



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Plantas andinas y amazónicas del Ecuador con actividad antimicrobiana

Informe Final de Integración Curricular, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingeniera en Biotecnología, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autora: Daniela Cristina López Medina

Tutor: Ph.D. Orestes Darío López Hernández

Ambato - Ecuador

Marzo - 2022

APROBACIÓN DEL TUTOR

Ph.D. Orestes Darío López Hernández

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final de Integración Curricular ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 20 de enero del 2022

Ph.D. Orestes Darío López Hernández

C.I. 1754784864

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Daniela Cristina López Medina, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Daniela Cristina López Medina

C.I. 1850141068

AUTORA

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Docentes calificadores, aprueban el presente Informe Final de Integración Curricular, 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 y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para la constancia firman:

Presidente del Tribunal

Dr. Mario Daniel García Solís

C.I. 1103605471

Mg. Jeanette Verónica Carrera Cevallos

C.I. 1716192271

Ambato, 18 de febrero de 2022

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final de Integración Curricular o parte de él, como documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final de Integración Curricular, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, 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.



Daniela Cristina López Medina

C.I. 1850141068

AUTORA

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios y a la Virgen de Guadalupe por todas las bendiciones recibidas a lo largo de mi carrera, permitiéndome llegar al final de esta meta importante en mi vida. Además de poner en mi camino a buenas personas que me han ayudado en este trayecto a este nuevo logro en mis estudios.

A mis padres Cecilia y Marcelo; y mi hermano Marcelo, quienes siempre estuvieron junto a mí en todo este tiempo dándome todo el amor, apoyo y la confianza en los buenos y malos momentos, por siempre motivarme a perseguir mis sueños y nunca rendirme, haciendo que este sueño se vuelva realidad.

A mis abuelitos Gabriel, Elvia (+) y Natividad; y a toda mi familia, por siempre estar presente con palabras de aliento y bendiciones en cada etapa de mis estudios.

AGRADECIMIENTO

Principalmente a Dios que me ha brindado la salud y la vida cada día, además de darme la oportunidad de culminar esta importante etapa de mi vida dentro de la primera promoción de Biotecnólogos de la Universidad Técnica de Ambato.

A mis padres y hermano por su comprensión, paciencia, esfuerzo y las facilidades brindadas, los cuales han permitido que pueda cumplir una meta más. Uds. son mi inspiración y motivación para cada día alcanzar mis sueños.

A mi tutor Ph.D. Orestes López, quien ha sido mi guía en la elaboración de este trabajo y me ha compartido todos sus conocimientos y consejos en la carrera, los cuales los llevaré siempre presente en mi vida.

A mis amigas “Caja Negra”, quienes han sido una bendición para mí a lo largo de la carrera, por los buenos recuerdos y experiencias vividas juntas, por el apoyo y la amistad brindada dentro y fuera de las aulas desde el primer día de la carrera.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xv
CAPITULO I	1
MARCO TEÓRICO	1
1.1. Antecedentes Investigativos.....	1
1.1.1. Resistencia a los antimicrobianos.....	1
1.1.1.1. Situación Actual de la RAM	2
1.1.2. Mecanismos de Resistencia a antibióticos.....	4
1.1.3. Resistencia antimicrobiana en el Ecuador	7
1.1.4. Uso medicinal de las plantas en el Ecuador.....	10
1.1.5. Actividad antimicrobiana de extractos vegetales.....	14
1.2. Objetivos	16
1.2.1. Objetivo General.....	16
1.2.2. Objetivos Específicos.....	16
CAPÍTULO II	17
METODOLOGÍA	17
2.1 Materiales.....	17
2.1.1. Bibliotecas virtuales/ bases de datos.....	17
2.1.2. Repositorios Institucionales de Universidades Ecuatorianas.....	17
2.1.3. Páginas Web.....	17
2.1.4. Gestor Bibliográfico.....	17

2.2	Métodos.....	18
2.2.1.	Investigación Bibliográfica.....	18
CAPÍTULO III.....		19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		19
3.1.	Métodos de Extracción de Extractos Vegetales.	19
3.1.1.	Maceración.	20
3.1.2.	Percolación.	22
3.1.3.	Decocción.	24
3.1.4.	Extracción por reflujo.....	26
3.1.5.	Extracción por Soxhlet.	28
3.1.6.	Extracción acelerada por disolvente (ASE).....	30
3.1.7.	Extracción con fluidos supercríticos (SFE).	32
3.1.8.	Extracción asistida por ultrasonidos (EAU).	35
3.1.9.	Extracción asistida por microondas (MAE).	37
3.1.10.	Extracción de campo eléctrico pulsado (PEF).....	39
3.1.11.	Extracción asistida por enzimas (EAE).	41
3.1.12.	Hidrodestilación (HD).	43
3.2.	Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana.....	45
3.2.1.	Métodos Fenotípicos	46
3.2.1.1.	Difusión	46
3.2.1.2.	Dilución	48
3.2.1.3.	Prueba de Epsilómero (Etest)	52
3.2.1.4.	Sistemas automatizados	53
3.2.1.5.	Espectrometría de masa por tiempo de vuelo por ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS)	56
3.2.2.	Métodos genotípicos	58
3.2.2.1.	PCR.....	58
3.2.2.2.	Microarrays (Chips de ADN)	61
3.3.	Actividad Antimicrobiana de plantas Andinas y Amazónicas del Ecuador.....	63
CAPITULO IV		71
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		71
4.1.	Conclusiones	71
4.2.	Recomendaciones.....	73

MATERIALES DE REFERENCIA.....	75
-------------------------------	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	9
<i>Porcentajes de resistencia de patógenos en Ecuador</i>	9
Tabla 2	¡Error! Marcador no definido.9
<i>Disolventes utilizados para la extracción de componentes activos</i>	19
Tabla 3	63
<i>Actividad antimicrobiana de plantas Andinas y Amazónicas del Ecuador (Control)</i>	63
Tabla 4	65
<i>Actividad antimicrobiana de plantas Andinas y Amazónicas del Ecuador (Sin Control)</i>	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	21
<i>Protocolo para la extracción por maceración.</i>	21
Figura 2	22
<i>Equipo de la extracción por percolación.</i>	22
Figura 3	23
<i>Protocolo para la extracción por percolación.</i>	23
Figura 4	24
<i>Equipo de la extracción por decocción.</i>	24
Figura 5	25
<i>Protocolo para la extracción por decocción.</i>	25
Figura 6	26
<i>Equipo de la extracción por reflujo.</i>	26
Figura 7	27
<i>Protocolo para la extracción por reflujo.</i>	27
Figura 8	28
<i>Equipo para la extracción por Soxhlet.</i>	28
Figura 9	29
<i>Protocolo para la extracción por Soxhlet.</i>	29
Figura 10	30
<i>Equipo para la extracción por ASE.</i>	30
Figura 11	31
<i>Protocolo para la extracción por ASE.</i>	31
Figura 12	33
<i>Equipo para la extracción por SFE.</i>	33
Figura 13	33
<i>Disposición del material vegetal en el lecho de extracción.</i>	33
Figura 14	34
<i>Protocolo para la extracción por SFE.</i>	34

Figura 15	35
<i>Equipo para la extracción por EAU.</i>	35
Figura 16	36
<i>Protocolo para la extracción por EAU.</i>	36
Figura 17	37
<i>Equipo para la extracción por MAE.</i>	37
Figura 18	38
<i>Protocolo para la extracción por MAE.</i>	38
Figura 19	39
<i>Equipo para la extracción por PEF.</i>	39
Figura 20	40
<i>Protocolo para la extracción por PEF.</i>	40
Figura 21	42
<i>Protocolo para la extracción por EAE.</i>	42
Figura 22	43
<i>Equipo para la extracción por HD.</i>	43
Figura 23	44
<i>Protocolo para la extracción por HD.</i>	44
Figura 24	46
<i>Resultado de la AST por difusión.</i>	46
Figura 25	47
<i>Protocolo de AST por difusión.</i>	47
Figura 26	48
<i>Resultado de la AST por dilución.</i>	48
Figura 27	49
<i>Protocolo para AST por Macrodilución de caldo.</i>	49
Figura 28	50
<i>Protocolo para AST por Microdilución de caldo.</i>	50
Figura 29	51
<i>Protocolo para AST por dilución en agar.</i>	51
Figura 30	52
<i>Resultado de la AST por Etest.</i>	52

Figura 31	53
<i>Protocolo para AST por Etest.</i>	53
Figura 32	54
<i>Equipo para la AST por Vitek 2.</i>	54
Figura 33	55
<i>Protocolo para AST por Vitek 2.</i>	55
Figura 34	56
<i>Equipo para la AST por MALDI-TOF MS.</i>	56
Figura 35	57
<i>Protocolo para AST por MALDI-TOF MS.</i>	57
Figura 36	58
<i>Equipo para la AST por PCR multiplex.</i>	58
Figura 37	59
<i>Protocolo para AST por PCR multiplex.</i>	59
Figura 38	61
<i>Equipo para la AST por Microarrays.</i>	61
Figura 39	62
<i>Protocolo para AST por Microarrays.</i>	62

RESUMEN

El presente informe final de integración curricular se realizó con el propósito de obtener un compendio e identificar las plantas del Ecuador con actividad antimicrobiana de las zonas Andinas y Amazónicas del país mediante revisión bibliográfica y el análisis de proyectos de titulación de pregrado y artículos científicos, ya que uno de los problemas actuales que posee mayor relevancia investigativa mundial es la resistencia a los antimicrobianos (RAM). Este problema se originó principalmente por el inadecuado uso de estas sustancias químicas, por lo que los microorganismos desarrollaron mecanismos de resistencia con el objetivo de inhibir el mecanismo de acción de los antibióticos sobre ellos. En Ecuador la RAM también ha sido catalogado como un problema primordial, pues se ha encontrado registros de resistencia los cuales promueven las enfermedades a nivel comunitario y hospitalario, por tanto, el país ha tomado medidas para contrarrestar este problema como el Centro Nacional de Referencia de Resistencia a los Antimicrobianos y el Plan Nacional de Vigilancia para la Prevención y el Control de la RAM (2019-2023). A partir de los estudios examinados se obtuvo información de investigaciones realizadas en Ecuador donde se demuestra que las plantas de las zonas Andinas y Amazónicas del país poseen actividad antimicrobiana sobre ciertas bacterias causantes de RAM. Además, se detallaron los principales métodos de extracción con los disolventes que se emplean y las pruebas para medir la actividad antimicrobiana, cabe recalcar que la elección de estos métodos depende de los intereses del investigador y los resultados que espera obtener.

Palabras clave: Investigación bibliográfica, actividad antimicrobiana, resistencia a los antimicrobianos, métodos de extracción, pruebas para medir la actividad antimicrobiana, extractos vegetales, compuestos bioactivos.

ABSTRACT

The final present report of curricular integration was carried out with the purpose of obtaining a compendium and identifying the plants of Ecuador with antimicrobial activity in the Andean and Amazonian Zones of the country through a bibliographic review and the analysis of degree works and scientific articles, since one of the most relevant current problems for research worldwide is antimicrobial resistance (AMR). This problem originated mainly from the inappropriate use of these chemical substances, for which microorganisms developed resistance mechanisms with the aim of inhibiting the mechanism of action of antibiotics on them. In Ecuador, AMR has also been classified as a primary problem, since resistance records have been found that promote diseases at the community and hospital levels, for which the country has taken measures to counteract this problem, such as the National Reference Center of Antimicrobial Resistance and the National Surveillance Plan for the Prevention and Control of AMR (2019-2023). From the studies examined, information was obtained from research carried out in Ecuador where it is shown that the plants of the Andean and Amazonian zones of the country have antimicrobial activity on certain bacteria that cause AMR. In addition, the main extraction methods with the solvents used and the tests to measure the antimicrobial activity were detailed, it should be emphasized that the choice of these methods depends on the interests of the researcher and the results he hopes to obtain.

Keywords: Bibliographic research, antimicrobial activity, antimicrobial resistance, extraction methods, test to measure antimicrobial activity, plants extracts, bioactive compounds.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos

1.1.1. Resistencia a los antimicrobianos

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) está entre las 10 principales amenazas a la salud mundial debido a que es responsable de 700 000 muertes anuales, es un proceso en el que los microorganismos desarrollan un conjunto de mecanismos, mismos que permiten que las bacterias obtengan “inmunidad” a las propiedades de acción que poseen los antibióticos que son utilizados para impedir el crecimiento de las mismas. Por otro lado, los casos de resistencia también aumentan debido a que las personas utilizan inadecuadamente estas sustancias químicas (dosis y concentración) en áreas como medicina, agricultura, veterinaria y acuicultura para evitar daños en los cultivos causados por bacterias u obtener animales más grandes y asegurar la producción de sus derivados (leche, carne, huevos), además de tratamientos incompletos por parte de los pacientes, poco interés de las industrias farmacéuticas en desarrollar nuevos antibióticos, medidas ineficientes en el control de la comercialización de antimicrobianos, falta de campañas que concienticen el uso y manejo de los medicamentos, deficiencia en el acceso a agua limpia, escasas en el saneamiento e higiene (ASH) de las personas y de los animales destinados al consumo humano y déficit en las medidas de prevención y control de las enfermedades e infecciones en los centros de salud así como en las explotaciones agrícolas. (Cabrera et al., 2007; Organización Mundial de la Salud, 2020a; Vanegas & Jiménez, 2020; Yu et al., 2021). Este uso irresponsable de los antibióticos ha impulsado a la aparición de nuevas cepas con la característica de ser multiresistentes a varias familias de antibióticos, especialmente a los carbapenémicos, metilina, vancomicina y cefalosporinas, ya que las bacterias tienen el potencial de transmitir genes o mutaciones no solo a individuos de su misma especie, sino a individuos de diferentes especies (Esperbent & Migliorati, 2017). Además, es importante mencionar la diferencia entre la persistencia y la resistencia a los antimicrobianos, la resistencia como se ha mencionado anteriormente, es cuando las bacterias poseen mecanismos que evitan que los antibióticos ejerzan su actividad bactericida sobre ellas y estos mecanismos son transferidos a sus células hijas. Mientras que la persistencia describe células bacterianas que no son susceptibles al fármaco pero que no poseen un mecanismo de resistencia, se refiere principalmente a algunas

células que se encuentran en una población bacteriana y que pueden estar en fase de crecimiento estacionaria, por tal motivo la mayoría de los agentes microbianos no poseen efecto sobre los microorganismos que no crecen, pero se dividen activamente (**Reygaert, 2018**).

Según **Vanegas & Jiménez, 2020** esto da paso a una era postantibiótica, en la que el mundo se está quedando sin mecanismos eficaces para tratar enfermedades, especialmente las de tipo infecciosas y el número de muertes por dichas enfermedades se incrementan significativamente anualmente, además de afectar a la economía mundial y a los sistemas de salud pública, ya que los trasplantes y las quimioterapias serán demasiado riesgosas e imposibles de realizar. Por tanto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) expone su inquietud por la falta de innovación en el desarrollo de nuevos antibióticos y ha publicado documentos en los que se detallan los perfiles de los fármacos necesarios para tratar las cepas resistentes a los antibióticos, con el objetivo de brindar una orientación y facilitar el desarrollo de los mismos. Además, cabe recalcar que con la aparición de la pandemia de COVID-19, la OMS aumenta su preocupación por la RAM debido a que en el transcurso de la misma, el uso inadecuado de los antibióticos se ha acrecentado notablemente, en consecuencia, pueden elevar o a su vez aparecer nuevos casos de resistencia a los antibióticos (**Organización Mundial de la Salud, 2020b**).

1.1.1.1. Situación Actual de la RAM

La **Organización Mundial de la Salud, 2020a** manifiesta que en la actualidad la RAM en el mundo se encuentra clasificada en cinco puntos primordiales, siendo estos:

- Farmacorresistencia de las bacterias: Se ha observado tasas elevadas de RAM en los antibióticos utilizados para tratar las infecciones bacterianas comunes (infecciones urinarias, transmisión sexual, septicemia y algunas formas de diarrea), así mismo se ha detectado que las enterobacteriáceas presentan resistencia a la colistina. *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) es una bacteria promotora de las infecciones nosocomiales, infecciones a recién nacidos, neumonía y septicemia, se han encontrado reportes en los que los antibióticos carbapenémicos dejaron de ser eficaces para al menos la mitad de los pacientes con infecciones producidas por *K. pneumoniae*. *Escherichia coli* presenta resistencia a las fluoroquinolonas y cefalosporinas, las mismas que se utilizan para tratar infecciones urinarias. *Staphylococcus aureus* es responsable de las infecciones producidas en los

centros de salud como en las comunidades, esta bacteria ha obtenido resistencia a la meticilina. *Neisseria gonorrhoeae* es una bacteria que produce gonorrea, la cual ha adquirido resistencia a las sulfamidas, las penicilinas, las tetraciclinas, los macrólidos, las fluoroquinolonas y las cefalosporinas.

- Farmacorresistencia de *Mycobacterium tuberculosis*: Es considerado como un gran peligro para la contención de la epidemia de la tuberculosis, ya que en el 2018 se reportaron datos de medio millón de nuevos casos de tuberculosis resistentes a la rifampicina (TBRR), producidos especialmente por la multirresistencia. Esto es un gran inconveniente debido a que los tratamientos para tratar la TBRR son más largos y costosos, además de menos eficaces ya que los pacientes que reciben el tratamiento no se curan por completo.
- Farmacorresistencia de los virus: La RM se vuelve cada vez más alarmante ya que los pacientes autodeprimidos; es decir personas en las que su sistema inmune reduce su capacidad de combatir infecciones u otras enfermedades, pacientes en reproducción vírica continua y que estén en exposición prolongada a fármacos promueven la resistencia a los antivíricos e incluso a los antirretrovíricos. Tal es el caso de la aparición del VIH farmacorresistente, por lo que la OMS recomienda el uso de un nuevo fármaco: dolutegravir como el principal tratamiento para niños y adultos.
- Farmacorresistencia de los parásitos causantes del paludismo: Los parásitos farmacorresistentes también son considerados como uno de los mayores peligros para el control antipalúdico, además de inducir un acrecentamiento en las tasas de morbilidad y mortalidad por paludismo. Entre los años del 2001 y 2019 se han confirmado varios casos de resistencia a los tratamientos combinados basados en la artemisinina, los cuales son los principales tratamientos para tratar el paludismo causado por *Plasmodium falciparum*.
- Farmacorresistencia de los hongos: La creciente farmacorresistencia a infecciones fúngicas ha empeorado la situación terapéutica para tratar estas enfermedades, para ilustrar esto se ha encontrado reportes de farmacorresistencia de *Candida auris* a el fluconazol, la amfotericina B, el voriconazol y una creciente resistencia a la caspofungina.

En consecuencia, el mundo actual posee más problemas en el tratamiento de las enfermedades ya que los fracasos terapéuticos van en aumento, las estancias hospitalarias son más largas y las pocas opciones terapéuticas que quedan se vuelven cada vez más caras. La RAM es un problema complicado que demanda un enfoque multisectorial unificado, es por ello que se han desarrollado

estrategias como el enfoque “Una Salud”, el cual reúne a los diferentes sectores y partes interesadas que intervienen en la salud de las personas, animales acuáticos y terrestres, plantas, producción de alimentos para el consumo humano y el medio ambiente con el fin de establecer lazos de colaboración para mejorar la RAM en la salud pública. Otra estrategia es el proyecto “Plan de Acción Mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos (PAM)”, mismo que compromete a los países de la Asamblea Mundial de la Salud ejecutada en el 2015 a elaborar y aplicar planes de acción nacionales multisectoriales. Estos planes fueron revisados y autorizados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), con la finalidad de certificar los avances mundiales para afrontar la RAM (**Organización Mundial de la Salud, 2020a**).

Además, se implementó la campaña anual mundial “Semana Mundial de Concientización sobre el Uso de los Antimicrobianos” que se desarrollará a partir del 18 al 24 de noviembre del 2020 , con el propósito de concientizar sobre la RAM y fomentar las prácticas óptimas del uso de los antibióticos, antifúngicos, antiparasitarios y antivíricos a la población en general, trabajadores sanitarios y los responsables de formular políticas que ayuden a ralentizar la progresión y propagación de la farmacoresistencia. Finalmente, la OMS junto con la iniciativa Medicamentos para las Enfermedades Desatendidas (DNDi) crearon la “Alianza Mundial para la Investigación y Desarrollo de Antibióticos (GARDP)”, la cual impulsa la investigación y el desarrollo mediante alianzas público-privadas; el objetivo principal de la GARDP es fabricar y mercantilizar cinco nuevos tratamientos contra las bacterias con resistencia a los antimicrobianos descritos como mayor amenaza por la OMS para el 2025 (**Organización Mundial de la Salud, 2020a**).

1.1.2. Mecanismos de Resistencia a antibióticos

La resistencia bacteriana puede darse de forma natural; intrínseca o inducida, esta resistencia es una propiedad concreta y universal de los microorganismos, puede ser inherente a una sola especie en particular y la adquisición del material genético se da de forma natural. Las bacterias que poseen este tipo de mecanismo son Bacteroides (aminoglucósidos, muchos β -lactámicos, quinolonas), Enterococos (aminoglucósidos, cefalosporinas, lincosamidas), *Listeria monocytogenes* (cefalosporinas), *Escherichia coli* (macrólidos), *Klebsiella pneumoniae* (ampicilina), *Serratia marcescens* (macrólidos), *Pseudomona aeruginosa* (sulfonamidas, ampicilina, cefalosporinas de

primera y segunda generación, cloranfenicol, tetraciclina), *Estenotrofomona maltofila* (aminoglucósidos, β -lactámicos, carbapenémicos, quinolonas), *Acinetobacter* spp. (ampicilina, glicopéptidos), *Estafilococo aureus*, *Micobacterium tuberculosis*, *Estreptococo pneumoniae* y *Estafilococo epidermidis*, las cuales causan más del 60 % de las infecciones hospitalarias. La resistencia adquirida se basa en el cambio genético de la bacteria para proporcionar defensas a la misma contra los antimicrobianos, cabe recalcar que estos genes de resistencia pueden transferirse eficientemente a otros microorganismos a través de elementos genéticos móviles (plásmidos, ADN desnudo o transposones) (Loera et al., 2016; Reygaert, 2018; Serra, 2017). El excesivo uso de los antibióticos ha facilitado la creación de un ambiente ideal que favorezca el desarrollo de la RAM. Entre los mecanismos más importantes constan:

- Transducción: Se transfiere cualquier parte del ADN bacteriano de una bacteria a otra a partir de bacteriófagos durante la fase de ensamblaje, el virus al ingresar a la bacteria susceptible induce a una nucleasa que fragmenta el cromosoma bacteriano y a la vez crea el ADN vírico con sus proteínas de envoltura, estas proteínas contienen ADN fragmentado bacteriano que permite introducir los nuevos genes de resistencia a la nueva bacteria. Es considerado como un mecanismo de transferencia de resistencia muy eficaz, pero al poseer una estrecha especificidad en cuanto a la relación virus-bacteria, este mecanismo se encuentra limitado por la relación filogenética de los microorganismos, especialmente si estos se encuentran en el mismo género.
- Conjugación: El material genético contenido en plásmidos es trasladado mediante una hebra sexual o contacto físico entre dos bacterias (donante y receptor). Los microorganismos que presentan este mecanismo pueden actuar como reservorios para mantener la resistencia a los antimicrobianos en una población bacteriana, incluso cuando existe la ausencia de selección de antibióticos, es decir que la conjugación puede propagar la RAM rápidamente entre las bacterias del microbioma cuando se encuentran inducidos a una presión selectiva por los antibióticos.
- Transformación: Consiste en transportar los genes a partir de un ADN desnudo de cualquier bacteria lisada a otra, la cual incorpora los genes adquiridos a su genoma, lo que permite una mezcla de información genética de bacterias que se encuentran muy distantes en el árbol filogenético, además posee un carácter universal.

- Transposición: La bacteria mueve al azar una parte de su ADN que contiene los genes de resistencia a diferentes antibióticos y genes cassetes para la expresión de un promotor, también pueden ser denominados como “genes saltarines”.
- Modificación enzimática o destrucción del antibiótico: Las enzimas destruyen e inactivan los antibióticos al hidrolizar sus anillos o a su vez alteran químicamente los elementos de la envoltura celular necesarios para la unión del antibiótico a la bacteria, esto se realiza mediante estímulos naturales o mutaciones en los genes, por lo que es considerada como un mecanismo de resistencia de alto nivel, el cual poseen las bacterias Gram negativas y Gram positivas. Las enzimas de importancia clínica son las hidrolasas, las cuales inactivan los antibióticos β -lactámicos como las cefalosporinas, penicilinas y carbapenémicos; las quinasas, acetiltransferasas y nucleotidiltransferasas son enzimas encargadas de la farmacoresistencia de los antibióticos aminoglucósidos, además de las metiltransferasas, mismas que modifican los elementos del ARNr en el ribosoma y confiere resistencia a los aminoglucósidos, lincosamidas, estreptograminas, macrólidos y oxazolidinonas.
- Impermeabilidad al antibiótico: Es un tipo de resistencia a través de la membrana, la cual se origina debido a mutaciones en la cantidad y forma de proteínas llamadas porinas, estas influyen en la permeabilidad de los antibióticos, es decir que las bacterias son menos sensibles al fármaco. Este tipo de resistencia se da mediante tres procesos generales: 1) cambio en el tipo de porinas expresadas, 2) cambio en el nivel de expresión de las porinas y 3) deterioro en la función de las porinas, además es común que estos procesos se de en bacterias Gram negativas, pero es considerado como un tipo de resistencia de bajo nivel por lo que se une a otros tipos de resistencia. Las bacterias que han adquirido resistencia a todas las clases de antibióticos utilizando este mecanismo son *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* ya que posee una baja permeabilidad de la membrana externa y un reducido número de canales de porinas.
- Alteración o producción de nuevos sitios blancos: Radica en cambiar los sitios blanco del antibiótico con el objetivo de evitar el efecto bactericida del mismo. Los cambios que se pueden presentar son: protección del objetivo (ciertos genes codifican proteínas que median en la protección de la diana para evitar que el antibiótico realice una interacción con la membrana de la bacteria), mutaciones puntuales en los genes que codifican el sitio diana, alteraciones enzimáticas en el sitio de unión (adición de grupos metilo en el ribosoma

realizado por los genes erythromycin ribosomal metilación - erm) y el reemplazo u omisión del sitio de destino. Este mecanismo lo utilizan principalmente bacterias Gram positivas.

