

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

INFORME DE INVESTIGACIÓN SOBRE:

"Evaluación del efecto antibacteriano de los extractos de plantas medicinales del Ecuador"

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

Autora: Núñez Hernández Erika Tatiana

Tutor: Dr. Gudiño Gomezjurado, Marco Esteban

Ambato – Ecuador

Octubre 2019

APROBACIÓN DEL TUTOR

En calidad de Tutor del Proyecto de Investigación sobre el tema:

"EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES DEL ECUADOR" de Núñez Hernández Erika Tatiana estudiante de la Carrera de Laboratorio Clínico, considero que reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la evaluación del jurado examinador designado por el Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias de la Salud.

Ambato, octubre 2019

EL TUTOR

……

Dr. Gudiño Gomezjurado, Marco Esteban

AUTORÍA DEL TRABAJO DE GRADO

Los criterios emitidos en el Trabajo de Investigación "**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES DEL ECUADOR**", como también los contenidos, ideas, análisis, conclusiones son de exclusiva responsabilidad de mi persona, como autora de este trabajo de grado.

Ambato, octubre 2019

EL AUTOR

……

Núñez Hernández Erika Tatiana

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de esta tesis o parte de ella un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación. Cedo los derechos en línea patrimonial de mi tesis con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de esta tesis, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autora.

Ambato, octubre del 2019

LA AUTORA

……..

Núñez Hernández Erika Tatiana

APROBACIÓN DEL JURADO EXAMINADOR

Los miembros del Tribunal Examinador aprueban el Informe del Proyecto de Investigación, sobre el tema **"EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES DEL ECUADOR"** de Núñez Hernández Erika Tatiana estudiante de la Carrera de Laboratorio Clínico.

Ambato, octubre 2019

Para constancia firman

.....	.....	.....
PRESIDENTE/A	1er VOCAL	2do VOCAL

DEDICATORIA

Isabel Roció Hernández Hidalgo.

Luis Alfonso Núñez Abril.

Todos mis logros y triunfos son de ustedes.

AGRADECIMIENTO

Isabel Roció Hernández Hidalgo

Luis Alfonso Núñez Abril

Dr. Marco Gudiño

Dra. Elizabeth Proaño

Ing. Diana Gonzales

Lic. Pamela Bustos

Dr. Víctor Guangasig

Dr. Mario Vilcacundo

Agradecer a Dios y a las personas nombradas anteriormente porque sin ellos este proyecto de investigación no hubiera salido a flote, no me queda nada mas que decir un Dios le pague a todos las personas que estuvieron a mi lado en esta etapa de mi vida.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS Y PÁGINAS PRELIMINARES

APROBACIÓN DEL TUTOR ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE GRADO iii
DERECHOS DE AUTOR iv
APROBACIÓN DEL JURADO EXAMINADOR v
DEDICATORIA vi
AGRADECIMIENTO vii
ÍNDICE DE TABLAS x
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES xi
RESUMEN xiv
SUMARY xv
CAPÍTULO I 1
MARCO TEÓRICO 1
1.1. Antecedentes Investigativos 1
1.2 Objetivos 5
1.2.1 Objetivo General 5
CAPÍTULO II 6
METODOLOGÍA 6
2.1. Materiales 6
Material vegetal 6
Cepas bacterianas utilizadas 8
Equipos 8
2.2. Métodos 9
Preparación de los macerados 9
Obtención de extractos etanólicos 9
Selección de disolventes 11
Prueba de susceptibilidad antibacteriana 13
1. Prueba de susceptibilidad en medio sólido por la técnica de difusión con disco 13
2. Prueba de susceptibilidad en medio sólido por la técnica de difusión a partir de pocillos 14

3. Determinación de la actividad antibacteriana en caldo 15
CAPÍTULO III 20
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 20
3.1. Análisis de los resultados 20
3.2. Discusión de los resultados 26
3.3 Verificación de hipótesis. 28
3.3.1 Hipótesis nula. 28
3.3.2 Hipótesis alterna. 28
CAPÍTULO IV 29
CONCLUSIONES 29
4.1 Conclusiones 29
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA 30
ANEXOS 33
1. Anexo N°1 Resolución de probación del trabajo de titulacion **"Evaluación del efecto antibacteriano de los extractos de plantas medicinales del Ecuador"** por el Consejo Directivo mediante la Resolución CD-P-2019-1427 con fecha de aprobación 22 de abril del 2019 33
2. AnexoN°2 Permiso emitido por el Ministerio del Ambiente. **"AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA**" N°021-2019-IC-FLO-DNB/MA 34
3. ANEXO N°3 Certicado De Entrega Del Material Vegetal Al Herbario Misael Acosta Solis – Universidad Técnica De Ambato 38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1. Especies vegetales utilizadas para la evaluación del efecto antibacteriano y el lugar en el que las muestras fueron recolectadas. 6

Tabla N°2. Especificaciones para la preparación de los medios de cultivo. 11

Tabla N°3. Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de las cepas Escherichia coli ATCC 25922, Pseudomonas aeruginosa ATCC 10145, Listeria monocytogenes ATCC 19115 y Staphylococcus aureus ATCC 25923 con A_{600} de 0,1 en el medio Muller Hinton. 12

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura N° 1. Materia vegetal desecada a 40°C con 30% de ventilación. Uña de gato en proceso de desecación por 24 horas para su posterior maceración. 9

Figura N° 2. Destilación del extracto etanolico. Rotavapor (EYELA NVC, China) debe trabajara 40°C y a 61 hectopascales (hPa) durante 30 minutos, aproximadamente... 10

Figura N° 3. Liofilización del extracto etanolico. Liofilizador Virtis (SP Scientific) alcanza una presión optima de 206 mT y una temperatura de -40°C para su trabajo durante 24 horas a 48 horas. 10

Figura N° 4. Preparación de inoculo bacteriano. Inoculación del microrganismo en caldo BHI por 24 horas. 13

Figura N° 5. Técnica de difusión en disco. Discos impregnados con el extracto vegetal en medio sólido Muller Hinton Agar No.2 (HIMEDIA^{R}, India) 14

Figura N° 6 Técnica de difusión en pocillo. Pocillos hechos con un sacabocado desechables con un diámetro de 6mm para colocar el extracto vegetal en medio sólido Muller Hinton Agar No.2 (HIMEDIA^{R}, India). 15

Figura N° 7. Distribución de tratamientos para el ensayo de la actividad antibacteriana en caldo. Las columnas 1 y 2 representan los controles del diluyente y del extracto, respectivamente. Las columnas 3 y 4 son los controles de crecimiento de la bacteria y la columna 5 corresponde al tratamiento del microorganismo con el extracto de la especie vegetal 16

Figura N° 8. Esquema de las diluciones seriadas. A partir de los pocillos se realizaron diluciones seriadas base 10 hasta la 10^{-7} dilución que fue sembrada en el medio TSA. 17

Figura N° 9. Distribución de los tratamientos para la determinación de la actividad bactericida de los extractos. Las columnas 1 y 2 representan los controles del diluyente y del extracto, respectivamente. Las columnas 3 y 4 son los controles de crecimiento de la bacteria y las columnas 5-10 corresponden a los tratamientos del microorganismo con concentraciones decrecientes del extracto. Más detalles en el texto. 18

Figura N° 10. Cribado de la actividad antibacteriana de los extractos de materia vegetal mediante la técnica de difusión en caja Petri utilizando discos frente a E.coli ATCC 25922. Las barras representan el diámetro en mm de cada uno de los halos formados, los asteriscos señalan que existió diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,1$). 20

Figura N° 11. Cribado de la actividad antibacteriana de los extractos de materia vegetal mediante la técnica de difusión en caja Petri utilizando pocillos frente a E.coli ATCC 25922 Las barras representan el diámetro en mm de cada uno de los halos formados, el número de asteriscos señala la diferencia significativa frente al tratamiento control: 100 uL de DMSO 0,1% (v/v). Uno, dos o tres asteriscos representan que existió diferencia significativa, muy significativa o extremadamente significativa, respectivamente. 21

Figura N° 12. Actividad antibacteriana de los extractos de Croton lechleri (A) y de Eucalyptus globulus Labil (B) frente a P. aeruginosa ATCC 10145 mediante la técnica de difusión en caja Petri utilizando pocillos. Las barras representan el diámetro en mm de cada uno de los halos formados. 21

Figura N° 13. Actividad antibacteriana de los extractos de Croton lechleri, Eucalyptus globulus Labil y Rosmarinus officinalis frente a: L. monocyotogenes ATCC 19115 (A) y S. aureus ATCC 25923 (B). Las barras representan el diámetro en mm de cada uno de los halos formados, los asteriscos señalan que existió diferencia extremedamente significativa ($p < 0,001$) frente al tratamiento control. 22

Figura N° 14. Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos de C. lechleri (A) y de E. globulus Labil (B) frente a E. coli ATCC 25922. El asterisco indica diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,1$) en el número de $\log_{10}$ UFC/mL de los tratamientos frente al control. 23

Figura N° 15 Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos de C. lechleri (A) y de E. globulus Labil (B) frente a P. aeruginosa ATCC 10145. Las barras representan el número de $\log_{10}$ UFC/mL. 24

Figura N° 16. Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos de *C. lechleri* (A y C) y de *E. globulus Labil* (B y D) frente a *S. aureus* ATCC 25923 (A y B) y *L. monocytogenes* ATCC 19115 (C y D). Los asteriscos indican diferencia estadísticamente extremedamente significativa ($p < 0,001$) en el número de $\log_{10}$ UFC/mL de los tratamientos frente al control. 25

Figura N° 17. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de *C. lechleri* (A) y de *E. globulus Labil* (B) frente a *L. monocytogenes* ATCC 19115. Se señala la menor concentración a la que se reprime completamente el crecimiento de la bacteria. 26

Figura N° 18. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de C. lechleri (A) y de E. globulus Labil (B) frente y S. aureus ATCC 25923. Se señala la menor concentración a la que se reprime completamente el crecimiento de la bacteria 26

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

"Evaluación del efecto antibacteriano de los extractos de plantas medicinales del Ecuador"

Autora: Núñez Hernández, Erika Tatiana

Tutor: Dr. Gudiño Gomezjurado, Marco Esteban

Fecha: octubre del 2019

RESUMEN

En la última década, los datos a nivel mundial muestran el aumento continuo de la resistencia de los microorganismos a los antimicrobianos. Todo esto se debe al consumo, indebido de estas sustancias por seres humanos y en la utilización de los antibióticos durante las prácticas agrícolas y veterinarias. Tanto es así, que según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la situación es emergente a nivel sanitario, con el consecuente impacto socioeconómico. Por lo cual se han buscado nuevas alternativas y una de ellas son las especies vegetales. Ecuador al poseer una gran diversidad de flora, fauna y diversidad étnica, los pueblos aborígenes han utilizado las plantas para atenuar y curar dolencias. Frente a estos antecedentes, nos propusimos evaluar la actividad antimicrobiana de 11 especies vegetales frente a bacterias. De estas, *Croton lechleri* y *Eucalyptus globulus Labil* presentaron efectos antibacterianos en presencia de $\log_{10}$ 7.8 UFC de *S. aureus* ATCC 25923 y $\log_{10}$ 8.48 UFC de *L. monocytogenes* ATCC 19115 con una concentración bactericida mínima de 2.5 mg para *S. aureus* ATCC 25923 y de 5 mg para *L. monocytogenes* ATCC 19115 con *C. lechleri* y de 5 mg para *S. aureus* ATCC 25923 y de 0.625 para *L. monocytogenes* ATCC 19115 con *Eucalyptus globulus Labil*.

