



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN
ALIMENTOS**



CARRERA EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

PORTADA

**“Evaluación de la actividad antibacteriana y antiinflamatoria *in vitro* del
extracto vegetal seco de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L)”**

Trabajo de Titulación, modalidad de Proyecto de Investigación, previa la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Autor: Gissela Maribel Acosta Sánchez

Tutor: Ph.D. Orestes Darío López Hernández

Ambato - Ecuador

Julio 2018

APROBACIÓN DEL TUTOR

Ph.D. Orestes Darío López Hernández

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 13 de Junio de 2018



Ph.D. Orestes Darío López Hernández

C.I. 175478486-4

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Gissela Maribel Acosta Sánchez, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



Srta. Gissela Maribel Acosta Sánchez

C.I. 180448929-0

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:



Presidente del Tribunal



Ph.D. Milton Rubén Ramos Moya
C.I. 180111963-5



MSc. Yunys Pérez Betancourt
C.I. 175647274-0

Ambato, 04 de Julio de 2018

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Proyecto de Investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Srta. Gissela Maribel Acosta Sánchez
C.I. 180448929-0
AUTOR

DEDICATORIA

A Dios, por regalarme la vida y permitirme disfrutar cada logro con mis seres queridos.

A mis padres, Julio Acosta y Nelly Sánchez lo más importante de mi vida, ellos son quienes me apoyaron en todo momento brindándome un consejo y una palabra de aliento hasta alcanzar mi meta, ahora su amor y comprensión han dado su fruto.

Fernanda, mi alma gemela, quien fue un pilar fundamental en mi vida personal y académica durante este tiempo, y a mi hermano Erick quien con sus locuras me sacaba una sonrisa a pesar de las dificultades.

Agradezco a mis abuelitos por estar siempre pendientes de mí y enseñarme que con esfuerzo y dedicación los sueños sí se cumplen.

A mis amigos, quienes estuvieron presentes durante mi vida estudiantil universitaria.

AGRADECIMIENTOS

La vida está llena de retos, y una de ellas es la vida universitaria. Tras verme en ella, me he dado cuenta que más allá de ser un reto, es una base para el enriquecimiento de mi conocimiento.

Agradezco a mi Institución, la Universidad Técnica de Ambato y a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos por abrirme las puertas para mi formación profesional.

A mis docentes, Ph. D Orestes López, Ph. D Linda Guamán, MSc. Yunys Pérez y , MSc. Cecilia Carpio, quienes con su paciencia, tiempo y dedicación hicieron que fuera posible el desarrollo de esta investigación.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

TRABAJO DE TITULACIÓN MODALIDAD PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

A. PÁGINAS PRELIMINARES	
PORTADA	i
APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
B. TEXTO	
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	4
EL PROBLEMA	4
1.1.- Tema.....	4
1.2.- Justificación	4
1.3.- Objetivos.....	5
1.3.1.- General	5
1.3.2.- Específicos.....	6
CAPÍTULO II	7
MARCO TEÓRICO.....	7
2.1.- Antecedentes investigativos.....	7
2.1.1.- Los Manglares	7
2.1.2.- Mangle Rojo (<i>Rhizophora mangle</i> L)	8
2.2.2.1.- Generalidades.....	8
2.2.2.2.- Fitoquímica.....	9
2.2.2.3.- Actividad Antimicrobiana	10
2.2.2.4.- Actividad Antiinflamatoria	11

2.1.2.- Microorganismos Patógenos	12
2.1.2.1.- <i>Staphylococcus aureus</i>	13
2.1.2.1.1.- Taxonomía.....	13
2.1.2.2.- <i>Listeria monocytogenes</i>	13
2.1.2.2.1.- Taxonomía.....	14
2.1.2.3.- <i>Bacillus cereus</i>	14
2.1.2.3.1.- Taxonomía.....	15
2.1.2.4.- <i>Escherichia coli</i>	15
2.1.2.4.1.- Taxonomía.....	15
2.1.2.5.- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
2.1.2.5.1.- Taxonomía.....	16
2.2.- Hipótesis	16
2.3.- Señalamiento de variables de la hipótesis	17
2.3.1.- Variables Independientes	17
2.3.2.- Variables Dependientes	17
CAPÍTULO III	18
MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1.- Materiales	18
3.2.- Métodos	18
3.2.1. Material vegetal.....	18
3.2.1.1. Obtención del extracto total vegetal	18
3.2.1.2. Cuantificación de los polifenoles totales del extracto seco de mangle rojo.....	19
3.2.1.3. Preparación de la muestra a diferentes concentraciones	19
3.2.2. Evaluación antimicrobiana.....	20
3.2.2.1. Activación de las cepas bacterianas.....	20
3.2.2.2. Ajuste de la suspensión de bacterias a 0,5 McFarland.....	20
3.2.2.3. Actividad antimicrobiana por difusión en disco-placa	20
3.2.2.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria.....	21
3.2.2.5. Determinación de la concentración bacteriana mínima (MBC).....	21
3.2.3. Actividad Antiinflamatoria	22
3.2.3.1. Solución de glóbulos rojos o eritrocitos al 40 %.....	22
3.2.3.2. Determinación de la actividad antiinflamatoria por el método de estabilización de la membrana de los glóbulos rojos o eritrocitos	22
3.3.- Diseño Experimental	23
CAPITULO IV.....	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25

4.1.- Análisis y discusión de los resultados	25
4.1.1.- Determinación de fenoles totales	25
4.1.2. Actividades Biológicas	27
4.1.2.1.- Evaluación de la Actividad Antimicrobiana del extracto total seco de mangle rojo (<i>Rhizophora mangle</i> L) frente a bacterias patógenas	27
4.1.2.1.1.- Determinación de la medida del diámetro del halo de inhibición	27
4.1.2.1.2.- Determinación del porcentaje de inhibición de acuerdo a la medida del diámetro del halo de inhibición	31
4.1.2.1.3.- Selección de la cepa que presenta mayor inhibición de crecimiento con el extracto seco de <i>Rhizophora mangle</i> L	33
4.1.2.1.4.- Determinación de la concentración mínima inhibitoria.....	34
4.1.2.1.5.- Determinación de la concentración bacteriana mínima (MBC)	35
4.1.2.2.- Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria del extracto total seco de mangle rojo (<i>Rhizophora mangle</i> L)	36
4.2.- Verificación de la hipótesis	38
CAPÍTULO V.....	39
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	39
5.1.- Conclusiones	39
5.2.- Recomendaciones.....	40
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
ANEXOS	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>S. aureus</i>	13
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>L. monocytogenes</i>	14
Tabla 3. Clasificación taxonómica de <i>B. cereus</i>	15
Tabla 4. Clasificación taxonómica de <i>E. coli</i>	15
Tabla 5. Clasificación taxonómica de <i>P. aeruginosa</i>	16
Tabla 6. Medida del Halo de Inhibición a diferentes concentraciones de <i>Rhizophora mangle</i> L.....	27
Tabla 7. Porcentaje de inhibición a diferentes concentraciones de extracto de <i>Rhizophora mangle</i> L.....	32
Tabla 8. Determinación cualitativa en base a los resultados del porcentaje de inhibición del extracto seco de <i>Rhizophora mangle</i> L según Ramirez y Diaz, (2007)	32
Tabla 9. Medida de la Absorbancia a 600 nm para la determinación de la MIC	35
Tabla 10. Cuantificación de las UFC/ml inhibidas a diferentes concentraciones del extracto seco de <i>Rhizophora mangle</i> L.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Polifenoles de bajo peso molecular presentes en <i>Rhizophora mangle</i> L (Regalado <i>et al.</i> , 2016)	10
Figura 2. Curva de calibración de ácido Gálico por el método Folin-Ciocalteu.....	25
Figura 3. Medida del halo de inhibición para <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® 25923™) a diferentes concentraciones de <i>Rhizophora mangle</i> L.....	29
Figura 4. Medida del halo de inhibición para <i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC® 19115™) a diferentes concentraciones de <i>Rhizophora mangle</i> L.....	30
Figura 5. Medida del halo de inhibición para <i>Bacillus cereus</i> (ATCC® 10876™), a diferentes concentraciones de <i>Rhizophora mangle</i> L.	31
Figura 6. Concentración del extracto total seco de <i>Rhizophora mangle</i> L (%) vs Halo de inhibición (mm) utilizando 5 cepas diferentes de bacterias patógenas Gram negativas y Gram positivas.....	33
Figura 7. Comparación de la actividad antiinflamatoria del extracto total seco de <i>Rhizophora mangle</i> L a diferentes concentraciones, como control positivo se usó la aspirina.	37

RESUMEN

En el presente estudio se evaluaron las actividades antimicrobiana y antiinflamatoria del extracto total seco de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L) cuyos ensayos se realizaron de forma *in vitro*. Las actividades biológicas ensayadas posiblemente se deben a los polifenoles que contiene este extracto vegetal. La cuantificación polifenólica del extracto en polvo se realizó por el método de Folin-Ciocalteu dando una concentración de $338,31 \pm 4,24$ mg GAE/g. La actividad antimicrobiana se realizó por el método de difusión en disco-placa, se usaron 5 microorganismos patógenos, los resultados obtenidos indicaron que el extracto vegetal inhibe el crecimiento microbiano de bacterias Gram positivas, entre ellas *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*, mientras que para bacterias Gram negativas no se evidenció una prueba positiva de inhibición de crecimiento bacteriano, entre ellas están *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, como control positivo se usó Gentamicina a 500 µg/ml. Para las bacterias Gram positivas se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) cuyos resultados fueron 11,23 mg/ml; 6,92 mg/ml y 5,63 mg/ml *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *B. cereus*, respectivamente. La actividad antiinflamatoria se evaluó sobre eritrocitos humanos, mediante el método de estabilización de la membrana, donde el porcentaje de la capacidad antiinflamatoria fue mayor que el control positivo (aspirina) en las concentraciones de 1; 1,5 y 2 mg/ml cuyos resultados fueron 68,51 %; 83,34 % y 84,67 % respectivamente, mientras que el control positivo dió un porcentaje de actividad antiinflamatoria a las mismas concentraciones de 54,75 %; 64,75 % y 74,49 %.

Palabras clave: *Rhizophora mangle* L, actividad antimicrobiana, actividad antiinflamatoria, extracto vegetal, bacterias patógenas

ABSTRACT

In the present study, the antimicrobial and anti-inflammatory activities of the dry total extract of red mangrove (*Rhizophora mangle* L), whose tests were carried out in vitro, were evaluated. The biological activities tested are possibly due to the polyphenols contained in this plant extract. The polyphenolic quantification of the powder extract was carried out by the Folin-Ciocalteu method giving a concentration of $338,31 \pm 4,24$ mgGAE/g. The antimicrobial activity was performed by disc-plate diffusion method, 5 pathogenic microorganisms were used, the results obtained indicated that the plant extract inhibits the microbial growth of *Gram*-positive bacteria, among them *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*, while that for *Gram*-negative bacteria a positive test for inhibition of bacterial growth was not evident, among them *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, as a positive control, Gentamicin was used at 500 µg/ml. For *Gram*-positive bacteria, the minimum inhibitory concentration (MIC) whose results were 11,23 mg/ml; 6,92 mg/ml and 5,63 mg/ml *S. aureus*, *L. monocytogenes* and *B. cereus*, respectively. The anti-inflammatory activity was evaluated on human erythrocytes, by means of the membrane stabilization method, where the percentage of the anti-inflammatory capacity was higher than the positive control (aspirin) in the concentrations of 1; 1.5 and 2 mg/ml whose results were 68,51 %; 83,34 % and 84,67 % respectively, while the positive control gave a percentage of anti-inflammatory activity at the same concentrations of 54,75 %; 64,75 % and 74,49 %.