- Presencia de bombas de eflujo que expulsan el antibiótico (BE): Se fundamenta en un mecanismo de eflujo (bomba), en el que las proteínas de membrana expulsan los antibióticos de la célula y ayudan a mantener las concentraciones intracelulares bajas, esto brinda a las bacterias resistencia intrínseca que disminuye o suprime la susceptibilidad hacia los antibióticos, expulsando compuestos tóxicos al ambiente externo, la expulsión puede ser de un sustrato específico, una sola molécula o puede expulsar distintas clases de moléculas. En procariontes existen cinco tipos de proteínas de expulsión: el casete de unión de ATP (ABC), facilitador principal (MFS), flujo de salida de múltiples fármacos y compuestos tóxicos (MATE), resistencia a múltiples fármacos de tamaño pequeño (SMR) y resistencia-modulación-división celular (RND). Es importante mencionar que los antibióticos de todas las clases son afectados por este mecanismo excepto la polimixina.
- Sobreexpresión del sitio blanco: Se basa en la duplicación o mutación de los promotores responsables de la transcripción de genes que codifican el sitio blanco, creando sustitutos de los objetivos diana con las mismas características del sitio blanco original (**Cabrera et al., 2007; Graf et al., 2019; Kapoor et al., 2017; Munita & Arias, 2016; Schaezner & Wright, 2020; Serra, 2017**).

1.1.3. Resistencia antimicrobiana en el Ecuador

Según la **Organización Panamericana de la Salud, 2021** la OMS publicó en 2020 la lista “Problemas sanitarios urgentes de dimensión mundial”, en la que se detalla los microorganismos que han demostrado un aumento considerable en los niveles de resistencia, siendo estos *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella spp.* De los cuales Ecuador presenta datos de resistencia bacteriana para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, además de *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis* y *Serratia marcescens*. Cabe señalar que el primer caso de resistencia en el país fue reportado en el 2010, siendo este de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas y responsable de la mayoría de infecciones a nivel comunitario y hospitalario, a partir de este suceso la Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica con ayuda del Centro Nacional de Referencia de Resistencia a los

Antimicrobianos (CRN-RAM) del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) han planteado un sistema de vigilancia basado en un sistema informático llamado WHONET, en el que 44 Hospitales centinelas realizan vigilancia RAM para obtener datos de la misma **(Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2018)**.

Además, el Ecuador ha elaborado un Plan Nacional de Vigilancia para la prevención y el control de la RAM (2019-2023) basado en el Plan de Acción Mundial sobre la RAM de la OMS, en el que se planea mejorar la concientización y comprensión de la RAM, reforzar los conocimientos a través de la vigilancia e investigación, reducir la repercusión de las infecciones hospitalarias, utilizar responsablemente los antimicrobianos e impulsar la inversión para el desarrollo de nuevos antibióticos o medios de diagnóstico **(Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2019)**. Los datos recaudados en el 2019 (Tabla1) muestran que la especie *Acinetobacter baumannii* posee mayor resistencia (65,4 %) al antibiótico TZP, *Klebsiella pneumoniae* tiene alta resistencia a CRO en un 70,2 %, *Pseudomonas aeruginosa* reporta una elevada resistencia del 33 % al IPM y *Staphylococcus aureus* ha adquirido una resistencia del 48,1 % y 44,2 % a la SXT **(Organización Panamericana de la Salud, 2019)**.

Tabla 1*Porcentajes de resistencia de patógenos en Ecuador*

Patógeno	Especie	Origen	Antibiótico	% Resistencia
Acinetobacter	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Hospital	AMK	52,6
			CAZ	40,8
			FEP	60,3
			IPM	63,9
			MEM	63,5
			TZP	65,4
Klebsiella	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hospital	CIP	50,7
			CRO	70,2
			CTX	63,4
			GEN	43,1
			IPM	39,6
			MEM	38,3
Pseudomonas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Hospital	TZP	48,1
			AMK	8,2
			CAZ	21,4
			CIP	32,1
			IPM	33,0
			MEM	30,3
Staphylococcus	<i>Staphylococcus aureus</i>	Hospital	TZP	19,9
			CIP	9,4
			CLI	22,0
			FOX	44,1
			GEN	7,4
			OXA	39,4

	SXT	48,1
	CIP	6,6
	CLI	24,7
Comunitario	FOX	30,1
	GEN	7,8
	OXA	31,5
	SXT	44,2

Nota: Amikacina (AMK), Ceftazidima (CAZ), Cefepime (FEP), Imipenem (IPM), Meropenem (MEM), Piperacilina-Tazobactam (TZP), Ciprofloxacina (CIP), Ceftriaxona (CRO), Cefotaxima (CTX), Gentamicina (GEN), Clindamicina (CLI), Cefoxitina (FOX), Oxacilina (OXA), Trimethoprima + Sulfametoxazol (SXT). Tomado de *Porcentajes de resistencia de patógenos seleccionados* por Organización Panamericana de la Salud, (2019), <https://www3.paho.org/data/index.php/es/temas/resistencia-antimicrobiana/567-amr-vig-es.html>

1.1.4. Uso medicinal de las plantas en el Ecuador

En Ecuador es un país reconocido por su diversidad biológica y su patrimonio en el conocimiento médico ancestral, ya que el uso de las especies vegetales medicinales se encuentra inmerso en la cotidianidad de su población, pues estas prácticas incorporan la salud pública, el cuidado al ecosistema natural y la correspondencia que existe entre el hombre y la naturaleza. Los saberes ancestrales que poseen los habitantes de las comunidades indígenas del país son divulgados de generación en generación de forma oral de padres a hijos, abarcan principalmente una gran variedad de aspectos en cuanto al conocimiento desarrollado longitudinalmente en relación con su entorno natural y la técnica en la que se emplean las plantas para curar o tratar enfermedades, así como el rol importante que juega en la economía del país, pues contribuye al desarrollo económico de las comunidades rurales y al desarrollo sostenible basado en la conservación y aprovechamiento de los recursos renovables, tal es el caso que estas plantas de uso medicinal incluso son vendidas en diferentes mercados de las regiones de la Sierra, Costa y Amazonía (Sarauz, 2021; Senescyt, 2016)

Es importante mencionar que en la actualidad se ha ido perdiendo los saberes y conocimientos ancestrales de los pueblos indígenas, las causas principales que dieron origen a esto son la globalización, misma que ha generado cambios ambientales, socioeconómicos y culturales bruscos, además de los procesos migratorios, principalmente de las zonas rurales a las urbanas, como resultado la comunicación entre padres e hijos se va volviendo escasa y por tanto se pierde la transmisión del conocimiento ancestral, provocando que el patrimonio cultural intangible del Ecuador no se preserve de generación en generación (**Sarauz, 2021**).

Ecuador cuenta con 3118 especies pertenecientes a 206 familias de plantas usadas con fines medicinales, de las cuales el 75 % son plantas nativas, 5 % son endémicas y el 11 % son introducidas en el país. En su mayoría las plantas medicinales son hierbas (1099 especies), arbustos (913 especies), árboles (610 especies), arbolitos (216 especies), subarbustos (187 especies), bejucos (185 especies) y lianas (137 especies). Así mismo se encontró información sobre las partes de las plantas más utilizadas con fines medicinales, siendo estas las hojas, flores, corteza, tallo, raíces, frutos, exudados, semillas y en algunos casos la planta entera. Los grupos étnicos que más utilizan las plantas medicinales para tratar enfermedades son los Kichwa del Oriente, los Kichwa de la Sierra, los Tsa'chi de la Costa, los Achuar, Wao, Secoya, Siona y los mestizos (**De la Torre et al., 2008**).

Las plantas utilizadas para curar infecciones constituyen alrededor del 26 % del total de las especies medicinales del Ecuador, es decir 825 especies son utilizadas para tratar infecciones causadas por bacterias, virus, hongos, protozoos, platelmintos, nematodos, anélidos y artrópodos. Las familias de plantas que poseen mayor número de registros de uso medicinal, especialmente para tratar infecciones causadas por virus y bacterias como pus, gonorrea, herpes, sarampión, erisipela, neumonías y enfermedades infectocontagiosas son Asteraceae, Solanaceae y Fabaceae. Mientras las especies más utilizadas con los mismos fines anteriormente mencionadas son *Margyricarpus pinnatus*, *Dalea coerulea*, *Iryanthera paraensis*, *Calathea metallica* y *Fittonia albivenis*, también se han encontrado investigaciones del uso de plantas para tratar afecciones fúngicas en las zonas bajas del Ecuador occidental y nororiental, las especies más citadas fueron *Iryanthera paraensis*, *Calathea metallica* y *Fittonia albivenis* (**De la Torre et al., 2008**). Esto demuestra que el Ecuador cuenta con una amplia gama de plantas de uso medicinal, mismas que

pueden ser utilizadas como una fuente importante de metabolitos para desarrollar nuevos fármacos con actividad antimicrobiana.

Otros usos medicinales de las plantas del Ecuador:

- Aliviar síntomas (dolor de cabeza, estómago, musculos, fiebre, diarrea, tos): Hierba luisa (*Cymbopogon citratus*), la ruda (*Ruta graveolens*), la manzanilla (*Matricaria recutita*), verbena (*Verbena litoralis*), la wawallpa panka pequeña (*Mollinedia ovata*), la borraja (*Borago officinalis*), guayaba (*Psidium guajava*), el jengibre (*Zingiber officinale*), *Abuta grandifolia*, *Dalea coerulea* y el poleo o tipo blanco (*Minthostachys mollis*).
- Heridas y lesiones: Favorece la cicatrización, se aplica en golpes, contusiones, fracturas, torceduras y lisiaduras y tratar quemaduras de sol. Las plantas que se utilizan son el matico (*Aristeguetia glutinosa*), sangre de drago (*Croton lechleri*) y las familias Asteraceae, Solanaceae y Euphorbiaceae.
- Desórdenes del sistema digestivo: Son usadas en el tratamiento de infecciones de hígado, empacho, indigestión, purgante o laxantes. Las plantas que se utilizan con este fin son Taraxaco o diente de león (*Taraxacum officinale*), kana yuyo (*Sonchus oleraceus*) y las familias Asteraceae, Fabaceae, Amaranthaceae y Lamiaceae.
- Contravenenos: Sirven para tratar mordeduras de serpiente, picaduras de rayas, hormigas, arañas y alacranes. Los recursos vegetales empleados son *Pentagonia spathicalyx* y familias Gesneriaceae, Piperaceae y Araceae
- Inflamaciones (extremidades, cara, cuerpo, riñones, hígado, ovarios, estómago e intestinos): Hierba mora, el matico, el llantén (*Plantago major*) y las familias Asteraceae, Solanaceae y Malvaceae.
- Desórdenes de la piel o tejidos subcutáneos: Las especies medicinales que más se utilizan son *Witheringia solanacea*, mote kasha o espino chivo (*Duranta triacantha*) y las familias Solanaceae, Asteraceae y Gesneriaceae; principalmente para tratar granos en la piel, cezema, sarpullido y espinillas, también ayuda a eliminar manchas en la piel, paspa e irritaciones cutáneas.
- Desórdenes del sistema respiratorio (gripe, resfríos, catarros, afecciones pulmonares o bronquiales): *Borago officinalis*, *Verbena litoralis*, *Dalea coerulea* y las familias Asteraceae, Solanaceae y Lamiaceae.

- Desórdenes del sistema urogenital: El taraxaco, caballo chupa (*Equisetum giganteum*), la chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*), *Abelmoschus moschatus*, hierba mora, kasha marucha (*Xanthium spinosum*) y las familias Asteraceae, Fabaceae y Gesneriaceae. Sirven para tratar afecciones renales y de la próstata, diuréticos, alivian malestares al orinar y lavados vaginales.
- Desórdenes del sistema esquelético muscular: Se utilizan para el tratamiento del reumatismo y la artritis, las cuales son *Mollinedia ovata*, nogal o tocte (*Juglans neotropica*) y las familias Asteraceae, Solanaceae y Urticaceae.
- Desórdenes de la gestación del parto y el posparto: El nogal, el petón, *Abuta grandifolia*, chukchu waska (*Drymonia coccinea*) y las familias Asteraceae, Fabaceae y Amaranthaceae.
- Desórdenes del sistema nervioso: Actúan principalmente como calmantes o sedantes, las pantas más utilizadas son el toronjil (*Melissa officinalis*), especies de ortiga (*U. dioica*, *U. echinata*, *U. leptophylla*, *U. urens*), valeriana (*Valeriana decussata*, *V. interrupta*, *V. microphylla*, *V. officinalis*, *V. plantaginea*, *V. pyramidalis*, *V. sorbifolia*) y familias Lamiaceae, Asteraceae y Valerianaceae.
- Desórdenes del sistema endócrino: *Columnea ericae*, la moradilla (*Alternanthera porrigens*), la ruda y las familias Asteraceae, Amaranthaceae y Gesneriaceae, son usadas para tratar irregularidades del ciclo menstrual que tienen sangrados excesivos y prolongados.
- Desórdenes del sistema circulatorio: El marco (*Ambrosia arborescens*), pataku yuyu (*Peperomia peltigera*), *Bauhinia guianensis* y familias Fabaceae, Asteraceae y Amaranthaceae, se ha encontrado que estas plantas tratan afecciones del corazón, alteraciones de la presión sanguínea, las várices y las hemorroides.
- Tumores y cánceres: La uña de gato (*Uncaria tomentosa*) y las familias Fabaceae, Amaryllidaceae y Rubiaceae, son empleadas especialmente para tratar diferentes tipos de cáncer como piel, próstata, leucemia, tumores malignos en los senos e incluso ayuda a tratar el cáncer sin especificar la parte del cuerpo que se encuentra afectada.
- Desórdenes del sistema sensorial: Las plantas medicinales se utilizan para aliviar las afecciones de los oídos como la sordera y en ojos como cataratas, pterigium, problemas de visión y ceguera: *Nicandra physalodes*, *Peperomia galioides* y las familias

Melastomataceae y Lamiaceae. Se usan principalmente para hacer colirios y gotas para el oído.

- Desórdenes nutricionales: Alfalfa y las familias Fabaceae y Asteraceae, son principalmente usados para curar la anemia, escorbuto y aumentar el apetito en las personas.
- Anestésicos (afecta la sensibilidad): La coca (*Erythroxylum coca*) y las familias Asteraceae y Solanaceae.
- Desórdenes del sistema metabólico: Las especies vegetales se usan principalmente para nivelar el colesterol, tratar la obesidad y la gota, además de ayudar a disminuir la grasa: *Bauhinia tarapotensis*, *Ziziphus thyrsoflora*, genciana (*Gentianella cerastioides*, *G. cernua*, *G. rupicola*) y las familias Asteraceae y Gentianaceae.
- Desórdenes mentales: *Chenopodium ambrosioides* y las familias Lamiaceae y Solanaceae, son principalmente empleadas para mejorar la memoria y tratar el histerismo, delirios, locuras, depresión e incluso que han encontrado estudios en los que se han aplicado estas plantas para tratar el alcoholismo.
- Desórdenes del sistema sanguíneo (afecciones de la sangre): El culantrillo (*Adiantum poiretii*), *Philodendron purpureoviride* y las familias Amaranthaceae y Asteraceae.
- Desórdenes del sistema inmune (enfermedades linfáticas): *Mollinedia ovata*, *Witheringia solanacea* y las familias Solanaceae y Rubiaceae (De la Torre et al., 2008).

1.1.5. Actividad antimicrobiana de extractos vegetales

A medida que los casos de farmacorresistencia incrementan en todo el mundo, los antibióticos tienden a ser menos eficaces, lo que produce infecciones más difíciles de tratar y los casos de mortalidad aumentan, a esto se suma la problemática del agotamiento o estancamiento en el desarrollo de nuevos antibióticos. Por tal motivo se agudiza la exigencia y el interés de buscar nuevos tratamientos de origen vegetal con poder antibacteriano como una alternativa para combatir la RAM (Díaz et al., 2017; Organización Mundial de la Salud, 2020a).

Las plantas son consideradas como una fuente valiosa de nutrientes y compuestos químicos que pueden utilizarse en el desarrollo de nuevos medicamentos, ya que producen metabolitos (polifenoles, alcaloides, flavonoides, fenólicos, taninos, terpenos, aceites esenciales, lectina, polipéptidos y poliacetilenos) que están involucrados en el mecanismo de defensa de las plantas y

poseen actividad farmacológica o biológica. En la actualidad la medicina tradicional y complementaria (MTC), la cual se define como la suma de los conocimientos, capacidades y prácticas usadas para mantener la salud, así como prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar diferentes tipos de enfermedades físicas y mentales, estas técnicas ancestrales son basadas principalmente en las teorías, creencias y expresiones de diferentes culturas. La MTC ha generado impacto debido a la preocupación de las personas por la seguridad, disponibilidad y los efectos secundarios mínimos que producen los fármacos desarrollados a partir de extractos vegetales en comparación con la medicina sintética, es importante mencionar que en los países occidentales más del 40 % de las industrias farmacéuticas elaboran sus productos a partir de los extractos vegetales (**Kebede et al., 2021; Organización Mundial de la Salud, 2013; Ralte et al., 2021**).

Adicionalmente la OMS ha realizado un plan denominado “Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023”, en el que se desarrolla una planificación para impulsar la MTC como una herramienta segura, respetuosa, asequible y efectiva para los profesionales sanitarios y los usuarios de los servicios de salud, además que mejore la atención de la salud promoviendo la integración, reglamentación, investigación y supervisión de la MTC. Así mismo analizaron los principales problemas que poseen los países la introducir la MTC en su sistema de salud, los cuales se relacionan principalmente con el desarrollo y la aplicación de políticas que regulen la MTC; identificación y evaluación de estrategias y criterios para incluir la MTC en el ámbito nacional; evaluación de servicios y productos, calificación de profesionales, procedimientos y criterios para evaluar su eficiencia; capacidad de inspeccionar y reglamentar la publicidad o afirmaciones de la MTC; actividades de investigación y desarrollo; formación y capacitación de profesionales de la MTC e intercambio de información relacionada con la MTC. A partir de esto se desarrolló cuatro objetivos principales que ayuden a los países a abordar los problemas anteriormente mencionados:

- Política: Integrar la MTC a través del desarrollo y la aplicación de programas nacionales.
- Seguridad, eficacia y calidad: Promover la seguridad, eficacia y la calidad de la MTC mediante la ampliación de conocimientos y el asesoramiento sobre las normas reglamentarias y garantía de la calidad.
- Acceso: Optimizar la disponibilidad y asequibilidad de la MTC, primordialmente a personas de bajos recursos económicos.

- Uso racional: Impulsar el uso terapéutico racional de la MTC entre los profesionales del área de salud y los usuarios (**Organización Mundial de la Salud, 2013**).

Al existir una variedad de especies vegetales con actividades farmacológicas se ha impulsado el desarrollo de la “Etnofarmacología”, la cual investiga las actividades farmacológicas y toxicológicas de cualquier preparación que contenga efectos beneficiosos o tóxicos para el ser humano. Cabe recalcar que la etnofarmacología no se centra en el detalle de los efectos médicos en base al contenido de un tratamiento o las historias clínicas de un paciente, sino que incluye la investigación biocientífica. El progreso de la etnofarmacología se dio con el objetivo de dar un enfoque científico a las propiedades medicinales de los compuestos bioactivos producidos por las plantas y determinar cómo actúan en el ser humano en el tratamiento de enfermedades. También esto puede aplicarse con la ayuda de la biotecnología, ya que se la puede utilizar para identificar los extractos vegetales con actividad biológica, analizar las interacciones moleculares de los mismos mediante la proteómica, genómica y metabolómica para diseñar fármacos más efectivos y directos (**Alves et al., 2021; Heinrich & Jäger, 2015**).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

- Obtener un compendio de las plantas con actividad antimicrobiana de las zonas andinas y amazónicas del Ecuador mediante revisión bibliográfica.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Identificar las plantas del Ecuador con actividad antimicrobiana mediante revisión bibliográfica.
- Referir la metodología para la extracción de los metabolitos de las plantas andinas y amazónicas del Ecuador mediante la revisión de artículos científicos.
- Describir los procedimientos para medir la actividad antimicrobiana de los metabolitos por medio de revisión bibliográfica.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Materiales

2.1.1. Bibliotecas virtuales/ bases de datos.

A través del sistema integrado de la Universidad Técnica de Ambato, se pudo acceder a bases de datos libres como Scientific Electronic Library Online (SciELO), Redalyc, ELIBRO, ProQuest y Springer. También se utilizaron plataformas virtuales de libre acceso como National Center for Biotechnology Information (NCBI), Google Académico y ELSEVIER. Mismos que ayudaron a obtener información actualizada acorde con el tema de investigación mediante artículos científicos y libros electrónicos.

2.1.2. Repositorios Institucionales de Universidades Ecuatorianas

La información obtenida para elaborar los resultados del proyecto de investigación fue realizada mediante el empleo de trabajos previos de repositorios institucionales de la Universidad Técnica de Ambato (UTA), Escuela Politécnica del Ejército, Universidad de Fuerzas Armadas (ESPE), Universidad Autónoma de los Andes (UNIANDES), Universidad Técnica de Machala, Universidad de Investigación de Tecnología Experimental Yachay y Universidad Politécnica Salesiana.

2.1.3. Páginas Web

Documentos referentes a la RAM en el mundo se revisaron mediante la página web de la Organización Mundial de la Salud (OMS), mientras que los reportes de la RAM en el Ecuador se obtuvieron por medio del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos (CRN-RAM) y del Ministerio de Salud Pública del Ecuador.

2.1.4. Gestor Bibliográfico

Para reportar la bibliografía del trabajo investigativo se manejó el gestor bibliográfico MENDELEY configurado en norma APA 7^{ma} edición.

2.2 Métodos

2.2.1. Investigación Bibliográfica

La redacción del presente documento se basó en la investigación, recolección, organización y el análisis de diversas fuentes de información bibliográficas que permitieron encontrar una posible solución al problema planteado con el cumplimiento de los objetivos propuestos, así mismo proporcionar una visión general de la RAM en el mundo y en el país, además de los diferentes estudios que se han realizado para dar respuesta a esa problemática a partir del uso de extractos vegetales con actividad antimicrobiana. La investigación realizada posee un enfoque cualitativo y el propósito de la metodología empleada fue destacar aspectos esenciales de investigaciones previas, examinar la información obtenida observando las coincidencias y diferencias, además de evaluar la confiabilidad de la misma discriminando investigaciones realizadas en años inferiores al 2010 y empleando palabras clave para la búsqueda de información relevante en español e inglés, las cuales fueron actividad antimicrobiana (antimicrobial activity), resistencia a antibióticos (antibiotic resistance), plantas amazónicas y andinas (andean and amazonian plants), extractos vegetales (vegetable extracts) y pruebas de actividad antimicrobiana (antimicrobial activity tests).

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Métodos de Extracción de Extractos Vegetales.

La extracción se basa en la separación de metabolitos como alcaloides, glucósidos, fenólicos, terpenoides y flavonoides del material vegetal utilizando disolventes mediante procedimientos estándar, su objetivo es separar los compuestos vegetales solubles, además de dejar un orujo celular insoluble (residuo). Existen factores que influyen en la calidad de los extractos obtenidos, siendo estos las propiedades del disolvente de extracción (selectividad, solubilidad y costo), los alcoholes son considerados como disolventes universales para la extracción; el tamaño de partícula, ya que su tamaño es fino, mejor es la penetración del solvente y la difusión de los solutos; la relación que existe entre solvente-materia prima, debido a que aumenta el rendimiento de la técnica y la temperatura de extracción, pues incrementa la solubilidad y la difusión o a su vez induce a la pérdida del disolvente; es importante mencionar que la duración de la extracción puede afectar la eficiencia del proceso (Azwanida, 2015; Zhang et al., 2018).

Tabla 2

Disolventes utilizados para la extracción de componentes activos.

Agua	Etanol	Metanol	Cloroformo	Diclorometano	Éter	Acetona
Taninos	Taninos	Taninos	Flavonoides	Terpenoides	Alcaloides	Flavonoides
Antocianina	Terpenoides	Terpenoides	Terpenoides		Terpenoides	
Terpenoides	Polifenol	Polifenol				
Saponinas	Flavonoides	Saponinas				
	Alcaloides	Antocianina				

Nota: Tomado de Conventional Extraction Methods Use in Medicinal Plants, their Advantages and Disadvantages, por **Golam, 2018**, de <https://www.ijbsac.org/wp-content/uploads/papers/v2i6/F0082122618.pdf>

3.1.1. Maceración.

Es considerado como el método de extracción más simple, ya que permite ablandar y romper la pared celular de la planta para liberar los compuestos fitoquímicos solubles, es importante mencionar que, dependiendo del disolvente empleado para la extracción, se obtendrán cierto tipo de compuesto extraído. Esta técnica se utiliza considerablemente en la investigación de plantas medicinales.

Ventajas:

- Es un método conveniente para la extracción de compuestos termolábiles.
- Utiliza útiles y equipos que no son complicados.
- No requiere operador calificado.