PALABRAS CLAVE: EFECTO ANTIBACTERIANO, PLANTAS MEDICINALES, ECUADOR, RESISTENCIA ANTIBACTERIANA, ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS), ANTIBIÓTICOS, CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA, CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA.

TECHNICAL UNIVERSITY OF AMBATO

FACULTY OF HEALTH SCIENCES

CLINICAL LABORATORY CAREER

"Evaluation of the antibacterial effect of extracts of medicinal plants of Ecuador"

Author: Núñez Hernández, Erika Tatiana

Tutor: Dr. Gudiño Gomezjurado, Marco Esteban

Date: October, 2019

SUMARY

In the last decade, worldwide data shows the continued increase in resistance of microorganisms to antimicrobials. All this is due to the abuse, abuse of these substances by humans and the use of antibiotics during agricultural and veterinary practices. So much so, that according to the World Health Organization (WHO) the situation is emerging at the health level, with the consequent socioeconomic impact. Therefore, new alternatives have been sought and one of them is the plant species. Ecuador, owning a great diversity of flora, fauna and ethnic diversity, Aboriginal peoples have used plants to mitigate and cure ailments. Against this background, we set out to evaluate the antimicrobial activity of 11 plant species against bacteria. Of these, *Croton lechleri* and *Eucalyptus globulus Labil* had antibacterial effects in the presence of log10 7.8 CFU of *S. aureus* ATCC 25923 and log10 8.48 CFU of *L. monocytogenes* ATCC 19115 with a minimum bactericidal concentration of 2.5 mg for *S. aureus* ATCC 25923 and 5 mg for *L. monocytogenes* ATCC 19115 with C. *lechleri* and 5 mg for *S. aureus* ATCC 25923 and 0.625 for *L. monocytogenes* ATCC 19115 with *Eucalyptus globulus Labil*.

KEY WORDS: ANTIBACTERIAL EFFECT, MEDICINAL PLANTS, ECUADOR, ANTIBACTERIAL RESISTANCE, WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), ANTIBIOTICS, MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION, MINIMUM BACTERICIDAL CONCENTRATION.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos

1.1.1 Resistencia bacteriana: breve descripción de la situación actual

En la última década, los datos a nivel mundial muestran el aumento continuo de la resistencia de los microorganismos a estos(1). A partir de 1940 con la era antibiótica y el descubrimiento de la penicilina por Sir Alexander Fleming y su posterior industrialización, los microorganismos han desarrollado resistencias progresivas y cada vez más frecuentes(2). Todo esto se debe al consumo, indebido de estas sustancias por seres humanos y en la utilización durante las prácticas agrícolas y veterinarias(3). Tanto es así, que según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la situación es emergente a nivel sanitario, con el consecuente impacto socioeconómico(4).

Los métodos que se utilizan para determinar si un microorganismo es resistente a un antibiótico se basan en la concentración mínima inhibitoria (CMI) que es la menor concentración de un antibiótico para inhibir el crecimiento de una cepa(5). De tal manera que al ser mayor al punto de corte establecido por las instituciones de estandarización ese microorganismo se considera como resistente a ese fármaco(5).

La situación de las resistencias a los antimicrobianos es alarmante ya que muchas de las cepas son resistentes a tres o más familias de antimicrobianos, lo que hace que las bacterias sean consideradas como multiresistentes(5). Los microorganismos pueden presentar resistencia innata o adquirida(5). La primera sucede cuando la bacteria contiene determinantes genéticos en su cromosoma que le confieren esa

característica(6). La resistencia adquirida consiste en la adquisición de esos genes a través de mecanismos de transferencia horizontal: (i) transformación, (ii) transducción y (iii) conjugación(5,7,8).

Los mecanismos a través de los cuales las bacterias expresan la resistencia a los antibióticos son variados: (i) mediante la producción de enzimas, como por ejemplo las betalactamasas que inactivan al anillo β-lactámico, (iii) mediante modificación del sitio activo, como sucede con las mutaciones de la proteína PBP2a de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA, del inglés *Methicillin Resistant Sataphylococcus aureus*), (iii) afectando el ingreso de las moléculas al citoplasma bacteriano, tal como sucede con las cepas portadoras del gen *tetA* que codifica una porina responsable por la expulsión de la tetraciclina desde el periplasma bacteriano y (iv) a través de la síntesis de moléculas diana falsas que impiden la unión del antibiótico a su blanco natural(7,8).

Ante esta situación, la OMS recomienda realizar mayor número de investigaciones encaminadas al desarrollo de nuevos fármacos y mejorar los ya existentes(2).

Kova,2016. Señala que resistencia a múltiples fármacos dando origen a infecciones difíciles de tratar o incluso intratables con antimicrobianos convencionales, el uso de antibióticos de amplio espectro es amplia y en su mayoría innecesaria, por los cual esto ha causado un elevado incremento en la resistencia emergente asociándose de igual manera con prácticas inadecuadas en el control de infecciones(9).

Bello, 2018. Al mantener actualizada información referente a la resistencia a los microorganismos esto ayuda en la investigación y al sistema de salud pública, *Staphylococcus* coagulasa positiva es la bacteria más común en el estudio de las lesiones de los niños provenientes de la ciudad de Las Tunas Cuba, evidenciando una alta resistencia antimicrobiana con 81,32% seguidamente de *Streptococcus pyogenes* 13,58%(10).

Friedman, 2016. La terapia antimicrobiana es uno de los desarrollos médicos más importantes del siglo XX, debido a la resistencia que se ha generados en la atención médica y en la comunidad está en riesgo todo el avance de terapias con antibióticos. Las infecciones con bacterias multirresistentes producen resultados adversos no solo clínicos sino económicos debido al fracaso o retraso en los tratamientos generando

impactos negativos que pueden medirse a nivel del paciente aumentando la morbilidad y mortalidad llegando a ser un problema de nivel mundial (11).

Rather, 2017. Explora la crisis actual a la resistencia de antibióticos y así descubrir los desafíos que generan la automedicación en los seres humanos, el uso negligente de antibióticos provoca que el cuerpo se vuelva más vulnerable a enfermedades esto causa que el tratamiento se convierta difícil ya que los patógenos evolucionan y desarrollan inmunidad a los antibióticos que se administra con frecuencia, la resistencia bacteriana altamente peligrosa que se ha convertido en un problema mundial debido que presenta dilemas terapéuticos a los médicos de todo el mundo(12).

Por lo que esta investigación hace referencia a la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas basadas en medicina natural.

1.1.2 Las especies vegetales como alternativa terapéutica antimicrobiana

Varios estudios han demostrado la actividad de las especies vegetales como posibles alternativas fitoterápicas como coadyuvantes para el tratamiento de diferentes patologías. Por ejemplo, Corzo. 2012 los extractos de *Cestrum buxifolium Kunth* se ha visto que son eficaces para *E. coli*, *P. auroginosa*, *S.aureus* (13). Pimentel, 2015 mostrado que los extractos de *Origanum vulgare* (orégano), *Tagetes elliptica (*chincho) y del *Tagetes minuta* (huacatay) comparado con Clorhexidina al 0.12% y Colgate Plax(pasta de dientes) frente a cepas de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 que genero una actividad antibacteriana(14). Esto puede suceder a los componentes químicos que poseen las plantas en su metabolismos convirtiéndolas en una bomba de principios activos, por tal motivos cada población con este conocimiento ancestral a desarrollando una forma de atenuar y curar dolencias a partir de plantas medicinas(15).

El Ecuador al poseer una gran diversidad en flora, fauna y etnias en el *Catálogo de Plantas Vasculares del Ecuador* se describen 5172 especies con diferentes utilidades incluyendo: a las plantas medicinales (60%), a las especies utilizadas en la construcción (55%), a las especies comestibles (30%) y a aquellas que se utilizan en la ornamentación (20%)(16).

1.1.3 Efecto antibacteriano de las especies de plantas medicinales

Franco,2013 indica que al evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de extracto de *Physalis peruviana L.* y *Caesalpinia pulcherrima (L.) Swartz* frete a cepas bacterias ATCC de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 *y Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 se obtuvo como resultado la concentración mínima inhibitoria CMI y la concentración mínima bactericida CMB, encontró una CMI de 0,256mg/mL a 1,024 y de igual manera en CMB de menor o igual a 1,024 para todas las cepas frente a los extractos(17).

Ramirez,2013 evaluó la actividad antibacteriana de seis plantas *Potentilla candicans, Borago officinalis, Gnaphalium viravira, Caesalpinia spinosa, Taraxacum officinalis y Helichrysum italicum* frente a *Staphylococcus aureus ATCC 43300, Enterococcus faecalis ATCC 51299, Escherichia coli ATCC 35218,Acinetobacter baumannii ATCC 19606, Klebsiella pneumoniae ATCC 700603 y Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853,* De los doce extractos derivados de las seis plantas analizadas, solo una planta mostraron efecto inhibitorio *Helichrysum italicum* para las bacterias grampositivas evaluadas (S. aureus ATCC 43300 y E. faecalis ATCC51299)(18).

Ramirez.2015, señala la actividad antibacteriana de extractos de plantas provenientes de Soraca-Colombia frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 resistente a meticilina para esta experimentación se tomó los ejemplares de Caléndula (hojas y flores), Hinojo (hojas), Malva (hojas), Llantén (hojas), Sauco (hojas), Haba (hojas) e Hierba mora (frutos) obteniendo resultados de concentración mínima inhibitoria (CMI) para *C. officinalis, P. australis Lam, S. nigra L.P y S.americanum I Mill* con una concentración de 10, 5, 2.5, 1.25 mg/mL frente el microorganismo(19).

Azuero.2016, analizo el efecto antibacteriano de doce especies vegetales como *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* (borra- ja), *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) que se tomaron al azar de Machala y Santa Rosa Ecuador para lo cual se

realizó extractos metanólicos, para enfrentándolos contra bacterias Gram positivas (*S. aureus*) como negativas (*E. coli* y *P. auroginosa*) y una cepa de hongo(*C. albicans*). *Taraxacum officinale Weber* y *Piper carpunya Ruiz* & *Pav* presentaron un efecto antibacteriano alto contra *E. coli*; sin embargo, *S. aureus* no presentó sensibilidad frente los extractos de *Lippia citriodora K* y *Piper carpunya Ruiz* & *Pav.* El bioensayo de actividad antifúngica realizado a los extractos de las especies estudiadas contra *C. albicans*, mostró que todos tienen acción fungicida alta, a excepción de *Taraxacum officinale Weber* con un menor efecto inhibitorio del crecimiento fúngico(20).

El Ecuador al disponer de una amplia variedad de especies vegetales. Entre estas, la tradición popular les ha atribuido propiedades medicinales que pueden variar dependiendo de la ubicación geográfica y de las condiciones climáticas(16). En el presente estudio nos propusimos evaluar la actividad antibacteriana de: chuchugaza (*Maytenus laevi*s), eucalipto (*Eucalyptus globulus Labil*), guayaba (*Psidium guajava*), guayusa (Ilex *guayusa*), ortiga (*Urtica dioica*), paico (*Dysphania ambrosioides*), romero (*Rosmarinus officinalis*), sangre de drago (*Croton lechleri*), teatina (*Theatīnus*), tilo (*Tila cordata*) y toronjil (*Melissa officinalis*).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

- Evaluar el efecto antibacteriano de los extractos de plantas medicinales del Ecuador.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Determinar el efecto antibacteriano de los extractos de las plantas medicinales del Ecuador frente a diferentes cepas bacterianas.
- Identificar, de ser posible, la CMI de los extractos de las plantas medicinales del Ecuador frente a una cepa bacteriana pura en medios líquidos.
- Establecer el efecto bactericida o bacteriostático de los extractos de las plantas medicinales sobre diferentes cepas bacterianas.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Materiales

Material vegetal

Las especies vegetales seleccionadas para este trabajo se describen en la Tabla N°1. Se seleccionó el material vegetal que cumpla las siguientes características organolépticas:

- Olor: que no se denote humedad.
- Color: que mantenga el color original de la especie vegetal.
- Textura: mantenga su integridad sin signos de deterioro.