Key words: *Rhizophora mangle* L, antimicrobial activity, anti-inflammatory activity, plant extract, pathogenic bacteria

INTRODUCCIÓN

El mangle rojo (*Rhizophora mangle* L) es una especie arbórea de 6 a 8 metros de altura que crecen en zonas costeras tropicales y subtropicales. Habita en clima cálido, desde el nivel del mar hasta los 100 m. Es una planta silvestre que constituye un tipo de vegetación denominado manglar. Crece en terrenos profundos con una abundante presencia de agua, asociada a bosques tropicales caducifolio, subcaducifolio y perennifolio. **(Argueta, Cano, y Rodarte, 2009)**

La presencia de esta especie vegetal medianamente desarrollada se despliega desde el norte de Colombia hasta Panamá, pero el manglar completamente prosperado solo se observa desde la parte central de Colombia hasta el norte de Ecuador con un extenso ecosistema lleno de crustáceos y moluscos. **(Cuyabeno Lodge, 2014)**

Rhizophora mangle L es un árbol que proporciona materia prima, como madera para la construcción de casas, balsas y para la elaboración de papel, además brindan compuestos químicos de uso medicinal. Por el color fuerte que presenta esta planta se usa como colorante entre una gama de colores que va desde rojo, marrón hasta negro y por la presencia de taninos en la corteza y frutos se usan para curtir pieles. **(Duke y Allen, 2006)**

El extracto acuoso de la corteza de mangle rojo presenta propiedades farmacológicas como antiséptico y acelerador de la curación de heridas, atribuidas a la compleja composición química que posee, donde predominan los polifenoles en 54,78 % y un 45,22 % de otros. Los polifenoles están representados en su mayoría por taninos poliméricos en un 80 % y taninos hidrolizables en un 20 %. **(Roger et al., 2011)**

El uso excesivo de compuestos químicos sintetizados como antibióticos ha ocasionado que las bacterias desarrollen mayor resistencia frente a los antibióticos, por lo que en la actualidad se han desarrollado alternativas etnofarmacológicas. **(Sánchez, 2013)**

Los metabolitos secundarios que producen las plantas representan una importante fuente de sustancias bioactivas. Los principales compuestos químicos presentes en el extracto de mangle rojo son polifenoles de bajo peso molecular como son: ácidos gálico, elágico y clorogénico; catequina y epicatequina. También se encontraron galotaninos, elagitaninos, taninos condensados, fitoesteres, carbohidratos libres y enlazados, ácidos grasos de cadena larga saturados e insaturados, compuestos volátiles y aceites esenciales no volátiles. **(Regalado, Sánchez, y Mancebo, 2016)**

La presencia de estos compuestos químicos hace que las plantas tengan propiedades tales como antioxidante, astringente y antimicrobiano, entre otros usos terapéuticos. **(Tomás-Barberán, 2003)**

Los polifenoles obtenidos de fuentes vegetales han sido motivo de gran estudio en el campo microbiológico, es por ello que se han realizado estudios antimicrobianos sobre microorganismos patógenos, tanto *Gram*-positivos como *Gram*-negativos. **(Ferreira, Santos, Barros, Rossi-Alva, y Fernandez, 2011)**

Las bacterias tanto *Gram* positivas como *Gram* negativas están presentes en la naturaleza, algunos de ellos son de interés en seguridad alimentaria, ya que estos microorganismos están presentes en los alimentos y pueden causar enfermedades infecciosas provocando dolores estomacales, vómitos, diarreas, fiebre, entre otras. **(Ramirez y Diaz, 2007)**. Como ejemplos de microorganismos se mencionan a las bacterias *Gram* positivas, entre ellas *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*, *Gram* negativas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* que son motivo del presente estudio.

Las plantas también han sido utilizadas para tratar enfermedades inflamatorias como es la artritis, arteriosclerosis, tromboembolismo, enfermedad arterial coronaria, cerebral y periférica, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, peritonitis, esclerosis múltiple y artritis reumatoide, entre otras. **(Estrada, Ruiz, y González, 2011)**

Es por ello que la actividad antiinflamatoria ha despertado en los últimos años un gran interés científico en el área etno-farmacológica, principalmente en virtud de la capacidad potencial de ciertos compuestos químicos presentes en extractos de plantas, ya que estos pueden tratar y posiblemente curar enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios. **(Estrada *et al.*, 2011)**

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1.- Tema

“Evaluación de la actividad antibacteriana y antiinflamatoria *in vitro* del extracto vegetal seco de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L)”

1.2.- Justificación

En los últimos años ha tomado una gran importancia la obtención de metabolitos a partir de fuentes naturales como son las plantas, ya que estudios han demostrado que los metabolitos secundarios producidos por las plantas presentan propiedades que permiten tratar o curar enfermedades con una determinada dosificación.

Las sustancias naturales han sido utilizadas, desde tiempos ancestrales, para el control de agentes de importancia clínica en Salud Pública, así como para prevenir el deterioro de productos alimenticios o controlar la presencia de microorganismos patógenos. Inicialmente, los productos naturales, incluyendo especias, plantas, hierbas y productos afines fueron usados ampliamente con este fin, luego sustituidos paulatinamente por los antibióticos, pero a finales del siglo XX se empezó a asociar el uso de estos últimos con efectos adversos, incluyendo la aparición y dispersión de cepas resistentes, razón por la cual los productos naturales recobraron fuerza como uso alternativo o complementario en el control de diversas enfermedades, con el propósito de mejorar y disminuir el riesgo para la salud.

Desde 1977, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estado recomendando a los gobiernos el uso racional, basado en criterios de eficacia, seguridad y calidad, de las medicinas tradicionales en los sistemas de salud.
(OPS, 2002)

Las infecciones causadas por bacterias patógenas provocan reacciones adversas en los seres vivos como vómito, diarrea, fiebre, dolor abdominal, etc., son el motivo para buscar nuevas alternativas curativas para combatirlos usando fuentes naturales como son las plantas.

El extracto de mangle rojo posee una gran cantidad de polifenoles que en su mayor parte son taninos, estos compuestos fenólicos son el principio activo que confiera propiedades como antioxidante, antiinflamatorio, antimicrobiano, entre otras propiedades curativas. **(Tomás-Barberán, 2003)**

La investigación científica es una herramienta que permite realizar estudios que a futuro se puedan aplicar para el desarrollo de fitofármacos, con la finalidad de ponerlos al alcance de los individuos, ya que la ingesta de medicamentos de fuentes naturales presenta muy pocos efectos adversos.

En cuanto a la parte socio económica también es de gran importancia ya que la extensión de manglares en las costas del Ecuador es muy extensa y se encuentra accesible al público, pero no se debe olvidar que el uso debe ser racional y sostenible para evitar el daño medio ambiental.

Es por ello que la industria y, en general, todo organismo que investiga y desarrolla nuevos compuestos, busca alternativas que permitan disminuir costos, pero que a su vez los productos que se obtengan sean efectivos y ayuden a solucionar diferentes problemas de la sociedad. De esta manera, se buscan nuevas aplicaciones terapéuticas de fitofármacos que estén disponibles para la sociedad.

1.3.- Objetivos

1.3.1.- General

- Evaluar la actividad antibacteriana y antiinflamatoria *in vitro* del extracto vegetal seco de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.)”

1.3.2.- Específicos

- Cuantificar los polifenoles totales del extracto total seco de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L) por el método de Folin-Ciocalteu.
- Determinar la actividad antibacteriana de manera *in vitro* del extracto total vegetal de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L) por el método de difusión en disco-placa frente a bacterias patógenas.
- Estimar la concentración inhibitoria mínima del extracto total vegetal de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L) por el método de dilución líquida sobre bacterias patógenas.
- Determinar la actividad antiinflamatoria del extracto total vegetal de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L) sobre eritrocitos mediante el método de estabilización de la membrana.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1.- Antecedentes investigativos

Los polifenoles son el grupo más numeroso de metabolitos secundarios de las plantas; estos son productos del metabolismo secundario de las plantas. Los polifenoles están asociados en los mecanismos de defensa de las plantas, cuando son atacadas por agentes externos como la radiación ultravioleta y la agresión de patógenos y predadores. **(Bravo, 1998)**

En los últimos años, los polifenoles han sido estudiados por sus magníficos beneficios en la salud del ser humano y es por ello que también ha sido de gran interés para la industria, principalmente para la industria farmacéutica. Además, los polifenoles han demostrado tener muchas actividades biológicas de gran interés en el ámbito de la salud; así, se ha descrito que pueden actuar como agentes antiinflamatorios, antivirales, antibacterianos, antitrombogénicos y anticancerígenos. **(Bravo, 1998; Nijveldt et al., 2001)**

2.1.1.- Los Manglares

Los manglares son ecosistemas biodiversos constituidos por especies arbóreas de 2 a 25 m de altura que crecen en zonas costeras tropicales y subtropicales. **(Gaxiola, 2011)**

La importancia ecológica de los manglares está basado en las funciones que cumple, como es la estabilización y protección de especies costeras, brindando un hábitat para peces, cefalópodos, cangrejos y moluscos. También los manglares poseen un valor económico por su acogida de especies para la pesca, así como por la extracción de taninos de la corteza del mangle, y la extracción de madera para diversos usos artesanales y comerciales. **(Olguín, Hernández, y Sánchez-Galván, 2007)**

Los manglares tienen diversas funciones ecológicas en el ecosistema, como son:

- Descarga y recarga de aguas subterráneas
- Control de flujo y reflujo en el encuentro de las aguas dulces con las marinas
- Control de erosión y estabilización costera
- Retención de sedimentos
- Retención de nutrientes
- Mantenimiento de la calidad del agua incluyendo transformación de nutrientes
- Estabilización microclimática
- Amortiguamiento de los contaminantes de ecosistemas vecinos
- Recreación y esparcimiento
- Incorporación biológica
- Hábitats de una alta biodiversidad. **(Yáñez-Arancibia, Twilley, y Lara Domínguez, 1998)**

2.1.2.- Mangle Rojo (*Rhizophora mangle* L)

2.2.2.1.- Generalidades

El mangle rojo (*Rhizophora mangle* L) se caracteriza por sus hojas anchas ovaladas y su brote de tan sólo dos o tres flores. En la mayor parte de los lugares esta especie forma densas zonas con palos poco desarrollados, donde las raíces aéreas son confundidas con los troncos del mismo. Este tipo de rodal recibe el nombre de mangle casilar o ñangal. **(Jimenez, 1999)**

La presencia de esta especie vegetal medianamente desarrollada se despliega desde el norte de Colombia hasta Panamá, pero el manglar completamente prosperado solo se observa desde la parte central de Colombia hasta el norte de Ecuador, con un extenso ecosistema lleno de crustáceos y moluscos., así como tambien una gran variedad de especies vegetales que lo rodean. **(Cuyabeno Lodge, 2014)**

Es originaria de litorales tropicales. Habita en clima cálido, desde el nivel del mar hasta los 100 m. El manglar es un tipo de vegetación considerada silvestre. Crece en terrenos profundos con una abundante presencia de agua. Asociada a bosques tropicales caducifolio, subcaducifolio y perennifolio. **(Argueta et al., 2009)**

Reino: *Plantae*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Malpighiales*

Phylum: *Tracheophyta*

Familia: *Rhizophoraceae*

Género: *Rhizophora*

Nombre común: Mangle rojo. **(Regalado et al., 2016)**

Se utiliza en las aftas bucales, úlceras y quistes anales, enfermedades gastrointestinales, los estudios de citotoxicidad han demostrando efectos favorables científicamente comprobados en el control de la acelerada proliferación celular. También señalan en diversos estudios científicos que esta planta es un importante antiséptico y cicatrizante de heridas por lo que puede tener efectos beneficiosos en las quemaduras. **(Regalado et al., 2016)**

2.2.2.2.- Fitoquímica

El extracto acuoso de la corteza de mangle rojo presenta propiedades farmacológicas como antiséptico y acelerador de la curación de heridas, atribuidas a la compleja composición química que posee, donde predominan los polifenoles 54,78 %, representados en su mayoría por taninos hidrolizables en un 20 % y taninos poliméricos el 80 %. **(Roger et al., 2011)**

Los metabolitos secundarios que producen las plantas representan una importante fuente de sustancias bioactivas. Los principales compuestos químicos presentes en el extracto de mangle Rojo son polifenoles de bajo

peso molecular como son: ácidos gálicos, elágico y clorogénico; catequina y epicatequina. También se encontraron galotaninos, elagitaninos, taninos condensados, fitoesteros, carbohidratos enlazados y libres, compuestos volátiles, ácidos grasos de cadena larga saturados e insaturados y aceites esenciales no volátiles. **(Regalado et al., 2016)**

Diferentes extractos naturales debido a la cantidad de polifenoles presentes, exhiben un espectro amplio de actividad antimicrobiana, frente a agentes patógenos presentes en los alimentos como hongos y bacterias. **(Adámez et.al., 2012)**

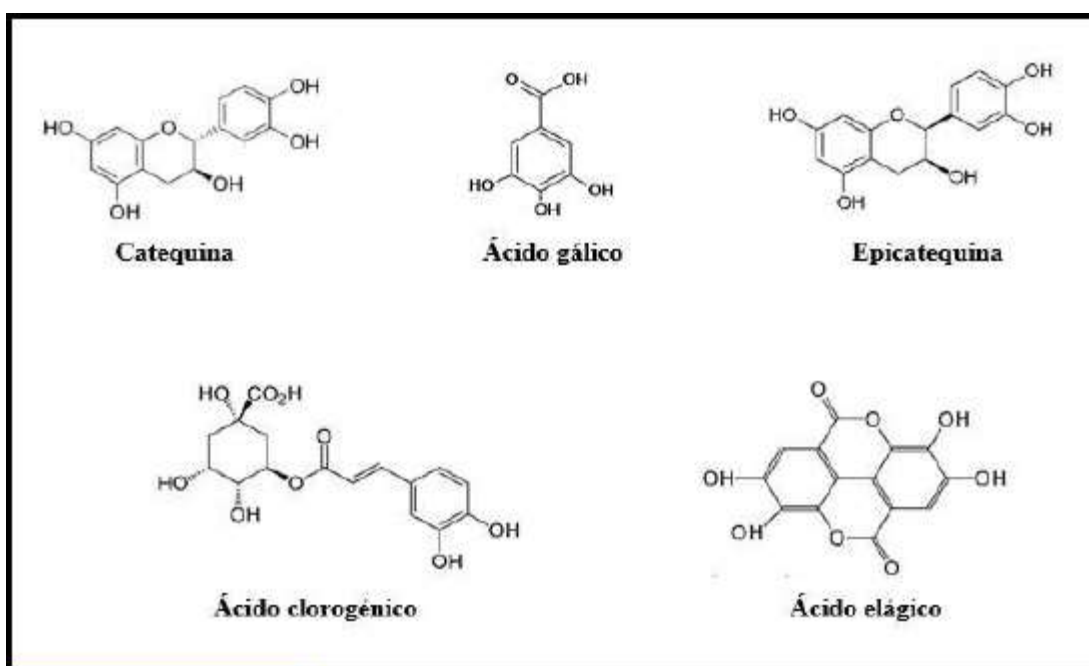


Figura 1. Polifenoles de bajo peso molecular presentes en *Rhizophora mangle* L
(Regalado et al., 2016)