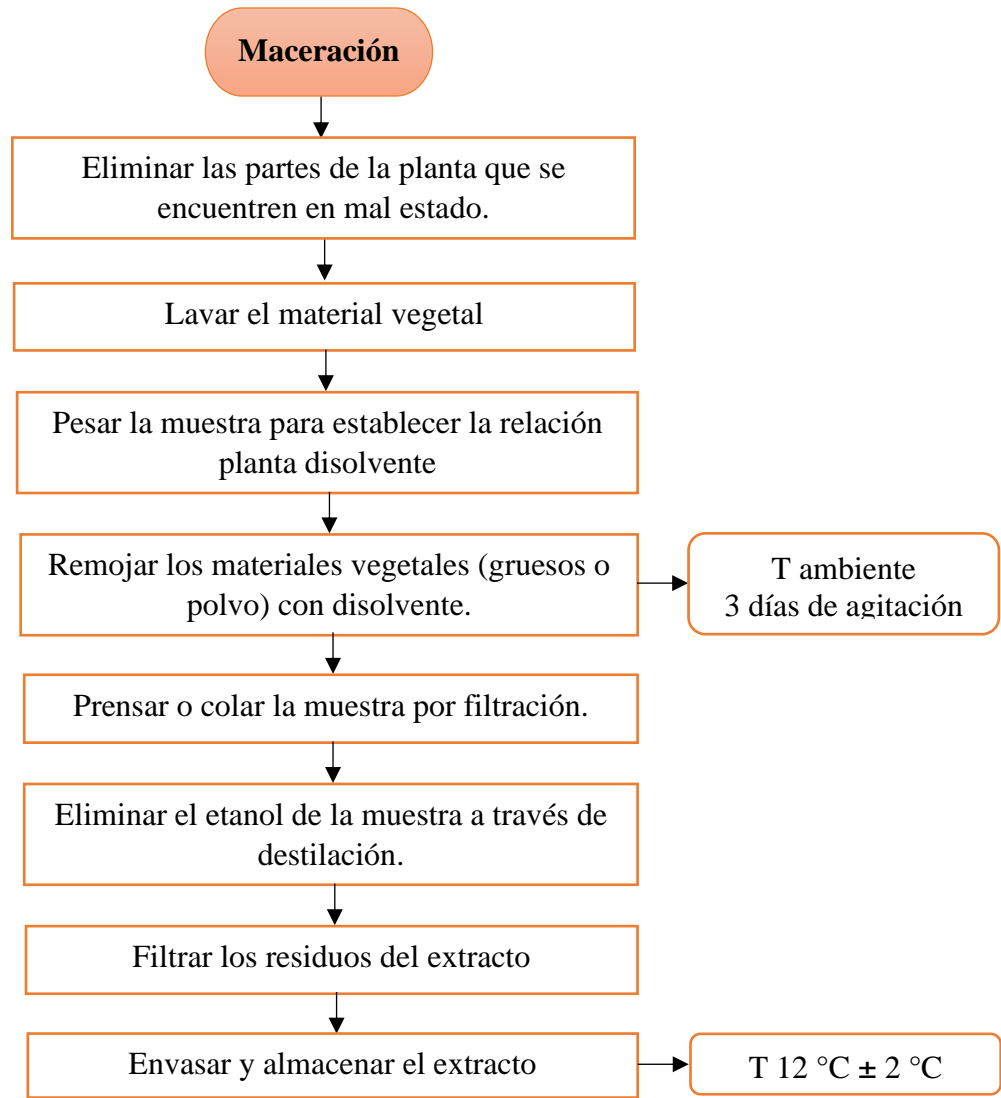
Desventajas:

- Tiempo de extracción prolongado.
- Requiere de mucho disolvente.
- No extrae de forma exhaustiva el extracto.
- Baja eficiencia de extracción.

(Abubakar & Haque, 2020; Dekebo, 2019; Golam, 2018; Zhang et al., 2018)

Figura 1

Protocolo para la extracción por maceración.



Nota: Tomado de Estudio del proceso de obtención de extractos de plantas medicinales cultivadas por la asociación flor de campo en la estancia y mushukwiñary en Tambalo de Pasa para promover su desarrollo, por **Tituaña**, **2013**, de <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/8563/1/MAI 05.pdf>

3.1.2. Percolación.

Es un proceso continuo en el cual el disolvente atraviesa la muestra vegetal pulverizada en un solo sentido, la muestra puede ser bañada por nuevas proporciones de disolvente y extraer todos los componentes de la misma.

Ventajas:

- Posee mayor eficiencia a diferencia de la maceración y requiere menos tiempo de extracción.
- Se pueden extraer compuestos termolábiles.
- Método adecuado para fármacos potentes y costosos.

Desventajas:

- Alto consumo de solvente.
- Se debe prestar atención en el tamaño de las partículas del material durante todo el proceso.

(Golam, 2018; Zhang et al., 2018)

Figura 2

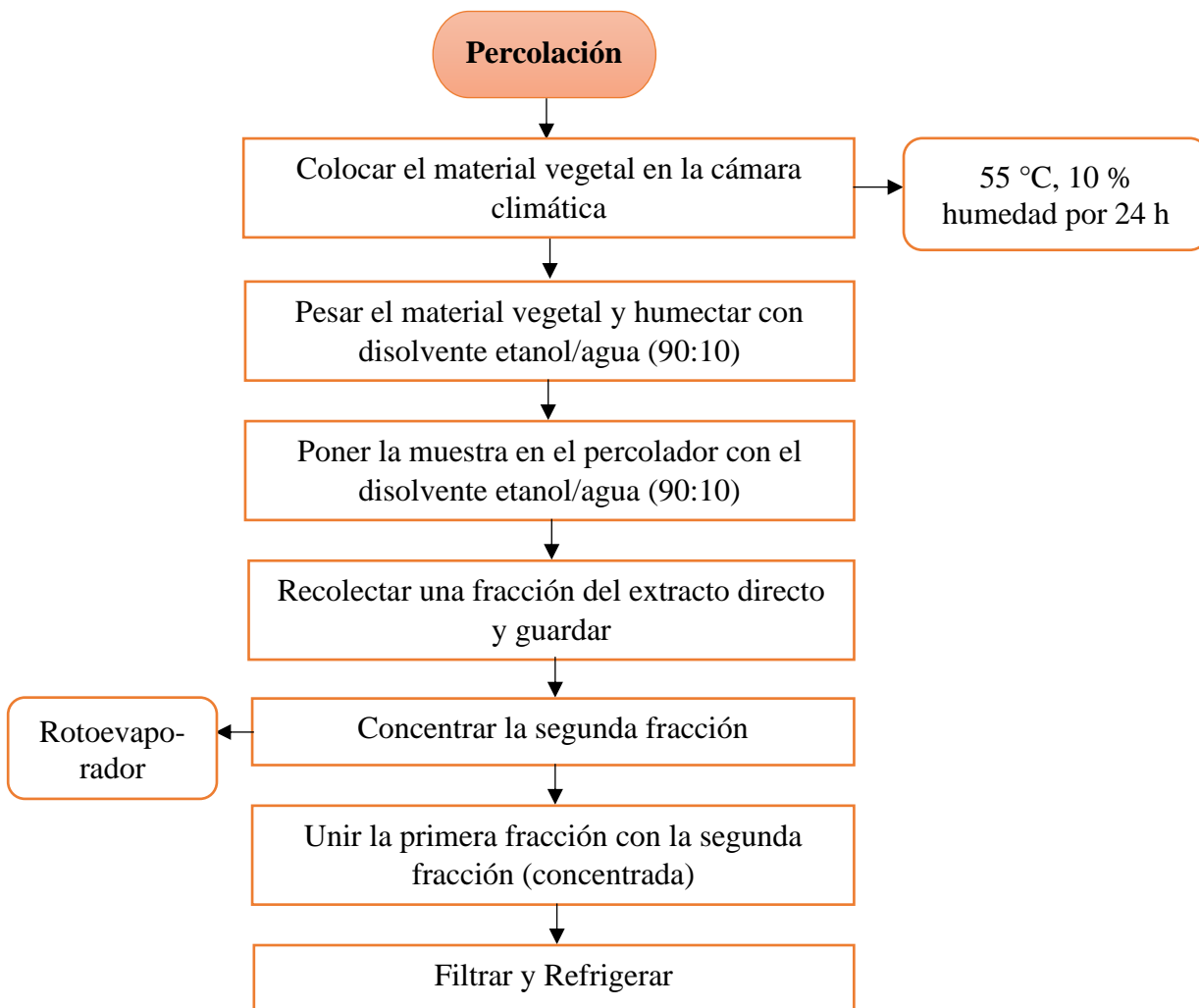
Equipo de la extracción por percolación.



Nota: Tomado de Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation, por **Azwanida, 2015**, de <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>

Figura 3

Protocolo para la extracción por percolación.



Nota: Tomado de Estandarización Fitoquímica Del Extracto De Caléndula (*Calendula Officinalis*), por **Amaguaña & Churuchumbi, 2018,** de <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>

3.1.3. Decocción.

Es un proceso que envuelve la extracción continua en caliente (temperatura de ebullición del agua), donde se utiliza un volumen determinado de agua como disolvente.

Ventajas:

- Mejora la disolución de ciertos compuestos bioactivos en comparación con la maceración.
- Es adecuada para extraer compuestos termoestables de raíces o cortezas.
- Tiene una duración corta de tiempo.
- No necesita de un operador capacitado.

Desventajas:

- Los extractos obtenidos por esta técnica poseen muchas impurezas, mismas que son solubles en agua.
- No se utiliza para la obtención de componentes termolábiles o volátiles.

(Abubakar & Haque, 2020; Dekebo, 2019; Zhang et al., 2018)

Figura 4

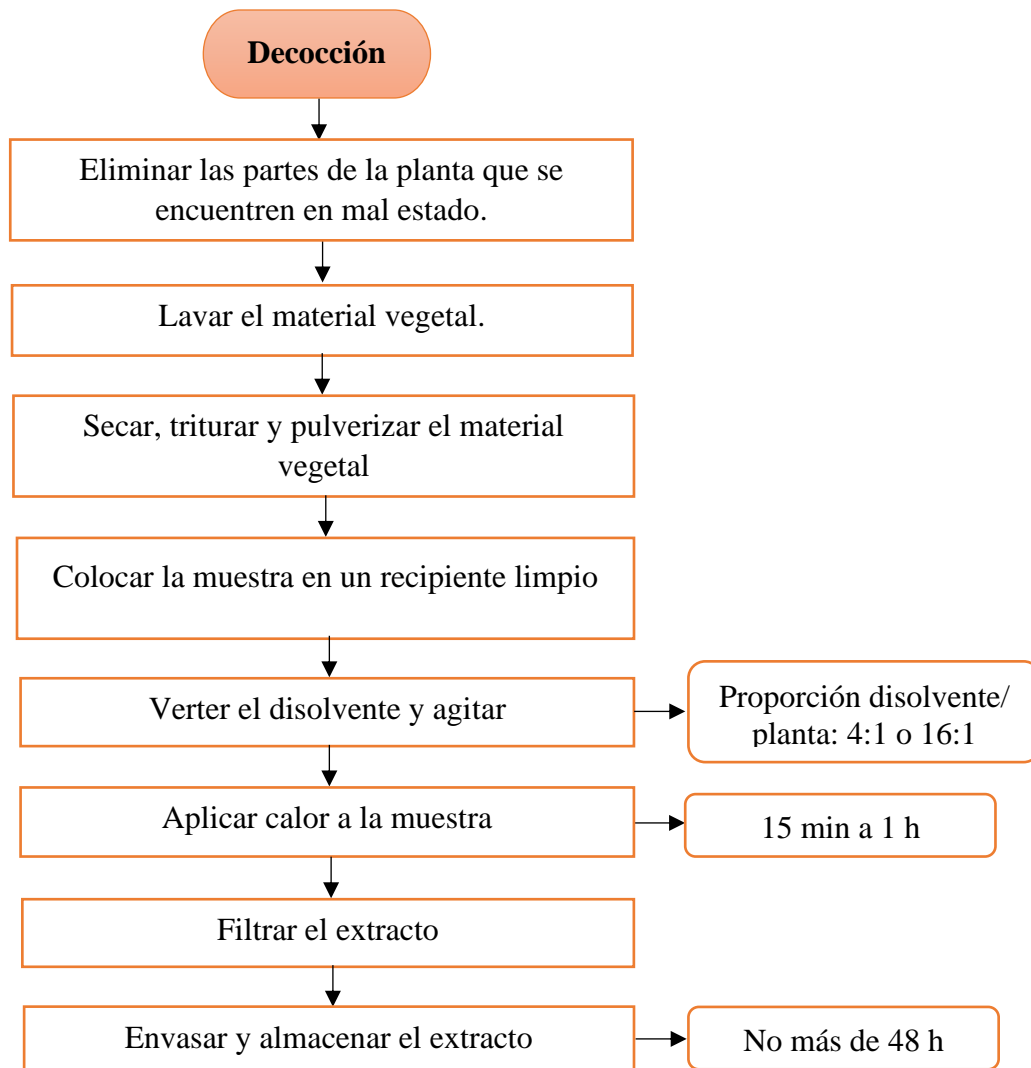
Equipo de la extracción por decocción.



Nota: Tomado de Conventional Extraction Methods Use in Medicinal Plants, their Advantages and Disadvantages, por **Golam, 2018**, de <https://www.ijbsac.org/wp-content/uploads/papers/v2i6/F0082122618.pdf>

Figura 5

Protocolo para la extracción por decocción.



Nota: Tomado de Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes, por **Abubakar & Haque, 2020**, de https://doi.org/10.4103/JPBS.JPBS_175_19

3.1.4. Extracción por reflujo.

Es un proceso de extracción sólido-líquido, el cual se realiza a temperatura constante con evaporación y condensación repetibles del solvente en un período de tiempo.

Ventajas:

- Necesita de menos disolvente y tiempo de extracción.
- Es más eficiente que la percolación o maceración.

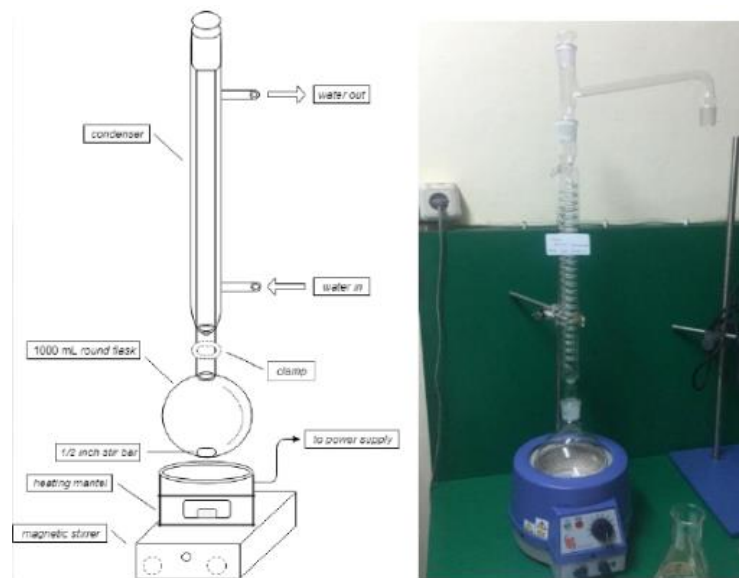
Desventajas:

- No es eficiente para extraer productos naturales termolábiles.

(Chua et al., 2016; Zhang et al., 2018)

Figura 6

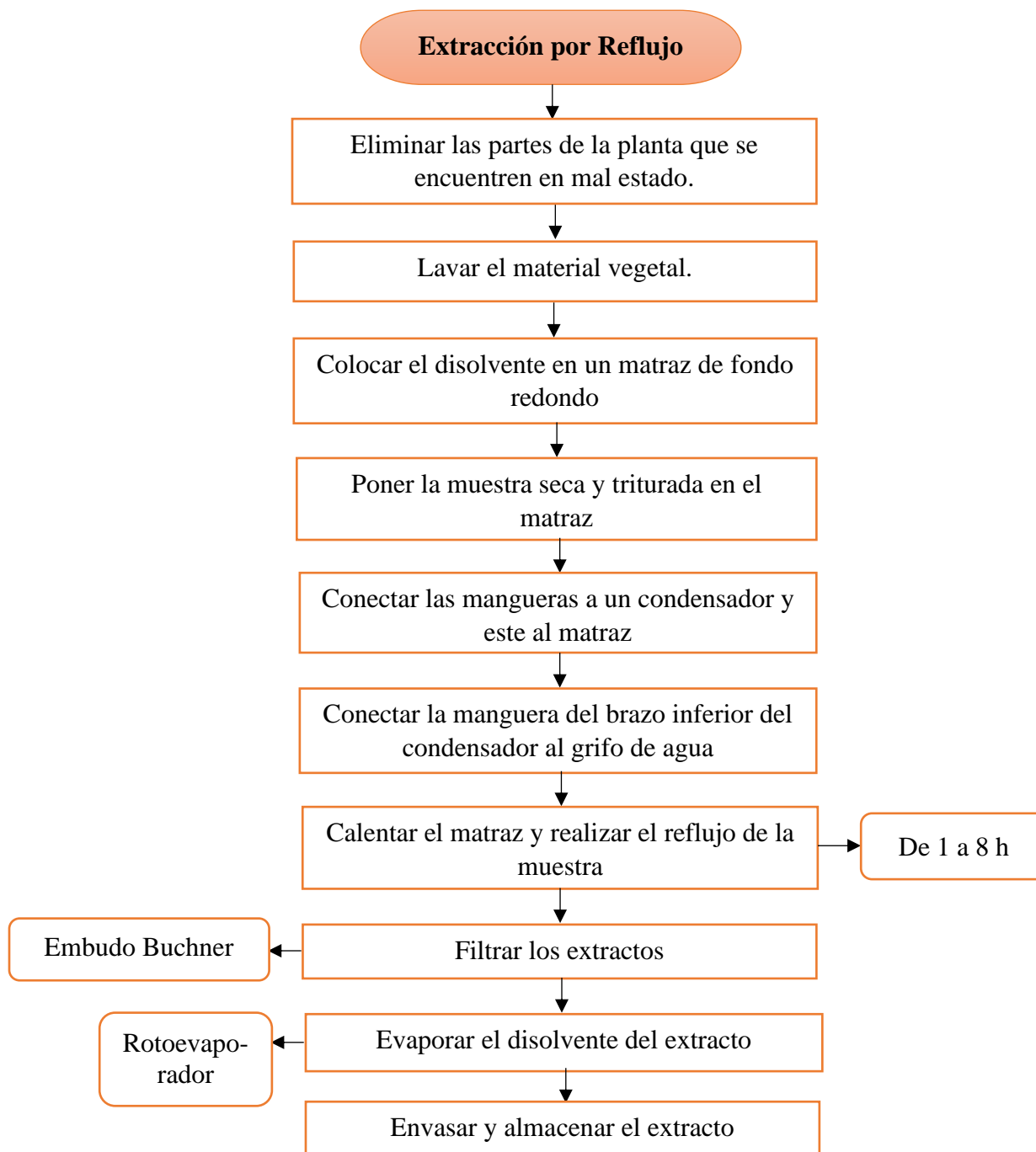
Equipo de la extracción por reflujo.



Nota: Tomado de Extraction and antioxidant activity test of black Sumatran incense, por **Hidayat et al., 2019**, de <https://doi.org/10.1063/1.5139354>

Figura 7

Protocolo para la extracción por reflujo.



Nota: Tomado de Techniques for the Extraction of Bioactive Compounds from Lebanese Urtica dioica, por **Bandar et al., 2013**, de <https://www.imedpub.com/articles/techniques-for-the-extraction-of-bioactivecompounds-from-lebanese-urtica-dioica.pdf>; The effect of extraction method on the major constituents and biological effects of Trachyspermum ammi L. fruits.

3.1.5. Extracción por Soxhlet.

Es una técnica automática que combina los beneficios de la extracción por reflujo y percolación, además que utiliza el principio del reflujo para obtener los extractos continuamente con un disolvente fresco, para ello se utiliza un aparato extractor de vidrio llamado Soxhlet. También se lo conoce como extracción en caliente continua.

Ventajas:

- Requiere de una menor cantidad de disolvente y tiempo de extracción.
- Posee una alta eficiencia de extracción.
- La técnica es adecuada para materiales vegetales termoestables o que poseen impurezas insolubles.
- No requiere de filtración y se puede aplicar grandes cantidades de calor.

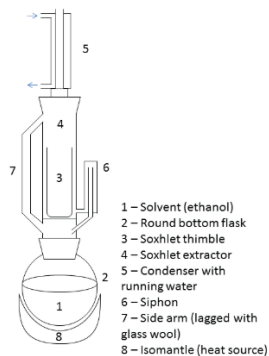
Desventajas:

- No es adecuado para compuestos termolábiles, pues incrementa las posibilidades de degradación térmica del extracto.
- Necesita de disolventes de alta pureza, los cuales son costosos.

(Abubakar & Haque, 2020; Azwanida, 2015; Zhang et al., 2018)

Figura 8

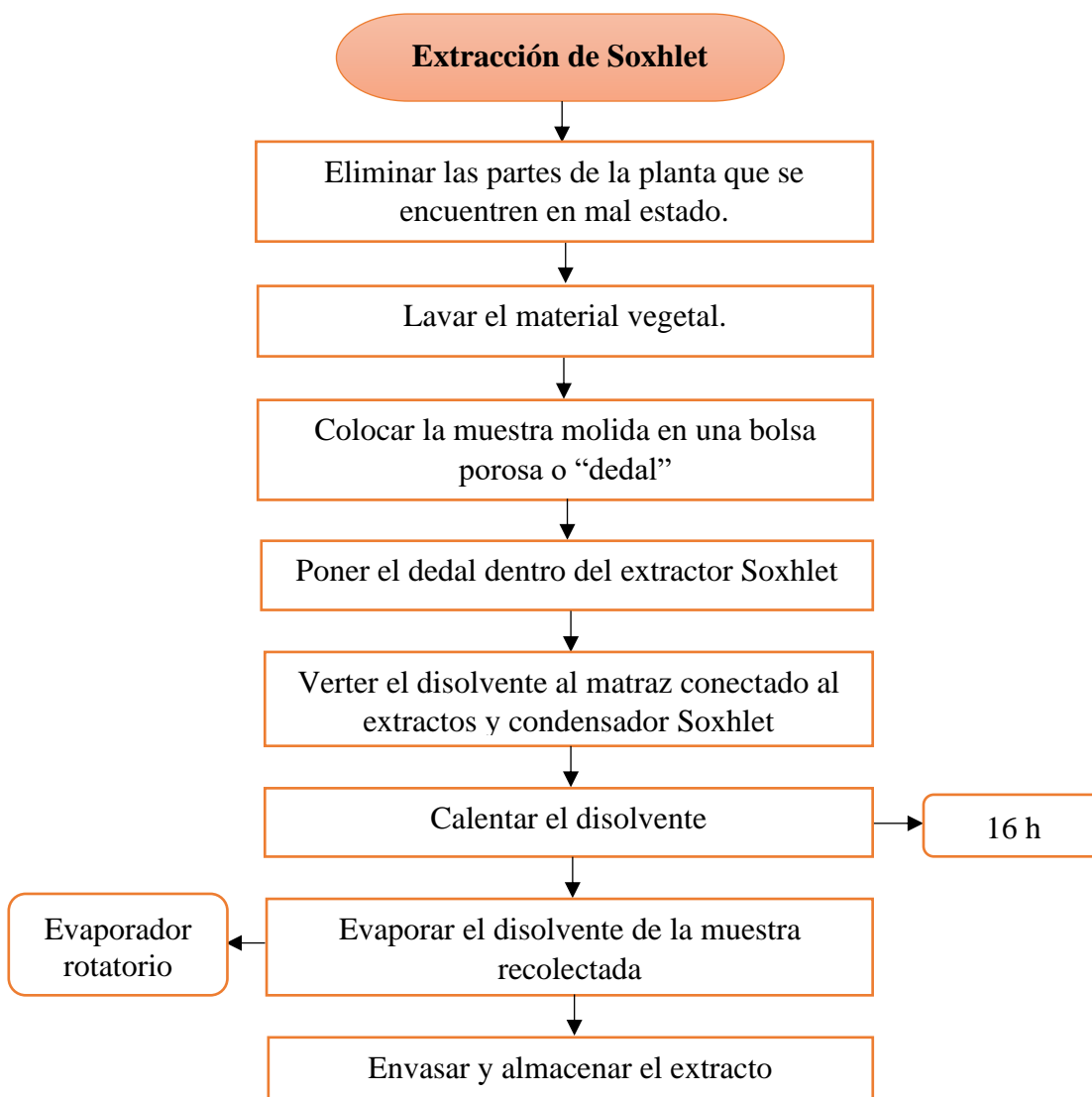
Equipo para la extracción por Soxhlet.



Nota: Tomado de Using Soxhlet Ethanol Extraction to Produce and Test Plant Material (Essential Oils) for Their Antimicrobial Properties, por **Redfern et al., 2014**, de <https://doi.org/10.1128/jmbe.v15i1.656>

Figura 9

Protocolo para la extracción por Soxhlet.



Nota: Tomado de Using Soxhlet Ethanol Extraction to Produce and Test Plant Material (Essential Oils) for Their Antimicrobial Properties, por **Redfern et al., 2014**, de <https://doi.org/10.1128/jmbe.v15i1.656>

3.1.6. Extracción acelerada por disolvente (ASE)

Se necesita de una presión alta para la extracción de los metabolitos, ya que mantiene a los disolventes líquidos por encima de su punto de ebullición. También es conocida como extracción de líquido presurizado, extracción por fluidos presurizados o acelerada.

Ventajas:

- Permite una alta penetración del disolvente en la materia prima.
- Reduce tiempos de extracción y disolvente.
- Análisis de muestras más rápido.
- Bajo riesgo de exposición a disolventes.