Tabla N°1. Especies vegetales utilizadas para la evaluación del efecto antibacteriano y el lugar en el que las muestras fueron recolectadas.

Nombre común	Nombre científico	Lugar de recolección
Teatina	*Theatīnus*	Pastaza, Puyo, Veracruz X=1.535531 Y= -77.915239
Guayusa	Ilex *guayusa*	Pastaza, Puyo, Veracruz X=1.535531 Y= -77.915239
Paico	*Dysphania ambrosioides*	Tungurahua, Quero, Rumipamba X= 768.412 Y=9´842.456

Guayaba	*Psidium guajava*	Pastaza, Puyo, Veracruz X=1.535531 Y= -77.915239
Sangre de drago	*Croton lechleri*	Pastaza, Puyo, Veracruz X=1.535531 Y= -77.915239
Chuchuguasa	*Maytenus laevi*s	Pastaza, Puyo, Veracruz X=1.535531 Y= -77.915239
Eucalipto	*Eucalyptus globulus Labil*	Tungurahua, Quero, Rumipamba X= 768.412 Y=9´842.456
Romero	*Rosmarinus officinalis*	Tungurahua, Quero, Rumipamba X= 768.412 Y=9´842.456
Ortiga	*Urtica dioica*	Tungurahua, Quero, Rumipamba X= 768.412 Y=9´842.456
Toronjil	*Melissa officinalis*	Tungurahua, Quero, Rumipamba X= 768.412 Y=9´842.456
Tilo	*Tila cordata*	Tungurahua, Quero, Rumipamba X= 768.412 Y=9´842.456

Cepas bacterianas utilizadas

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio fueron: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Equipos

Los equipos utilizados en la investigación se encuentran en los laboratorios de Investigación de la Facultad de Ciencia, Ingeniería en Alimentos y Biotecnología y en la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Técnica de Ambato:

- Rotavapor (EYELA NVC),
- Balanza analítica (METTLER TOLEDO),
- pH- metro (OAKTOM^{R}),
- Estufa (POL-EKO APARATURA),
- Cabina de PCR (BIOSAFETY CABINET VERTICAL LAMINAR FLOW HOOD),
- Vortex (MIXER LABNET INTERNATIONAL, INC),
- Liofilizador Virtis (SP Scientific),
- Refrigerador 2°C-4°C
- Ultracongelador -80°C.

Reactivos

Los reactivos utilizados en la investigación fueron:

- Agua destilada
- Brain Heart Infusion (BBL^{TM})
- Soyabean Casein Digest Agar (Trytone Soya Agar)
- Muller Hinton Agar No.2, (HIMEDIA^{R}, India)
- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- Aceite mineral.

2.2. Métodos

Preparación de los macerados

Los tallos y hojas que cumplieron con las características organolépticas se recolectaron y almacenaron a temperatura ambiente hasta el momento del análisis. Antes de la maceración, el material vegetal se lavó con agua destilada hasta eliminar todo contaminante presente en la superficie. Posteriormente, las muestras se desecaron a 40°C con 30% de ventilación durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo, la materia vegetal seca se trituró, pesó y se maceró en etanol absoluto entre 7 a 15 días en frascos ámbar en una proporción 1:15 (material vegetal: etanol).



Figura N° 1. Materia vegetal desecada a 40°C con 30% de ventilación. Uña de gato en proceso de desecación por 24 horas para su posterior maceración.

Obtención de extractos etanólicos

Transcurrido el tiempo de la maceración, el etanol se filtró a través de papel filtro Whatman N°1. El material vegetal retenido se destiló en un rotavapor (EYELA NVC, China) a 40°C y a 61 hectopascales (hPa) durante 30 minutos, aproximadamente. Una vez eliminado el etanol, se recolectó el tejido vegetal, se determinó su volumen y se conservó a -80°C hasta ser liofilizado.



Figura N° 2. Destilación del extracto etanolico. Rotavapor (EYELA NVC, China) debe trabajara 40°C y a 61 hectopascales (hPa) durante 30 minutos, aproximadamente.

Liofilización

En proceso de liofilización el extracto etanólico previamente obtenido debe estar congelado a -80°C el equipo Liofilizador Virtis (SP Scientific) alcanzó una presión optima de 206 mT y una temperatura de -40°C para que trabaje durante 24 horas a 48 horas eliminando las sustancias volátiles como agua etanol.

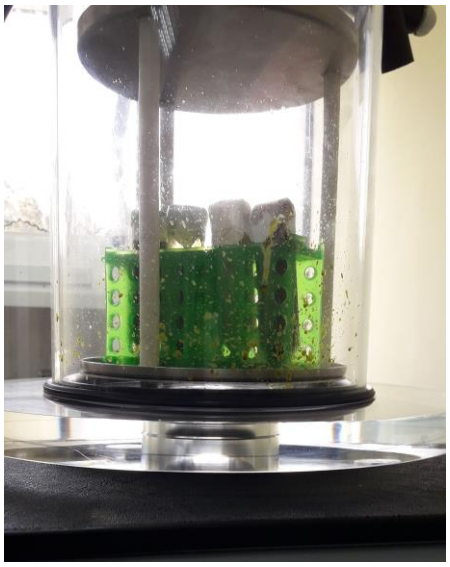


Figura N° 3. **Liofilización del extracto etanolico.** Liofilizador Virtis (SP Scientific) alcanza una presión optima de 206 mT y una temperatura de -40°C para su trabajo durante 24 horas a 48 horas.

Selección de disolventes

Como disolventes de los extractos liofilizados se utilizaron Dimetilsulfoxido (0,1% v/v) (DMSO) y aceite mineral estéril al 100%.

Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados en este estudio fueron: Muller Hinton Agar No.2 (HIMEDIA^{R}, India), *Tryptone Soy Agar* (TSB) (HIMEDIA,India) y *Brain Heart Infusion* (BHI) (BBL^{TM}, France). Para la preparación de los medios se siguieron las especificaciones de casas comerciales (tabla N°2).

Tabla N°2. Especificaciones para la preparación de los medios de cultivo.

Medios de cultivo	Especificaciones de preparación
Muller Hinton Agar No.2 (HIMEDIA^{R}, India)	Suspend 38.0g in1000mL distilled water. Sterilize by autoclaving al 15 lbs pressure (121°C) fot 15 minutes.
Brain Heart Infusion (BHI) (BBL^{TM}, France)	Suspend 37g in1000mL distilled water. Sterilize by autoclaving al 15 lbs pressure (121°C) fot 15 minutes.
Tryptone Soy Agar (TSB) (HIMEDIA,India)	Suspend 37g in1000mL distilled water. Sterilizeby autoclaving al 15 lbs pressure (121°C) fot 15 minutes.

Preparación del inóculo bacteriano

Una vez desinfectada el área de trabajo, se sembraron las cepas en el medio de cultivo TSA y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación y haber verificado la pureza del cultivo, se inoculó una asada del crecimiento en 5 mL de caldo BHI y se incubó a 37°C por 24 horas. El producto de esta incubación se inoculó en 250 mL de BHI y se incubó conforme se mencionó anteriormente. A partir del este último crecimiento se inoculó en 200 mL de BHI, el volumen necesario para

alcanzar la A_{600} de 0,1 (Tabla N°3) Para realizar el recuento de las $UFC \cdot mL^{-1}$ (Unidades Formadoras de Colonias en un mililitro)se realizaron diluciones seriadas base 10 en agua destilada estéril a partir del inóculo A_{600} = 0,1. Cien microlitros de las diluciones 10^{-4} a 10^{-7} se inocularon en TSA y se estrió utilizando un asa de Digralsky. Posteriormente, se incubó a 37 °C durante24h antes de realizar el recuento de UFC´s (Tabla N°3).

Tabla N°3. Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de las cepas Escherichia coli ATCC 25922, Pseudomonas aeruginosa ATCC 10145, Listeria monocytogenes ATCC 19115 y Staphylococcus aureus ATCC 25923 con A_{600} de 0,1 en el medio Muller Hinton.

Cepa	**UFC**	**$\log_{10}$UFC**$\cdot mL^{-1}$	**$\log_{10}$UFC**$\cdot 0,1\ mL^{-1}$
Escherichia coli ATCC 25922	$3x10^9$ UFC$\cdot mL^{-1}$	$\log_{10}$9.48UFC$\cdot mL^{-1}$	$\log_{10}$8.48UFC
Pseudomonas aeruginosa ATCC 10145	3×10^9 UFC$\cdot mL^{-1}$	$\log_{10}$9.48UFC$\cdot mL^{-1}$	$\log_{10}$8.48UFC
Listeria monocytogenes ATCC 19115	$3x10^9$ UFC$\cdot mL^{-1}$	$\log_{10}$9.48UFC$\cdot mL^{-1}$	$\log_{10}$8.48UFC
Staphylococcus aureus ATCC 25923	6.4×10^7 UFC$\cdot mL^{-1}$	$\log_{10}$8.80UFC$\cdot mL^{-1}$	$\log_{10}$7.80uFC



Figura N° 4. Preparación de inoculo bacteriano. Inoculación del microrganismo en caldo BHI por 24 horas.

Prueba de susceptibilidad antibacteriana

Con el propósito de determinar el efecto antibacteriano de los extractos de las plantas medicinales, se realizaron los siguientes ensayos.

1. **Prueba de susceptibilidad en medio sólido por la técnica de difusión con disco**

Discos estériles de papel filtro Whatman N°42 de 6 mm se impregnaron con 1 mg de cada extracto (Tabla N°1.) disuelto en DMSO 0,1% (v/v). Para esto tomamos 10 µL del extracto y se depositó en los discos que se dejaron en reposo, en la campana, durante una hora, a temperatura ambiente hasta que el disolvente se evapore. Transcurrido este tiempo, los discos se depositaron sobre un inóculo bacteriano de *Escherichia coli* ATCC 25922 y se incubó a 37°C durante24h antes de medir el diámetro de los halos de inhibición. En cada caja Petri se colocó un disco con 10 µL del disolvente como control. (Figura N°5)



Figura N° 5. Técnica de difusión en disco. Discos impregnados con el extracto vegetal en medio sólido Muller Hinton Agar No.2 (HIMEDIA^{R}, India)

2. Prueba de susceptibilidad en medio sólido por la técnica de difusión a partir de pocillos

Se procedió de manera semejante al apartado anterior. Brevemente, sobre el césped bacteriano equivalente a A_{600}= 0,1 de cada una de las cepas, en el caso de *Escherichia coli* ATCC 25922 se realizó perforaciones de 6 mm de diámetro con un sacabocados desechable, estéril. En cada uno de los pocillos formados se colocó 10 mg de los extractos de las especies vegetales (Tabla N°1) para las demás cepas bacterianas (Tabla N°3) solo se confronto con los extractos de *Croton lechleri*, *Eucalyptus globulus Labil* y *Rosmarinus officinalis* En cada caja Petri se colocaron 100µL del disolvente como control. Después de incubar a 37°C por 24 horas se midieron los diámetros de los halos de inhibición.