2.2.2.3.- Actividad Antimicrobiana

Según varios estudios realizados se demostró que el extracto acuoso de la corteza de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L) presentó actividad antimicrobiana frente a bacterias que provocan mastitis bovina. **(Regalado et al., 2016)**. Esta enfermedad es provocada por la inflamación de la glándula mamaria que produce alteraciones físicas y químicas en la composición de la

leche, aumento del número de células somáticas por la presencia de microorganismos patógenos. **(Calderón y Rodríguez, 2008)**

Los microorganismos patógenos principales en este grupo son los Gram-negativos como: *Echerichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiela pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. **(Ferreira et al., 2011)**

En relación a la actividad antibacteriana, la concentración mínima inhibitoria (CIM) del extracto de hoja de *Rhizophora mangle* L posee el mejor rendimiento para inhibir el crecimiento de cepas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* y *Micrococcus luteus*), mientras que el extracto de corteza tiene una mejor eficacia frente a cepas Gram-negativas (*Echerichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiela pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. **(Ferreira et al., 2011)**

2.2.2.4.- Actividad Antiinflamatoria

La inflamación fue descrita por Celsus en el año 10 antes de Cristo como enrojecimiento e hinchazón con calor y dolor, es una respuesta protectora, cuyo principal objetivo es librar al organismo del elemento causante del daño celular, como microbios y toxinas, y de las consecuencias de ese daño, con formación de células y tejidos necróticos. **(Enciso y Arroyo, 2011)**; se trata de un proceso complejo que involucra la acción coordinada de múltiples células, caracterizado por alteraciones en la permeabilidad vascular y la producción de mediadores inflamatorios locales, como esteroides, prostaglandinas, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y especies reactivas de oxígeno (ERO). **(Chow et.al., 2005; Hutchinson et.al., 2011)**

La sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO) pueden inducir a un estrés oxidativo y generar daños a nivel celular, que promueven la aparición de enfermedades crónicas. En las enfermedades infecciosas, la inflamación es una respuesta fundamental en la defensa del huésped, la eliminación del agente patógeno y en la reparación y normalización de las funciones del tejido, sin embargo, múltiples enfermedades que evolucionan

con procesos infecciosos como la fibrosis quística, sinusitis, bronquitis, prostatitis, el colon irritable, así como las que se desarrollan a nivel periodontal, y del tracto gastrointestinal; involucran respuestas inflamatorias sostenidas que generan efectos potencialmente nocivos que agravan en gran medida las condiciones patológicas. **(Ospina et.al., 2013)**

En tiempos antiguos las comunidades utilizaban las plantas como fuentes farmacológicas para tratar enfermedades como inflamaciones reumáticas, artritis, entre otras enfermedades inflamatorias. **(Cortés Castell et al., 2014)**

Los polifenoles despliegan un gran potencial como antiinflamatorios inhibiendo el factor NF-Kappa-B, reduciendo el efecto dañino de los azúcares sobre las proteínas, y como potenciador de la longevidad. **(Porrás y López, 2009)**

Se ha encontrado que el resveratrol (RSV), un polifenol natural, es un nuevo agente potencial para suprimir la inflamación de la artritis inducida por colágeno en un modelo de ratón donde se evaluaron los marcadores clínicos y bioquímicos de la artritis reumatoide (AR). Se encontró que los marcadores clínicos (el recuento de 28 articulaciones para la hinchazón y la sensibilidad) y la evaluación del puntaje de la actividad de la enfermedad para 28 articulaciones se redujeron significativamente en el grupo tratado con RSV. Además, los niveles séricos de ciertos marcadores bioquímicos (proteína C reactiva, velocidad de sedimentación de eritrocitos, osteocalcina subcarboxilada, metaloproteinasa-3 de matriz, factor alfa de necrosis tumoral e interleucina-6) también disminuyeron significativamente en pacientes tratados con RSV. **(Khojah et.al., 2018)**

2.1.2.- Microorganismos Patógenos

Los microorganismos patógenos en los alimentos han sido una de las causas de enfermedades transmitidas en muchas regiones del planeta, estos constituyen un problema de salud pública muy grande, entre los

microorganismos de interés sanitario se destacan *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, entre otros.

2.1.2.1.- *Staphylococcus aureus*

El género *S. aureus* son bacterias *Gram* positivas, no forman esporas, generalmente no poseen cápsula y raras excepciones son anaerobias facultativas. Además, tienen la capacidad para desarrollar resistencia a casi cualquier nuevo antibiótico debido a que se adaptan y sobreviven en una gran diversidad de entornos. (Choez y Ortiz, 2015)

2.1.2.1.1.- Taxonomía

Clasificación taxonómica para *S. aureus*:

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *S. aureus*

REINO	BACTERIA
FILO:	Fimicutes
CLASE	Bacilos
ORDEN	Baciliales
FAMILIA:	Staphylococcaceae
GÉNERO	<i>Staphylococcus</i>
ESPECIE	<i>aureus</i>

Fuente: Choez y Ortiz, 2015

2.1.2.2.- *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes es una bacteria bacilo *Gram* positivo. Es el agente de listeriosis, una infección seria causada por consumir el alimento contaminado con la bacteria. La listeriosis ha sido reconocida como un problema de salud pública importante en los Estados Unidos. La enfermedad afecta a mujeres principalmente embarazadas, recién nacidos, y adultos con sistemas inmunológicos debilitados. La forma patógena de la enfermedad tiene una mortalidad mayor que el 25 %. Las dos manifestaciones clínicas principales

son la sepsis y la meningitis. La meningitis a menudo es complicada por encefalitis, una patología que es insólita para infecciones bacterianas. **(Choez y Ortiz, 2015)**

2.1.2.2.1.- Taxonomía

Desde el punto de vista taxonómico su clasificación es la siguiente:

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *L. monocytogenes*

REINO	BACTERIA
FILO:	Fimicutes
CLASE	Bacilos
ORDEN	Baciliales
FAMILIA:	Listeriaceae
GÉNERO	<i>Listeria</i>
ESPECIE	<i>monocytogenes</i>

Fuente: Choez y Ortiz, 2015

2.1.2.3.- *Bacillus cereus*

B. cereus es un microorganismo resistente a los procesos de cocción o pasteurización de los alimentos. Se encuentra en el ambiente de forma habitual y tiene el potencial de contaminar fácilmente los alimentos por prácticas de manufactura deficientes, lo cual puede propiciar condiciones adecuadas para su proliferación y desencadenar la presentación de enfermedades transmitidas por alimentos al hombre. **(Choez y Ortiz, 2015)**

2.1.2.3.1.- Taxonomía

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *B. cereus*

REINO	BACTERIA
FILO:	Firmicutes
CLASE	Bacilli
ORDEN	Bacillales
FAMILIA:	Bacillaceae
GÉNERO	<i>Bacillus</i>
ESPECIE	<i>cereus</i>

Fuente: Choez y Ortiz, 2015

2.1.2.4.- *Escherichia coli*

En 1885 Theodore Escherich, un pediatra alemán, describió por primera vez una bacteria encontrada en las heces de neonatos y niños sanos esta bacteria fue denominada *Bacterium coli commune*. Posteriormente, en 1919 Castellani y Chalmers la denominaron *Escherichia coli*. Este microorganismo es representante de las bacterias *Gram* negativas y es una de las más estudiadas a nivel de biología celular. (Donnenberg, 2002)

2.1.2.4.1.- Taxonomía

Desde el punto de vista taxonómico su clasificación es la siguiente:

Tabla 4. Clasificación taxonómica de *E. coli*

REINO	BACTERIA
FILO:	Proteobacteria
CLASE	Gammaproteobacteria
ORDEN	Enterobacteriales
FAMILIA:	Enterobacteriaceae
GÉNERO	<i>Escherichia</i>
ESPECIE	<i>coli</i>

Fuente: Choez y Ortiz, 2015

2.1.2.5.- *Pseudomonas aeruginosa*

La especie *P. aeruginosa* fue aislada por primera vez de muestras ambientales por Schroeter en 1872. Este microorganismo puede sobrevivir en ambientes acuosos con nutrientes mínimos. Las colonias de *P. aeruginosa* presenta un color azul-verdoso debido a la producción del pigmento piocianina, un compuesto redox muy activo que produce múltiples efectos citopáticos en células de los mamíferos, producido únicamente por esta especie. La especie *P. aeruginosa* es el patógeno más importante para el ser humano, por las infecciones causadas y la morbilidad y mortalidad asociadas. (Palleroni et.al., 1973)

2.1.2.5.1.- Taxonomía

Tabla 5. Clasificación taxonómica de *P. aeruginosa*

REINO	BACTERIA
FILO:	Proteobacteria
CLASE	Gammaproteobacteria
ORDEN	Pseudomonadales
FAMILIA:	Pseudomonadaceae
GÉNERO	<i>Pseudomona</i>
ESPECIE	<i>aeruginosa</i>

Fuente: Palleroni et al., 1973

2.2.- Hipótesis

Hipótesis Nula

El extracto total seco de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L), no presenta actividad antimicrobiana ni actividad antiinflamatoria.

Hipótesis Alternativa

El extracto total seco de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L), si presenta actividad antimicrobiana y actividad antiinflamatoria.

2.3.- Señalamiento de variables de la hipótesis

2.3.1.- Variables Independientes

- ✓ Concentraciones porcentuales del extracto total seco de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L): 10, 25, 50, 75 y 100 %.

2.3.2.- Variables Dependientes

- ✓ **Actividades Biológicas**
 - Actividad antimicrobiana
 - Actividad antiinflamatoria

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Materiales

Extracto vegetal seco de las cortezas de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L), agar Mueller Hinton (MH), caldo de peptona y soya (TSB) (Merck KGaA, Germany), agua destilada, solución salina al 0,9 % y 0,85 %, Gentamicina con una concentración de 500 µg/ml, cepas bacterianas, *Gram*-positivas: *Listeria monocytogenes* (ATCC® 19115™), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Staphylococcus aureus subsp. aureus* Rosenbach (ATCC® 25923™), y *Gram*-negativas: *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), eritrocitos de sangre humana y celdas plásticas de 1 ml.

3.2.- Métodos

3.2.1. Material vegetal

Para la obtención del material vegetal seco, se utilizaron las cortezas del árbol de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L) de la playa de Cojimíes en la provincia de Manabí, Ecuador.

3.2.1.1. Obtención del extracto total vegetal

El material vegetal se limpió, las sustancias extrañas se retiraron y el material fresco se secó bajo la acción de la luz solar por 11 días. Las cortezas fueron molidas en un molino de tornillo sin fin. El material vegetal triturado se colocó en vasos de precipitación pyrex de 600 mL que contenían 500 mL de agua osmotizada hirviendo (92 °C, Ambato) sobre una plancha de calentamiento con agitación media (IKA®C-MAG, China) a su máxima capacidad de

calentamiento. El tiempo de extracción fue de una 1 hora y la relación material vegetal/agua (MV/A) fue de 1:20 (25 g/500 mL) para obtener una mayor cantidad de polifenoles.

El volumen de extracto obtenido se concentró en un rotoevaporador, luego se secó a través del mini spray dryer (Buchi B290) a una temperatura de entrada de 140 °C y de salida de 80 °C, el producto fue un polvo de color rojo intenso.

3.2.1.2. Cuantificación de los polifenoles totales del extracto seco de mangle rojo.

La cuantificación de polifenoles totales se realizó por el método modificado (Folin-Ciocalteu ,1927), en el cual se obtuvo un producto de color azul por la acción de compuestos fenólicos al reducir un complejo fosfowolframato-fosfomolibdato. En tubos de ensayo se colocó 0,1 mL del extracto líquido de mangle rojo previamente diluido y centrifugado (10 min a 12000 rpm) y 0,1 mL de Folin–Ciocalteu, se dejó reaccionar por 3 minutos y luego se agregó 2 mL de solución de carbonato de sodio (75 g/L). Finalmente se completó el volumen de cada tubo de ensayo hasta 5 mL con agua destilada, se agitó bien cada tubo en un vórtex (Mixer, Reino Unido) y enseguida se llevó a una estufa a 60 °C por 15 min, dicho proceso se desarrolló por triplicado. Se contó con un espectrofotómetro UV (HACH, USA.) para la medición de las absorbancias de cada una de las muestras a 750 nm de longitud de onda. La curva de calibración se obtuvo a partir de un stock de ácido gálico de 200 mg/L, del cual se obtuvieron distintas soluciones diluidas de 50,61 mg/L; 99,53 mg/L; 151,05 mg/L y 195,99 mg/L. Se aplicó el mismo tratamiento de reacción que a la muestra de mangle rojo para la medición de sus absorbancias a 750 nm.