(Gomes et al., 2017; Zhang et al., 2018)

Figura 10

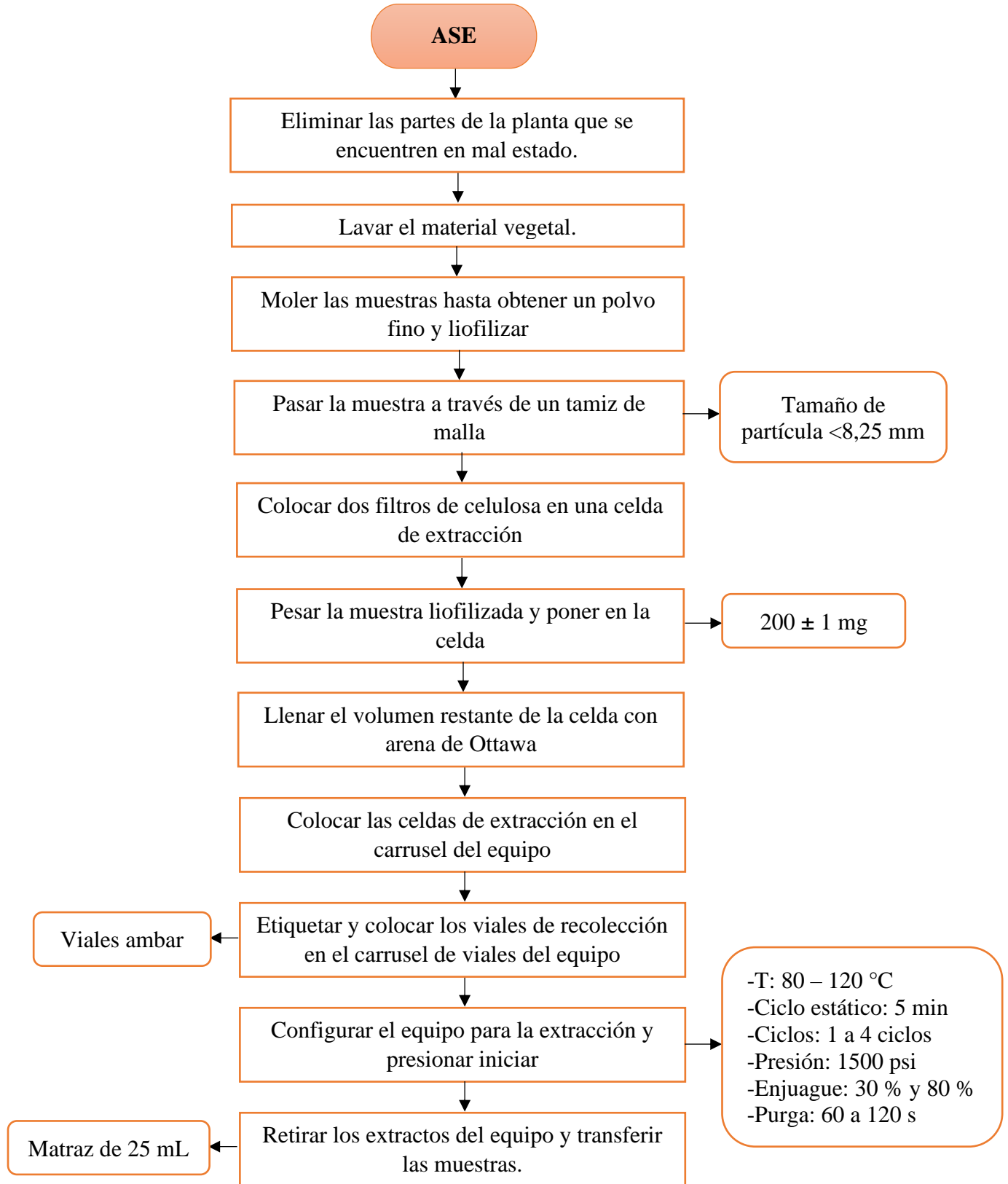
Equipo para la extracción por ASE.

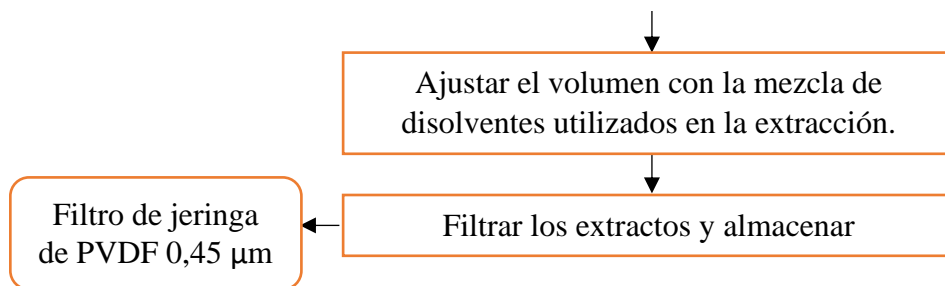


Nota: Tomado de Técnica De Extracción Acelerada De Solventes, por **Lanzetta Rengifo, 2018**, de <https://lanzettarengifo.com/tecnica-de-extraccion-acelerada-de-solventes/>

Figura 11

Protocolo para la extracción por ASE.





Nota: Tomado de Extraction of Phenolic Acids from Plant Tissue Using Accelerated Solvent Extraction (ASE), por **Dionex Corporation, 2011**, de <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/40398-AN357-ASE-Phenolic-Extracts-Plants-27Apr2011-LPN1834-02.pdf>

3.1.7. Extracción con fluidos supercríticos (SFE).

En esta técnica se utilizan fluidos supercríticos (SF) como disolventes para la extracción, por ejemplo: el dióxido de carbono supercrítico, debido a que son selectivos, bajo costo, no tóxicos, permiten la extracción de compuesto termolábiles y tienen una solubilidad e infusibilidad parecida a los líquidos y gases, respectivamente. Además de disolver una gran variedad de productos naturales. Si se desea mejorar la solubilidad del dióxido de carbono supercrítico, se debe añadir pequeñas cantidades de etanol y metanol al mismo.

Ventajas:

- Se puede añadir al SF modificadores que potencien sus propiedades disolventes.

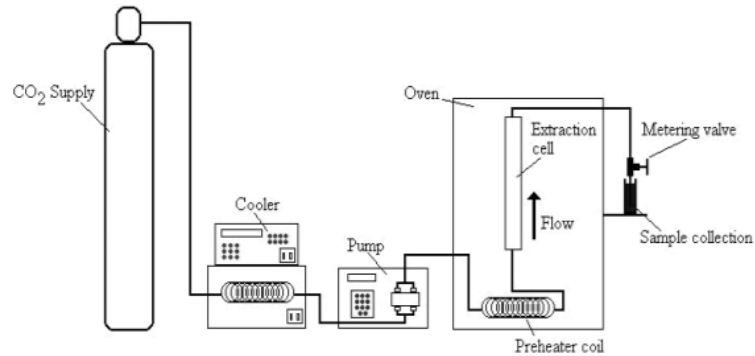
Desventajas:

- El dióxido de carbono supercrítico tiene poca solubilidad para los compuestos polares

(Dekebo, 2019; Zhang et al., 2018)

Figura 12

Equipo para la extracción por SFE.



Nota: Tomado de Supercritical Fluid Extraction, por **Sapkale et al., 2010**, de <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00675-9>

Figura 13

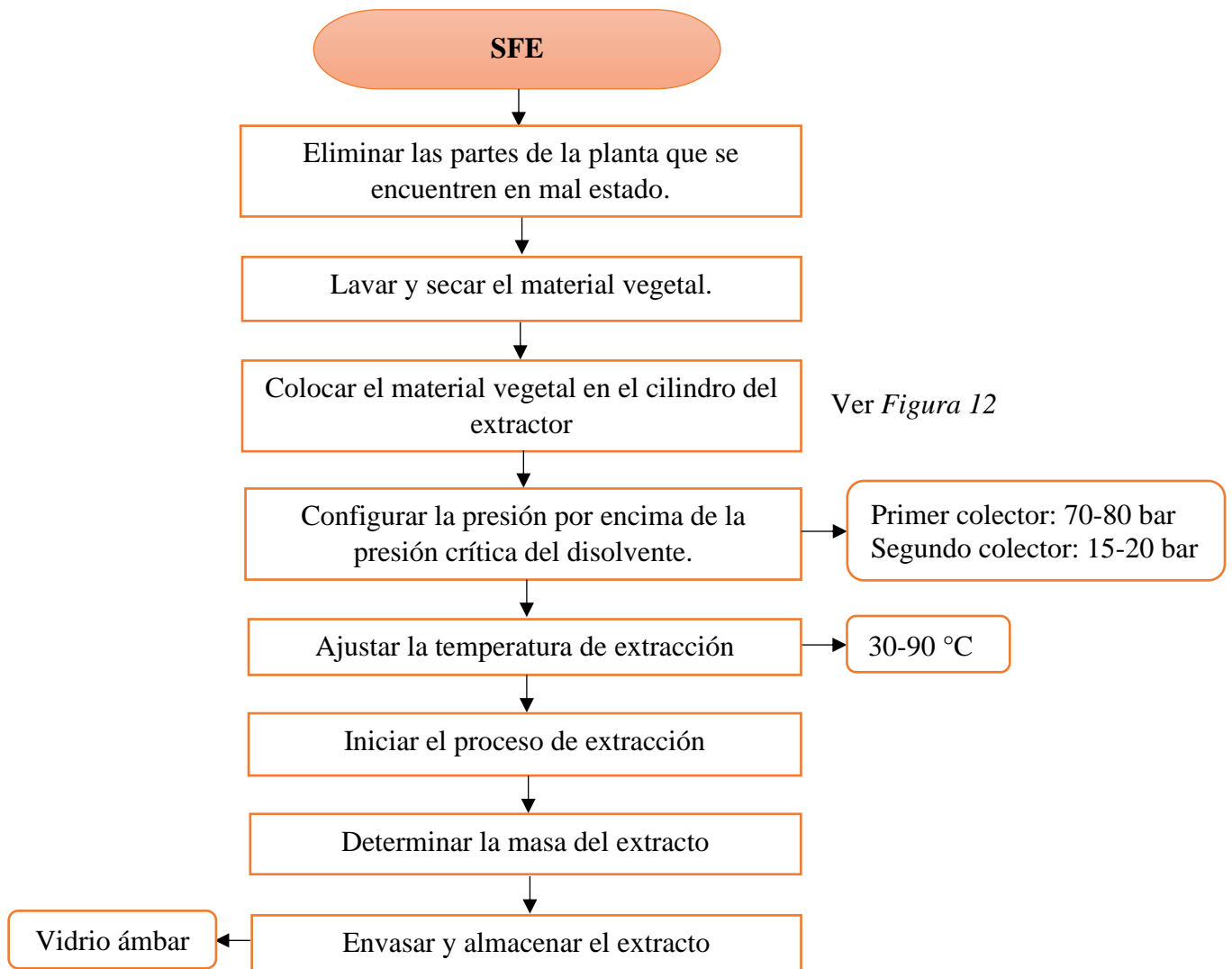
Disposición del material vegetal en el lecho de extracción.



Nota: Tomado de Aplicación de procesos de separación con CO₂ supercrítico a la producción y optimización de bioplaguicidas, por **Navarro, 2012**, de https://www.aragon.es/documents/20127/674325/TESIS_BIOPLAGUICIDAS.pdf/c491abd7-a8e5-3d1a-6815-70239f2a362a

Figura 14

Protocolo para la extracción por SFE.



Nota: Tomado de Aplicación de procesos de separación con CO₂ supercrítico a la producción y optimización de bioplaguicidas, por Navarro, 2012, de https://www.aragon.es/documents/20127/674325/TESIS_BIOPLAGUICIDAS.pdf/c491abd7-a8e5-3d1a-6815-70239f2a362a; Guia de Extracción por Fluidos Super críticos: Fundamentos y Aplicaciones, por Román et al., 2016, de https://repositorio.sena.edu.co/bitstream/handle/11404/4698/guia_extraccion_fluidos_supercriticos.pdf;jsessionid=3E4196B0876B8EE7FA056EC3C07301DE?sequence=1

3.1.8. Extracción asistida por ultrasonidos (EAU).

Se basa en el uso de la energía de las ondas ultrasónicas que oscilan entre 20 y 2000 kHz para la extracción de los metabolitos, el ultrasonido es el solvente, mismo que genera cavitación que acelera la difusión, disolución y transferencia de calor del soluto, además de alterar las propiedades físicas y químicas de la muestra, facilitando la liberación de los compuestos. Igualmente, se la conoce como extracción ultrasónica o sonicación.

Ventajas:

- Esta técnica es aplicable para muestras pequeñas.
- Bajo consumo de disolventes y energía.
- Reducción de tiempo de extracción y temperatura.
- Se puede utilizar para extraer compuestos termolábiles e inestables.

Desventajas:

- Es difícil de reproducir.
- Si se aplica una excesiva cantidad de energía, puede degradar el fitoquímico de los extractos.

(Abubakar & Haque, 2020; Dekebo, 2019; Zhang et al., 2018)

Figura 15

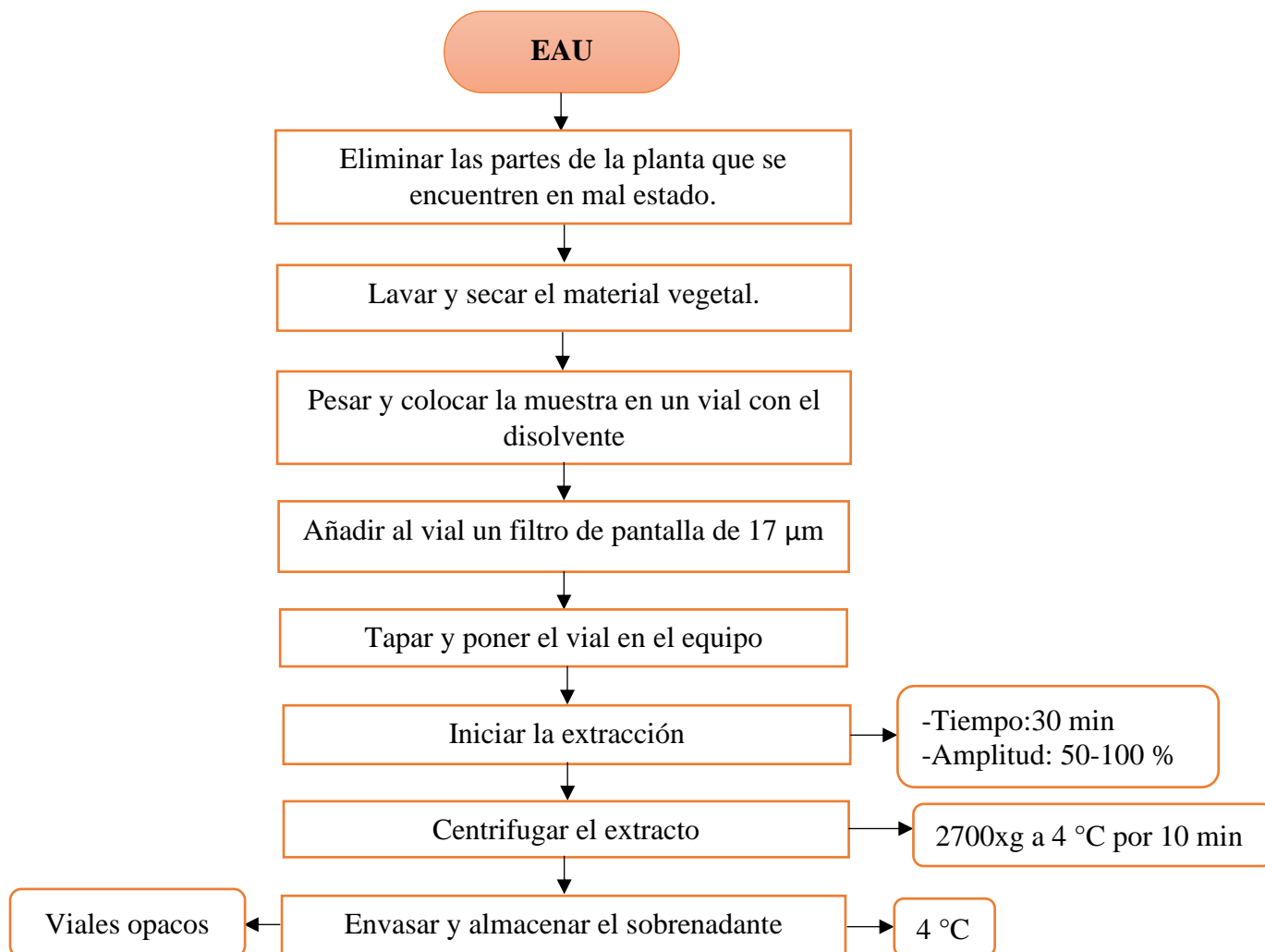
Equipo para la extracción por EAU.



Nota: Tomado de extracción automática por ultrasonidos de material vegetal con el muestreador multipropósito MPS del Gerstel como estación de trabajo con doble cabezal, por **LabCiencia**, 2015, de http://www.gerstel.com/pdf/p-lc-an-2014-08_es.pdf

Figura 16

Protocolo para la extracción por EAU.



Nota: Tomado de Ultrasound-Assisted Extraction Of Phenolics Compounds From Chia (Salvia Hispanica L.) Seeds And Their Antioxidant Activity, por Corona et al., 2016, de <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v50n4/1405-3195-agro-50-04-403.pdf>; Extracción automática por ultrasonidos de material vegetal con el muestreador multipropósito MPS del Gerstel como estación de trabajo con doble cabezal, por **LabCiencia**, 2015, de http://www.gerstel.com/pdf/plc-an-2014-08_es.pdf

3.1.9. Extracción asistida por microondas (MAE).

Este método de extracción usa la energía de microondas que puede ir desde los 300 MHz a 300 GHz y longitudes de onda ente 1 cm y 1 m para favorecer la partición de los analitos de la muestra, la transferencia de calor y masa que se realizan en la MAE poseen la misma dirección, lo que permite crear un efecto sinérgico que acelera la extracción y mejora el rendimiento de la misma, además de promover la penetración del disolvente en el material vegetal. Existen 2 tipos: sin disolvente (compuestos volátiles) y con disolvente (compuestos no volátiles).

Ventajas:

- Aumenta el rendimiento del extracto, disminuye la degradación térmica y el calentamiento selectivo de la matriz
- Reduce el empleo de disolventes orgánicos, la cantidad de disolvente y el tiempo de extracción.
- Utiliza menos disolventes tóxicos.
- El método es óptimo para la obtención de flavonoides y compuestos fenólicos.
- Tiene mayor reproducibilidad

Desventajas:

- Los compuestos taninos y antocianinas pueden degradarse debido a las altas temperaturas que requiere el proceso.

(Abubakar & Haque, 2020; Dekebo, 2019; Zhang et al., 2018)

Figura 17

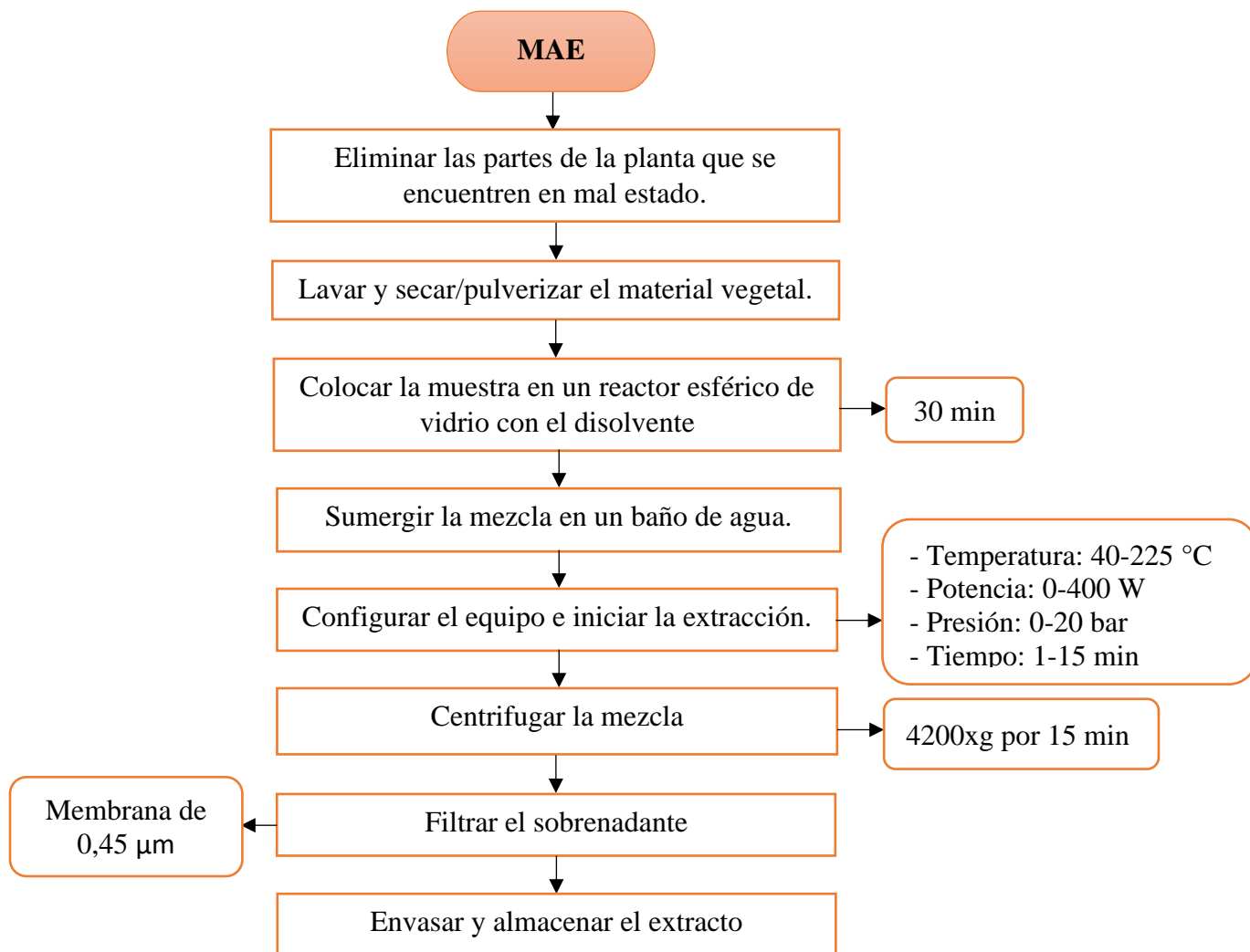
Equipo para la extracción por MAE.



Nota: Tomado de Intelligent Microwave Catalytic Synthesis Extractor, por **XiangHu Technologies, 2021**, de <http://en.xianghukeji.com/product/43.html>

Figura 18

Protocolo para la extracción por MAE.



Nota: Tomado de microwave Extraction of active principles from medicinal plants. UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science, por **Alupului et al., 2012**, de https://www.researchgate.net/publication/237051724_Microwave_Extraction_of_active_principles_from_medicinal_plants; Microwave-assisted extraction of natural antioxidants from the exotic *Gordonia axillaris* fruit: Optimization and identification of phenolic compounds, por **Li et al., 2017**, de <https://doi.org/10.3390/molecules22091481>; Microwave-assisted extraction of *Cucurbita pepo* L. (pumpkin) seed lipids, por **Salomón et al., 2013**, de <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v18n1/pla04113.pdf>

3.1.10. Extracción de campo eléctrico pulsado (PEF).

Es una técnica no térmica en que la transferencia de masa aumenta por lo que destruye las estructuras de la membrana y facilita la extracción del metabolito. La eficacia de la PEF depende principalmente de la intensidad del campo, entrada específica de energía, número de pulsos, temperatura del tratamiento.

Ventajas:

- Aumenta el rendimiento del proceso.
- Disminuye el tiempo de extracción.
- Minimiza la degradación de los extractos termolábiles.

(Zhang et al., 2018)

Figura 19

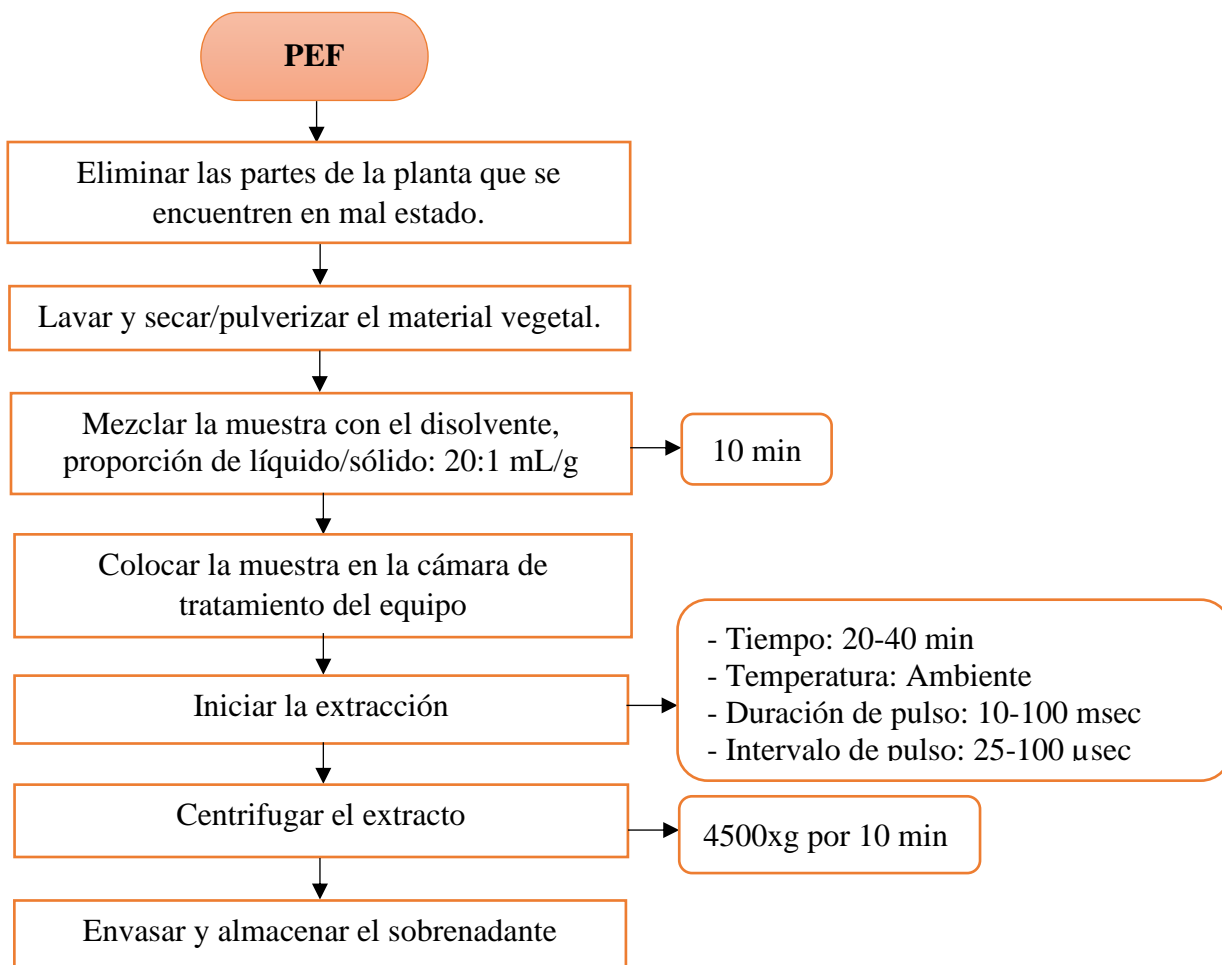
Equipo para la extracción por PEF.