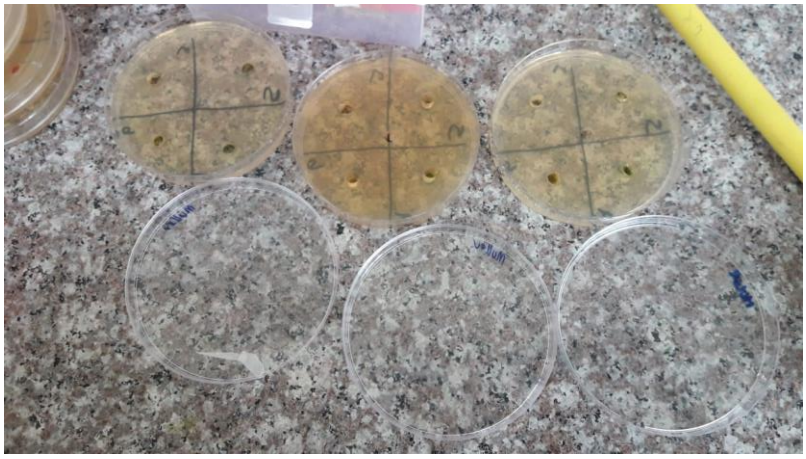


Figura N° 6 **Técnica de difusión en pocillo.** Pocillos hechos con un sacabocado desechables con un diámetro de 6mm para colocar el extracto vegetal en medio sólido Muller Hinton Agar No.2 (HIMEDIA^{R}, India).

3. Determinación de la actividad antibacteriana en caldo

Con el propósito de determinar la actividad antimicrobiana de los extractos confrontamos una densidad bacteriana conocida de las cepas de *E. coli* ATCC 25922 *S. aureus* ATCC2 5923, *L. monocytogenes* ATCC 19115 y *P. auroginosa* ATCC 10145 (Tabla N°3) con 10 mg de los extractos de *Croton lechleri, Eucalyptus globulus Labil* en placas de 96 pocillos. Tal como se detalla en la Figura N°7.

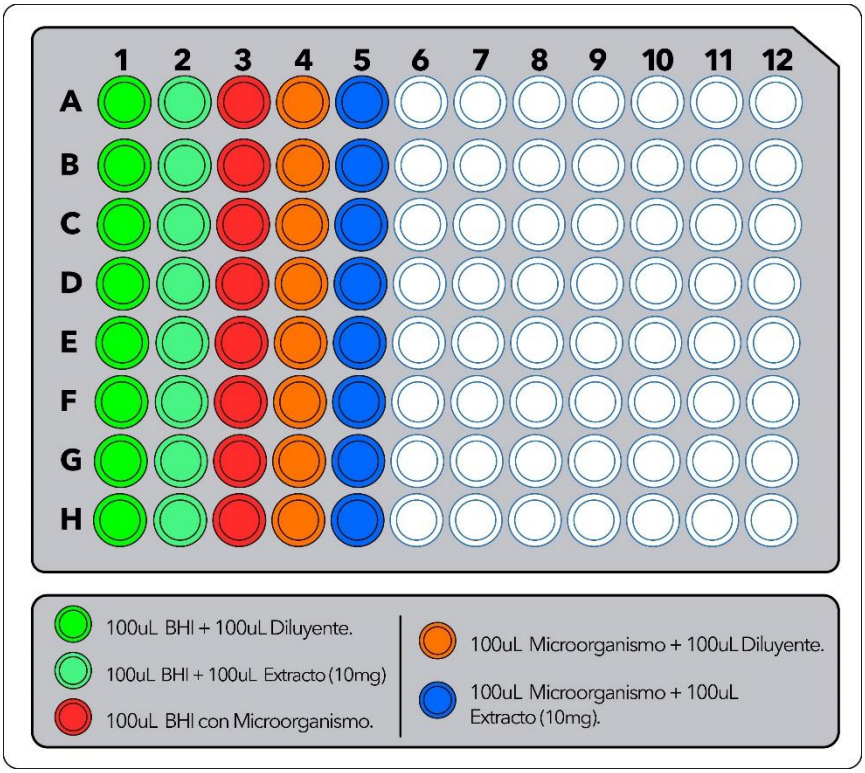


Figura N° 7. Distribución de tratamientos para el ensayo de la actividad antibacteriana en caldo. Las columnas 1 y 2 representan los controles del diluyente y del extracto, respectivamente. Las columnas 3 y 4 son los controles de crecimiento de la bacteria y la columna 5 corresponde al tratamiento del microorganismo con el extracto de la especie vegetal.

Una vez inoculadas, las placas se llevaron a incubar a 37°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se sembraron tres repeticiones de cada tratamiento previamente diluido hasta el factor 10^{-7} en cajas Petri con TSA con el propósito de realizar los recuentos de las UFC (Figura N°8). Cada ensayo se realizó con tres réplicas técnicas y de tres réplicas biológicas.

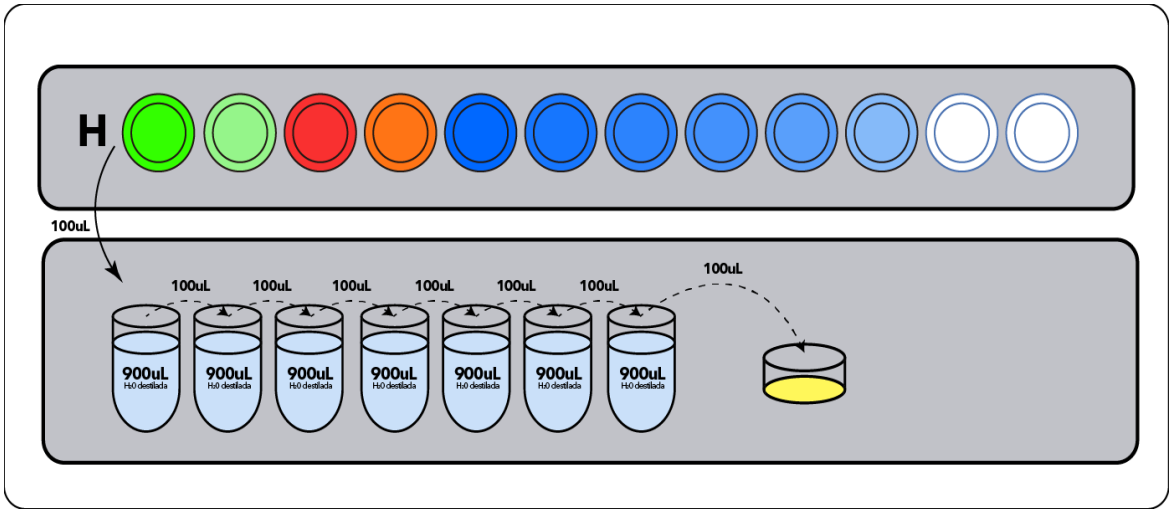


Figura N° 8. Esquema de las diluciones seriadas. A partir de los pocillos se realizaron diluciones seriadas base 10 hasta la 10^{-7} dilución que fue sembrada en el medio TSA.

4. Determinación de la actividad bactericida en caldo

Con el propósito de determinar la actividad bactericida de los extractos de *Croton lechleri*, *Eucalyptus globulus Labil* inoculamos la densidad bacteriana equivalente a la A_{600} de 0,1 de los microorganismos *S. aureus* ATCC2 5923 y *L. monocytogenes* ATCC 19115(Tabla N°3) en presencia de las siguientes concentraciones siguientes concentraciones de cada uno de los extractos: 20 mg,10 mg, 5 mg, 2,5 mg, 1,25 mg y 0,625 mg tal como se muestra en la Figura N°9.

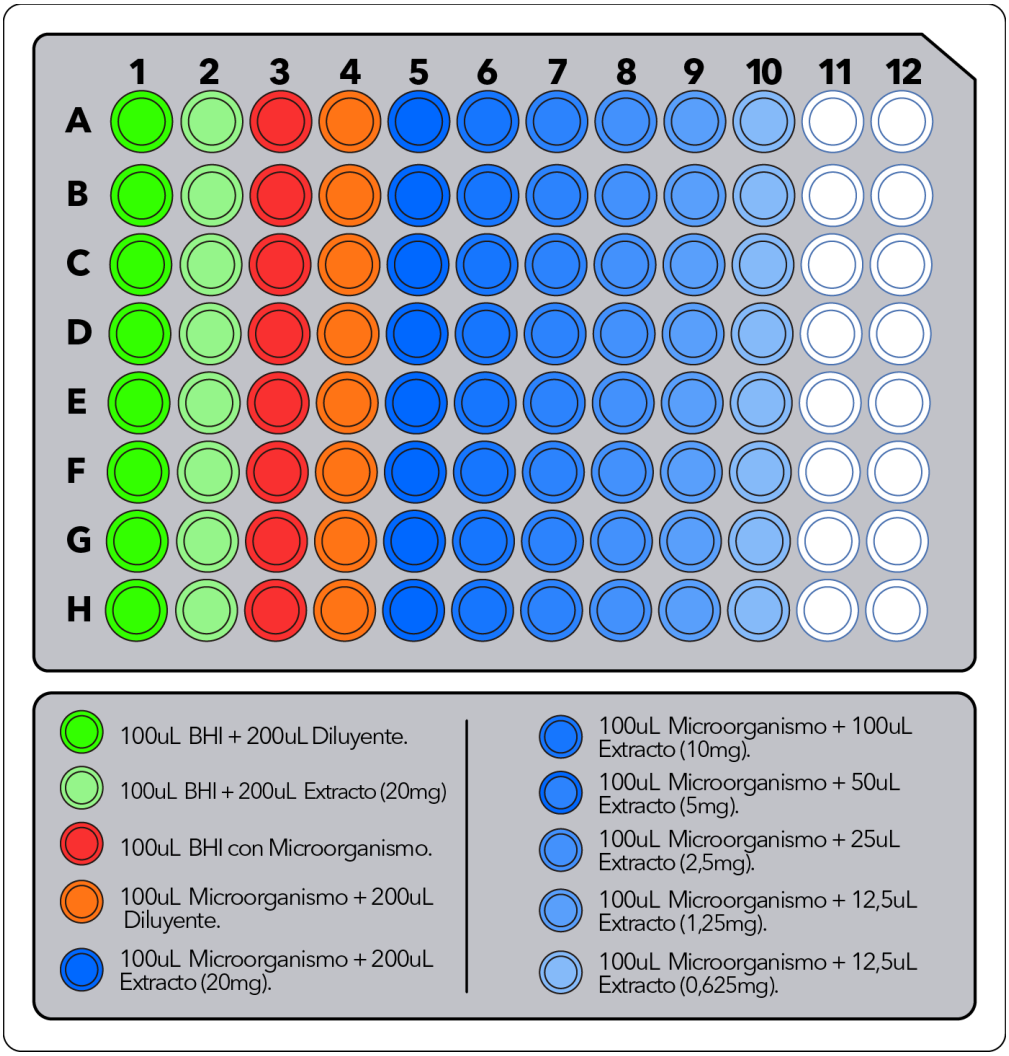


Figura N° 9. Distribución de los tratamientos para la determinación de la actividad bactericida de los extractos. Las columnas 1 y 2 representan los controles del diluyente y del extracto, respectivamente. Las columnas 3 y 4 son los controles de crecimiento de la bacteria y las columnas 5-10 corresponden a los tratamientos del microorganismo con concentraciones decrecientes del extracto. Más detalles en el texto.