3.2.1.3. Preparación de la muestra a diferentes concentraciones

Se pesaron 2 g del extracto vegetal total de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L) y se diluyeron en 3 ml de agua destilada estéril, está fue la solución madre de la cual se partió para formar las diferentes concentraciones porcentuales de 100, 75, 50, 25 y 10 %.

3.2.2. Evaluación antimicrobiana

3.2.2.1. Activación de las cepas bacterianas

Para la activación de las cepas bacterianas se tomaron muestras de cada una de las bacterias que se encontraban en congelación a -80 °C *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, luego se colocaron en diferentes tubos de ensayo con tapa rosca que contenían 5 ml de medio de cultivo líquido estéril TSB. Los tubos fueron incubados en condiciones anaerobias a 37°C y 200 rpm en una incubadora con agitación (INCU-SHAKER Mini Benchmark) durante 16-18 horas.

3.2.2.2. Ajuste de la suspensión de bacterias a 0,5 McFarland

Transcurrido el tiempo de incubación se midió la absorbancia de cada uno de los tubos con las suspensiones bacterianas a 600 nm y luego se ajustó a 0,5 McFarland (**Hood et al. 2010**) correspondiente a una absorbancia de 0,1.

3.2.2.3. Actividad antimicrobiana por difusión en disco-placa

La evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó con bacterias Gram-positivas *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. aureus*, y Gram-negativas *E. coli* y *P. aeruginosa*. Para el control positivo se utilizó Gentamicina, antibiótico de amplio espectro a una concentración de 500 µg/ml.

Se hicieron pozos de ocho mm de diámetro, se perforaron en el agar y se llenaron con 100 µL de extracto de mangle rojo con cada una de las concentraciones realizadas anteriormente (100, 75, 50, 25 y 10 %). Las placas se incubaron durante 48 horas a 37 °C. Se utilizó agua destilada estéril como control negativo. Transcurrido el tiempo de incubación, se midieron las zonas de inhibición y el efecto se calculó como una media de 3 pruebas replicadas. Luego, se determinó el porcentaje de inhibición mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(D. \text{ halo de extracto} - D. \text{ halo blanco})}{(D. \text{ halo control positivo} - D. \text{ halo blanco})} * 100 \quad [\text{Ec. 1}]$$

Donde:

D: diámetro (mm)

D. halo control positivo= Gentamicina 500 µg/ml

D. del blanco= medida del pocillo 8 mm

3.2.2.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria

La determinación de la MIC se realizó por el método de dilución líquida. Las cepas bacterianas de *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, se cultivaron en TSB entre 12 y 16 horas a 37 °C en condiciones anaerobias. Los inóculos para los ensayos se diluyeron en una solución de NaCl al 0,85 % ajustándose a la escala estándar de McFarland 0,5 y confirmada mediante lectura en un espectrofotómetro a 600 nm.

Posteriormente se realizan diluciones seriadas del extracto para colocar 100 µL de cada una de las diluciones en cada uno de los tubos que contienen 10 µL de la suspensión de bacterias. Los tubos se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se midió la turbidez en el espectrofotómetro a 600 nm para evaluar la MIC. Las pruebas de la MIC se realizaron por triplicado de acuerdo con CLSI (2012).

3.2.2.5. Determinación de la concentración bacteriana mínima (MBC)

La determinación de MBC se llevó a cabo transfiriendo alícuotas de 10 µL de suspensiones bacterianas de los tubos de ensayo a placas Petri que contienen agar Mueller Hinton (MH). Las placas se incubaron a 37 °C durante 5 días en condiciones anaerobias. El MBC se define como la concentración más baja que no muestra crecimiento celular en la superficie de agar inoculado. Las pruebas se realizaron por triplicado.

3.2.3. Actividad Antiinflamatoria

3.2.3.1. Solución de glóbulos rojos o eritrocitos al 40 %

En la preparación de la solución de eritrocitos al 40 % se realizaron ciertas modificaciones en el método realizado por **Kumar et al. (2011)**. Se extrajeron 5 ml de sangre de un paciente voluntario sano con previo consentimiento informado, sin ingerir medicamentos antiinflamatorios al menos durante los anteriores 15 días. La sangre se colocó en un tubo de 5 ml con anticoagulante EDTA (MONOJECT, USA) y se centrifugó durante 5 minutos en la centrífuga (Hettich Zentrifugen, Germany) a 3000 rpm. Con una micropipeta se procedió a retirar el sobrenadante o plasma sanguíneo, y a los eritrocitos precipitados se añadió 3 ml de solución tampón fosfato (PBS) pH 7,4; se mezcla el contenido y nuevamente se lleva a centrifugar durante 5 minutos a 3000 rpm, el proceso de lavado de los eritrocitos se repitió 4 veces. En el último lavado se preparó la solución de eritrocitos al 40 % en PBS.

3.2.3.2. Determinación de la actividad antiinflamatoria por el método de estabilización de la membrana de los glóbulos rojos o eritrocitos

El método desarrollado por **Rashid et al. (2011)** y con algunas modificaciones realizadas en dicha metodología, se determinó el porcentaje de actividad antiinflamatoria del extracto vegetal. Se preparó una solución del extracto vegetal en PBS a una concentración de 40 mg/ml, esta fue la solución madre. Partiendo de ésta solución, se preparó 30 ml de solución del extracto vegetal en PBS a distintas concentraciones (1; 1,5; 2; 2,5 mg/ml). Para la solución antiinflamatoria patrón o testigo se utilizó aspirina de 500 mg, de la cual se realizaron soluciones con las mismas concentraciones del extracto vegetal a evaluar. Para cada experimento se utilizaron 3 tubos: Abs1, Abs2 y Abs3. En Abs1 y Abs2 se añadió 3 ml del extracto vegetal y para Abs3 3 ml de PBS, a los 3 tubos se adicionaron 30 µL de la solución de glóbulos rojos al 40 % y se mezcló ligeramente el contenido de los tubos. Los tubos Abs2 y Abs3 se llevaron a baño María a 54 °C durante 20 minutos, la temperatura induce a la lisis de los eritrocitos en ausencia de un antiinflamatorio. Mientras que Abs1

no se sometió a calor y se dejó reposar durante 20 minutos. Seguido, los tubos se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm. Se midieron las absorbancias de los sobrenadantes en el espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 540 nm. Se utilizó como blanco de lectura PBS. Los valores fueron registrados para aplicar la ecuación (**Ec. 2**) para la determinación del porcentaje de actividad antiinflamatoria.

$$\% \text{ Actividad antiinflamatoria} = 100 * \left(1 - \frac{Abs_2 - Abs_1}{Abs_3 - Abs_1} \right) \quad [\text{Ec. 2}]$$

Donde:

Abs1: Tubo sin extracto sin calentar

Abs2: Tubo con extracto sometido a temperatura

Abs3: Tubo control sometido a temperatura (**Rashid et al., 2011**)

3.3.- Diseño Experimental

Se seleccionó un extracto vegetal de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L) con 5 diferentes concentraciones para evaluar el efecto antibacteriano que tiene sobre 5 cepas diferentes de microorganismos patógenos bacterias Gram-positivas: *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. aureus*, y Gram-negativas: *E. coli* y *P. aeruginosa*.

Para el desarrollo del estudio se utilizó el siguiente diseño experimental: factorial (AxB), los datos obtenidos se evaluaron mediante el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI.I. Donde:

- El Factor A son las concentraciones (100 %, 75 %, 50 %, 25 % y 10 %) de extracto vegetal de Mangle Rojo.
- El Factor B son las 5 cepas de microorganismos que fueron utilizadas para los ensayos.

Mientras que para el estudio de la actividad antiinflamatoria se realizó un análisis de varianza con una tabla ANOVA simple, para evidenciar el mejor tratamiento (concentración del extracto seco de mangle rojo) para la actividad

biológica evaluada. El programa estadístico utilizado fue Statgraphics Centurion XVI.I. Para cada ensayo evaluado se trabajó con 3 réplicas.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- Análisis y discusión de los resultados

4.1.1.- Determinación de fenoles totales

Mediante el método de Folin-Ciocalteu se determinó la concentración de fenoles totales del extracto total seco de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L) a nivel de laboratorio, para lo cual se realizó una curva estándar con diferentes concentraciones de ácido Gálico con sus respectivas absorbancias como se muestra en la Figura 2, los valores medidos de absorbancia se muestran en el Anexo I.

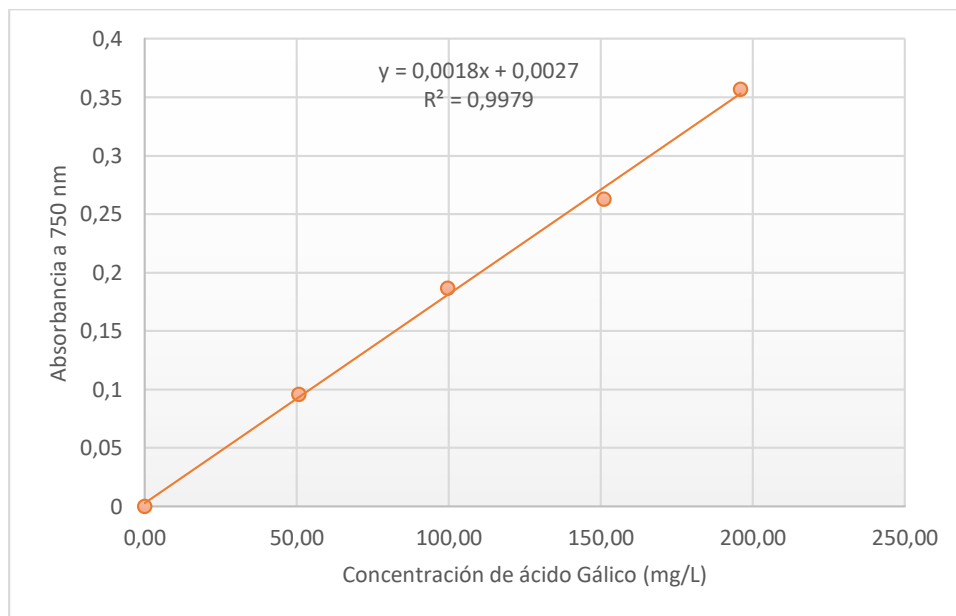


Figura 2. Curva de calibración de ácido Gálico por el método Folin-Ciocalteu.

La cantidad de fenoles totales del extracto total seco dió como resultado un valor de $338,31 \pm 4,24$ mg GAE/g, que se expresa en mg de equivalentes de de ácido Gálico por g de extracto total seco de mangle rojo. El valor de

absorbancia obtenido fue de 0,612 a una longitud de onda de 750 nm, la concentración de polifenoles se obtuvo mediante la ecuación presentada en la Figura 2.

La concentración de polifenoles que presenta el extracto total seco de mangle rojo es alta en comparación con otras fuentes naturales que contienen polifenoles, como las hortalizas, entre ellas el tomate riñón (*Solanum lycopersicum* L) que contiene $151,62 \pm 31,81$ mg GAE/g (**Ferrer et.al., 2016**), así como también se han cuantificado los polifenoles de otras especies vegetales utilizadas como plantas medicinales como son las especies de siemprevivas (*Sempervivum*) con una concentración de $0,1304 \pm 0,0201$ mg GAE/g (**Márquez et.al., 2012**). También se han realizado estudios de cuantificación de polifenoles en frutas, tales como: ciruela roja (249 ± 67 mg GAE/g) y zapote (258 ± 124 mg GAE/g) y fresa (238 ± 86 mg GAE/g). (**Vasco, Ruales, y Kamal-Eldin, 2008**). Estos valores demuestran que el contenido de polifenoles totales que contienen las cortezas de *Rhizophora mangle* L fue alta por lo que sería una fuente muy importante de obtención de polifenoles para la industria farmacéutica, siempre y cuando el uso de esta planta sea racional y sostenible con el medio ambiente.

Según estudios realizados por **Cruz et.al. (2015)** en relación al contenido de polifenoles totales de las cortezas de mangle rojo de San Carlos, Guatemala se obtuvo un valor de $538,9 \pm 40,3$ mg GAE/g, comparándolo con la concentración de polifenoles totales del presente estudio de $338,31 \pm 4,24$ mg GAE/g, se observó una diferencia entre estos valores que puede relacionarse al diferente uso de disolvente para su extracción, puesto que el primer estudio lo realizaron con etanol y en este estudio la extracción se hizo con agua; otra razón puede ser el lugar de procedencia de la materia prima (mangle rojo).

4.1.2. Actividades Biológicas

4.1.2.1.- Evaluación de la Actividad Antimicrobiana del extracto total seco de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L) frente a bacterias patógenas

Numerosos estudios han demostrado que las plantas presentan compuestos bioactivos que permiten controlar o matar microorganismos patógenos, entre estos compuestos están los polifenoles que se han encontrado en diferentes fuentes vegetales, atribuyendo que poseen actividad antimicrobiana frente a bacterias *Gram* positivas y *Gram* negativas, y además provocan inhibición en el crecimiento de microorganismos psicotroforos, coliformes y coliformes fecales. (Pokorny, Yanishlieva, y Gordon, 2005)

Se menciona que la ubicación y el número de radicales hidroxilo en el grupo fenólico está estrechamente relacionado con la toxicidad de los polifenoles contra los microorganismos. (Barranco, 2004)

4.1.2.1.1.- Determinación de la medida del diámetro del halo de inhibición

El efecto antimicrobiano que poseen algunas fuentes vegetales ha sido atribuido a compuestos fenólicos, tales como: taninos, ácidos fenólicos de bajo peso molecular, flavonoides, antocianinas, etc., presentes en diferentes partes de la planta. (Osorio *et.al.*, 2011).