Nota: Tomado de Removing Barriers to Commercialization of PEF Systems and Processes. *Diversified Technologies*, por **Kempkes et al., 2015**, de https://www.researchgate.net/publication/283904199_Removing_Barriers_to_Commercialization_of_PEF_Systems_and_Processes

Figura 20

Protocolo para la extracción por PEF.



Nota: Tomado de pulsed electric field extraction and antioxidant activity determination of moringa oleifera dry leaves: A comparative study with other extraction techniques, por **Bozinou et al., 2019**, de <https://doi.org/10.3390/beverages5010008>; Evaluation of pulsed electric field polyphenol extraction from Vitis vinifera, Sideritis scardica and Crocus sativus, por **Lakka et al., 2021**, de <https://doi.org/10.3390/chemengineering5020025>

3.1.11. Extracción asistida por enzimas (EAE).

Se basa en la acción hidrolítica de enzimas como la celulosa, α -amilasa, proteasa, y pectina, las cuales actúan sobre los componentes de la pared o membrana celular facilitando la liberación de los extractos, debido a que algunas matrices poseen compuestos fitoquímicos que se encuentran en el citoplasma y estos son retenidos por la red polisacárido-lignina y no permiten la extracción de los mismos. Existen dos formas de realizar el proceso, a través de la extracción acuosa asistida por enzimas (EAAE) y prensado en frío asistido por enzimas (EACP).

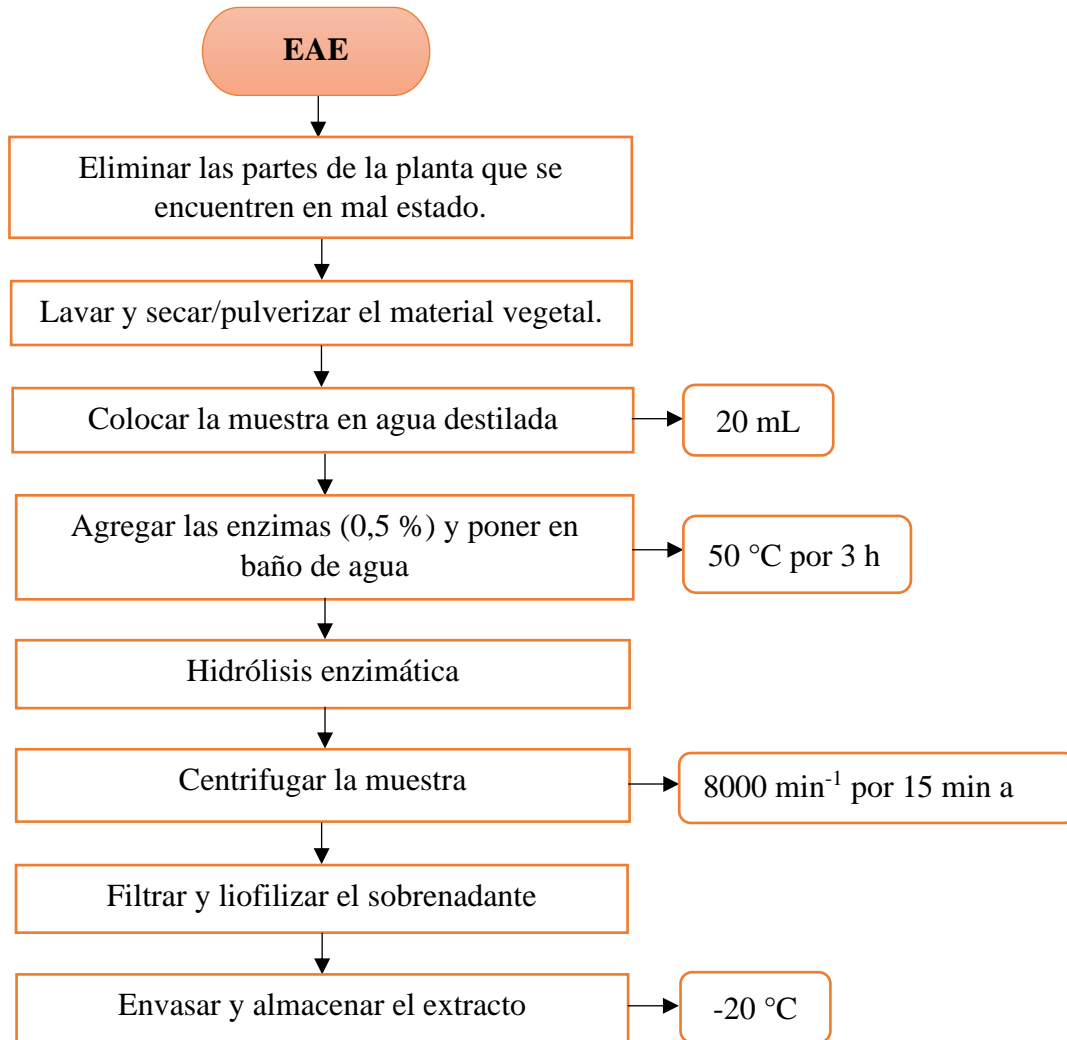
Ventajas:

- Técnica novedosa y eficaz para la extracción de metabolitos secundarios con propiedades antioxidantes y flavonoides.
- Mejor rendimiento de la extracción y calidad del extracto.
- Menor tiempo de extracción y cantidad de disolventes.

(Dekebo, 2019; Zhang et al., 2018)

Figura 21

Protocolo para la extracción por EAE.



Nota: Tomado de Enzyme-assisted extraction of bioactive material from *Chondrus crispus* and *Codium fragile* and its effect on Herpes simplex virus (HSV-1), por **Kulshreshtha et al., 2015**, de <https://doi.org/10.3390/md13010558>

3.1.12. Hidrodestilación (HD).

EL método tradicional para la extracción de aceites volátiles es la HD, la cual consta de tres procesos fisicoquímicos importantes: hidrodifusión, hidrólisis y descomposición por calor en esta los aceites esenciales se evaporan calentando una mezcla de solvente y el material vegetal, liberando los compuestos bioactivos de la matriz de la planta. Existen tres tipos de HD: destilación de agua, destilación de agua y vapor y destilación directa de vapor.

Ventajas:

- Bajo costo en la fabricación del equipo y operación.

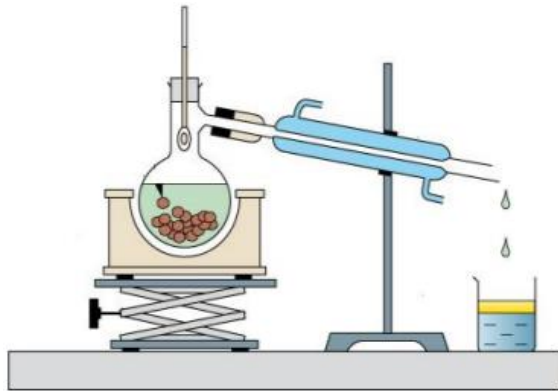
Desventajas:

- Algunos compuestos termolábiles se descomponen en HD.

(Rassem et al., 2016; Zhang et al., 2018)

Figura 22

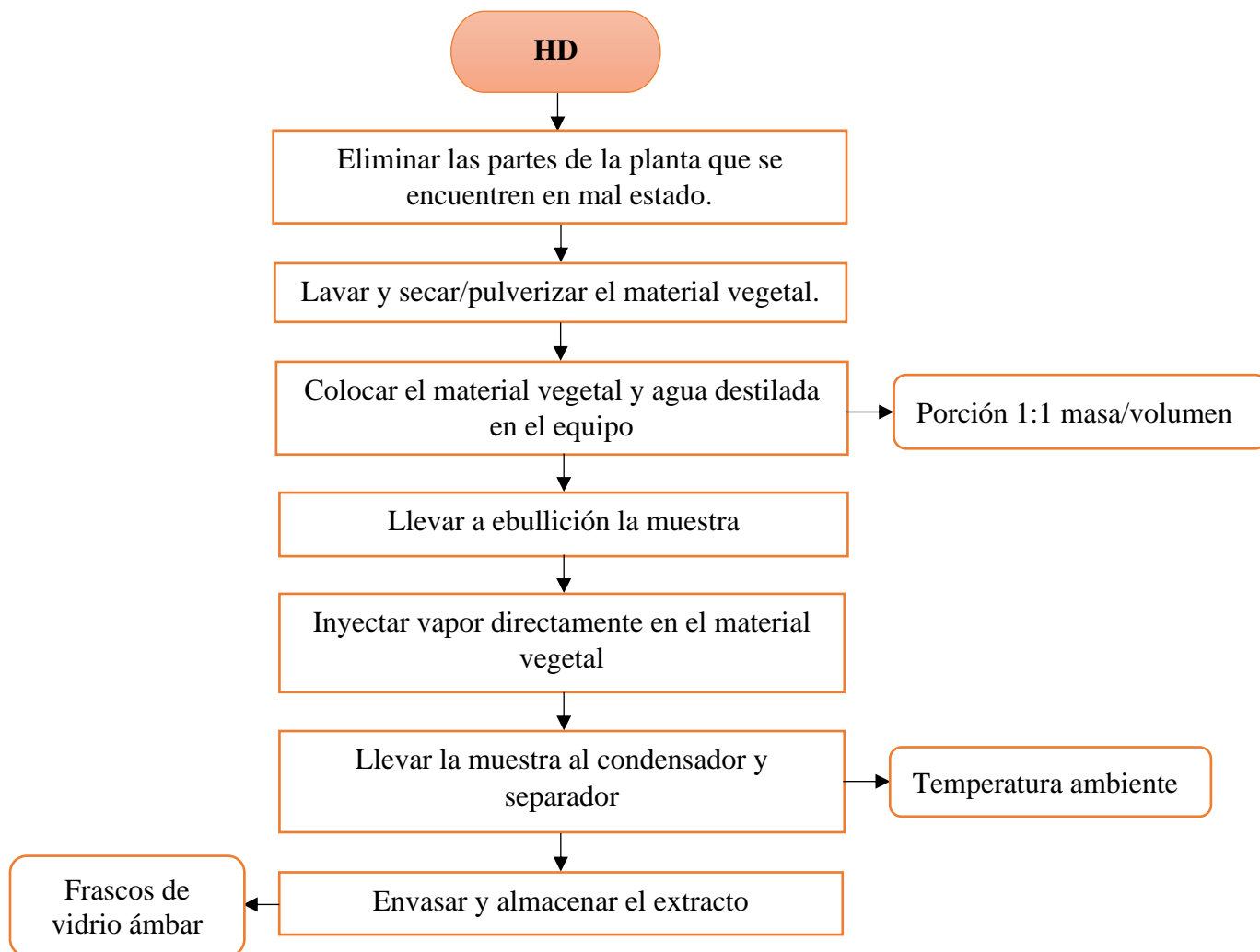
Equipo para la extracción por HD.



Nota: Tomado de Techniques For Extraction of Essential Oils From Plants: A Review, por **Rassem et al., 2016**, de <http://www.ajbasweb.com/old/ajbas/2016/November/117-127.pdf>

Figura 23

Protocolo para la extracción por HD.



Nota: Tomado de Extraction of Polyphenols From Aromatic and Medicinal Plants: An Overview of the Methods and the Effect of Extraction Parameters, por **Oreopoulou et al., 2019**, de <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813768-0.00025-6>; Influence of Harvesting Stage and Distillation Time of Damask Rose (*Rosa damascena* Mill.) Flowers on Essential Oil Content and Composition in the Western Himalayas, por **Sharma & Kumar, 2018**, de <https://doi.org/10.1080/0972060X.2017.1399089>

3.2. Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana.

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (AST), son una herramienta importante que permiten determinar la sensibilidad que poseen las bacterias a ciertos agentes antimicrobianos, estas pruebas se utilizan principalmente en microorganismos con genes de resistencia adquiridos como *Enterobacteriaceae* productoras de betalactamasas de espectro extendido, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp. y *Enterococcus* sp (Benkova et al., 2020).

Estos procedimientos generalmente se lo realizan al menos en 24 horas para obtener el crecimiento de los microorganismos y 24 horas adicionales para realizar la caracterización del aislamiento (identificación bioquímica y las AST). Algunos métodos proyectan resultados cualitativos a través de categorías como susceptible (S), intermedio (I) o resistente (R), pero también se puede obtener resultados cuantitativos, los cuales expresan las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) que inhiben el crecimiento visible de un microorganismo. La incubación las muestras por lo general se realizan durante la noche, pero en ciertos microorganismos como los anaerobios, este período puede extenderse. También las concentraciones de los agentes antimicrobianos se realizan en diluciones dobles y se expresan en mg/mL o µg/mL (Benkova et al., 2020).

Actualmente existen dos tipos de AST, las cuales son las fenotípicas y genotípicas, la primera posee las ventajas de predecir la resistencia a los medicamentos y susceptibilidad, así como enumerar el nivel de sensibilidad de un patógeno al compuesto antimicrobiano. Mientras que la segunda es un método más directo y eficaz que elimina los cultivos bacterianos, incubación prolongada, posibilidades de contaminación y prolongación de infecciones mortales. Sin embargo posee desventajas como los agentes microbianos necesarios para el análisis necesitan de un ensayo específico para su detección, solo se pueden detectar genes de resistencia potenciales, mismos que no son tan relevantes debido a las mutaciones coincidentes, el perfil genético de todas las bacterias no se encuentra definidos, probabilidad de resultados falsos/positivos, requieren de reactivos costosos con maquinaria en condiciones específicas de mantenimiento (Benkova et al., 2020; Khan et al., 2019).

3.2.1. Métodos Fenotípicos

3.2.1.1. Difusión

Fue desarrollado en 1940 (método de Kirby-Bauer) y es considerado como uno de los ensayos de AST más antiguos y utilizados. Se encuentra influenciado por factores fisicoquímicos como evaporación, solubilidad, pH, temperatura, medios de cultivo y proporciona resultados cualitativos, además la zona de inhibición que se obtiene tiene correlación con el antibiótico y este se compara con la tabla estándar de anchos de zona predeterminados.

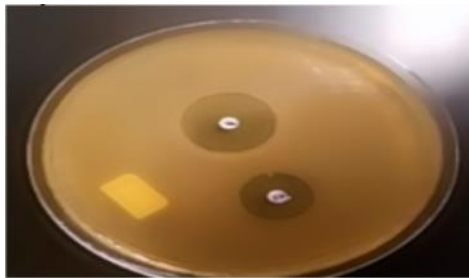
Ventajas:

- Simplicidad, reproducibilidad, facilidad para modificar los discos antimicrobianos.
- Posibilidad de utilizarlos como prueba de detección contra numerosos aislamientos.
- Bajo costo

(Benkova et al., 2020; Khan et al., 2019)

Figura 24

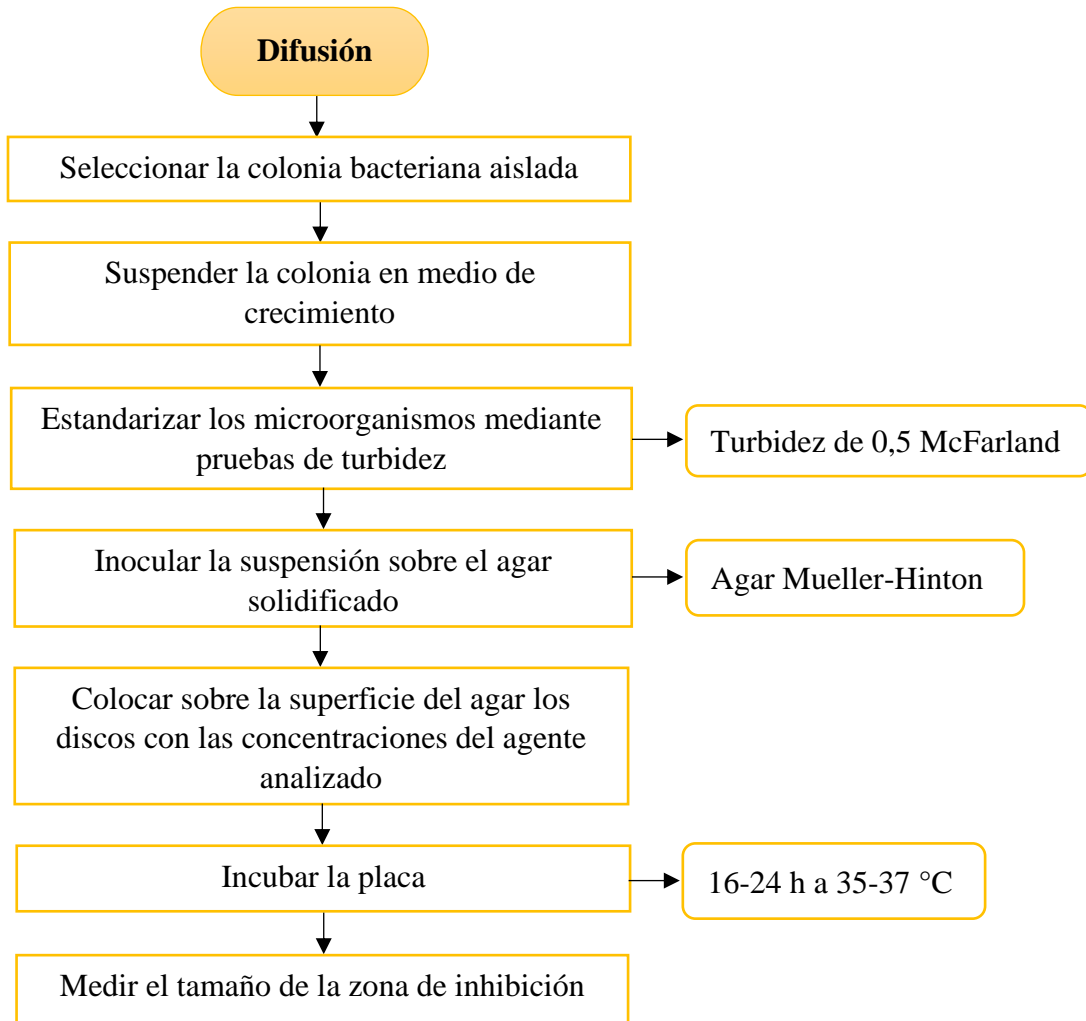
Resultado de la AST por difusión.



Nota: Tomado de Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing, por **Khan et al., 2019**, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6627445/pdf/diagnostics-09-00049.pdf>

Figura 25

Protocolo de AST por difusión.



Nota: Tomado de Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing, por **Khan et al., 2019**, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6627445/pdf/diagnostics-09-00049.pdf>; Antimicrobial susceptibility testing: currently used methods and devices and the near future in clinical practice, por **Benkova et al., 2020**, de <https://doi.org/10.1111/jam.14704>

3.2.1.2. Dilución

Permite el crecimiento y la identificación de las poblaciones bacterianas en una suspensión o en placas de agar y valores de CMI de agentes antimicrobianos. Este método se utiliza principalmente para la medición cuantitativa de la actividad antimicrobiana de bacterias, levaduras y hongos filamentosos. Existen tres tipos de dilución: microdilución, macrodilución y dilución en agar.

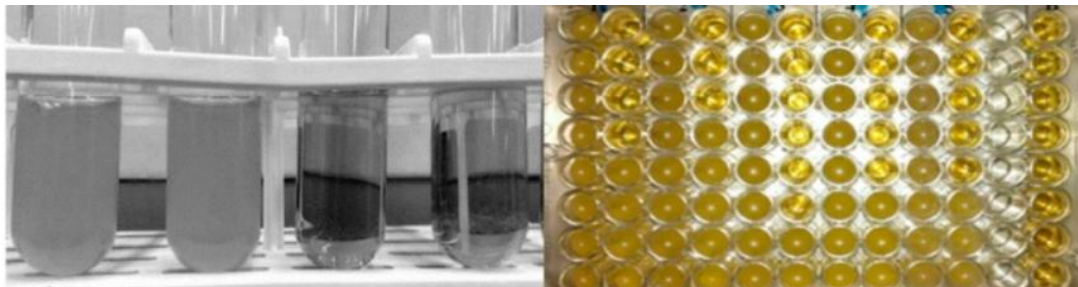
Desventajas:

- Necesidad de un gran volumen de reactivos y espacio experimental
- Pasos de dilución tediosos
- Probabilidad de resultados falsos/positivos
- Posibilidad de contaminación cruzada
- Incompatibilidad de discriminar las bacterias

(Benkova et al., 2020; Khan et al., 2019)

Figura 26

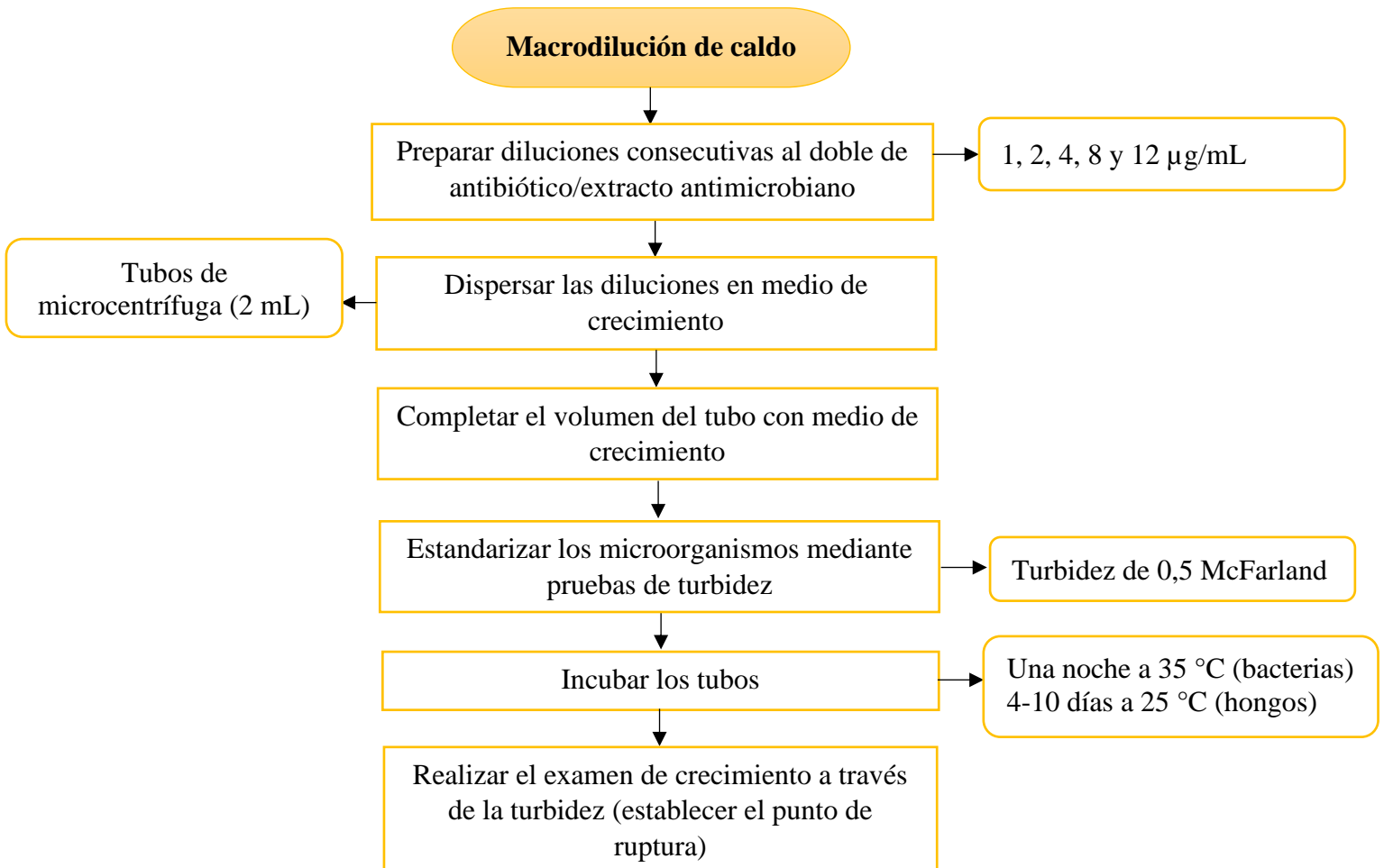
Resultado de la AST por dilución.