Una vez inoculadas, las placas se llevaron a incubar a 37°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se sembraron tres repeticiones de cada tratamiento previamente diluido hasta el factor 10^{-7} en cajas Petri con TSA con el propósito de realizar los recuentos de las UFC (Figura N°8). Cada ensayo se realizó con tres réplicas técnicas y tres réplicas biológicas.

Análisis de los resultados

Para el análisis estadístico se utilizó el software Graphpad Prism. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Mediante tres réplicas técnicas durante cada ensayo y tres réplicas biológicas efectuadas a diferentes momentos. Para los cuales se utilizó la Prueba *T the student* para el análisis de los halos de inhibición y la Prueba *Anova* para el análisis de la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida y de igual manera se utilizó la prueba de *Tukey* al 95 % de confianza.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1.Análisis de los resultados

Con el propósito de evaluar el efecto antibacteriano de los extractos vegetales realizamos dos ensayos preliminares. En primer lugar, evaluamos si 1 mg de los diferentes extractos, impregnados en discos de papel filtro inhiben o no el crecimiento de *E. coli* ATCC 25922. Bajo estas condiciones no evidenciamos diferencia estadísticamente significativa frente al tratamiento control:10 uL de DMSO al 0.1% (p <0,1) (Figura N°10).

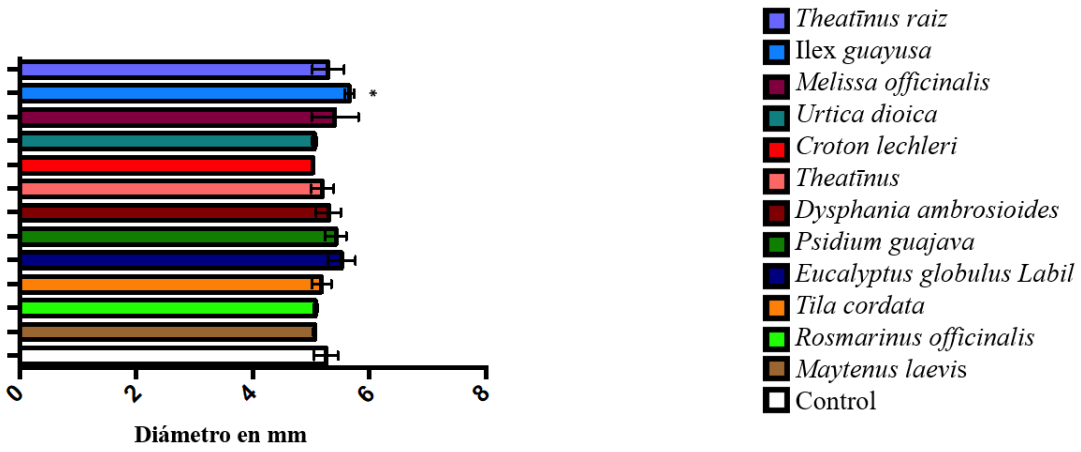


Figura N° 10. **Cribado de la actividad antibacteriana de los extractos de materia vegetal mediante la técnica de difusión en caja Petri utilizando discos frente a E.coli ATCC 25922**. Las barras representan el diámetro en mm de cada uno de los halos formados, los asteriscos señalan que existió diferencia estadísticamente significativa (p < 0,1).

Como en la experimentación anterior no se evidenció un efecto inhibitorio, decidimos modificar la técnica de difusión en caja Petri mediante el empleo de pocillos en los cuales se colocaron 10 mg de cada uno de los extractos. Con estas condiciones experimentales se observó que los extractos de: *Croton lecheri* y de *Eucalyptus*

globulus Labil inhiben de manera significativa ($p < 0,001$) el crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 (Figura N°11).

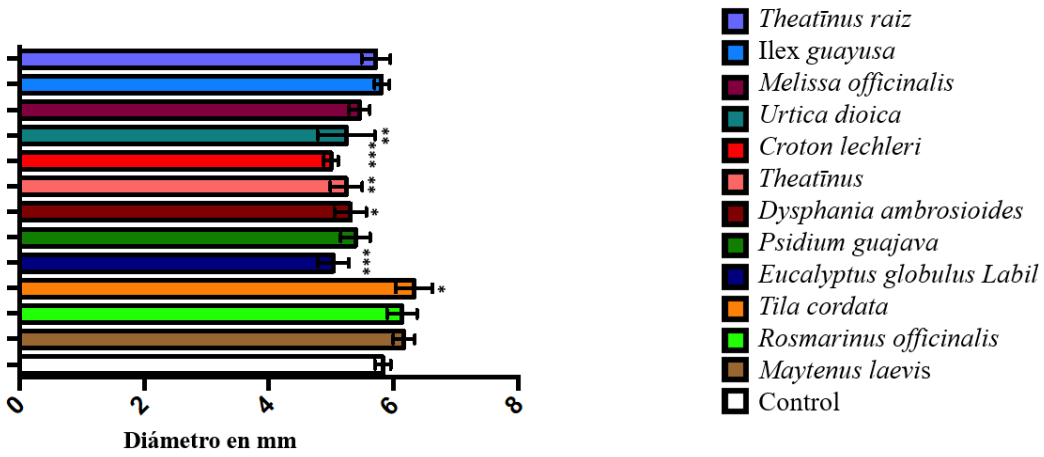


Figura N° 11. Cribado de la actividad antibacteriana de los extractos de materia vegetal mediante la técnica de difusión en caja Petri utilizando pocillos frente a E.coli ATCC 25922 Las barras representan el diámetro en mm de cada uno de los halos formados, el número de asteriscos señala la diferencia significativa frente al tratamiento control: 100 uL de DMSO 0,1% (v/v). Uno, dos o tres asteriscos representan que existió diferencia significativa, muy significativa o extremadamente significativa, respectivamente.

Después del cribado con todas las especies vegetales confrontadas con *E.coli* ATCC 25922, se tomó en cuenta a *Croton lecheri* y *Eucalyptus gloobulus Labil* nos planteamos evaluar si ese efecto se replica en otro bacilo Gram negativo. Para ello utilizamos la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. Sin que las dos especies vegetales evaluadas inhiban el crecimiento de este microorganismo (Figura 12).

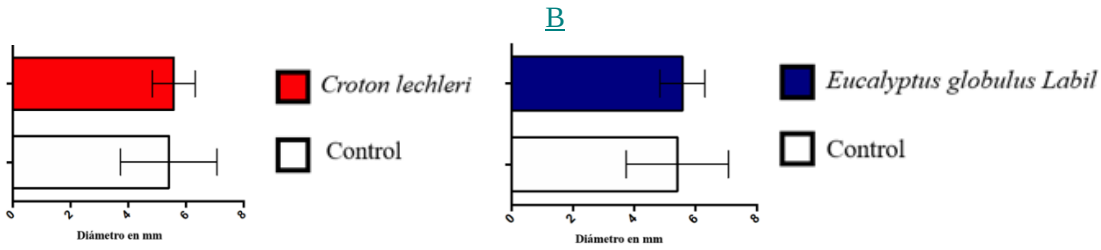


Figura N° 12. Actividad antibacteriana de los extractos de Croton lechleri (A) y de Eucalyptus globulus Labil (B) frente a P. aeruginosa ATCC 10145 mediante la técnica de difusión en caja Petri utilizando pocillos. Las barras representan el diámetro en mm de cada uno de los halos formados**.**

Ante estos resultados decidimos determinar si los extractos vegetales poseen actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas. Para ello, confrontamos 10 mg de los extractos de: *C. lechleri, E. globulus* L. *y Rosmarinus officialis* frente a 8.48 log_{10}UFC de *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 y 7.80 log_{10}UFC de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. El crecimiento de *L. monoytogenes* fue inhibido de manera estadísticamente significativa ($p < 0,001$) con los dos extractos de *C. lechleri* y de *E. globulus* L, mientras que el crecimiento de *S. aureus* ATCC 25923 fue reprimido significativamente con los tres extractos evaluados (Figura 13).

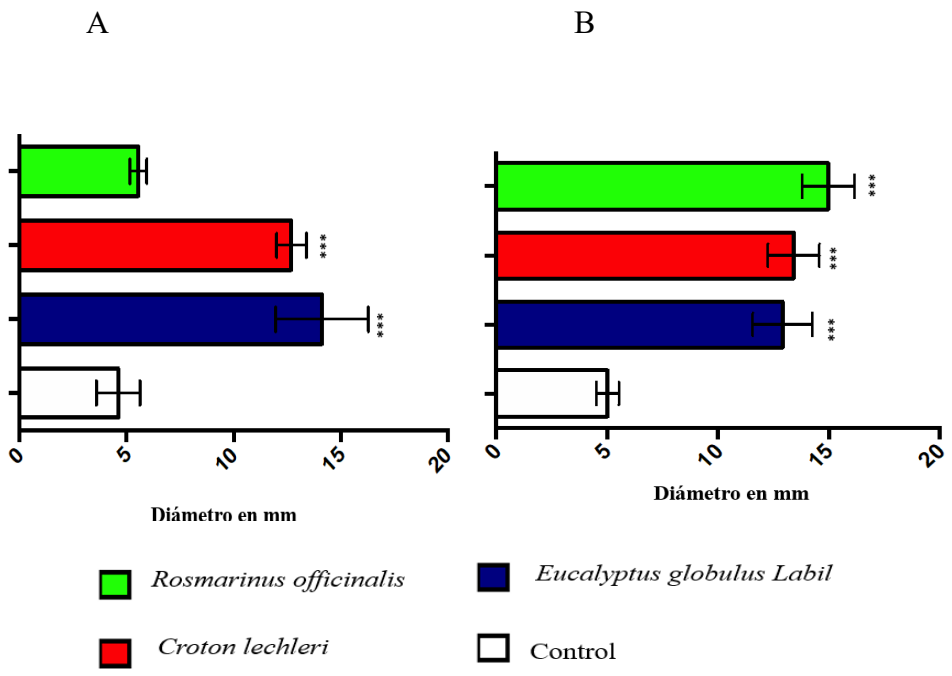


Figura N° 13. Actividad antibacteriana de los extractos de Croton lechleri, Eucalyptus globulus Labil y Rosmarinus officinalis frente a: L. monocyotogenes ATCC 19115 (A) y S. aureus ATCC 25923 (B). Las barras representan el diámetro en mm de cada uno de los halos formados, los asteriscos señalan que existió diferencia extremedamente significativa ($p < 0,001$) frente al tratamiento control.

Para confirmar la actividad antibacteriana de los extractos de *C. lecheri* y de *E. globulus Labil* inoculamos 8.48 log_{10} UFC de *E. coli* ATCC 25922 con 10 mg de cada uno de los extractos. Inmediatamente, se efectuó los recuentos de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC´s) en los tratamientos y en los controles. Mediante este

experimento, bajo las condiciones estudiadas, el extracto de *C. lechleri* produjo la disminución significativa ($p < 0,1$) del número de UFC´s respecto al control, lo que no sucedió con *E. globulus Labil* (Figura 14).