Los resultados del experimento se detallan a continuación en la Tabla 6.

Tabla 6. Medida del Halo de Inhibición a diferentes concentraciones de *Rhizophora mangle* L

Concentración del extracto de <i>Rhizophora mangle</i> L (%)	<i>S. aureus</i> (mm)	<i>L. monocytógenes</i> (mm)	<i>B. cereus</i> (mm)	<i>E. coli</i> (mm)	<i>P. aeruginosa</i> (mm)
100	16,33±0,58	14,67±0,58	19,33±0,58	0,00±0,00	0,00±0,00
75	14,67±0,58	13,00±0,00	16,33±1,53	0,00±0,00	0,00±0,00
50	10,67±0,58	9,67±0,58	15,33±0,58	0,00±0,00	0,00±0,00
25	9,33±0,58	0,00±0,00	14,00±1,00	0,00±0,00	0,00±0,00
10	0,00±0,00	0,00±0,00	10,33±1,15	0,00±0,00	0,00±0,00
Control +	28,67±0,58	29,67±0,58	28,33±0,58	33,00±0,00	28,00±0,00
Control -	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

La medida del halo de inhibición fue una clara prueba del efecto inhibitorio que presenta el extracto total seco de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L). Así se observó que el antibacteriano vegetal tuvo un efecto positivo frente a la cepas de *S. aureus* (ATCC® 25923™), *L. monocytogenes* (ATCC® 19115™) y *B. cereus* (ATCC® 10876™), mientras que para las cepas de *E. coli* (ATCC® 25922™) y *P. aeruginosa* (ATCC® 10145™) no existió un efecto inhibitorio, porque no se observó la formación de un halo de inhibición. Deduciendo que el extracto seco de mangle rojo actúa sobre bacterias *Gram* positivas, a las concentraciones previamente establecidas (Tabla 6). Una de las posibles razones por las que el extracto no actuó en bacterias *Gram* negativas fue porque dichas bacterias presentan compuestos anfipáticos que funcionan como bombas de expulsión de diversas sustancias, por lo cual, el antibacteriano es expulsado de manera inmediata, sin alcanzar a cumplir el efecto. **(Domingo y López, 2003)**

En la Tabla 6 se observa que la actividad antimicrobiana varía entre microorganismos, puesto que la inhibición del crecimiento de *S. aureus*, empieza a una concentración de polifenoles de $56,385 \pm 4,24$ mg/ml (25 % de extracto total seco de *Rhizophora mangle* L) formando un halo de inhibición de $9,33 \pm 0,58$ mm, en comparación con lo reportado por **Armenteros y Ginori, (1999)**, quienes informan que la inhibición del crecimiento de *S. aureus* empieza a una concentración de 8 mg/ml en presencia de extractos de mangle rojo, la variación de estos valores se puede deber al lugar de procedencia del material vegetal.

En comparación con extractos acuosos de otras fuentes vegetales como es la ruda (*Ruta graveolens*) sobre la inhibición de crecimiento de *S. aureus*, presenta un halo de 9 a 10 mm de diámetro con una concentración de 20 mg/ml. La ruda contiene una cantidad alta en polifenoles por lo que sería una alternativa muy eficiente en el área fito-farmacológica. **(Alzoreky y Nakahara, 2003; Bonjar, Aghighi, y Karimi, 2004).**

Los resultados de la inhibición obtenidos para *L. monocytogenes* (ATCC® 19115™) son a partir de una concentración de polifenoles de

112,770±4,24 mg/ml con una concentración de 50 % de extracto total seco de *Rhizophora mangle* L (Tabla 6), la comparación bibliográfica se realizó con los datos reportados por **Choez y Ortiz, (2015)**, que indican que a una concentración del 25 % de extracto de mango (*Mangifera indica*) con quitosano al 5 % forma un halo de inhibición de 9 mm, esta comparación se realizó porque no existen estudios realizados de la actividad antimicrobiana del extracto de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L) frente a *L. monocytogenes*.

El extracto de mangle presentó una actividad antimicrobiana frente a *B. cereus* desde la concentración más baja de este estudio (10 % de extracto total seco de *Rhizophora mangle* L), lo que representa una concentración de polifenoles de 22,554±4,24 mg/ml con un halo de inhibición de 10,33±1,15 mm, estos valores fueron comparados con la actividad antimicrobiana de aceites esenciales que contienen compuestos fenólicos siendo este similar a lo obtenido en el presente estudio; el valor de halo de inhibición fue de 11 mm a una concentración de polifenoles de 25 mg/ml. (**Ramírez et.al., 2009**)

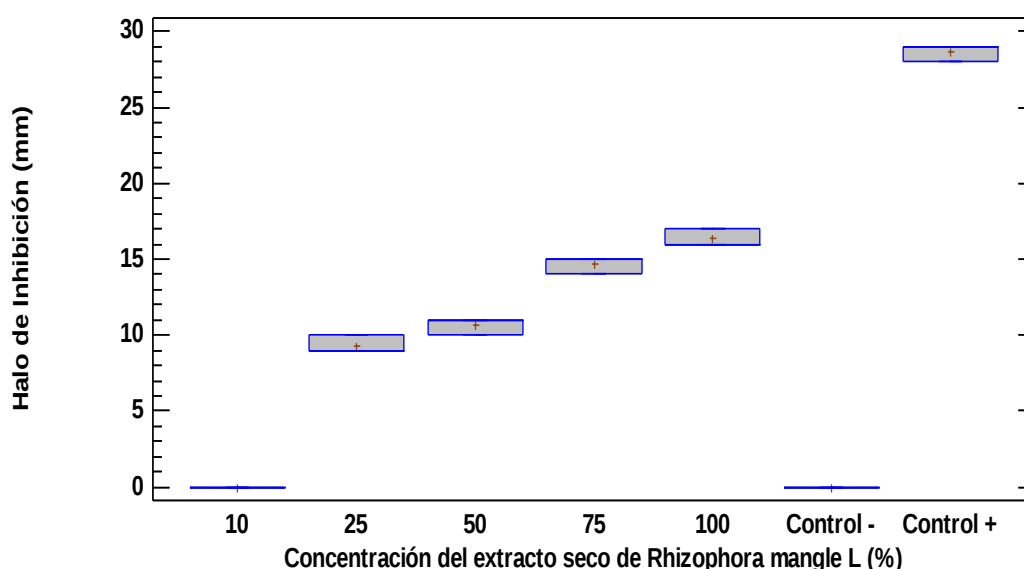


Figura 3. Medida del halo de inhibición para *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™) a diferentes concentraciones de *Rhizophora mangle* L. Como control negativo se usó agua estéril y como control positivo se usó Gentamicina 500 µg/ml. Mediante un análisis de varianza ANOVA simple existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias, con un nivel de confianza del 95 % y un valor de $P < 0,05$.

La Figura 3 muestra que el control positivo tiene un mayor halo de inhibición, siendo este de $28,67 \pm 0,58$ mm, en comparación con la concentración más alta del extracto seco de mangle rojo (100 %) dando un halo de inhibición de $16,33 \pm 0,58$ mm para *S. aureus*. El control negativo presentó un resultado idéntico a una concentración del 10 % del extracto de mangle rojo.

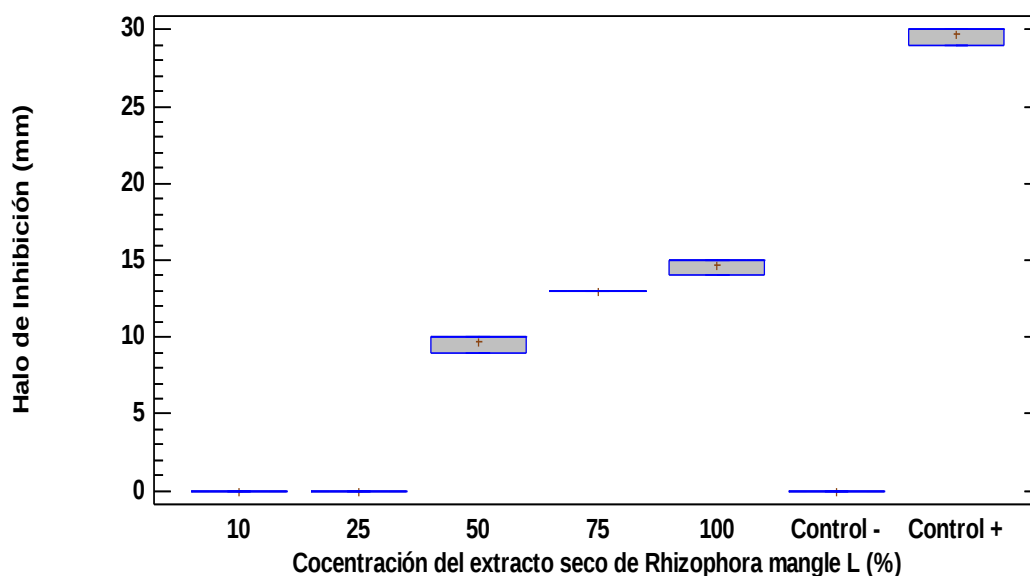


Figura 4. Medida del halo de inhibición para *Listeria monocytogenes* (ATCC® 19115™) a diferentes concentraciones de *Rhizophora mangle* L. Como control negativo se usó agua estéril y como control positivo se usó Gentamicina 500 µg/ml. Mediante un análisis de varianza ANOVA simple existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias, con un nivel de confianza del 95 % y un valor de $P < 0,05$.

En la Figura 4 se observa que el control positivo tiene un mayor halo de inhibición, siendo este de $29,67 \pm 0,58$ mm, en comparación con la concentración más alta del extracto seco de mangle rojo (100 %) dando un halo de inhibición de $14,67 \pm 0,58$ mm para *L. monocytogenes*. El control negativo presentó un resultado idéntico a una concentración del 10 y 25 % del extracto de mangle rojo, por lo que se concluye que a estas concentraciones no existe actividad antimicrobiana.

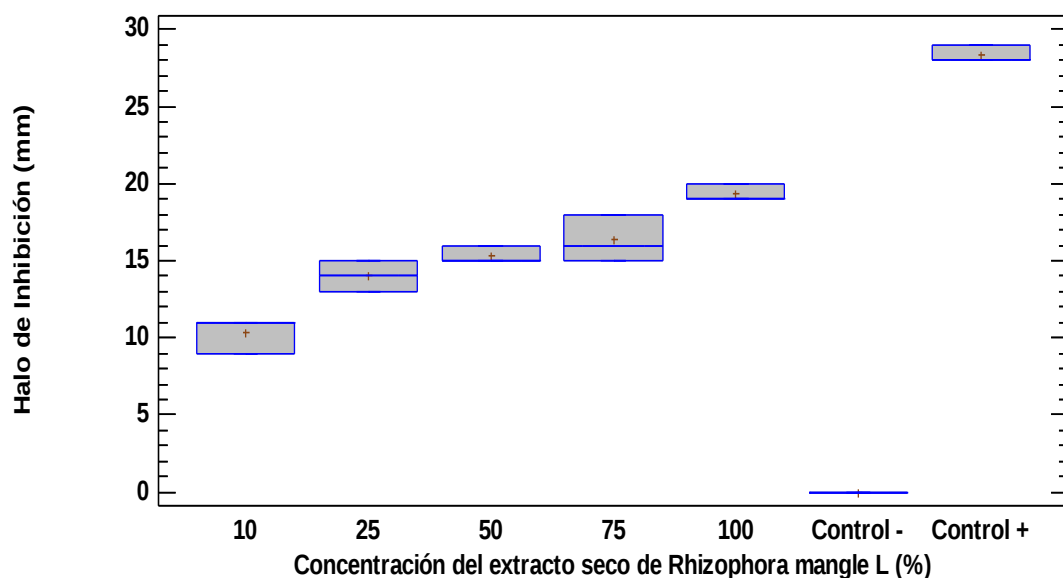


Figura 5. Medida del halo de inhibición para *Bacillus cereus* (ATCC® 10876™), a diferentes concentraciones de *Rhizophora mangle* L. Como control negativo se usó agua estéril y como control positivo se usó Gentamicina 500 µg/ml. Mediante un análisis de varianza ANOVA simple existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias, con un nivel de confianza del 95 % y un valor de $P < 0,05$.

En la Figura 5 se observa que todas las concentraciones utilizadas en el experimento, el extracto de mangle rojo tiene efecto inhibitorio sobre la cepa de *B. cereus*.

4.1.2.1.2.- Determinación del porcentaje de inhibición de acuerdo a la medida del diámetro del halo de inhibición

El porcentaje de inhibición bacteriana se calculó de acuerdo a la **Ec. 1**

Los resultados del porcentaje de inhibición para cada microorganismo de acuerdo a la concentración de extracto de mangle rojo se detallan en la Tabla 7.