Nota: Tomado de Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing, por **Khan et al., 2019**, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6627445/pdf/diagnostics-09-00049.pdf>

Figura 27

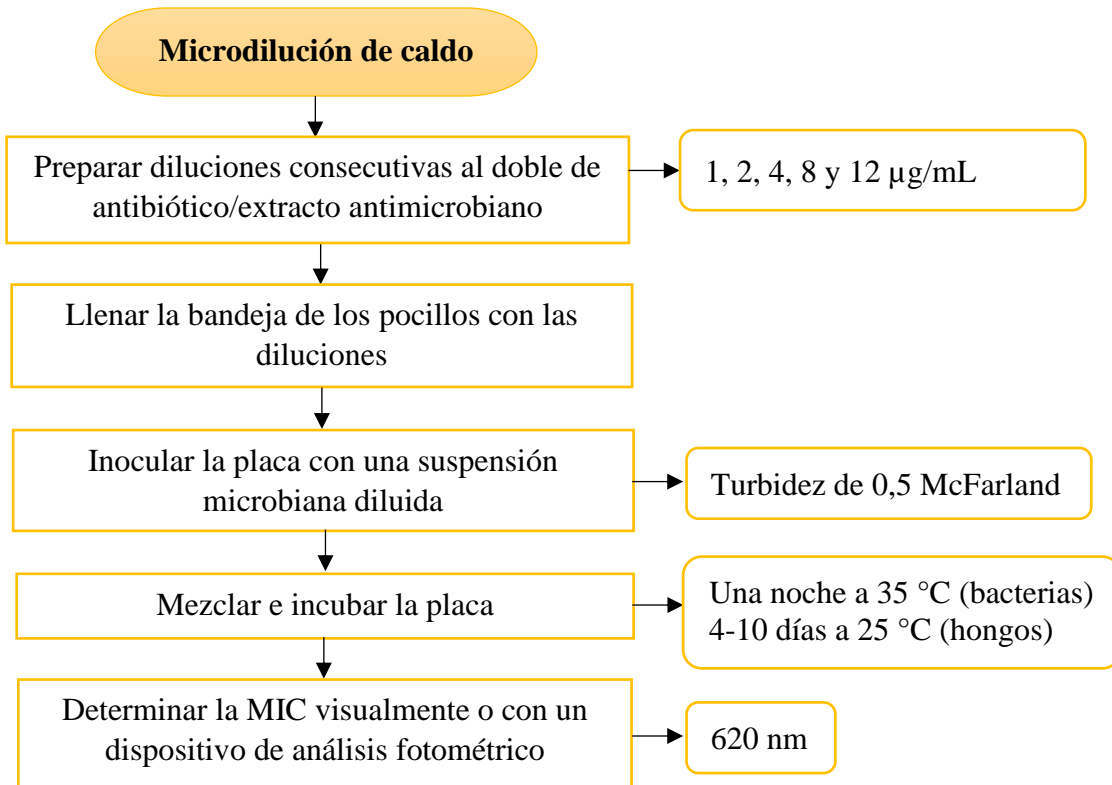
Protocolo para AST por Macrodilución de caldo.



Nota: Tomado de Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing, por **Khan et al., 2019**, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6627445/pdf/diagnostics-09-00049.pdf>; Antimicrobial susceptibility testing: currently used methods and devices and the near future in clinical practice, por **Benkova et al., 2020**, de <https://doi.org/10.1111/jam.14704>

Figura 28

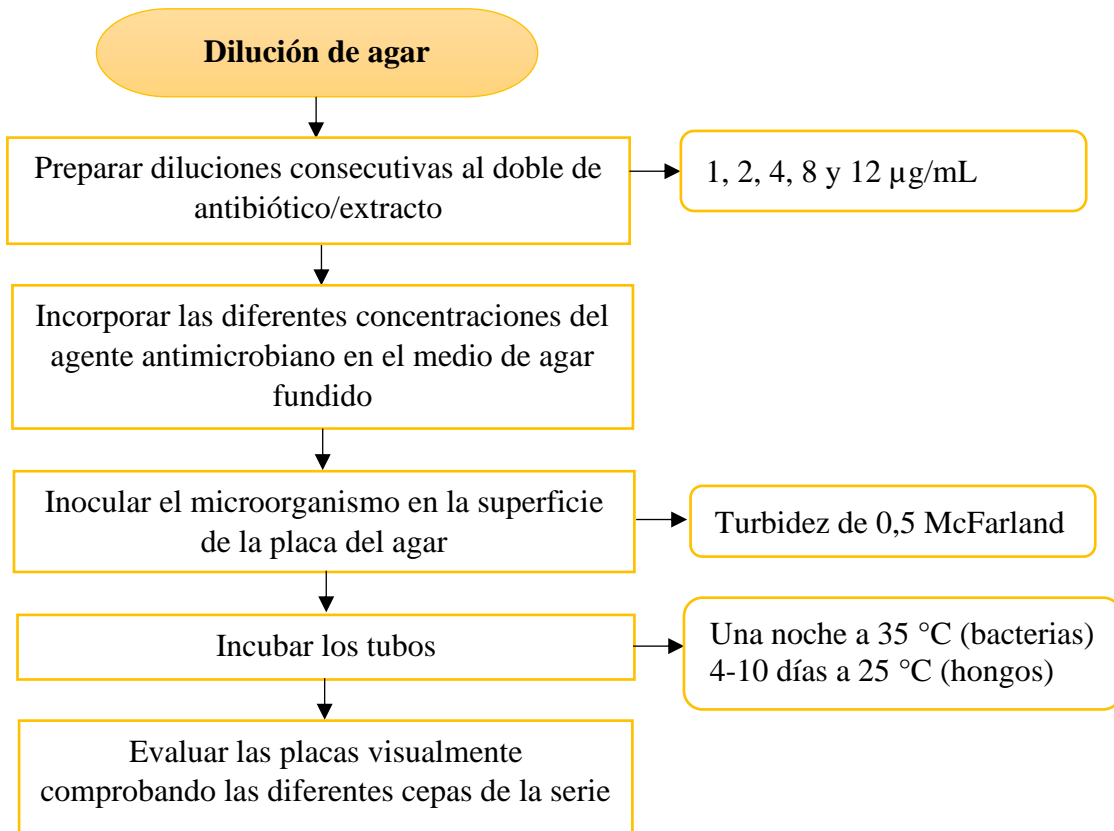
Protocolo para AST por Microdilución de caldo.



Nota: Tomado de Antimicrobial susceptibility testing: currently used methods and devices and the near future in clinical practice, por **Benkova et al., 2020**, de <https://doi.org/10.1111/jam.14704>

Figura 29

Protocolo para AST por dilución en agar.



Nota: Tomado de Antimicrobial susceptibility testing: currently used methods and devices and the near future in clinical practice, por **Benkova et al., 2020**, de <https://doi.org/10.1111/jam.14704>

3.2.1.3. Prueba de Epsilómero (Etest)

Se basa en la medición de la resistencia a través de tiras de plástico recubiertas con diferentes concentraciones de antibióticos y rangos de CMI respectivamente marcados en la superficie y parte posterior de la tira, además combina los principios de los métodos de dilución y dilución. Se utiliza especialmente con bacterias de crecimiento lento y para la determinación de antibacterianos, antifúngicos y antimicobacterianos.

Ventajas:

- Esta técnica de encuentra aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), debido a su simplicidad, precisión y confiabilidad.
- Es una metodología muy sensible debido a que puede detectar resistencias en cantidades mínimas de antibióticos.
- Permite cuantificar fácilmente de las cepas de resistencia en laboratorios y hospitales.

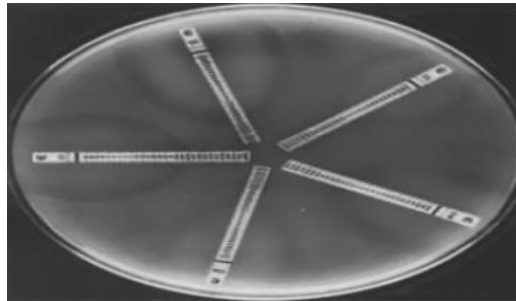
Desventajas:

- No es una técnica eficaz para la medición de resistencia en ciertos antibióticos como penicilina, ciprofloxacina, ofloxacina y rifampicina, además de antibióticos recubiertos sensibles al pH.
- Rendimiento de lotes es costoso, también el almacenamiento y compra de las tiras.

(Benkova et al., 2020; Khan et al., 2019)

Figura 30

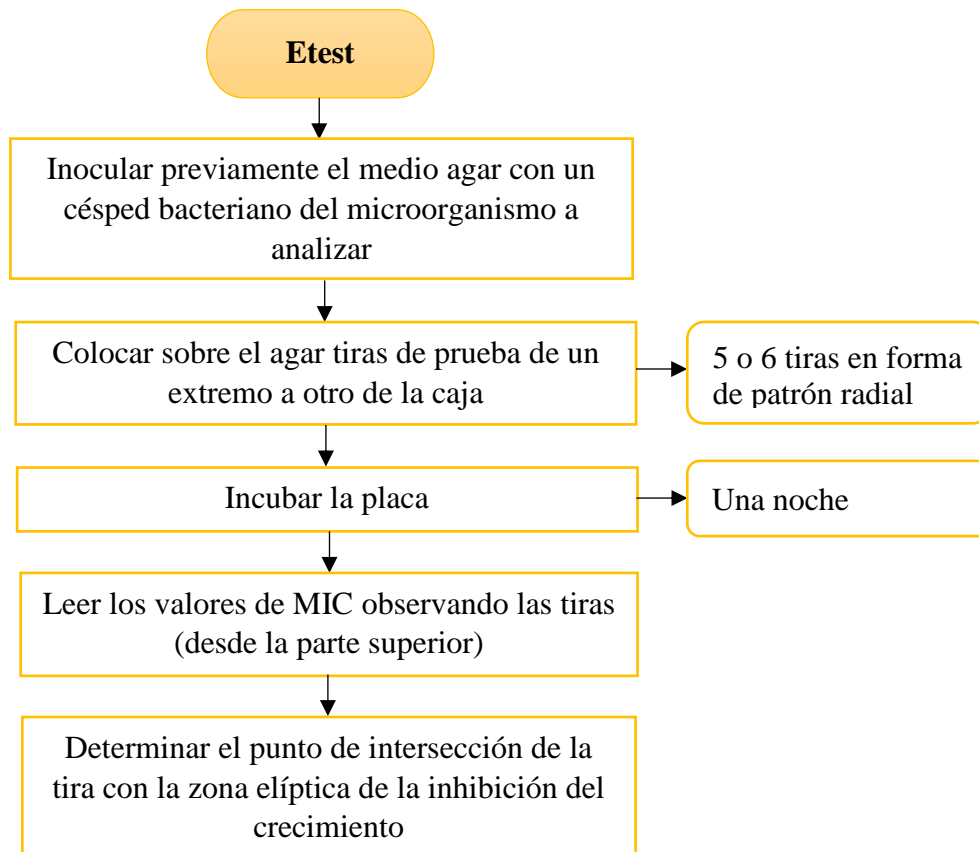
Resultado de la AST por Etest.



Nota: Tomado de Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing, por **Khan et al., 2019**, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6627445/pdf/diagnostics-09-00049.pdf>

Figura 31

Protocolo para AST por Etest.



Nota: Tomado de Antimicrobial susceptibility testing: currently used methods and devices and the near future in clinical practice, por **Benkova et al., 2020**, de <https://doi.org/10.1111/jam.14704>

3.2.1.4. Sistemas automatizados

Los sistemas automatizados utilizan sistemas ópticos para medir cambios sutiles y determinar el crecimiento bacteriano. Cada sistema cuenta con paneles específicos (40 a 100 pozos), además del tiempo promedio para realizar la detección (20, 12 y 9 h) e inoculación automatizada. Así mismo, todos los sistemas se encuentran incorporados en con un software, el cual tiene la capacidad de mejorar el rendimiento y procesamiento de los datos. Los principales sistemas para la medición de la susceptibilidad antimicrobiana son Vitek 2, MicroScan WalkAway, Micronaut, The Advantage Test, Phoenix y Sensititre ARIS 2X, cabe recalcar que estos sistemas se encuentran aprobados por la FDA.

Ventajas:

- Es considerada como una técnica simple y automatizada.
- Reduce los tiempos de incubación (6-12 horas) y manipulación.
- La integración informática es una herramienta que ha permitido un mejor análisis y validación de resultados.

Desventajas:

- Carecen de reproducibilidad, sensibilidad y confiabilidad.
- Incapacidad de analizar una amplia gama de bacterias clínicamente relevantes y agentes antimicrobianos.
- Capacidad limitada del panel.

(Benkova et al., 2020; Khan et al., 2019)

Figura 32

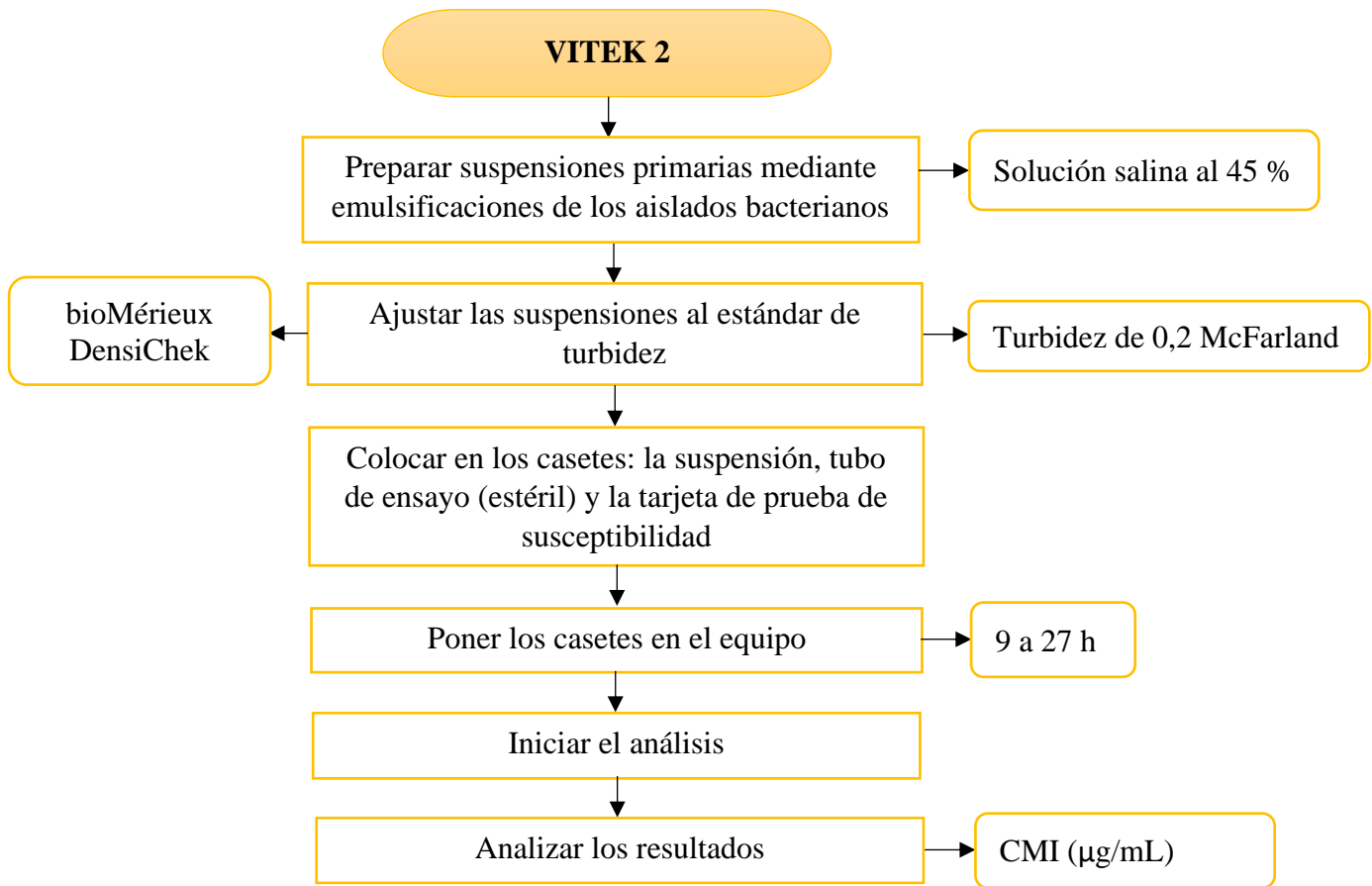
Equipo para la AST por Vitek 2.



Nota: Tomado de *VITEK 2 Compact, Automated ID/AST Instrument*, por **BioMérieux Diagnostics, 2021**, de <https://www.biomerieux-diagnostics.com/vitekr-2-compact-0>

Figura 33

Protocolo para AST por Vitek 2.



Nota: Tomado de Multicenter comparison of the VITEK 2 antifungal susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing amphotericin B, flucytosine, and voriconazole against *Candida* spp, por **Pfaller et al., 2007**, de <https://doi.org/10.1128/JCM.00403-07>

3.2.1.5. Espectrometría de masa por tiempo de vuelo por ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS)

Es un método que se basa en la determinación de la relación masa/carga (m/z) que genera el espectro de la muestra, la diferenciación de las cepas a través de proteínas ribosómicas y los resultados se comparan con la base de datos de referencia.

Ventajas:

- Método sensible y de alta precisión para la identificación bacteriana.
- Es una técnica que ahorra tiempo, ya que puede identificar en minutos colonias Gram-positivas, Gram-negativas y levaduras, además es menos costosa y altamente automatizada.

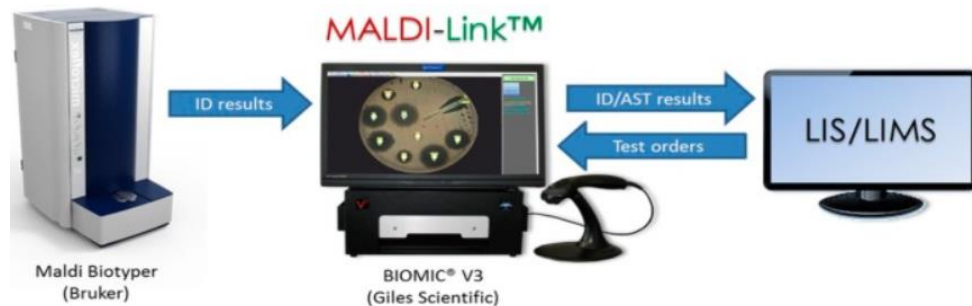
Desventajas:

- El equipo tiene un costo elevado, así como su mantenimiento.

(Khan et al., 2019; Pulido et al., 2013)

Figura 34

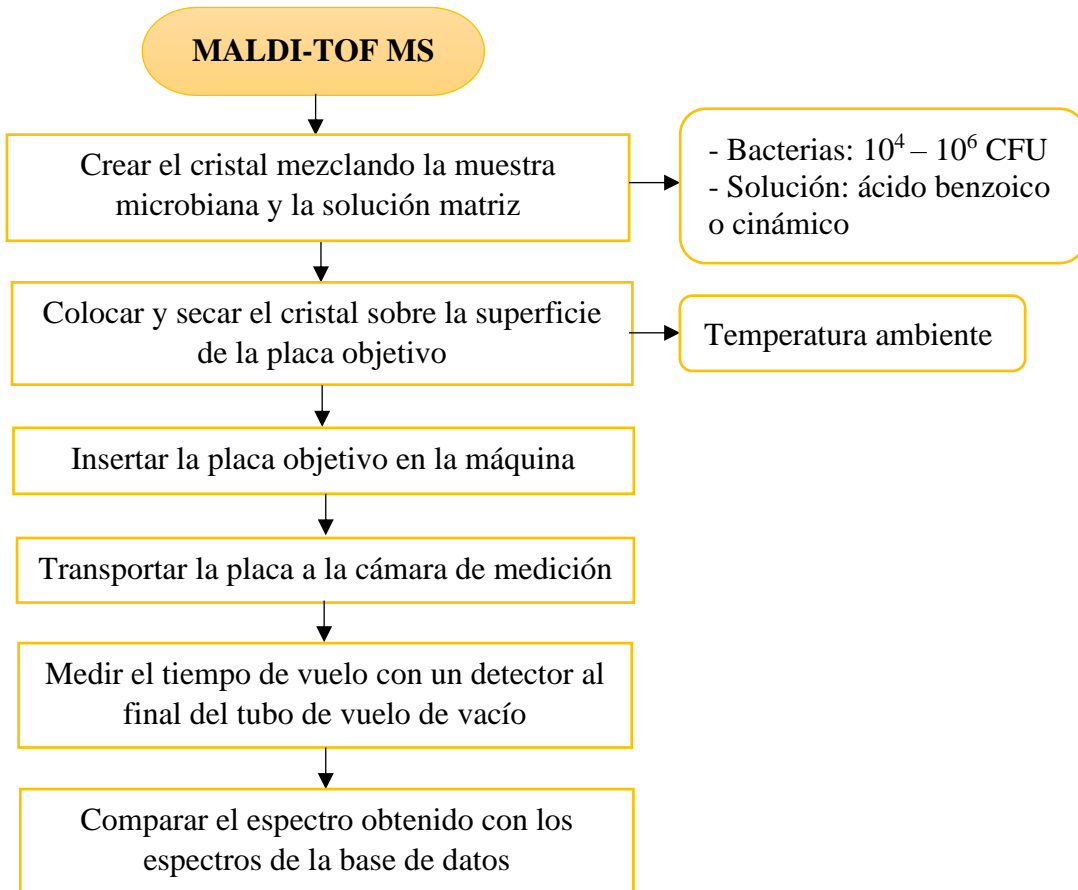
Equipo para la AST por MALDI-TOF MS.



Nota: Tomado de Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing, por **Khan et al., 2019**, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6627445/pdf/diagnostics-09-00049.pdf>

Figura 35

Protocolo para AST por MALDI-TOF MS.



Nota: Tomado de Antimicrobial susceptibility testing: currently used methods and devices and the near future in clinical practice, por **Benkova et al., 2020**, de <https://doi.org/10.1111/jam.14704>

3.2.2. Métodos genotípicos

3.2.2.1. PCR

La técnica de PCR se basa principalmente en la amplificación específica de la secuencia de ácidos nucleicos. Se puede confirmar la presencia de genes de resistencia mediante electroforesis, transferencia de Southern, polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción, polimorfismo de conformación monocatenario (SSCP), huellas dactilares de ADN, balizas moleculares u otros métodos de análisis de secuenciación de ADN.

Ventajas:

- Es considerada como la herramienta molecular más eficiente y rápida para la cuantificación y perfil de genes bacterianos infecciosos
- La muestra no siempre necesita ser purificada y puede contener mezclas bacterianas.
- Alta especificidad y sensibilidad
- Resultados disponibles en 2 horas.

Desventajas:

- Costos de adquisición y mantenimiento altos.
- No se pueden detectar mecanismos de resistencia nuevos o no caracterizados.

(Khan et al., 2019; Pulido et al., 2013)

Figura 36

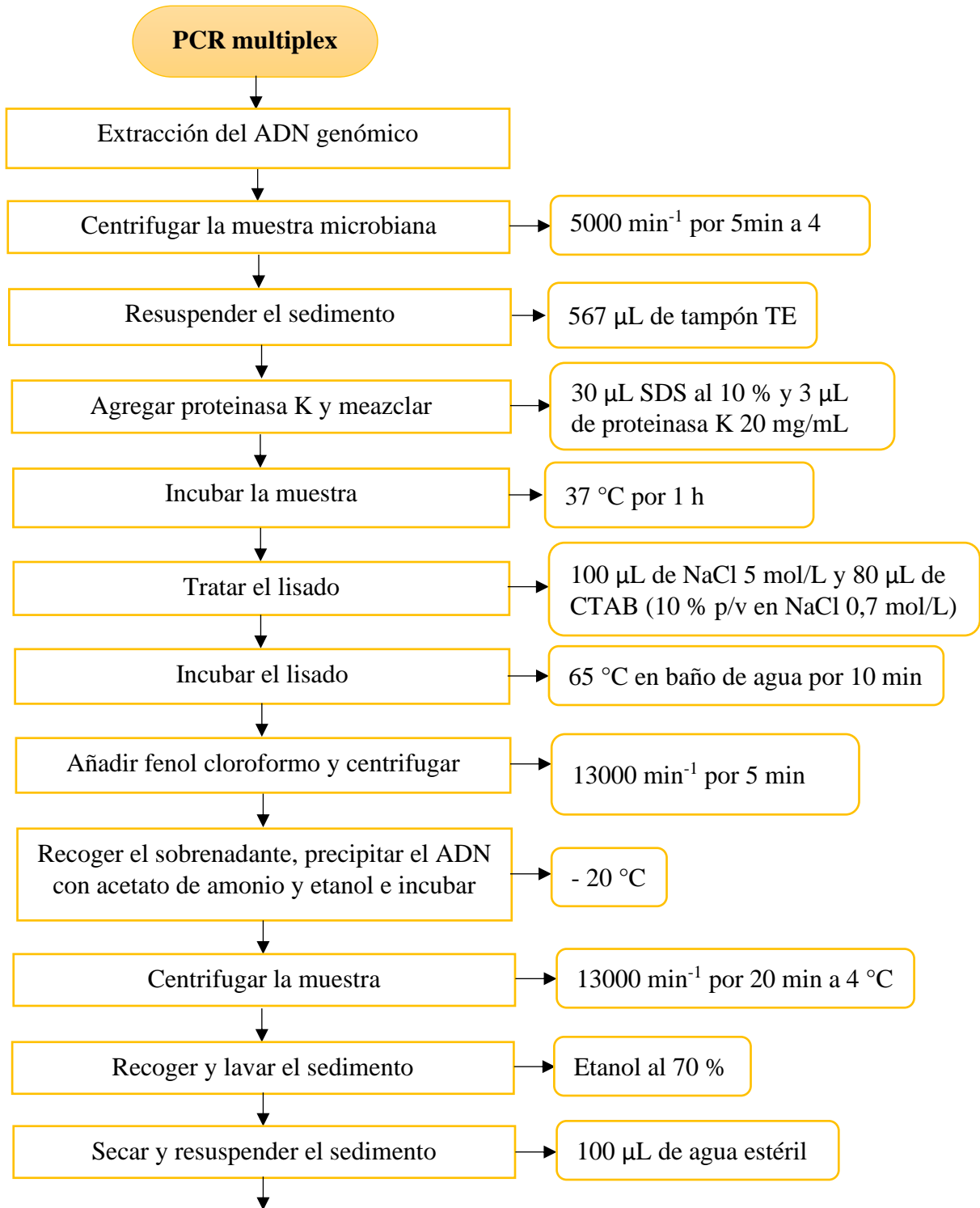
Equipo para la AST por PCR multiplex.