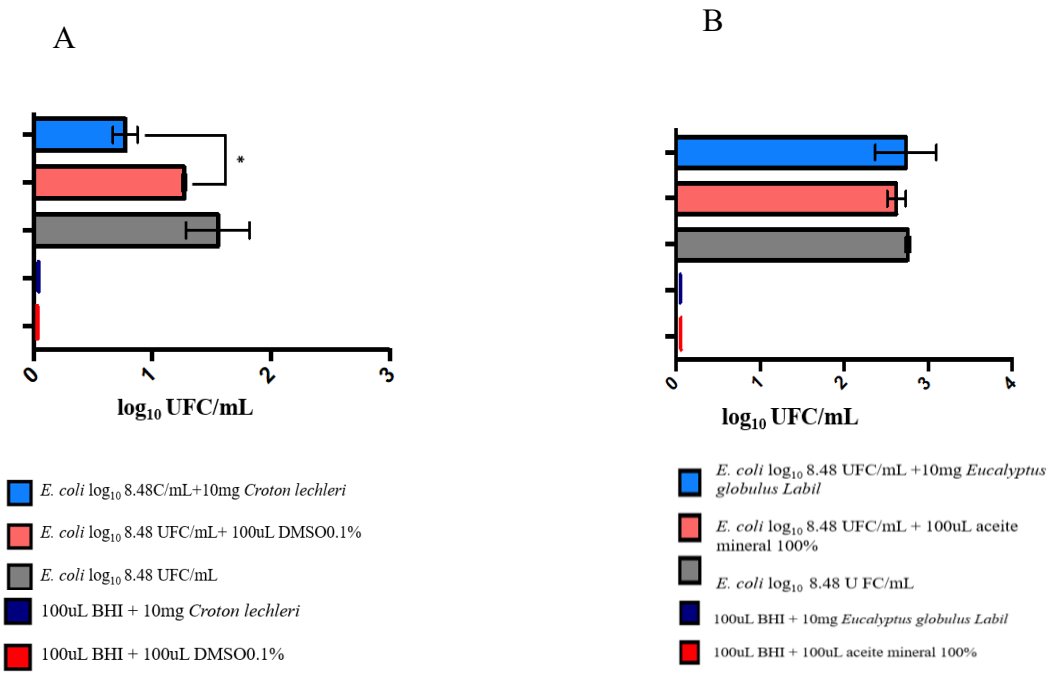


Figura N° 14. **Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos de C. lechleri (A) y de E. globulus Labil (B) frente a E. coli ATCC 25922**. El asterisco indica diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,1$) en el número de $\log_{10}$ UFC/mL de los tratamientos frente al control.

Al observar que los extractos de *C. lechleri* y de *E. globulus Labil* presentan un comportamiento inhibitorio variable sobre una misma cepa, decidimos evaluar si estas especies vegetales presentan actividad frente a 8.48 $\log_{10}$ UFC de *P. aeruginosa* ATCC 10145 sin que hayamos observado diferencias significativas entre los tratamientos y el control (Figura 15).

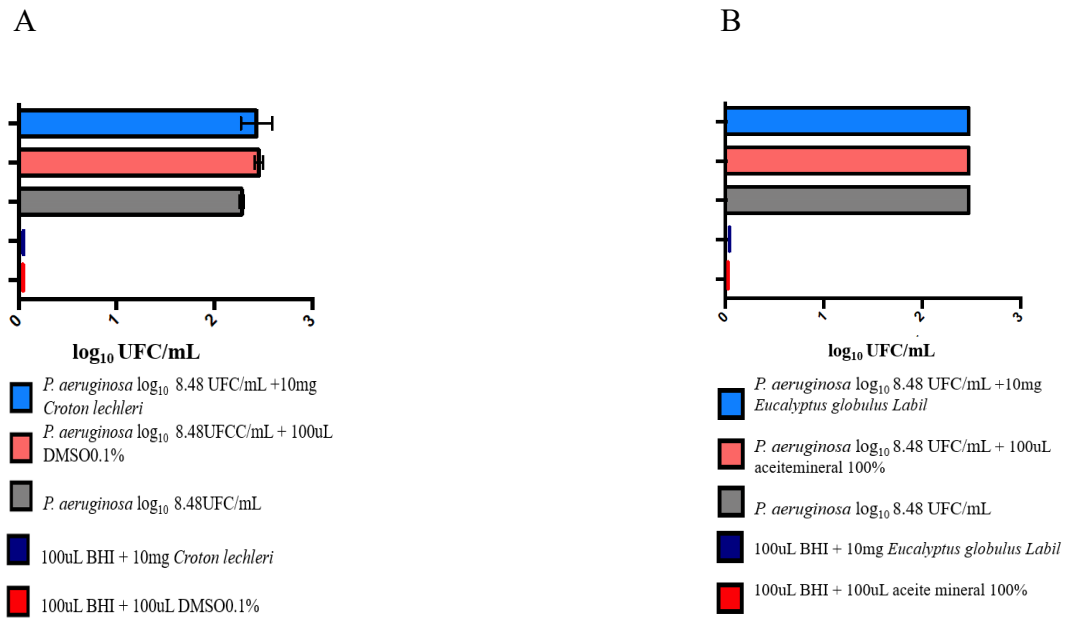


Figura N° 15 Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos de C. lechleri (A) y de E. globulus Labil (B) frente a P. aeruginosa ATCC 10145. Las barras representan el número de $\log_{10}$ UFC/mL.

Una vez evidenciado que los extractos de *C. lechleri* y de *E. globulus Labil* inhiben el crecimiento de las bacterias Gram positivas *S. aureus* ATCC 25923 y *L. monocytogenes* ATCC 19115 cuantificamos la tasa de inhibición mediante los recuentos de los tratamientos con los extractos frente al control. Ante estas condiciones, el número de UFC´s disminuyó de manera extremadamente significativa ($p < 0,001$), en un 100% en los tratamientos con los extractos en relación al control (Figura 16).

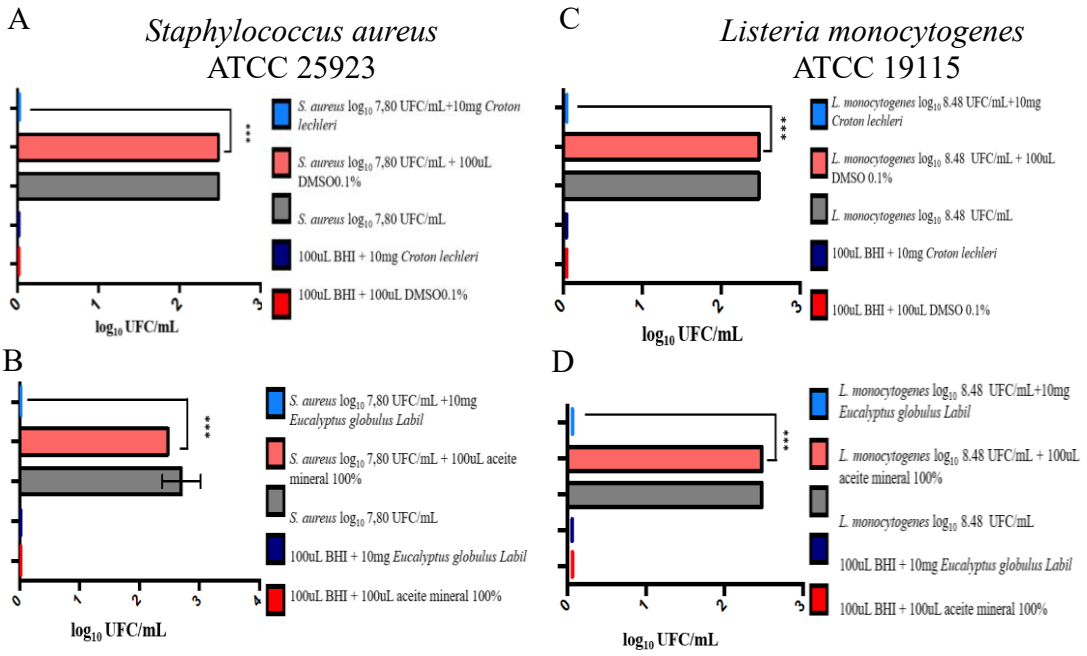


Figura N° 16. **Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos de *C. lechleri* (A y C) y de *E. globulus Labil* (B y D) frente a *S. aureus* ATCC 25923 (A y B) y *L. monocytogenes* ATCC 19115 (C y D)**. Los asteriscos indican diferencia estadísticamente extremedamente significativa ($p < 0,001$) en el número de $\log_{10}$ UFC/mL de los tratamientos frente al control.

Al haber observado el efecto inhibitorio de los extractos de *C. lechleri* y de *E. globulus Labilis* frente a *L. monocytogenes* ATCC 19115 y S. *aureus* ATCC 25923 determinamos la concentración bactericida mínima (CBM) de estas especies vegetales frente a las dos bacterias Gram positivas. Las CBM fue de 5 mg *C. lechleri* y de 0,625 mg *E. globulus Labilis* para *L. monocytogenes* ATCC 19115, respectivamente (Figura 17).

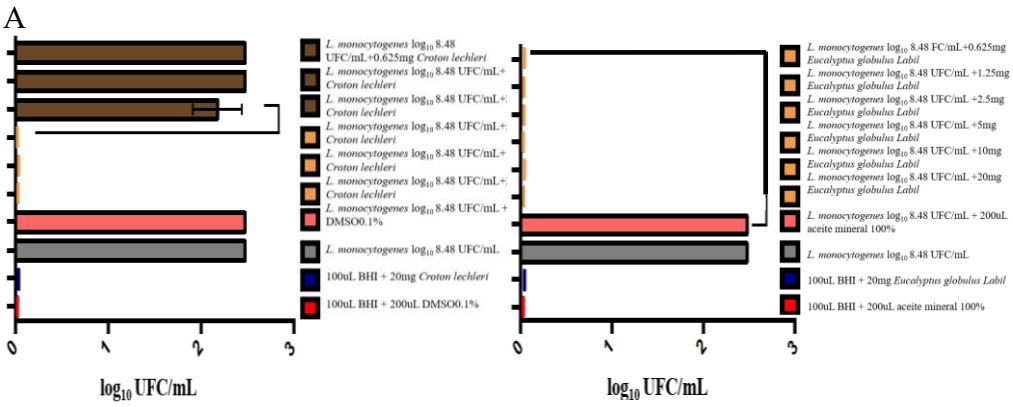


Figura N° 17. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de *C. lechleri* (A) y de *E. globulus Labil* (B) frente a *L. monocytogenes* ATCC 19115. Se señala la menor concentración a la que se reprime completamente el crecimiento de la bacteria.

Mientras que las CBM de estas dos especies vegetales para *S. aureus* ATCC 25923 fueron de 2,5 mg para *C. lechleri* y de 5 mg para *E. globulus Labil* (Figura 18).

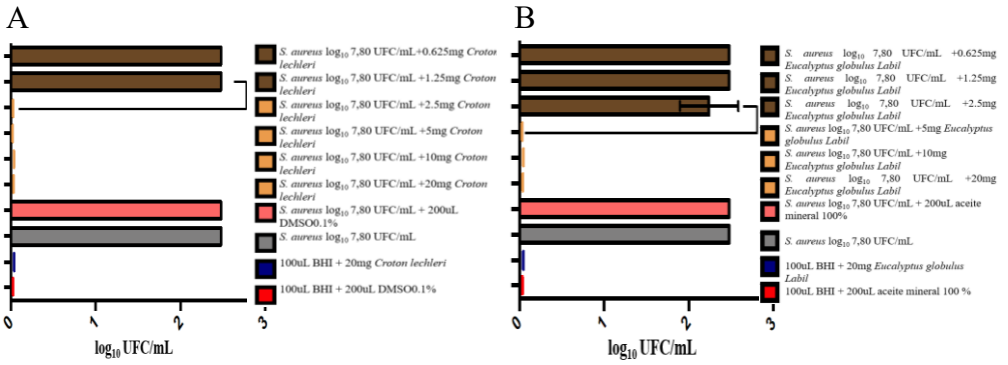


Figura N° 18. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de C. lechleri (A) y de E. globulus Labil (B) frente y S. aureus ATCC 25923. Se señala la menor concentración a la que se reprime completamente el crecimiento de la bacteria

3.2.Discusión de los resultados

En la investigación se evaluó 11 especies de plantas medicinales endémicas de diferentes regiones de Ecuador (Tabla N° 1 de la de metodología). En este país varias plantas se han utilizado con propósitos medicinales empleadas como analgésicos o

coadyuvantes en el tratamiento de diferentes dolencias(15). Lewis,2006 reportó que las plantas poseen más de una decena de metabolitos secundarios que sintetizan a nivel macro y submicromolar afectando tanto a las bacterias Gram positivas como Gram negativas(21).