Tabla 7. Porcentaje de inhibición a diferentes concentraciones de extracto de *Rhizophora mangle* L

Concentración del extracto de <i>Rhizophora mangle</i> L (%)	<i>S.aureus</i> (%)	<i>L. monocytógenes</i> (%)	<i>B. cereus</i> (%)	<i>E. coli</i> (%)	<i>P. aeruginosa</i> (%)
100	40,30±2,79	30,78±2,66	55,73±2,84	0,00±0,00	0,00±0,00
75	32,27±2,47	23,07±0,00	40,97±7,51	0,00±0,00	0,00±0,00
50	12,92±2,79	7,71±2,66	36,06±2,84	0,00±0,00	0,00±0,00
25	6,43±2,79	0,00±0,00	29,51±4,92	0,00±0,00	0,00±0,00
10	0,00±0,00	0,00±0,00	11,46±5,68	0,00±0,00	0,00±0,00

El porcentaje de inhibición se determinó de acuerdo al método de difusión de disco-placa (pocillos), que es un método muy utilizado ya que concentra y difunde mayor cantidad del extracto ensayado, facilitando la evaluación de su potencial antibacteriano y a su vez este método es altamente reproducible. (Cruz-Carrillo, Rodríguez, y Rodríguez, 2010)

La actividad antimicrobiana se considera alta cuando su porcentaje de inhibición es >70 %, intermedia entre el 50-70 % y baja cuando es <50 %. (Ramírez y Díaz, 2007). De acuerdo con el autor se determinó de manera cualitativa la actividad antimicrobiana en alta, intermedia y baja como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Determinación cualitativa en base a los resultados del porcentaje de inhibición del extracto seco de *Rhizophora mangle* L según Ramírez y Díaz, (2007)

Concentración del extracto de <i>Rhizophora mangle</i> L (%)	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytógenes</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
100	+	+	++	+	+
75	+	+	+	+	+
50	+	+	+	+	+
25	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+

+++ = Inhibición alta >70%

++ = Inhibición intermedia entre 50-70%

+ = Inhibición baja <50%

4.1.2.1.3.- Selección de la cepa que presenta mayor inhibición de crecimiento con el extracto seco de *Rhizophora mangle* L

Con todos los resultados obtenidos de la actividad antimicrobiana se eligió la mejor concentración con la que actúa el extracto total seco de mangle rojo *Rhizophora mangle* L y también se seleccionó la cepa que presenta una mayor inhibición con el extracto ensayado.

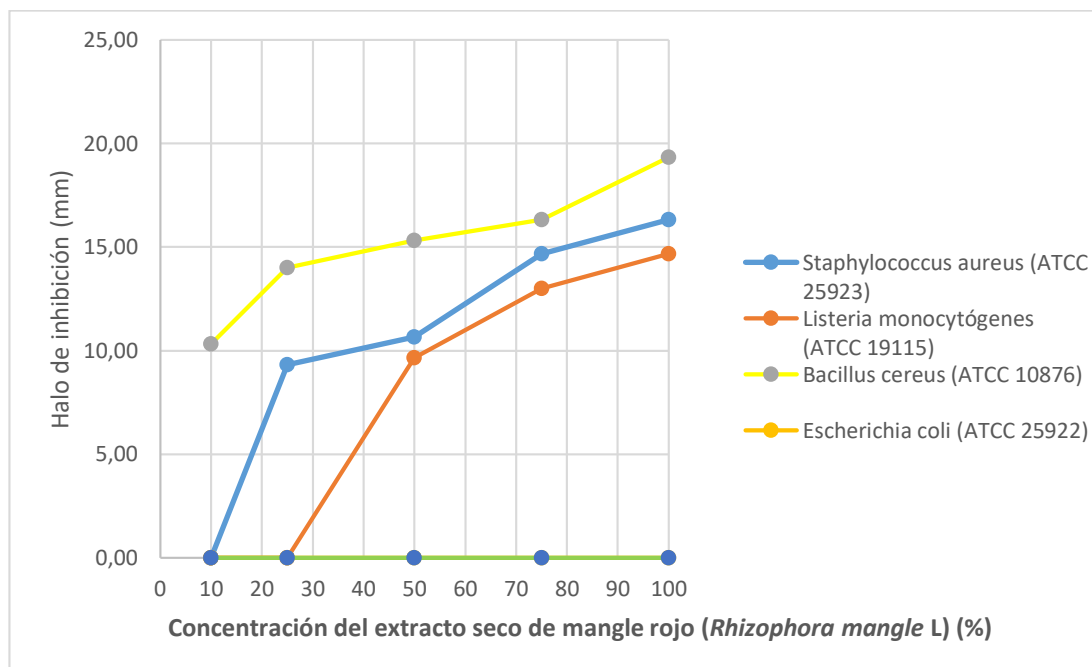


Figura 6. Concentración del extracto total seco de *Rhizophora mangle* L (%) vs Halo de inhibición (mm) utilizando 5 cepas diferentes de bacterias patógenas Gram negativas y Gram positivas. Como control negativo se usó agua estéril y como control positivo se usó Gentamicina 500 µg/ml. Mediante un diseño factorial AxB se realizó un análisis de varianza ANOVA y se determinó que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias, con un nivel de confianza del 95 % y un valor de $P < 0,05$.

En la Figura 6 se observa claramente que el microorganismo que presenta una mayor inhibición de crecimiento es el *B. cereus*, ya que a la menor concentración establecida en el estudio (10 % del extracto total seco de *Rhizophora mangle* L) presenta la formación de un halo de inhibición que fue de $10,33 \pm 1,15$ mm, y que al comparar con las demás bacterias, es la única cepa que presenta una zona de inhibición a esta concentración. También se puede resaltar que el extracto actuó de mejor manera en bacterias Gram

positivas, puesto que *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *B. cereus* si presentaron una zona de inhibición por la actividad antimicrobiana que presentó el extracto vegetal de mangle rojo, mientras que para las cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa* que son bacterias *Gram* negativas no se formó ninguna zona de inhibición. Otras posibles explicaciones de estos resultados puede ser, porque el compuesto activo no alcanzó el sitio de acción o bien, las porinas impidieron el paso del principio activo al interior de la célula. **(Cruz-Carrillo et al., 2010)**. Otros autores **(Alzoreky y Nakahara, 2003)** explican que las bacterias *Gram* negativas suelen ser más resistentes en estos experimentos, debido a la presencia de liposacáridos en su membrana externa.

4.1.2.1.4.- Determinación de la concentración mínima inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria (MIC) es la concentración más baja de un antimicrobiano específico necesaria para inhibir el crecimiento de un organismo de prueba. **(Naveda, 2010)**

La determinación de la MIC se realizó por método de dilución líquida. Para ello se tomó en cuenta los resultados obtenidos de los ensayos de inhibición, ya que a partir del porcentaje de la concentración del extracto total seco de mangle rojo con la que formó el menor halo de inhibición bacteriana, se realizaron las diluciones seriadas del extracto vegetal.

Los ensayos para la MIC se realizaron para las bacterias *Gram* positivas, ya que fueron las bacterias que si presentaron una zona de inhibición con el extracto total seco de *Rhizophora mangle* L. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Medida de la Absorbancia a 600 nm para la determinación de la MIC

Dilución	<i>S. aureus</i>		<i>L. monocytógenes</i>		<i>B. cereus</i>	
	25 %	50 %	50 %	75 %	10 %	25 %
1/10	0,556±0,068	0,470±0,018	0,837±0,070	0,479±0,043	0,676±0,058	0,369±0,004
1/100	0,807±0,019	0,777±0,029	0,975±0,009	0,810±0,010	0,696±0,031	0,589±0,027
1/1000	0,849±0,023	0,795±0,031	0,957±0,019	0,818±0,048	0,690±0,024	0,672±0,013
1/10000	0,826±0,035	0,871±0,038	0,898±0,029	0,921±0,102	0,691±0,015	0,666±0,051
1/100000	0,904±0,030	0,866±0,040	0,891±0,024	0,920±0,120	0,705±0,036	0,681±0,036
Control +	0,051±0,033		0,049±0,047		0,027±0,029	
Control -	0,827±0,067		0,974±0,051		0,689±0,042	

La MIC se determinó de acuerdo a la medida de la absorbancia de cada uno de los tubos que contenía el inóculo de bacterias en presencia del extracto de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L). Según **Bontempo et al. (2013)** para determinar la MIC se escoge el valor de absorbancia menor que se obtuvo con cada una de las cepas estudiadas con las diferentes diluciones de extracto total seco de mangle rojo que se establecieron. Para cada una de las diluciones del extracto vegetal de *Rhizophora mangle* L se realizó un blanco, ya que este tiene un color fuerte y esto puede interferir con la medida de la absorbancia.

El valor de la absorbancia con la que se determinó la concentración mínima inhibitoria para *S. aureus* es de 0,470±0,018, lo que representa una MIC en relación concentración de polifenoles de 11,23 mg/ml, lo que concuerda con lo reportado por **Armenteros y Ginori, (1999)**; la absorbancia obtenida para *L. monocytógenes* es de 0,479±0,043, lo que representa una concentración de polifenoles de 16,92 mg/ml y la absorbancia reportada para *B. cereus* es de 0,369±0,004 que indica un valor de la MIC de 5,63 mg/ml que representa la concentración de polifenoles de extracto seco de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L).

4.1.2.1.5.- Determinación de la concentración bacteriana mínima (MBC)

La MBC se define como la concentración de muestra más baja que no muestra crecimiento celular en la superficie de agar inoculado. (**Ferreira et al., 2011**)

A una dilución de 1 en 10 las bacterias *Gram* positivas, *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *B. cereus* presentan un crecimiento bacteriano mínimo, representado por las UFC/ml. Los resultados se detallan en la Tabla 10.

Tabla 10. Cuantificación de las UFC/ml inhibidas a diferentes concentraciones del extracto seco de *Rhizophora mangle* L

Dilución	<i>S. aureus</i>		<i>L. monocytógenes</i>		<i>B. cereus</i>	
	25 %	50 %	50 %	75 %	10 %	25 %
1/10	9,08E+08± 1,36E+08	7,36E+08± 3,50E+07	1,47E+09± 1,39E+08	7,54E+08± 8,54E+07	1,15E+09± 1,15E+08	5,34E+08± 7,21E+06
1/100	1,41E+09± 3,83E+07	1,35E+09± 5,80E+07	1,75E+09± 1,83E+07	1,42E+09± 2,00E+07	1,19E+09± 6,24E+07	9,74E+08± 5,40E+07
1/1000	1,49E+09± 4,69 E+07	1,39E+09± 6,24E+07	1,71E+09± 3,83E+07	1,43E+09± 9,64E+07	1,18E+09± 4,83E+07	1,14E+09± 2,51E+07
1/10000	1,45E+09± 6,92 E+07	1,54E+09± 7,69E+07	1,59E+09± 5,82E+07	1,64E+09± 2,03E+08	1,18E+09± 3,03E+07	1,13E+09± 1,02E+08
1/100000	1,45E+09± 5,90 E+07	1,53E+09± 7,98E+07	1,58E+09± 4,81E+07	1,64E+09± 2,41E+08	1,21E+09± 7,13E+07	1,16E+09± 7,29E+07

4.1.2.2.- Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria del extracto total seco de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L)

La inflamación es una respuesta protectora, cuyo principal objetivo es librar al organismo del elemento causante del daño celular, como microbios y toxinas, y de las consecuencias de ese daño, con formación de células y tejidos necróticos. **(Enciso y Arroyo, 2011)**

Los lisosomas son componentes celulares que están formados por enzimas proteolíticas y cuando estos se ven afectados por procesos inflamatorios su membrana lisosomal tiende a sufrir lisamiento, y por lo tanto causa afecciones a tejidos adyacentes. **(Kumar et al., 2011)**

En la Figura 7 se presentan los resultados sobre el porcentaje de actividad antiinflamatoria que tiene el extracto total seco de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L) a diferentes concentraciones, como control positivo se usó la aspirina que es un antiinflamatorio comercial.