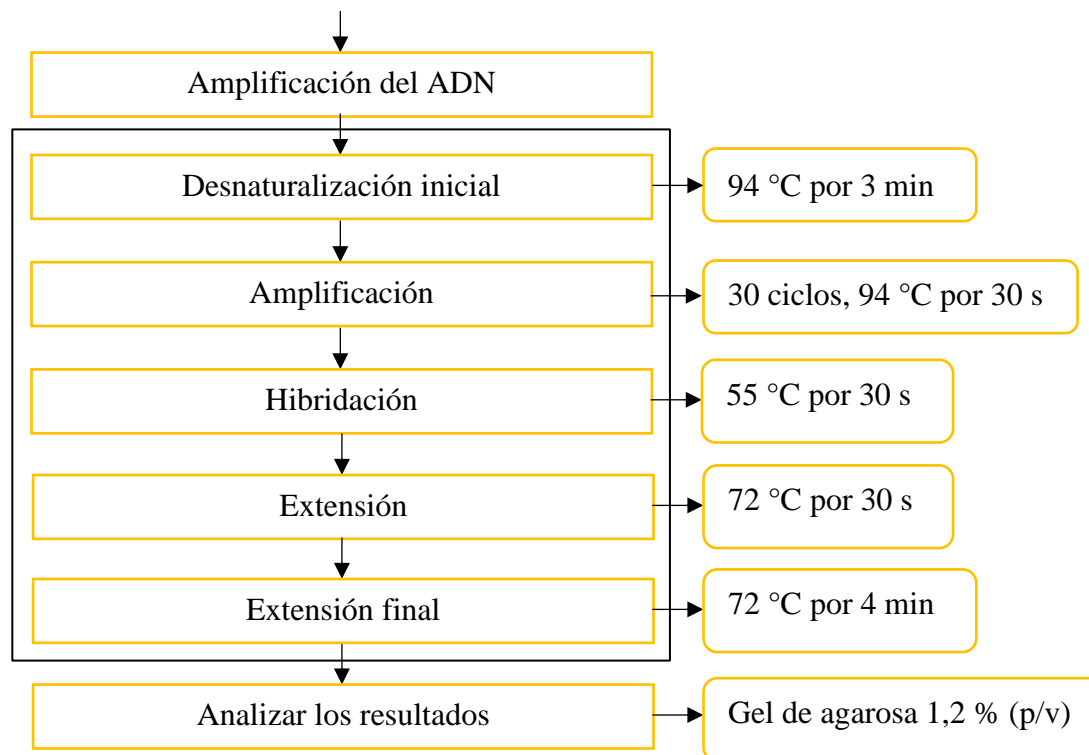


Nota: Tomado de Sistema de PCR multiplex FilmArray™, por **Biomérieux, 2018**, de <https://www.biomerieux.es/diagnostico-clinico/productos/sistema-de-pcr-multiplex-filmarraytm>

Figura 37

Protocolo para AST por PCR multiplex.





Nota: La PRC se llevó a cabo en un volumen final de 100 μ L, el cuál contenía 40 ng de ADN molde 10 pmol de los cebadores, desoxirribonucleósido trifosfato 0,4 mmol/L Y 5U de ADN polimerasa *Taq* en 1xTampón de PCR 4 mmol/L. SDS: dodecil sulfato de sodio. Tomado de Evaluation of multiplex polymerase chain reaction as an alternative to conventional antibiotic sensitivity test, por **Rathore et al., 2018**, de <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.474-479>

3.2.2.2. Microarrays (Chips de ADN)

Es considerado como una tecnología prometedora ya que se emplean matrices de ADN con sondas de fragmentos de ADNc, los brazos de la sonda se hibridan con la secuencia diana originando una molécula de doble hebra con una muestra de hebra sencilla, si la combinación de la hebra es perfecta, el corte será ligado por la ADN ligasa y de esta manera determinar los genes de resistencia; pero si los brazos de la sonda no inciden, estas no se conectarán. Los resultados obtenidos se visualizarán mediante detección colorimétrica.

Ventajas:

- Tiene la capacidad de detectar numerosas secuencias diferentes en un solo ensayo.
- Esta técnica es ideal para microorganismos que poseen distintos mecanismos de resistencia.

Desventajas:

- No proporciona datos sobre los valores de MIC.
- No se pueden detectar mecanismos de resistencia nuevos o no caracterizados.

(Cohen et al., 2010; Khan et al., 2019; Pulido et al., 2013)

Figura 38

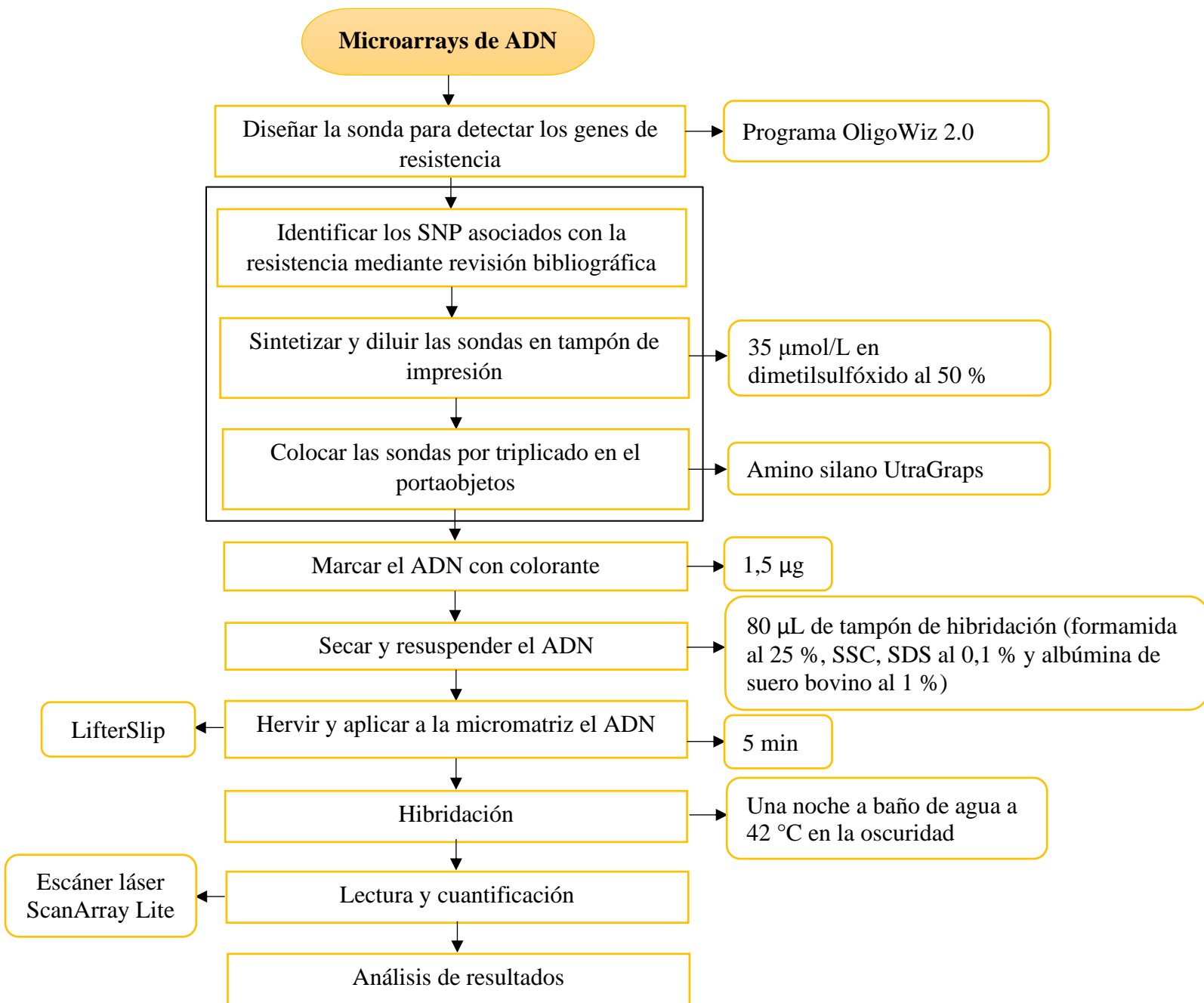
Equipo para la AST por Microarrays.



Nota: Tomado de *Tecnología de microarrays (chips de ADN o ARN)*, por **Biesecker, 2018**, de <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Tecnologia-de-microarrays>

Figura 39

Protocolo para AST por Microarrays.



Nota: SSC: citrato de sodio salino, SDS: dodecil sulfato de sodio. Tomado de Development of a DNA microarray to detect antimicrobial resistance genes identified in the national center for biotechnology information database, por **Frye et al., 2010**, de <https://doi.org/10.1089/mdr.2009.008>

3.3. Actividad Antimicrobiana de plantas Andinas y Amazónicas del Ecuador

Tabla 3

Actividad antimicrobiana de plantas Andinas y Amazónicas del Ecuador (Control).

Nombre común	Nombre científico	Región	AST	Control	Actividad antimicrobiana	Tipo de Extracto	Compuestos del Extracto	Cita
Diente de león	<i>Taraxacum officinale</i>	Andina	Difusión en agar	Ciprofloxacina (10,2 mm)	<i>E. coli</i> (10,2 mm)	Extracto metanólico	-	(Azuero et al., 2016)
			Difusión en disco	Ciprofloxacina (21 mm)	<i>Proteus spp</i> : 25% concentración: 14 mm 100% concentración: 21 mm	Extracto hidroetanólico	Saponinas Fenoles Flavonoides Quinonas Esteroides Alcaloides	(Chacha, 2018)
Ajenjo	<i>Artemisia absinthium</i>	Andina	Difusión en agar	- Ciprofloxacina (9,8 mm) - Ketoconazol (11,4 mm)	- <i>E. coli</i> (9,4 mm) - <i>C. albicans</i> (11,2 mm)	Extracto metanólico	-	(Azuero et al., 2016)
Cilantro	<i>Coriandrum sativum</i>	Andina	Difusión en agar	Ketoconazol (11,3 mm)	<i>C. albicans</i> (11,1 mm)	Extracto metanólico	-	(Azuero et al., 2016)
Toronjil	<i>Melissa officinalis</i>	Andina	Difusión en agar	- Ciprofloxacina (10 mm) - Ketoconazol (11,4 mm)	- <i>E. coli</i> (9,4 mm) - <i>C. albicans</i> (11,2 mm)	Extracto metanólico	-	(Azuero et al., 2016)
Achochilla	<i>Momordica charantia</i>	Amazónica	Difusión en agar	- Ciprofloxacina (9,9 mm) - Ketoconazol (11,4 mm)	- <i>E. coli</i> (9,9 mm) - <i>C. albicans</i> (11,1 mm)	Extracto metanólico	-	(Azuero et al., 2016)

Hierba Luisa	<i>Cymbopogon citratus</i>	Andina y Amazónica	Difusión en agar	- Ciprofloxacina (9,3 mm) - Ketoconazol (11,4 mm)	- <i>E. coli</i> (9,3 mm) - <i>C. albicans</i> (11,1 mm)	Extracto metanólico	-	(Azuero et al., 2016)
Guaviduca	<i>Piper carpunya</i>	Andina y Amazónica	Difusión en agar	- Ciprofloxacina (10 mm) - Ketoconazol (11,2 mm)	- <i>E. coli</i> (10,2 mm) - <i>C. albicans</i> (10,9 mm)	Extracto metanólico	-	(Azuero et al., 2016)
Hoja de mariposa	<i>Ageratum conyzoides</i>	Andina y Amazónica	Difusión en agar	Ketoconazol (11,4 mm)	<i>C. albicans</i> (11,2 mm)	Extracto metanólico	-	(Azuero et al., 2016)

Nota: Pruebas para medir la actividad antimicrobiana (AST), halos de inhibición (mm), no reporta los compuestos del extracto (-). *E. coli*, *Escherichia coli*; *C. albicans*, *Candida albicans*. Los nombres comunes y científicos fueron tomados de Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador, por **De la Torre et al., 2008**, de https://www.researchgate.net/publication/310828407_Enciclopedia_de_las_Plantas_Utiles_del_Ecuador. La ubicación geográfica de las plantas fue tomado de Tropicos, por **Catalogue of the Vascular Plants Of Ecuador, 2021**, de <http://legacy.tropicos.org/NameSearch.aspx?projectid=2&langid=66>

Tabla 4

Actividad antimicrobiana de plantas Andinas y Amazónicas del Ecuador (Sin Control).

Nombre común	Nombre científico	Región	AST	Actividad antimicrobiana	Tipo de Extracto	Compuestos del Extracto	Cita
Eucalipto	<i>Eucalyptus globulus</i>	Andina	Difusión en disco y caldo	<i>E. coli</i> (5 mm) <i>L. monoxytogenes</i> (14,8 mm)	Extracto etanólico	-	(Núñez, 2019)
Ají rocoto	<i>Capsicum pubescens</i>	Andina	Difusión en disco	<i>E. coli</i> (190 mm) <i>P. aeruginosa</i> (1140 mm) <i>B. cereus</i> (870 mm) <i>C. perfringens</i> (910 mm)	Extracto etanólico	-	(Chipantiza, 2017)
Mejorana	<i>Origanum majorana</i>	Andina	Difusión en disco	Proteus spp: 25%concentración: 6,3 mm 100%concentración: 10,3 mm	Extracto hidroetanólico	Flavonoides, azúcares reductores, saponinas, fenólicos, esteroides	(Guevara, 2018)
Sangre de drago	<i>Croton lechleri</i>	Andina y Amazónica	Difusión en disco y caldo	<i>E. coli</i> (5 mm) <i>L. monoxytogenes</i> (14 mm)	Extracto etanólico	-	(Núñez, 2019)
Guayusa	<i>Ilex guayusa</i>	Andina y Amazónica	Difusión en disco y caldo	<i>E. coli</i> (5.8 mm)	Extracto etanólico	-	(Núñez, 2019)
Lunchik/Biso	<i>Vernonanthura patens</i>	Andina y Amazónica	Difusión en disco	<i>E. coli</i> : 25%concentración: 7,6 mm 100%concentración: 19,3 mm	Extracto hidroetanólico	Fenoles, flavonoides, terpenos y aurinas	(Rivera, 2018)

Nota: Pruebas para medir la actividad antimicrobiana (AST), halos de inhibición (mm), no reporta los compuestos del extracto (-). *E. coli*, *Escherichia coli*; *L. monoxytogenes*, *Listeria monocytogenes*; *P. aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa*, *B. cereus*, *Bacillus cereus*, *C. perfringens*, *Clostridium perfringens*. Los nombres comunes y científicos fueron tomados de Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador, por **De la Torre et al., 2008**, de https://www.researchgate.net/publication/310828407_Enciclopedia_de_las_Plantas_Utiles_del_Ecuador. La ubicación geográfica de las plantas fue tomado de Tropicos, por **Catalogue of the Vascular Plants Of Ecuador, 2021**, de <http://legacy.tropicos.org/NameSearch.aspx?projectid=2&langid=66>

Los compuestos bioactivos son comunes en la mayoría de las partes de una planta, pero ninguno es ubicuamente abundante ya que depende de su expresión genética, la respuesta al estrés, el tipo de suelo y el clima al que este expuesto la planta (**Iloki et al., 2015**). Por tanto, los métodos de extracción y los solventes de extracción son uno de los factores que poseen mayor influencia y pueden afectar la obtención de los componentes bioactivos de las plantas y el rendimiento de actividad que estos poseen (**Ngo et al., 2017**).

Un buen disolvente se caracteriza por realizar una extracción óptima de los metabolitos secundarios y la capacidad de mantenerlos estables químicamente. Los disolventes más comunes que se utilizan son el agua y los disolventes orgánicos como: metanol, etanol, cloroformo y acetona o a su vez la mezcla de estos con agua (**Ngo et al., 2017; Thouri et al., 2017**). Así mismo se debe tomar en cuenta la polaridad de los disolventes debido a que tiene un gran impacto en los compuestos que pueden ser extraídos, pues puede afectar la eficiencia de la solvatación, es decir que podría alterar las interacciones de los enlaces de hidrógeno del solvente con los sitios polares de los metabolitos. También es importante considerar la solubilidad de los compuestos en los disolventes de extracción para evitar que estos se degraden (**Iloki et al., 2015; Thouri et al., 2017**). El metanol y etanol son los disolventes más empleados para los procesos de extracción por poseer la característica de presentar una polaridad alta, que en presencia del material vegetal; que de igual manera posee una gran variedad de compuestos con alta polaridad, le permite infiltrarse fácilmente en el tejido vegetal y aumentar el rendimiento del proceso de extracción (**Onyebuchi & Kavaz, 2020**).

Según **Ngo et al., 2017** el rendimiento de los extractos pueden verse significativamente afectados por el tipo de disolvente, ya que en su investigación empleo diferentes compuestos para la extracción de los bioactivos presentes en las raíces de *Salacia chinensis* L., en la cual determinó que el metanol tenía una mayor cantidad de sólidos extraíbles (15,6 %), seguido del etanol al 50 % (14,3 %), metanol 50 % (12,3 %) y acetona al 50 % (12,2 %). También, estudió el impacto de los disolventes de extracción en la obtención de fenoles y flavonoides, siendo la mezcla de agua al 50 % con metanol, etanol o acetona, la mejor opción para la extracción de los mismos, mientras que se logró un mejor rendimiento en la extracción de saponinas con acetona al 50 %.

En el estudio de **Colvin, 2018** se realizó una comparación de los diferentes métodos de extracción

con sus respectivas limitaciones y fortalezas para obtener el compuesto bioactivo de interés a partir de las raíces de planta *Glycyrrhiza glabra*, siendo estos métodos: maceración, MAE y EAU, de los cuales se obtuvieron mejores resultados en la maceración y EAU ya que el autor concluye que estas son las técnicas más propicias, productivas y factibles para la extracción efectiva del metabolito. Sin embargo, de acuerdo con **Mutalib, 2015** el mejor método de extracción es MAE ya que consume menos tiempo, mano de obra y aumenta la transfusión de masa a través de la matriz sólida del material vegetal, garantiza la mayor cantidad, calidad y pureza de los componentes activos del extracto, además se obtuvo un rendimiento del mismo de 7,6 %, seguido de la extracción por Soxhlet con un rendimiento de 6,4 %, extracción por reflujo con 5,5 %, maceración 7 días y 15 días con 5,3 y 5,0 %, respectivamente, infusión con 4,6 %, decocción con 3,8 % y EAU con 2,8 %.

Estos estudios refuerzan los puntos mencionados anteriormente sobre importancia de elegir correctamente el método de extracción y el disolvente a emplearse en el mismo, puesto que estos poseen una gran influencia en la calidad, cantidad y la actividad biológica del extracto. En los estudios realizados en Ecuador para la extracción de metabolitos con actividad antimicrobiana de plantas andinas y amazónicas también se puede observar que los disolventes empleados con mayor frecuencia fueron el metanol y etanol (*Tabla 3 y 4*).

Se ha encontrado estudios en los que mencionan que los flavonoides, fenoles, taninos, saponinas, esteroides y terpenoides poseen propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivirales, ya que dañan las membranas celulares bacterianas, interfieren en la producción de aminoácidos responsables del crecimiento bacteriano y modifican la RAM al inhibir las enzimas que activan la resistencia. Además, estos compuestos poseen estructuras y modos de acción diferentes a los antibióticos, por lo que resulta en una gran ventaja pues hace que el riesgo de resistencia cruzada sea altamente improbable. Así mismo, se han encontrado investigaciones en las que compuestos derivados de plantas pueden restaurar la aplicación clínica de antibióticos antiguos a los que los microorganismos han adquirido resistencia o son ineficientes por sí solos (**Bubonja et al., 2020; Iloki et al., 2015**). La actividad antimicrobiana de estos compuestos pueden verse afectada por la concentración del extracto debido a que si la concentración del extracto es mayor y contiene más metabolitos secundarios, el efecto de inhibición sobre las bacterias aumenta, por tanto es importante realizar estudios en los que se analicen varias concentraciones del extracto para

determinar la concentración más efectiva para inhibir el crecimiento antimicrobiano (**Haghgoo et al., 2017**).

Las pruebas estandarizadas para medir la actividad antimicrobiana como los métodos de difusión en disco y difusión del pozo en agar, son las más utilizadas, esto se debe a que permiten evaluar la actividad biológica de los compuestos extraídos de las plantas, ayuda a establecer que microorganismos son sensibles o cuales muestran resistencia a los extractos y establecer una terapia alterna. Es importante mencionar que los diferentes resultados que se obtienen en las AST pueden estar relacionados con distintos factores que afectan su efectividad, los cuales pueden ser la elección de las plantas, el tipo de extracción, selección de bioensayos como la preparación y cantidad del inóculo, la técnica de AST, temperatura de extracción e incubación, el medio de cultivo (pueden producir resultados falsos positivos o negativos), tiempo de extracción e incubación, el uso correcto de los controles y determinación de los puntos finales (**Sánchez et al., 2016**).

A continuación, se discuten trabajos en los que se han evaluado la actividad antimicrobiana de las plantas reportadas en la *Tabla 3*, especialmente en los que se ha observado diferencias significativas en los halos de inhibición en comparación con los estudios realizados en Ecuador. En un artículo realizado por **Chen et al., 2021** reporta la actividad antibacteriana del extracto metanólico del Diente de león, el cual posee el mismo halo de inhibición para *E. coli* que el reportado por **Azuero et al., 2016** (*Tabla 3*). Sin embargo, en el primer estudio el extracto etanólico (200 mg/mL) fue el que mostró más actividad antimicrobiana con un halo de inhibición de 23,50 mm para dicha bacteria. Además, menciona que los compuestos alcaloides, taninos y flavonoides pueden ser los responsables de la actividad antimicrobiana del extracto, los cuales algunos también se encuentran mencionados por **Chacha, 2018** (*Tabla 3*).

Al comparar el estudio realizado por **Azuero et al., 2016** (*Tabla 3*) con el estudio de **Zarghami et al., 2016** en el Ajenjo, el aceite esencial reportado por el segundo autor tuvo mayor actividad antimicrobiana (30 mm) en *E. coli* al analizarlo con Gentamicina a comparación el extracto metanólico (9,4 mm) el cual se examinó con Ciprofloxacina. Esto debido a que el aceite esencial contenía compuestos como el sabineno, pineno, α -felandreno, p-cimeno y camazuleno, los cuales poseen una actividad antimicrobiana prometedora. Se obtuvieron resultados parecidos en el

estudio de **Zarghami et al., 2016** para *C. albicans* con un halo de inhibición de 26 mm y se identificaron compuestos activos con actividad antibacteriana como fenchona y alcanfor.

Según el estudio realizado por **Yildiz, 2016** el extracto etanólico de Cilantro posee un halo de inhibición de 9 mm frente *C. albicans*, mientras que el aceite esencial tiene un halo de 18 mm. Al equiparar estos resultados con los obtenidos por **Azuero et al., 2016** (*Tabla 3*), el extracto metanólico posee mayor actividad antimicrobiana que el extracto etanólico pero menor actividad que el aceite esencial, ya que este posee un amplio espectro de efecto antifúngico y baja toxicidad en comparación que los extractos alcohólicos (**Yildiz, 2016**).

Como plantea **Abdel et al., 2019** en su artículo, el extracto metanólico del Toronjil no posee actividad antimicrobiana para *E. coli* pero si posee actividad para *C. albicans*, el cual reportó halos de inhibición 16 mm en una concentración del extracto de 0,625 mg/mL y 20 mm con la concentración 5 mg/mL. A diferencia del extracto metanólico reportado por **Azuero et al., 2016** (*Tabla 3*), el cual si mostro actividad antimicrobiana para *E. coli* y *C. albicans*. El artículo realizado por **Ozusaglam & Karakoca, 2013** muestra que la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de la Achochilla es de 14,5 mm y 25, 2 mm para *E. coli* y *C. albicans*, respectivamente, cabe recalcar que el extracto fue obtenido a partir de la fruta inmadura de la planta y se utilizó como control positivo Gentamicina. En tanto que el extracto metanólico registrado por **Azuero et al., 2016** (*Tabla 3*) señala halos de inhibición para *E. coli* de 9,9 mm y para *C. albicans* de 11,1 mm.

En la investigación realizada por **Mekonnen et al., 2016** se demostró que el aceite esencial de *Eucalyptus globulus* presentó actividad antimicrobiana ante *S. aureus* (*Staphylococcus aureus*) 32 mm, *S. epidermiditis* (*Staphylococcus epidermidis*) 20 mm, *S. typhi* (*Salmonella typhi*) 18 mm, *E. coli* 10 mm *Shingella spp* 18 mm y *P. aeruginosa* (*Pseudomonas aeruginosa*) 28 mm; en comparación con el control Gentamicina 18 mm, 21 mm, 18 mm, 21 mm, NI (no inhibición) y 19 mm, respectivamente para cada bacteria, mientras que en el estudio realizado por **Núñez, 2019** manifestó un halo de inhibición de 5,0 mm para *E. coli* y 14,8 mm para *L. monoytogenes*. Además, el análisis fitoquímico realizado por **Mekonnen et al., 2016** indicó que los principales componentes del aceite fueron α - y β - pineno, limoneno, eucaliptol, α -Phellandrene, sabinena y alcanfor.