A partir de los resultados obtenidos en la investigación, 2 extractos de plantas medicinales mostraron actividad antibacteriana de manera estadísticamente significativa ($p < 0,001$). Con resultados variables dependiendo de la cepa microbiana o si es una bacteria Gram positiva o Gram negativa. Estudios previos señalan que las bacterias Gram-negativas poseen una barrera de permeabilidad en su membrana externa, hidrófila que no permite el paso de compuestos hidrófobos ni anfipáticos esto se debe por pruinas y a las moléculas de transporte especializadas que se encuentran en la membrana (21).De la misma manera Pírez, 2002 indica que las bacterias Gram positivas poseen una gruesa capa de peptidoglicano lo que podría hacer de esta una barrera que impide el ingreso de diferentes compuestos, incluyendo los antimicrobianos (22).

Frente a estos antecedentes, es posible que las carcaterísticas estructurales y moleculares propias de cada cepa inhiban el efecto que los extractos pueden tener, tal como observamos con la sesibilidad de *E. coli* ATCC 25922 a *C. lechleri* y no con *P. aeruginosa* ATCC 10145 (Figura 14).

Por otro lado, las CIM de *C. lechleri* y *E. globulus L* frente a *S. aureus* ATCC 25923 y *L. monocytogenes* ATCC 19115 oscilaron entre 0,625 mg y 5 mg (Figuras 17 y 18) lo que nos hace suponer que esas especies vegetales poseen metabolitos que podrían tener algún efecto selectivo frente a microorganismos Gram positivos.

Si bien se han realizado estudios semejantes al nuestro, la metodología que se ha utilizado no garantiza la fiabilidad de los resultados ya que no se han llevado los controles adecuados o se han empleado solventes a concentraciones altas que inhiben el crecimiento bacteriano(14,18).

Frente a estos antecedentes, es posible que los efectos observados se deban a la presencia de uno o varios metabolitos microbianos que desencadenan el efecto bactericida neto o que activen mecanismos de señalización capaces de inducir respuestas apoptóticas dependientes de la concentración de los compuestos vegetales

que culminen con la muerte bacteriana. De ahí que, futuras investigaciones podrían desarrollarse con el fin de purificar los metabolitos de las especies vegetales y desarrollar un cribado con el propósito de dilucidar el mecanismo por el cual estas sustancias cumplen su efecto antimicrobiano.

3.3 Verificación de hipótesis.

3.3.1 Hipótesis nula.

- Los extractos de planta medicinales del Ecuador no presentan efecto antibacteriano frente a diferentes cepas de microorganismos.

3.3.2 Hipótesis alterna.

- Los extractos de planta medicinales del Ecuador presentan efecto antibacteriano frente a diferentes cepas de microorganismos.

Con base a los resultados analizados los extractos de *C. lechleri* y de *E. globulus Labil* tiene efecto antibacteriano sobre todo frente a bacterias Gram positivas, se acepta la hipótesis alterna.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES

4.1 Conclusiones

- Se determinó el efecto antibacteriano de los extractos de *C. lechleri* y de *E. globulus Labil* a una concentración de 10 mg frente a $\log_{10}$ 7.8 UFC de *S. aureus* ATCC 25923 y $\log_{10}$ 8.48 UFC de *L. monocytogenes* ATCC 19115.

- Se identificó la CIM de los extractos de *C. lechleri* y de *E. globulus Labil* que correspondió a 10 mg inhiendo el crecimiento por completo de a $\log_{10}$ 7.8 UFC de *S. aureus* ATCC 25923 y $\log_{10}$ 8.48 UFC de *L. monocytogenes* ATCC 19115.

- Se estableció que la concentración mínima bactericida del extracto de *C. lechleri* para $\log_{10}$ 7.8 UFC de *S. aureus* ATCC 25923 fue de 2.5 mg y para $\log_{10}$ 8.48 UFC de *L. monocytogenes* ATCC 19115 fue de 5mg. La concentración mínima bactericida del extracto de *E. globulus Labil* para $\log_{10}$ 7.8 UFC de *S. aureus* ATCC 25923 fue de 5 mg y para $\log_{10}$ 8.48 UFC de *L. monocytogenes* ATCC 19115 fue de 0.625mg.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Roca I, Akova M, Baquero F, Carlet J, Cavaleri M, Coenen S, et al. The global threat of antimicrobial resistance : science for intervention. New Microbes New Infect. 6(February 2015):22–9.

2. Quiñones Pérez D. Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque "Una salud" Rev Cubana Med Trop [Internet]. 2017;69(3):1–17. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602017000300009&lng=es&nrm=iso&tlng=es

3. Chaudhary AS. A review of global initiatives to fight antibiotic resistance and recent antibiotics′ discovery. Acta Pharm Sin B [Internet]. 2016;6(6):552–6. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2016.06.004

4. Chaudhary AS. PERSPECTIVE A review of global initiatives to fi ght antibiotic resistance and recent antibiotics ' discovery. Acta Pharm Sin B. 2016;6(6):552–6.

5. Calderón Rojas G, Aguilar Ulate L. Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. Infectología [Internet]. 2016;(621):757–63. Available from: http://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/621/art03.pdf

6. Frieri M, Kumar K, Boutin A. Antibiotic resistance. J Infect Public Health. 2017;10(4):369–78.

7. Moreno C, González R, Beltrán C. Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. Antimicrobial resistance mechanisms in respiratory pathogens. Rev Otorrinolaringol. 2009;69(2):185–92.

8. Abrera CREUC, Ómez ROFAG, Úñiga ANEDZ. Colombia Médica La resistencia de bacterias a antibióticos , antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación Colombia Médica. 2007;38:149–58.

9. Akova M. Epidemiology of antimicrobial resistance in bloodstream infections. Virulence [Internet]. 2016;7(3):252–66. Available from: http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2016.1159366

10. Bello-fernández ZL, Cozme-rojas Y, Pacheco-pérez Y, Mejías-mayo CL. Resistencia antimicrobiana de Staphylococcus coagulasa positiva en cultivo de lesión en niños de Las Tunas. Rev Electrónica Dr Zoilo E Mar. 2018;43(2):6.

11. Friedman ND, Temkin E, Carmeli Y. The negative impact of antibiotic resistance. Clin Microbiol Infect [Internet]. 2016;22(5):416–22. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.002

12. Rather IA, Kim BC, Bajpai VK, Park YH. Self-medication and antibiotic resistance: Crisis, current challenges, and prevention. Saudi J Biol Sci [Internet]. 2017;24(4):808–12. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.01.004

13. Barragán DCC. Trabajo científico Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico. (57):81–6.

14. Ramirez EP, Andamayo DC, Quintana M, Solar D, Torres DM. Efecto antibacteriano de extractos etanólicos de plantas utilizadas en la tradiciones culinarias andinas sobre microorganismos de la cavidad bucal. 2015;25(3):268–77.

15. L MA, F IC. Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. 2010;1288–93.

16. Balslev H, Navarrete H, De la Torre L, Macía M. Introducción. Encicl plantas útiles del Ecuador [Internet]. 2008;1–3. Available from: https://www.puce.edu.ec/portal/wr-resource/blobs/1/PUB-QCA-PUCE-2008-Enciclopedia.pdf

17. Luis A, Germán E, Indira B, Harold A. Actividad Antibacteriana in vitro de Extractos y Fracciones de Physalis peruviana L . y Caesalpinia pulcherrima (L .) Swartz * [In vitro antibacterial activity of extracts and fractions of Physalis peruviana L . and. 2013;

18. Ramírez R, Pedraza A, Sáenz M. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de plantas frente a cepas bacterianas multiresistentes. ResearchGate [Internet]. 2013;(April 2013):1–7. Available from: http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Evaluación+de+la+actividad+antimicrobiana+de+extractos+de+plantas+frente+a+cepas+bacterianas+multiresistentes#0

19. Isabel M, Mayorga E. Issn: 2145-5333. 2015;7(1):4–12.

20. Martin S. 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. 2016;9:11–8.

21. Lewis K, Ausubel FM, O Plumbagin OH HO OH Resveratrol OH HO HO OH HO OH O O Gossypol OO. Prospects for plant-derived antibacterials Coumestrol C O M M E N TA R Y. Nat Biotechnol [Internet]. 2006;24(12):1504–7. Available from: http://www.nature.com/naturebiotechnology

22. Pírez M. Morfologia Y Estructura Bacteriana. 2002;1–10. Available from: http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap 9.pdf

ANEXOS

1. Anexo N°1 Resolución de probación del trabajo de titulacion **"Evaluación del efecto antibacteriano de los extractos de plantas medicinales del Ecuador"** por el Consejo Directivo mediante la Resolución CD-P-2019-1427 con fecha de aprobación 22 de abril del 2019.

CONSEJO DIRECTIVO

FCS
FACULTAD DE CIENCIAS
DE LA SALUD

Ambato, 22 de Abril de 2019
Resolución CD-P-2019-1427

Señorita
Núñez Hernández Erika Tatiana
ESTUDIANTE
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 22 de Abril de 2019, en conocimiento del acuerdo UTA-UAT-FCS-2019-0229-A, suscrito por el Dr. Esp. Jesús Chicaiza Tayupanta, Presidente de la Unidad de Titulación, sugiriendo se apruebe la **PROPUESTA DE TRABAJO DE TITULACIÓN** del/la estudiante Núñez Hernández Erika Tatiana de la carrera de **Laboratorio Clínico,** al respecto.

CONSEJO DIRECTIVO, RESUELVE:

- **APROBAR** AL/A SEÑOR/ITA NÚÑEZ HERNÁNDEZ ERIKA TATIANA, ESTUDIANTE DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO, CON EL TEMA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN **"EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES DEL ECUADOR "**, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TITULO DE LICENCIADO/A EN **LABORATORIO CLÍNICO.**
- **DESIGNAR COMO TUTOR DEL TRABAJO DE GRADUACIÓN O TITULACIÓN, AL DOCTOR MARCO GUDIÑO GOMEZJURADO, DEBERÁ PRESENTAR UN INFORME BIMENSUAL DE SU AVANCE Y UNO AL FINAL, DE CONFORMIDAD CON EL ART. 14 DEL REGLAMENTO DE GRADUACIÓN PARA OBTENER EL TÍTULO TERMINAL DE TERCER NIVEL EN LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO.**
- **AUTORIZAR** AL/A SEÑOR/ITA ESTUDIANTE DE LA CARRERA DE **LABORATORIO CLÍNICO,** LA ELABORACIÓN DEL TRABAJO DE GRADUACIÓN O TITULACIÓN EN LOS PLAZOS ESTABLECIDOS EN LA DISPOSICIÓN GENERAL, INCISO TERCERO Y CUARTO DEL REGLAMENTO DE RÉGIMEN ACADÉMICO.