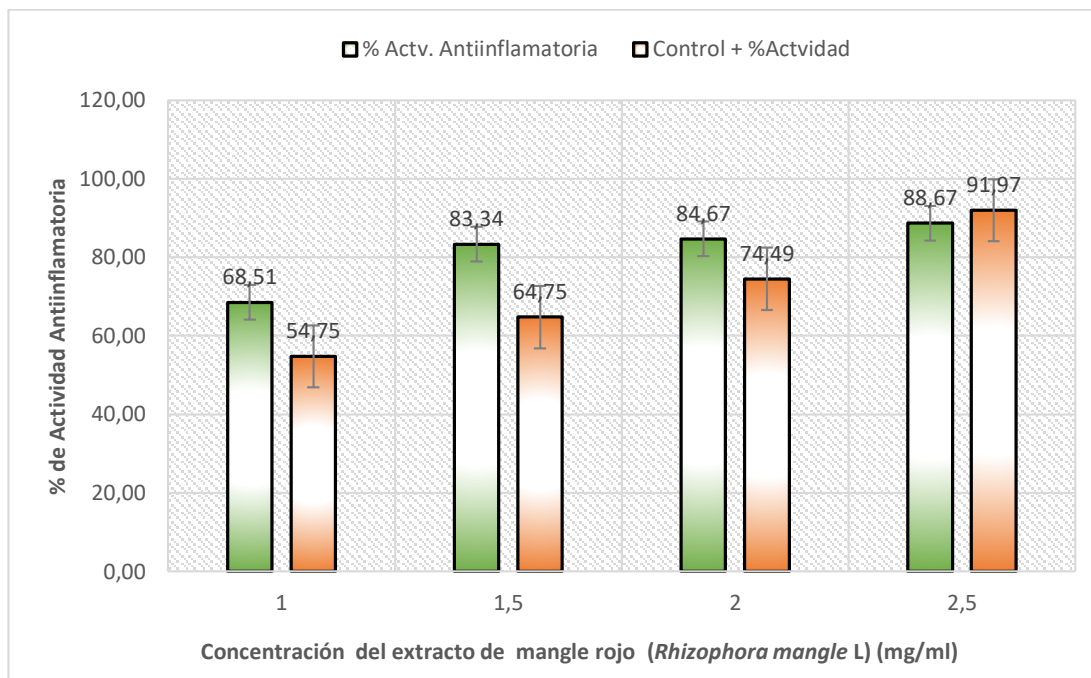


Figura 7. Comparación de la actividad antiinflamatoria del extracto total seco de *Rhizophora mangle* L a diferentes concentraciones, como control positivo se usó la aspirina. Mediante un análisis de varianza ANOVA simple con un nivel de confianza del 95 % y con un valor de $P > 0.05$

En la Figura 7 se observa que no existe una diferencia significativa entre la concentración de 1,5 y 2 mg/ml del extracto total seco de mangle rojo *Rhizophora mangle* L, obteniendo un porcentaje de actividad antiinflamatoria de 83,34 y 83,67 % respectivamente, en comparación con el control positivo (aspirina) el porcentaje de actividad antiinflamatoria que presenta el extracto vegetal a las concentraciones de 1; 1,5 y 2 mg/ml es significativamente más alto como se observa en la Figura 7.

Los resultados obtenidos del porcentaje de actividad antiinflamatoria se pueden deber al contenido de polifenoles del extracto de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L). Según **Parvin et al. (2015)** se han mostrado efectos antiinflamatorios por parte de flavonoides y taninos, mientras que **Regalado et al. (2016)** mencionan que evaluaron la actividad inhibitoria *in vitro* de la ciclooxigenasa-2 y fosfolipasa-A2, donde la fracción polifenólica mostró el 84 % de inhibición de la enzima ciclooxigenasa-2, mientras que el extracto

acuoso de la corteza y la fracción polifenólica mostraron una actividad inhibitoria dependiente de la dosis de la secreción de fosfolipasa-A2.

Oyedapo et.al. (2010) suponen que el efecto estabilizador de la membrana podría corresponder a la unión, mediante cargas, de los componentes del extracto vegetal con la membrana del eritrocito, permitiendo proteger a la membrana de agentes que estén involucrados en la lisis de la misma. Se ha demostrado que los taninos y saponinas poseen la capacidad de enlazar cationes, por lo que podrían estabilizar la membrana de los eritrocitos, al igual que los flavonoides y polifenoles.

4.2.- Verificación de la hipótesis

Con los resultados obtenidos en la parte experimental *in vitro* de las actividades biológicas (antimicrobiana y antiinflamatoria) se determinó que:

$H_0 \neq 0$ La hipótesis nula se rechaza

$H_a = 0$ La hipótesis alternativa se acepta

Lo que indica que el extracto total seco de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L), si presentó actividad antimicrobiana y también actividad antiinflamatoria.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1.- Conclusiones

- Se cuantificaron los polifenoles totales del extracto total seco de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L) por el método de Folin-Ciocalteu obteniéndose una concentración de $338,31 \pm 4,24$ mg GAE/g.
- Se determinó la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto total vegetal de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L) por el método de difusión en disco-placa frente a bacterias patógenas. El extracto vegetal tuvo efecto inhibitorio frente a bacterias Gram positivas *Listeria monocytogenes* (ATCC® 19115™), *Bacillus cereus* (ATCC® 10876™), *Staphylococcus aureus subsp. aureus Rosenbach* (ATCC® 25923™), mientras que frente a bacterias Gram negativas no tuvo efecto antibacteriano.
- La MIC del extracto total vegetal de Mangle rojo (*Rhizophora mangle* L) se estimó por el método de dilución líquida sobre bacterias patógenas, registrando una MIC de 11,23 mg/ml para *S. aureus* (ATCC® 25923™), una MIC de 16,92 mg/ml para *L. monocytogenes* (ATCC® 19115™) y 5,63 mg/ml para *B. cereus* (ATCC® 10876™)
- La actividad antiinflamatoria del extracto total vegetal de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L) se determinó sobre eritrocitos humanos mediante el método de estabilización de la membrana. El porcentaje de actividad antiinflamatoria a una concentración de 1; 1,5 y 2 mg/ml de extracto vegetal fue de 68,51, 83,34 y 84,67 %, respectivamente, por lo que al comparar con el control positivo (aspirina) se obtuvo que el extracto vegetal tiene un mayor porcentaje de actividad antiinflamatoria.

5.2.- Recomendaciones

- Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto seco de mangle rojo a concentraciones más altas en microorganismos *Gram* negativos.
- Efectuar estudios antibacterianos y antiinflamatorios de manera *in vivo* del extracto seco de mangle rojo
- Evaluar la citotoxicidad de los polifenoles del extracto seco de mangle rojo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adámez, J. D., Samino, E. G., Sánchez, E. V., & González-Gómez, D. (2012). In vitro estimation of the antibacterial activity and antioxidant capacity of aqueous extracts from grape-seeds (*Vitis vinifera* L.). *Food Control*, 24(1–2), 136–141.
- Alzoreky, N. S., & Nakahara, K. (2003). Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International Journal of Food Microbiology*, 80(3), 223–230.
- Argueta, A., Cano, A., & Rodarte, L. (2009). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. *BIBLIOTECA DIGITAL de La Medicina Tradicional Mexica*.
- Armenteros, M., & Ginori, M. C. (1999). Determination of the minimum inhibitory concentration of *Rhizophora mangle* L.(Red mangrove) against different microorganisms. Letter to the editor. *Revista de Salud Animal (Cuba)*.
- Barranco, S. L. (2004). Búsqueda de compuestos antimicrobianos en *Heterotheca inuloides*, *Gnaphalium oxyphyllum*, *Passiflora incarnata*, *Rosmarinus officinalis* y *Ruta graveolens*. Tesis de grado Licenciatura en Químico farmacobiología. 2004. México: Universidad de las Américas Puebla. Departamento de Química y Biología.
- Bonjar, S., Aghighi, S., & Karimi, A. (2004). Antibacterial and Antifungal Survey in used in Indigenous Herbal-Medicine of South East Regions of Iran. *University of Kerman, Asian Network for Scientific Information*, , 4, 405–412. Retrieved from http://researchrepository.murdoch.edu.au/id/eprint/15422/1/antibacterial_and_antifungal_survey_in_plants.pdf
- Bontempo, P., Carafa, V., Grassi, R., Basile, A., Tenore, G. C., Formisano, C., ... Altucci, L. (2013). Antioxidant, antimicrobial and anti-proliferative activities of *Solanum tuberosum* L. var. Vitelotte. *Food and Chemical*

Toxicology, 55, 304–312.

Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317–333.

Calderón, A., & Rodríguez, V. C. (2008). Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 21(4).

Choez, A., & Ortiz, C. (2015). Acción antimicrobiana de soluciones formadoras de recubrimientos comestibles a base de quitosano y extracto hidroalcohólico de mango (*Mangifera Indica*) frente a microorganismos de interés sanitario. Universidad de Guayaquil. Facultad Ciencias Químicas.

Chow, J.-M., Shen, S.-C., Huan, S. K., Lin, H.-Y., & Chen, Y.-C. (2005). Quercetin, but not rutin and quercitrin, prevention of H₂O₂-induced apoptosis via anti-oxidant activity and heme oxygenase 1 gene expression in macrophages. *Biochemical Pharmacology*, 69(12), 1839–1851.

CLSI. (2012). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 9(32), 88.

Cortés Castell, E., Veciana Galindo, C., Torro Montell, L., Sirvent Segura, E., Rizo Baeza, M. M., & Gil Guillén, V. (2014). Actividad antiinflamatoria de un extracto polifenólico de hueso de olivas en la línea celular de monocitos humanos THP1-XBLUE-CD14. *Nutrición Hospitalaria*. scieloes

Cruz-Carrillo, A., Rodríguez, N., & Rodríguez, C. E. (2010). In vitro evaluation of the antibacterial effect of *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* and *Silybum marianum*. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 13(2), 117–124.

Cruz, S. M., Marroquín, N., Alvarez, L. E., Chang, D. E., & Cáceres, A. (2015). Evaluation of Mangrove (*Rhizophora mangle* L.) products as coloring, antimicrobial and antioxidant agents. *Int J Phytocosmetics Nat*

Ingredients, 2(1), 12.

Cuyabeno Lodge. (2014). Manglares del Ecuador. Retrieved from <http://www.cuyabenolodge.com/turismo-amazonas/manglares-de-ecuador.htm>.

Domingo, D., & López, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Rev Esp Quimioterap*, 16(4), 385–393.

Donnenberg, M. S. (2002). Introduction Pp. I InDonnenberg, MS (Ed.) *Escherichia Coli: Virulence Mechanisms Of A Versatile pathogen*. Elsevier Ltd, UK. ISBN.

Duke, N. C., & Allen, J. A. (2006). *Rhizophora mangle*, *R. samoensis*, *R. racemosa*, *R. × harrisonii* (Atlantic–East Pacific red mangrove). *Species Profiles for Pacific Island Agroforestry*, 10, 1–18.

Enciso, E., & Arroyo, J. (2011). Efecto antiinflamatorio y antioxidante de los flavonoides de las hojas de *Jungia rugosa* Less (matco de puna) en un modelo experimental en ratas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 72(4), 231–7. Retrieved from <http://www.scielo.org.pe/pdf/afm/v72n4/a02v72n4>

Estrada, H., Ruiz, K., & González, D. (2011). Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales [Anti-inflammatory Activity of Natural Products]. *Plantas Medicinales y Aromáticas Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat*, 10(103), 182–217. Retrieved from www.blacpma.usach.cl

Ferreira, F., Santos, S., Barros, T., Rossi-Alva, J., & Fernandez, L. (2011). Atividade antibacteriana in vitro de extratos de *Rhizophora mangle* L. *Rev. Bras. Pl. Med*, 13(3), 305–310.

Ferrer, D., Fung, Y., Gómez, L., & Cuyper, A. (2016). CONTENIDO DE POLIFENOLES EN *Solanum lycopersicum* L. BAJO LA ACCIÓN DE UN CAMPO MAGNÉTICO ESTÁTICO. *Cultivos Tropicales: Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas*, 37, 142–147. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/1932/193246189019.pdf>

- Gaxiola, J. M. D. (2011). Una revisión sobre los manglares: características, problemáticas y su marco jurídico. Importancia de los manglares, el daño de los efectos antropogénicos y su marco jurídico: caso sistema lagunar de Topolobampo. *Ra Ximhai: Revista Científica de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sostenible*, 7(3), 355–369.
- Hood, R. D., Singh, P., Hsu, F., Güvener, T., Carl, M. A., Trinidad, R. R. S., ... Plemel, R. L. (2010). A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria. *Cell Host & Microbe*, 7(1), 25–37.
- Hutchinson, J. L., Rajagopal, S. P., Sales, K. J., & Jabbour, H. N. (2011). Molecular regulators of resolution of inflammation: potential therapeutic targets in the reproductive system. *Reproduction*, 142(1), 15–28.
- Jimenez, J. A. (1999). Ambiente, distribución y características estructurales en los manglares del Pacífico de Centro América: contrastes climáticos. *Ecosistemas de Manglar En América Tropical. Instituto de Ecología, AC Xalapa México, UICN/ORMA Costa Rica, NOAA/NMFS Silver Spring MD EUA*. P, 51–70.
- Khojah, H. M., Ahmed, S., Abdel-Rahman, M. S., & Elhakeim, E. H. (2018). Resveratrol as an effective adjuvant therapy in the management of rheumatoid arthritis: a clinical study. *Clinical Rheumatology*. Department of Clinical and Hospital Pharmacy, College of Pharmacy, Taibah University, Medina, Saudi Arabia: Springer London. <https://doi.org/10.1007/s10067-018-4080-8>
- Kumar, V., Bhat, Z. A., Kumar, D., Bohra, P., & Sheela, S. (2011). In-vitro anti-inflammatory activity of leaf extracts of *Basella alba* linn. Var. *alba*. *International Journal of Drug Development and Research*, 3(2).
- Márquez, J., Galván, M., Durón, S., & Flores, V. (2012). *Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de extractos de siempreviva* (6 No. 2). México. Retrieved from https://issuu.com/pina23/docs/contenido_de_polifenoles
- Naveda, G. F. (2010). Establecimiento de un proceso de obtención de extracto

de ruda (Ruda Graveolens), con alto contenido de polifenoles. QUITO/EPN/2010.

- Nijveldt, R. J., Van Nood, E. L. S., Van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Van Norren, K., & Van Leeuwen, P. A. M. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74(4), 418–425.
- Olguín, E. J., Hernández, M. E., & Sánchez-Galván, G. (2007). Contaminación de manglares por hidrocarburos y estrategias de biorremediación, fitorremediación y restauración. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 23(3), 139–154.
- OPS. (2002). Datos Básicos a Índices Compuestos: Una Revisión del Análisis de Mortalidad. *Organización Panamericana de La Salud*, 23.
- Osorio, E., Álvarez, V., Álvarez, L., & Giusti, M. (2011). Phenolics, betacyanins and antioxidant activity in *Opuntia joconostle* fruits. *Food Research International*, 44(7), 2160–2168.
- Ospina, F., Castro, L., Ocampo, J., Pájaro, Y., & Díaz, I. (2013). Actividad antiinflamatoria, antioxidante y antibacteriana de dos especies del género *Tabebuia*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. scielocu.
- Oyedapo, O. O., Akinpelu, B. A., Akinwunmi, K. F., Adeyinka, M. O., & Sipeolu, F. O. (2010). Red blood cell membrane stabilizing potentials of extracts of *Lantana camara* and its fractions. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 2(4), 46–51.
- Palleroni, N. J., Kunisawa, R., Contopoulou, R., & Doudoroff, M. (1973). Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 23(4), 333–339.
- Parvin, M. S., Das, N., Jahan, N., Akhter, M. A., Nahar, L., & Islam, M. E. (2015). Evaluation of in vitro anti-inflammatory and antibacterial potential of *Crescentia cujete* leaves and stem bark. *BMC Research Notes*, 8(1), 412.

- Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. (2005). Antioxidantes de los alimentos. *Zaragoza, España: Editorial Acribia. SA.*
- Porras, A. P., & López, A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Universidad de Las Américas*, 14. Retrieved from [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TsIA-3\(1\)-Porras-Loaiza-et-al-2009.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TsIA-3(1)-Porras-Loaiza-et-al-2009.pdf)
- Ramírez, L., Isaza, J., Veloza, L., Stashenko, E., & Martín, D. (2009). Actividad antibacteriana de aceites esenciales de diferentes orígenes de Colombia. *Ciencia: Refereed Scientific Journal from the Experimental Faculty of Sciences at La Universidad Del Zulia.*, 17(4). Retrieved from <http://www.produccioncientificaluz.org/index.php/ciencia/article/view/9960/9947>
- Ramirez, L. S., & Diaz, H. E. (2007). Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del ruibarbo (*Rumex conglomeratus*). *Scientia et Technica*, 1(33).
- Rashid, M. A., Sikder, M. M. A., Kaisar, M. A., Miah, M. K., Parvez, M. M., & Hossian, A. (2011). Membrane stabilizing activity-a possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of two Bangladeshi medicinal plants: *Mesua nagassarium* (Burm. F.) and *Kigelia pinnata* (Jack) Dc. *IJPRD*, 3, 1–5.
- Regalado, A. I., Sánchez, L. M., & Mancebo, B. (2016). *Rhizophora mangle* L.(mangle rojo): Una especie con potencialidades de uso terapéutico. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 4(1), 1–17.
- Roger, S., María, D., Rodríguez Perdomo, Y., Pérez Bueno, T., Riverón Alemán, Y., & Gastón Morales Lacarrere, I. (2011). Estabilidad acelerada de un gel de *Rhizophora mangle* L.(mangle rojo) para heridas y quemaduras. *Revista Cubana de Farmacia*, 45(4), 563–574.
- Sánchez, M. A. (2013). Efecto inhibitorio de *allium cepa* y *allium sativum* sobre cepas de *escherichia coli* y *salmonella enteritidis*.
- Tomás-Barberán, F. A. (2003). Los polifenoles de los alimentos y la salud.

Alimentación Nutrición y Salud, 10(2), 41–53.

- Vasco, C., Ruales, J., & Kamal-Eldin, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*, 111(4), 816–823. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2008.04.054>
- Yáñez-Arancibia, A., Twilley, R. R., & Lara Domínguez, A. L. (1998). Los ecosistemas de manglar frente al cambio climático global. *Madera y Bosques*, 4(2).

ANEXOS

Anexo I. Datos para la curva estándar de ácido Gálico

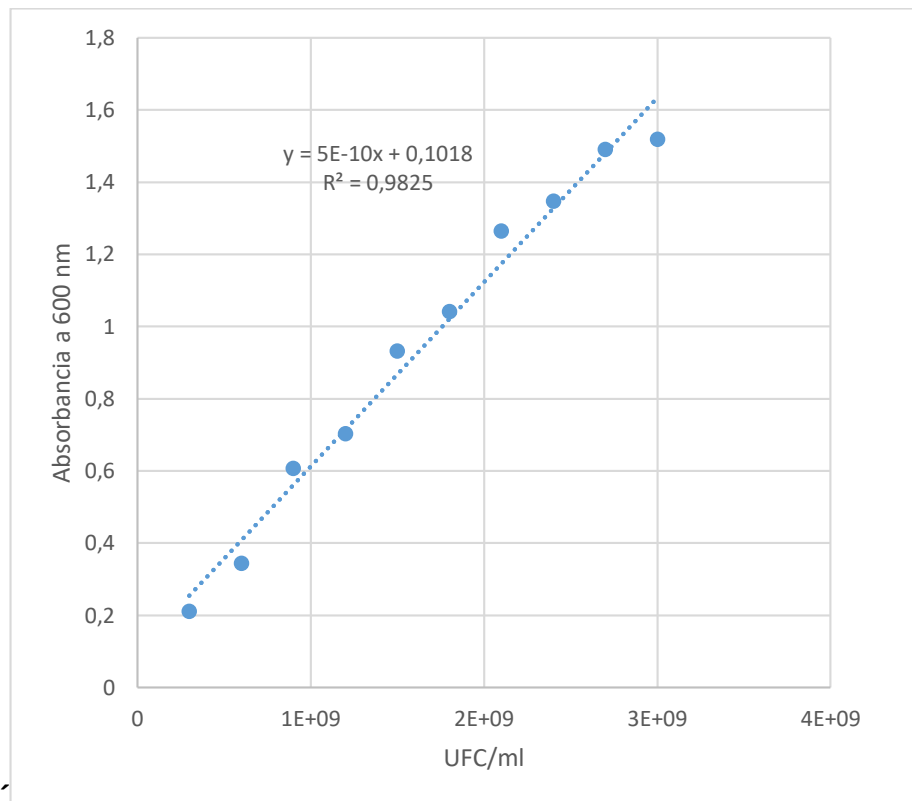
Concentración de ácido Gálico (mg/L)	Absorbancia a 750 nm
0,00	0,000±0,000
50,61	0,096±0,001
99,53	0,187±0,002
151,05	0,263±0,004
195,99	0,357±0,002

Anexo II. Concentraciones de polifenoles de acuerdo al porcentaje de extracto de *Rhizophora mangle* L (mg/ml)

Concentración del extracto total seco en %	Concentración de polifenoles en mg/ml
100	225,540±4,24
75	169,155±4,24
50	112,770±4,24
25	56,385±4,24
10	22,554±4,24

Anexo III. Escala McFarland y ecuación de la recta.

Tubo N°	UFC/ml	Absorbancia a 600 nm
1	3,00E+08	0,21
2	6,00E+08	0,343
3	9,00E+08	0,606
4	1,20E+09	0,702
5	1,50E+09	0,931
6	1,80E+09	1,04
7	2,10E+09	1,263
8	2,40E+09	1,346
9	2,70E+09	1,49
10	3,00E+09	1,518



Anexo IV. Fotografías de la parte experimental del proyecto de investigación

Activación de las cepas bacterianas 18 horas antes de los ensayos. (A) material utilizado y (B) Incubadora con agitación (Shaker Benchmark mini)



Siembra de los inóculos bacterianos para el ensayo de actividad antimicrobiana

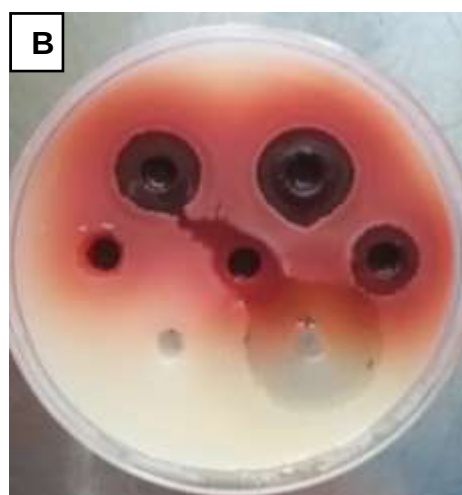
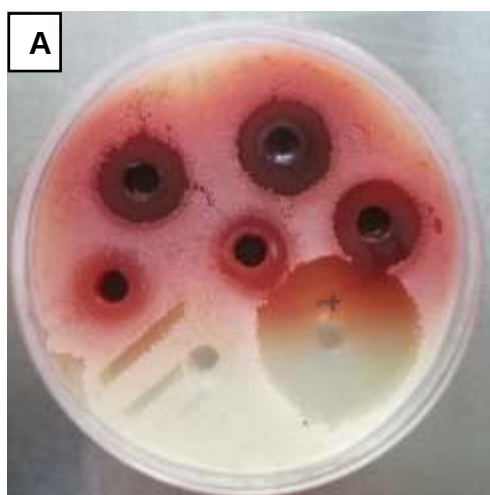


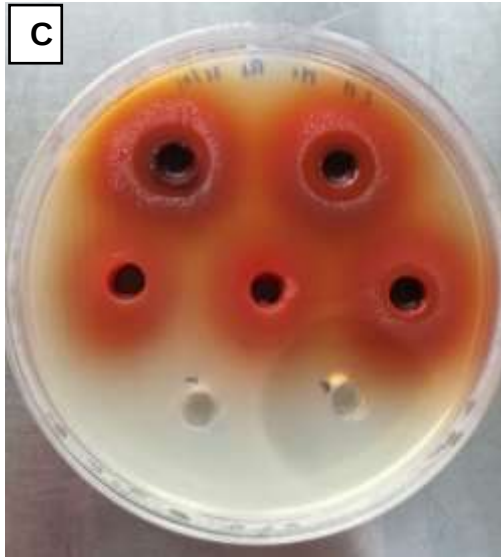
Determinación de la concentración mínima inhibitoria (A) y de la concentración bacteriana mínima (B)



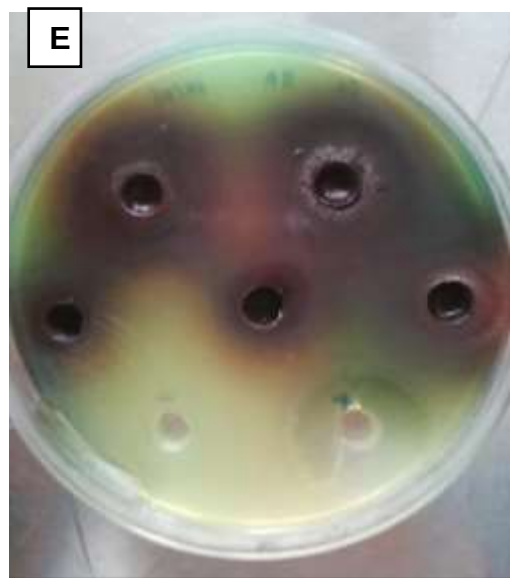
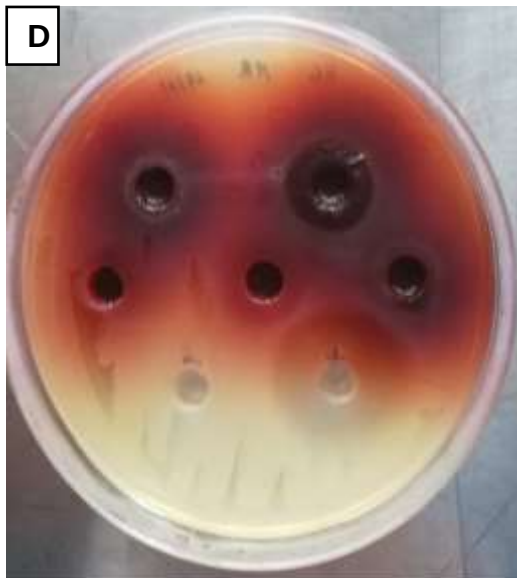
Halo de inhibición bacteriana de todos los microorganismos ensayados. *S. aureus* (ATCC® 25923™) (A), para *B. cereus* (ATCC® 10876™) (B), *L. monocytogenes* (ATCC® 19115™) (C), *E. coli* (ATCC® 25922™) (D) y *P. aeruginosa* (ATCC® 10145™) (E).

Bacterias *Gram* positivas





Bacterias *Gram* negativas



Determinación antiinflamatoria. Solución de eritrocitos al 40 % (A), concentraciones del extracto vegetal (B), lisis celular en una plancha de calentamiento (C) y tubos con eritrocitos y extracto vegetal (D).