Atentamente,

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CONSEJO DIRECTIVO
PRESIDENCIA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Dr. Marcelo Ochoa Egas
Presidente

Anexo acuerdo UTA-UAT-FCS-2019-0229-A (DOCUMENTACIÓN CORRESPONDIENTE)
c.c. **CARPETA ESTUDIANTIL**
DOCTOR MARCO GUDIÑO GOMEZJURADO, (TUTOR)

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO Cdla. Ingahurco Teléfono (03) 3 730 268 Ext. 5211
www.uta.edu.ec

2. AnexoN°2 Permiso emitido por el Ministerio del Ambiente. **"AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA"** N°021-2019-IC-FLO-DNB/MA

MINISTERIO DEL AMBIENTE

AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

Nº 021-2019-IC-FLO-DNB/MA

FLORA X **FAUNA**

El Ministerio del Ambiente, en uso de las atribuciones que le confiere el acuerdo interinstitucional Nro. SENESCYT-MAE-2018-001 autoriza a:

Nombre	Nacionalidad	# Cédula	Función
Erika Tatiana Núñez Hernández	Ecuatoriana	1805212154	Tesista

Para que lleven a cabo la investigación científica **"Evaluación del efecto antibacteriano de los extractos de plantas medicinales del Ecuador".**

DE ACUERDO A LAS SIGUIENTES ESPECIFICACIONES

1. Solicitud de: Erika Tatiana Núñez Hernández. Estudiante
2. Contraparte del Ministerio del Ambiente: Dirección Nacional de Biodiversidad.
3. Institución científica nacional de apoyo: Universidad Técnica de Ambato.
4. Entrega de informe final: **15 Julio 2020**.
5. Inicio de la actividad: 08/07/2019.
6. En caso de no llevarse a cabo la investigación se debe informar a la Autoridad Ambiental adjunto un justificativo.
7. Valoración técnica del proyecto: Fanny Tello
8. 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.
9. Esta Autorización **NO HABILITA EXPORTACIÓN DE FLORA/FAUNA O MICROORGANISMOS,** sin la correspondiente autorización de la Dirección Nacional de Biodiversidad
10. Las muestras recolectadas no podrán ser utilizadas en actividades de **BIOPROSPECCIÓN, NI ACCESO AL RECURSO GENÉTICO,** competencia exclusiva se la Unidad de Acceso a Recursos Genéticos, DNB. De los resultados que se desprendan de esta investigación, no podrán ser utilizados para estudios posteriores de Acceso a Recurso Genéticos sin la previa autorización del Ministerio del Ambiente.

SE AUTORIZA LA RECOLECCIÓN DE MUESTRAS EN CAMPO

11. Recolección de hojas, resinas y raíces de especies citadas en la siguiente tabla:

Nombre común	Nombre científico	Cantidad de recolección
Copaiba	*Copaifera langsdorffii*	15 ramas
Teatina	*Theatīnus sp.*	15 ramas
Guayusa	*Ilex guayusa*	100 hojas
Paico	*Dysphania ambrosioides*	15 ramas
Guayaba	*Psidium guajava*	100 hojas
ajo de monte	*Mansoa alliacea*	100 hojas

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.

sangre de drago	*Croton lechleri*	100mL aproximadamente
uña de gato	*Uncaria tomentosa*	500g de corteza, aproximadamente
Chuchuguasa	*Maytenus laevis*	500g de corteza, aproximadamente
Cedrón	*Aloysia citrodora*	15 ramas
Malva	*Malva sylvestris*	100 hojas
Romero	*Rosmarinus officinalis*	15 ramas
Ortiga	*Urtica dioica*	15 ramas
Toronjil	*Melissa officinalis*	15 ramas
Tilo	*Tilia cordata*	100 hojas
Taraxaco	*Taraxacum officinale*	25 plantas

Obligaciones del investigador

12. Citar en las publicaciones científicas, tesis e informes técnicos científicos el número de Autorización de Investigación Científica otorgada por el Ministerio del Ambiente, con el que se colecto el material biológico.
13. Entregar al Ministerio del Ambiente-Dirección Nacional de Biodiversidad, (02) dos copias del informe final impreso a ambas caras en formato PDF, y una versión digital, de los resultados de la autorización otorgada. (Solicitar formato Informe Final DNB).
14. Entregar al Ministerio del Ambiente-Dirección Nacional de Biodiversidad la información asociada a cada muestra, esta información deberá ser facilitada en formato digital de acuerdo a los estándares establecidos Solicitar formato Informe Final DNB,
15. A los informes parciales y finales deberán obligatoriamente adjuntarse los siguientes anexos:
    - Lista taxonómica de las especies de debidamente identificadas, objeto de la autorización de colecta con sus respectivas coordenadas. (Solicitar Formato en la DPI).
    - Copia de todo el material fotográfico que puedan ser utilizados para difusión. (se respetara el derecho de autoría).
16. Las muestras deben ser preservadas, curadas y depositadas de lo contrario, es obligatorio sufragar los gastos que demanden la preparación del material para su ingreso a la colección correspondiente.

Del incumplimiento de las obligaciones dispuestas en los numerales 12, 13, 14, 15 y 16 se responsabiliza a: Erika Tatiana Núñez Hernández

SE AUTORIZA LA RECOLECCIÓN CON EL PROPOSITO DE:

17. Evaluar el efecto antibacteriano de los extractos de plantas medicinales del Ecuador.
18. Determinar el efecto antibacteriano de los extractos de las plantas medicinales del Ecuador frente a diferentes cepas bacterianas.
19. Identificar, de ser posible, la CIM de los extractos de las plantas medicinales del Ecuador frente a una cepa bacteriana pura en medios líquidos.
20. Establecer el efecto bactericida o bacteriostático de los extractos de las plantas medicinales sobre diferentes cepas bacterianas.

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.

SE AUTORIZA LA INVESTIGACIÓN EN LAS PROVINCIAS

Provincia	Nombre científico	Nombre común
Pastaza	*Copaifera langsdorffii*	Copaiba
Pastaza	*Theatīnus*	Teatina
Pastaza	*Ilex guayusa*	Guayusa
Tungurahua	*Dysphania ambrosioides*	Paico
Pastaza	*Psidium guajava*	Guayaba
Pastaza	*Mansoa alliacea*	ajo de monte
Pastaza	*Croton lechleri*	sangre de drago
Pastaza	*Uncaria tomentosa*	uña de gato
Pastaza	*Maytenus laevis*	Chuchuguasa
Tungurahua	*Aloysia citrodora*	Cedrón
Tungurahua	*Malva Sylvestris*	Malva
Tungurahua	*Rosmarinus officinalis*	Romero
Tungurahua	*Urtica dioica*	Ortiga
Tungurahua	*Melissa officinois*	Toronjil
Tungurahua	*Tilia cordata*	Tilo
Tungurahua	*Taraxacum officinale*	Taraxaco

SE AUTORIZA LA UTILIZACIÓN DE LOS SIGUIENTES MATERIALES Y/O EQUIPOS PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA INVESTIGACIÓN.

MATERIALES		
Rotavapor	Balanza analítica	pH- metro
Estufa	Cabina de PCR	Liofilizador Virtis
Refrigeradora 2°C	Refrigeradora -80°C	Puntas amarillas (1-200uL)
Puntas azules (100-1000uL)	Microtubos de 2 mL	Microtubos de 1.5 mL
Guantes desechables	Placas de 96 pocillos	Frascos estériles
Papel aluminio	Cajas monopetri desechables	Sacabocados desechables
Papel filtro	Agua destilada	BBL™ Brain Heart Infusion
Soyabean Casein Digest Agar (Trytone Soya Agar),	Muller Hinton Agar No.2, SIGMA-ALDRICH.	Dimethyl sulfoxide (DMSO),Aceite mineral

OBLIGACIONES Y CONDICIONES PARA LA VIGENCIA DE ESTA AUTORIZACIÓN:

21. LOS INVESTIGADORES DEBERÁN REALIZAR SUS INTERVENCIONES EN CAMPO BAJO UN MANEJO RESPONSABLE Y ÉTICO CON LOS ESPECÍMENES ASÍ COMO CON LOS EQUIPOS Y MATERIALES UTILIZADOS DURANTE LA INVESTIGACIÓN.

22. PARA EL INGRESO AREAS DE PROPIEDAD PRIVADA LOS INVESTIGADORES DEBERAN CONTAR CON LA AUTORIZACIÓN DEL RESPECTIVO PROPIETARIO.

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.

23. PARA EL INGRESO ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS LOS INVESTIGADORES DEBERAN INFORMAR DE SU INGRESO AL RESPECTIVO JEFE DE ÁREA DEL MAE.

24. 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.

25. TODO USO INDEBIDO DE ESTA AUTORIZACIÓN, ASÍ COMO EL INCUMPLIMIENTO DE ASPECTOS LEGALES, ADMINISTRATIVOS O TÉCNICOS ESTABLECIDOS EN LA MISMA, SERÁN SANCIONADOS.

26. EL INCUMPLIMIENTO DE CUALQUIERA DE ESTAS DISPOCISIONES ASÌ COMO EL USO INDEBIDO DE ESTE DOCUMENTO, O EL INCUMPLIMIENTO DE LAS DISPOSICIONES LEGALES, ADMINISTRATIVAS O TÉCNICAS ESTABLECIDAS EN LA MISMA, SERÁN SANCIONADOS CONFORME CODIGO ORGANICO DEL AMBIENTE Y CODIGO INTEGRAL PENAL Y CON LA SUSPENSIÓN INMEDIATA DE LA PRESENTE AUTORIZACIÒN.

27. TASA POR AUTORIZACIÓN: 20 VEINTE DÓLARES NO REEMBOLSABLES DEPOSITADOS EN LA CUENTA 0010000785, CÓDIGO SUBLÍNEA 190499, FACTURA 001-002-71043

Dr. Wilson Rojas
Director Nacional de Biodiversidad (E).
JO/FT
2019/07/09

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.

3. ANEXO N°3 Certicado De Entrega Del Material Vegetal Al Herbario Misael Acosta Solis – Universidad Técnica De Ambato

Herbario
Misael Acosta Solís

Ambato, 06 de agosto del 2019

Of. 06-AMAS-2019

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

De mis consideraciones:

Primeramente permítame saludarle y desearle éxitos en sus funciones que acertadamente desempeña en beneficio del medio ambiente de nuestro país. Por intermedio del presente me permito informar que el Dr. Marco Gudiño Investigador del Proyecto "Evaluación del efecto antibacteriano de los extractos de plantas medicinales del Ecuador". Realiza la entrega a través de su estudiante Srta. Erika Tatiana Núñez Hernández integrante de su grupo de investigación de un duplicado de las siguientes colecciones botánicas: *Croton lechleri, Ilex guayusa, Theatinus, Maytenus laevis, Eucaliptus globulus, Rosmarinus officinalis, Urtica dioica, Melissa officinalis, Tilia cordata, Dysphania ambrosioides* al Herbario Ambato Misael Acosta Solís (AMAS) de la Universidad Técnica de Ambato. Material que se mantendrá bajo la custodia de nuestra institución.

Sin otro particular, agradezco y suscribo.

Atentamente,

PhD. José Homero Vargas López
CURADOR HERBARIO (AMAS)

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
AMAS
HERBARIO
MISAEL
ACOSTA SOLÍS
AMBATO - ECUADOR