Las tablas reportadas en el presente capítulo (*Tabla 3* y *4*) junto a los estudios en los cuales se

realizaron comparaciones de la actividad antimicrobiana, pueden ser utilizados como guía para replicar y profundizar en el análisis tanto de los métodos de extracción de metabolitos secundarios presentes en plantas y los disolventes empleados para dicho procedimiento, como en la efectividad y las concentraciones de los extractos ante la inhibición del crecimiento de los microorganismos. Lo cual permitiría mejorar el rendimiento de los extractos y ampliar el estudio de las técnicas para obtener mejores resultados. Cabe mencionar que se requieren mayores análisis para las plantas de la *Tabla 4*, debido a que no se encontraron controles positivos con los que se pueda comparar si los extractos poseen actividad antimicrobiana que superen dichos controles o no.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Se obtuvo un compendio de 25 plantas que presentan actividad antimicrobiana de las zonas Andinas y Amazónicas del Ecuador, el compendio se realizó en su mayoría a base de la revisión bibliográfica de repositorios de universidades y algunos artículos científicos de relevancia, lo que demuestra que en Ecuador se están realizando investigaciones con el objetivo de encontrar nuevos antibióticos a través de uso de plantas que demuestren actividad antibacteriana como una alternativa de solución a la resistencia a los antimicrobianos (RAM) que actualmente es uno de los principales problemas a los que se está enfrentando el país dentro de la salud pública producto del consumo libre y excesivo de los antibióticos por parte de los pacientes y los profesionales de la salud en el tratamiento de enfermedades.
- Se identificaron las plantas del Ecuador que presentan actividad antimicrobiana mediante una revisión bibliográfica, a partir del compendio obtenido se reportó un total de 14 especies vegetales, dentro de las cuales se especificó los principios activos de algunas de ellas de acuerdo a los reportes encontrados en las investigaciones. Además, se clasificó principalmente si se reportaba el halo de inhibición y el control utilizado, una vez realizado ese procedimiento se obtuvo dos tablas, en la primera se encuentra detallada los halos de inhibición de los controles y las cepas con las que se realizaron el estudio, permitiendo la comparación de los efectos de los extractos sobre los microorganismos, estos efectos en su mayoría son iguales o ligeramente inferiores al control. La segunda tabla contiene los halos de inhibición de los extractos sobre las bacterias, mostrando que los mismos poseen actividad antimicrobiana y deben realizarse más estudios utilizando controles que permitan comparar la eficiencia del extracto. Cabe recalcar que en algunos estudios se realizaron los análisis fitoquímicos de los extractos, lo cual es importante ya que puede ayudar a identificar qué compuesto específico posee la actividad antimicrobiana y de esta manera poder potenciarlo en investigaciones futuras. Así mismo, se encontró que la mayoría de las

plantas analizadas en las investigaciones reportadas son de la región Andina o, que su vez también se las puede encontrar en la región Amazónica, pero no se hallaron muchos estudios de especies vegetales que se encuentren propiamente en la región Amazónica.

- Se refirió la metodología para la extracción de metabolitos de las plantas andinas y amazónicas del Ecuador mediante la revisión de artículos científicos, los cuales se encuentran sintetizados en diagramas de flujo para que se facilite la comprensión y replicación de los procedimientos de extracción. Así mismo, se detalló las ventajas y desventajas que posee cada método, lo cual es muy útil porque servirá como referencia en futuras investigaciones y permitirá escoger el método correcto que se ajuste más a los objetivos planteados y los resultados que se esperan obtener de los estudios. También se explicó la importancia que poseen los disolventes (polaridad y solubilidad) sobre la extracción de la actividad antimicrobiana de los extractos, encontrando que el metanol y etanol son los solventes con los que se obtienen mayor rendimiento del compuesto extraído, además se encontró que el método de extracción más eficaz es la extracción por microondas (MAE) ya posee muchos beneficios extras en comparación con los métodos tradicionales.
- Se describió los procedimientos para medir la actividad antimicrobiana de los metabolitos obtenidos de las plantas, estos al igual que los métodos para la extracción se encuentran resumidos y desarrollados en diagramas de flujo donde se indican tiempos y temperaturas de incubación, soluciones empleadas en el procedimiento y algunos materiales y equipos, además de estar clasificados en dos categorías principales: métodos fenotípicos y genotípicos. En los trabajos analizados de la actividad antimicrobiana de las plantas del Ecuador, se puede evidenciar que el método más utilizado es el método fenotípico: difusión en disco. Sin embargo, se puede medir la actividad antimicrobiana con los métodos genotípicos que permitan desarrollar perfiles genéticos para las muestras en estudio, los investigadores reportan que estos métodos poseen mayor especificidad y sensibilidad, se obtienen resultados en un período corto de tiempo, además permitirían a su vez obtener mayor información sobre los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos que presentan los microorganismos estudiados y reportados en las fuentes bibliográficas analizadas.

4.2. Recomendaciones

- Es importante investigar las plantas de las familias mencionadas en el apartado de “Uso medicinal de las plantas en el Ecuador” del Capítulo I, debido a que no se encontraron muchos registros del análisis de esas especies.
- Utilizar cepas microbianas estandarizadas y bien definidas para evaluar la actividad antimicrobiana, ya que el uso de estas cepas permite un control de calidad interno y ayuda a calibrar la prueba para comparar resultados con otras investigaciones (**Bubonja et al., 2020**).
- Se recomienda realizar más estudios a los extractos vegetales sobre las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), especialmente a concentraciones inferiores de 0,1 mg/mL, ya que algunos autores consideran que los extractos con esas concentraciones son interesantes para la búsqueda de posibles nuevos antibióticos (**Jacobus, 2019**).
- El método de difusión en agar no es recomendable utilizarlo para determinar la CMI de extractos de plantas ya que presenta insensibilidad, falta de difusión de las moléculas no polares en la matriz y dificultad para obtener resultados reproducibles. En su lugar es aceptable utilizar el método de dilución en microplaca en serie que utiliza violeta de p-iodonitrotetrazolio (INT), debido a que se produce resultados reproducibles, realistas e incluso ayuda a determinar las concentraciones letales mínimas (**Jacobus, 2019**).
- Se sugiere que se realice inóculos grandes, ya que se han encontrado artículos que afirman que el tamaño del inóculo influye en el CMI, esto se debe a que el tiempo de adaptación de las bacterias al medio sea menor, también ayuda a evitar el requisito de contar y ajustar el número de células antes de determinar la CMI y permite trabajar en condiciones limpias (**Jacobus, 2019**).

- Para asegurar que el método de extracción es el adecuado y que el extracto posea actividad antimicrobiana, es necesario incluir un control positivo de un antibiótico estándar, el cual debe estar a la misma concentración que el extracto. Además, es importante colocar un control negativo (preferiblemente el disolvente utilizado en la extracción), el cual ayudará a asegurar que la actividad antimicrobiana encontrada sea netamente del extracto (**Jacobus, 2019**).

MATERIALES DE REFERENCIA

- Abdel, W., Fahim, J., Fouad, M., & Kamel, M. (2019). Antibacterial, antifungal, and GC–MS studies of *Melissa officinalis*. *South African Journal of Botany*, *124*, 228–234. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.05.011>
- Abubakar, A., & Haque, M. (2020). Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, *12*(1), 1. https://doi.org/10.4103/JPBS.JPBS_175_19
- Alupului, A., Călinescu, I., & Lavric, V. (2012). Microwave Extraction of active principles from medicinal plants. *UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science*, *74*(2), 129–142. https://www.researchgate.net/publication/237051724_Microwave_Extraction_of_active_principles_from_medicinal_plants
- Alves, A., Nascimento, C., Barreto, A., Stephens, P., Saranraj, P., & Diré, G. (2021). The role of medicinal plants on drug development : a the role of medicinal plants on drug development : a biotechnological overview. *Asian Journal of Multidisciplinary Research, February*. <https://doi.org/10.22192/iajmr.2020.6.4.5>
- Amaguaña, F., & Churuchumbi, E. (2018). Estandarización Fitoquímica Del Extracto De Caléndula (*Calendula Officinalis*). *Tesis*, *1*, 141. <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
- Azuero, A., Jaramillo, C., San Martin, D., & D'Armas, H. (2016). Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador. *Ciencia Unemi*, *9*(20), 11–18. <http://ojs.unemi.edu.ec/index.php/cienciaunemi/article/view/342>
- Azwanida, N. (2015). A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, *04*(03), 3–8. <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>
- Bandar, H., Hijazi, A., Rammal, H., Hachem, A., & Saad, Z. (2013). Techniques for the Extraction of Bioactive Compounds from Lebanese *Urtica dioica*. *American Journal of Phytomedicine*

- and Clinical Therapeutics*, 1(6), 507–513. <https://www.imedpub.com/articles/techniques-for-the-extraction-of-bioactivecompounds-from-lebanese-urtica-dioica.pdf>
- Benkova, M., Soukup, O., & Marek, J. (2020). Antimicrobial susceptibility testing: currently used methods and devices and the near future in clinical practice. *Journal of Applied Microbiology*, 129(4), 806–822. <https://doi.org/10.1111/jam.14704>
- Biesecker, L. (2018). *Tecnología de microarrays (chips de ADN o ARN)*. National Human Genome Research Institute. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Tecnologia-de-microarrays>
- Biomérieux. (2018). *Sistema de PCR multiplex FilmArray™*. <https://www.biomerieux.es/diagnostico-clinico/productos/sistema-de-pcr-multiplex-filmarraytm>
- BioMérieux Diagnostics. (2021). *VITEK 2 Compact, Automated ID/AST Instrument*. <https://www.biomerieux-diagnostics.com/vitekr-2-compact-0>
- Bozinou, E., Karageorgou, I., Batra, G., Dourtoglou, V., & Lalas, S. (2019). Pulsed electric field extraction and antioxidant activity determination of moringa oleifera dry leaves: A comparative study with other extraction techniques. *Beverages*, 5(1). <https://doi.org/10.3390/beverages5010008>
- Bubonja, M., Knezević, S., & Abram, M. (2020). Challenges to antimicrobial susceptibility testing of plant-derived polyphenolic compounds. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 71(4), 300–311. <https://doi.org/10.2478/aiht-2020-71-3396>
- Cabrera, C., Gómez, R., & Zúñiga, A. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica*, 38(2), 149–158. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=28338208>
- Catalogue of the Vascular Plants Of Ecuador. (2021). *Tropicos*. <http://legacy.tropicos.org/NameSearch.aspx?projectid=2&langid=66>
- Chacha, G. (2018). *Evaluación de la actividad antimicrobiana “in vitro” de extracto hidroetanólico de las hojas de Taraxacum officinale en Proteus spp.* [Universidad Regional

Autónoma de los Andes].
<https://dspace.uniandes.edu.ec/bitstream/123456789/8751/1/PIUAMFCH011-2018.pdf>

Chen, K., Wu, W., Hou, X., Yang, Q., & Li, Z. (2021). A review: Antimicrobial properties of several medicinal plants widely used in Traditional Chinese Medicine. *Food Quality and Safety*, 5, 1–22. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyab020>

Chipantiza, H. (2017). *Extracción de capsaicina y evaluación de su actividad antimicrobiana frente a: Aspergillus niger, Bacillus cereus, Clostridium perfringens, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa.* [Universidad Técnica de Ambato].
https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/25298/1/BQ_113.pdf

Chua, L., Latiff, N., & Mohamad, M. (2016). Reflux extraction and cleanup process by column chromatography for high yield of andrographolide enriched extract. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 3(2), 64–70.
<https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2016.01.004>

Cohen, J., Dierikx, C., Naiemi, N., Karczmarek, A., Van Hoek, A., Vos, P., Fluit, A., Scharringa, J., Duim, B., Mevius, D., & Leverstein-Van Hall, M. (2010). Rapid detection of TEM, SHV and CTX-M extended-spectrum b-lactamases in Enterobacteriaceae using ligation-mediated amplification with microarray analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(7), 1377–1381. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq146>

Colvin, D. (2018). A Review on Comparison of the Extraction Methods Used in Licorice Root: Their Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, 07(06).
<https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000323>

Corona, E., Martínez, N., Ruiz, H., & Carranza, J. (2016). Ultrasound-Assisted Extraction Of Phenolics Compounds From Chia (*Salvia Hispanica* L.) Seeds And Their Antioxidant Activity. *Agrociencia*, 50(4), 403–412. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v50n4/1405-3195-agro-50-04-403.pdf>

De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M., & Balslev, H. (2008). Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. En *Herbario QCA & Herbario AAU*.
https://www.researchgate.net/publication/310828407_Enciclopedia_de_las_Plantas_Utiles_

del_Ecuador

- Dekebo, A. (2019). Plant Extracts. En *Plant Extracts* (pp. 3–5). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85493>
- Díaz, M., Lugo, Y., Fonte, L., Castro, I., López, O., & Montejo, I. (2017). Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos frescos de hojas de *Morus alba* L. *Pastos y Forrajes*, 40(1), 43–48. <https://www.redalyc.org/pdf/2691/269150990006.pdf>
- Dionex Corporation. (2011). *Extraction of Phenolic Acids from Plant Tissue Using Accelerated Solvent Extraction (ASE)*. 1–5. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/40398-AN357-ASE-Phenolic-Extracts-Plants-27Apr2011-LPN1834-02.pdf>
- Esperbent, C., & Migliorati, M. (2017). Bacterias multirresistentes: una amenaza oculta que crece. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 43(1), 6–10. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86451165002>
- Frye, J., Lindsey, R., Rondeau, G., Porwollik, S., Long, F., McClelland, M., Jackson, C., Englen, M., Meinersmann, R., Berrang, M., Davis, J., Barrett, J., Turpin, J., Thitaram, S., & Fedorka-Cray, P. (2010). Development of a DNA microarray to detect antimicrobial resistance genes identified in the national center for biotechnology information database. *Microbial Drug Resistance*, 16(1), 9–19. <https://doi.org/10.1089/mdr.2009.0082>
- Golam, M. (2018). Conventional Extraction Methods Use in Medicinal Plants, their Advantages and Disadvantages. *International Journal of Basic Sciences and Applied Computing*, 6, 10–14. <https://www.ijbsac.org/wp-content/uploads/papers/v2i6/F0082122618.pdf>
- Gomes, S., Portugal, L., Dos Anjos, J., De Jesus, O., De Oliveira, E., Juceni, D., & David, J. (2017). Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in *Passiflora* species. *Microchemical Journal*, 132, 28–35. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2016.12.021>
- Graf, F., Palm, M., Warringer, J., & Farewell, A. (2019). Inhibiting conjugation as a tool in the fight against antibiotic resistance. *Drug Development Research*, 80(1), 19–23. <https://doi.org/10.1002/ddr.21457>

- Guevara, E. (2018). *Evaluación de la Actividad Antimicrobiana “In Vitro” del Extracto Hidroetanólico de Hojas de Origanum Majorana en cepas de Proteus Spp.* [Universidad Regional Autónoma de los Andes]. https://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/05/996438/evaluacion-de-la-actividad-antimicrobiana-in-vitro-del-extracto_Nf67FDT.pdf
- Haghgoo, R., Mehran, M., Afshari, E., Farajian, H., & Ahmadvand, M. (2017). *Antibacterial Effects of Different Concentrations of Althaea officinalis Root Extract versus 0.2% Chlorhexidine and Penicillin on Streptococcus mutans and Lactobacillus (In vitro)*. 8. <https://doi.org/10.4103/jispcd.JISPCD>
- Heinrich, M., & Jäger, A. (2015). Ethnopharmacology: A Short History of a Multidisciplinary Field of Research. En *Ethnopharmacology* (pp. 1–8). <https://ebookcentral.proquest.com/lib/uta-ebooks/detail.action?docID=4039949&query=Ethnopharmacology#>
- Hidayat, N., Yati, K., Krisanti, E., & Gozan, M. (2019). Extraction and antioxidant activity test of black Sumatran incense. *AIP Conference Proceedings*, 2193(December). <https://doi.org/10.1063/1.5139354>
- Iloki, S., Lewis, L., Lara, C., Gil, A., Fernandez, D., Rubio, J., & Haines, D. (2015). Solvent effects on phytochemical constituent profiles and antioxidant activities, using four different extraction formulations for analysis of *Bucida buceras* L. and *Phoradendron californicum* Complementary and Alternative Medicine. *BMC Research Notes*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1388-1>
- Jacobus, N. (2019). Avoiding pitfalls in determining antimicrobial activity of plant extracts and publishing the results. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2519-3>
- Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). *Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians*. <https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP>
- Kebede, T., Gadisa, E., & Tufa, A. (2021). Antimicrobial activities evaluation and phytochemical screening of some selected medicinal plants: A possible alternative in the treatment of

- multidrug-resistant microbes. *PLoS ONE*, 16(3 March), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249253>
- Kempkes, M., Simpson, R., & Roth, I. (2015). Removing Barriers to Commercialization of PEF Systems and Processes. *Diversified Technologies*, November. https://www.researchgate.net/publication/283904199_Removing_Barriers_to_Commercialization_of_PEF_Systems_and_Processes
- Khan, Z., Siddiqui, M., & Park, S. (2019). Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing. *Molecular Diversity Preservation International*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6627445/pdf/diagnostics-09-00049.pdf>
- Khanavi, M., Eftekhari, M., Hosseinsalari, A., Akbarzadeh, T., Safavi, M., Asatouri, R., Mirabzadeh, M., & Shams, M. (2018). The effect of extraction method on the major constituents and biological effects of *Trachyspermum ammi* L. fruits. *Research Journal of Pharmacognosy*, 5(1), 55–61. http://www.rjpharmacognosy.ir/article_54433.html
- Kulshreshtha, G., Burlot, A., Marty, C., Critchley, A., Hafting, J., Bedoux, G., Bourgougnon, N., & Prithiviraj, B. (2015). Enzyme-assisted extraction of bioactive material from *Chondrus crispus* and *Codium fragile* and its effect on Herpes simplex virus (HSV-1). *Marine Drugs*, 13(1), 558–580. <https://doi.org/10.3390/md13010558>
- LabCiencia. (2015). *Extracción automática por ultrasonidos de material vegetal con el muestreador multipropósito MPS del Gerstel como estación de trabajo con doble cabezal*. http://www.gerstel.com/pdf/p-lc-an-2014-08_es.pdf
- Lakka, A., Bozinou, E., Makris, D., & Lalas, S. (2021). Evaluation of pulsed electric field polyphenol extraction from *Vitis vinifera*, *Sideritis scardica* and *Crocus sativus*. *ChemEngineering*, 5(2). <https://doi.org/10.3390/chemengineering5020025>
- Lanzetta Rengifo. (2018). *Técnica De Extracción Acelerada De Solventes*. <https://lanzettarengifo.com/tecnica-de-extraccion-acelerada-de-solventes/>
- Li, Y., Li, S., Lin, S., Zhang, J., Zhao, C., & Li, H. (2017). Microwave-assisted extraction of natural antioxidants from the exotic *Gordonia axillaris* fruit: Optimization and identification of phenolic compounds. *Molecules*, 22(9). <https://doi.org/10.3390/molecules22091481>

- Loera, P., López, C., Romero, C., Luévanos, M., & Balagurusamy, N. (2016). *Mecanismos De Resistencia Intrínseca y Adquirida a Antibióticos En Bacterias*. 1–36. <http://www.investigacionyposgrado.uadec.mx/site/wp-content/uploads/2020/07/bn-Pati-Carlos-Dani-et-al-antibiotic-resis-RMT-2016.pdf>
- Mekonnen, A., Yitayew, B., Tesema, A., & Taddese, S. (2016). In Vitro Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Thymus schimperi*, *Matricaria chamomilla*, *Eucalyptus globulus*, and *Rosmarinus officinalis*. *International Journal of Microbiology*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9545693>
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (2018). Reporte de datos de resistencia a los antimicrobianos en ecuador 2014-2018. *Ministerio de Salud Publica*, 10. https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/08/gaceta_ram2018.pdf
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (2019). *Plan Nacional para la prevención y control de la resistencia antimicrobiana 2019*. https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/10/Plan-Nacional-para-la-prevención-y-control-de-la-resistencia-antimicrobiana_2019_compressed.pdf
- Munita, J., & Arias, C. (2016). *Mechanisms of Antibiotic Resistance*. [https://doi.org/10.1016/S0065-7743\(08\)60495-9](https://doi.org/10.1016/S0065-7743(08)60495-9)
- Mutalib, L. (2015). Comparison between conventional and modern methods for extraction of *Rosmarinus officinalis* leaves. *Zanco Journal of Medical Sciences*, 19(2), 1029–1034. <https://doi.org/10.15218/zjms.2015.0027>
- Navarro, L. (2012). Aplicación de procesos de separación con CO2 supercrítico a la producción y optimización de bioplaguicidas. *The Journal of Supercritical Fluids*. https://www.aragon.es/documents/20127/674325/TESIS_BIOPLAGUICIDAS.pdf/c491abd7-a8e5-3d1a-6815-70239f2a362a
- Ngo, T., Scarlett, C., Bowyer, M., Ngo, P., & Vuong, Q. (2017). Impact of different extraction solvents on bioactive compounds and antioxidant capacity from the root of *Salacia chinensis* L. *Journal of Food Quality*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9305047>
- Núñez, E. (2019). *Evaluación del efecto antibacteriano de los extractos de plantas medicinales*

del Ecuador [Universidad Técnica de Ambato].
https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/30418/2/TESIS_BIBLIO.pdf

Onyebuchi, C., & Kavaz, D. (2020). Effect of extraction temperature and solvent type on the bioactive potential of *Ocimum gratissimum* L. extracts. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78847-5>

Oreopoulou, A., Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2019). Extraction of Polyphenols From Aromatic and Medicinal Plants: An Overview of the Methods and the Effect of Extraction Parameters. En *Polyphenols in Plants* (pp. 243–259). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813768-0.00025-6>

Organización Mundial de la Salud. (2013). *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional*. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/95008/9789243506098_spa.pdf

Organización Mundial de la Salud. (2020a). Resistencia a los antimicrobianos. En *Revista de Investigaciones Agropecuarias* (Vol. 43, Número 1). <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

Organización Mundial de la Salud. (2020b, junio 1). *Un número sin precedentes de países informa tasas preocupantes de resistencia a los antimicrobianos*. <https://www.who.int/es/news/item/01-06-2020-record-number-of-countries-contribute-data-revealing-disturbing-rates-of-antimicrobial-resistance>

Organización Panamericana de la Salud. (2019). *Porcentajes de resistencia de patógenos seleccionados*. Organización Panamericana de la Salud. <https://www3.paho.org/data/index.php/es/temas/resistencia-antimicrobiana/567-amr-vig-es.html>

Organización Panamericana de la Salud. (2021, marzo 4). *Patógenos multirresistentes que son prioritarios para la OMS*. <https://www.paho.org/es/noticias/4-3-2021-patogenos-multirresistentes-que-son-prioritarios-para-oms>

Ozusaglam, M., & Karakoca, K. (2013). *Antimicrobial and antioxidant activities of Momordica charantia from Turkey*. *12*(13), 1548–1558. <https://doi.org/10.5897/AJB2012.2932>

Pfaller, M., Diekema, D., Procop, G., & Rinaldi, M. (2007). Multicenter comparison of the VITEK

- 2 antifungal susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing amphotericin B, flucytosine, and voriconazole against *Candida* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(11), 3522–3528. <https://doi.org/10.1128/JCM.00403-07>
- Pulido, M., García, M., Reyes, M., Cisneros, J., & McConnell, M. (2013). Progress on the development of rapid methods for antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(12), 2710–2717. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt253>
- Ralte, L., Bhardwaj, U., & Singh, T. (2021). Traditionally used edible Solanaceae plants of Mizoram, India have high antioxidant and antimicrobial potential for effective phytopharmaceutical and nutraceutical formulations. *Heliyon*, 7(May), e07907. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07907>
- Rassem, H., Nour, A., & Yunus, R. (2016). Techniques For Extraction of Essential Oils From Plants: A Review. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 10(16), 117–127. <http://www.ajbasweb.com/old/ajbas/2016/November/117-127.pdf>
- Rathore, K., Joseph, B., Sharma, D., Gaurav, A., Sharma, S., Milind, M., Patel, P., Prakash, C., & Singh, L. (2018). Evaluation of multiplex polymerase chain reaction as an alternative to conventional antibiotic sensitivity test. *Veterinary World*, 11(4), 474–479. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.474-479>
- Redfern, J., Kinninmonth, M., Burdass, D., & Verran, J. (2014). Using Soxhlet Ethanol Extraction to Produce and Test Plant Material (Essential Oils) for Their Antimicrobial Properties. *Journal of Microbiology & Biology Education*, 15(1), 45–46. <https://doi.org/10.1128/jmbe.v15i1.656>
- Reygaert, W. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- Rivera, F. (2018). *Evaluación de la actividad antimicrobiana “in vitro” del extracto hidroetanólico de hojas de Vernonanthura patens (Laritaco) sobre Escherichia coli* [Universidad Regional Autónoma de los Andes]. <https://dspace.uniandes.edu.ec/bitstream/123456789/8935/1/PIUAMFCH042-2018.pdf>
- Román, M., Rivera, C., Cardona, L., Muñoz, L., Gomez, D., Passaro, C., & Quiceno, J. M. (2016).

- Guía de Extracción por Fluidos Super críticos: Fundamentos y Aplicaciones. *Tecnoparque*, 1, 48. https://repositorio.sena.edu.co/bitstream/handle/11404/4698/guia_extraccion_fluidos_super_criticos.pdf;jsessionid=3E4196B0876B8EE7FA056EC3C07301DE?sequence=1
- Salomón, S., Bermello, A., Márquez, T., López, O., González, M., & Llópiz, J. (2013). Microwave-assisted extraction of Cucurbita pepo L. (pumpkin) seed lipids. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(1), 17–26. <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v18n1/pla04113.pdf>
- Sánchez, E., Castillo, S., & García, P. (2016). Actividad antimicrobiana. *Investigación en plantas de importancia médica*, 77–100. <https://doi.org/10.3926/oms.334>
- Sapkale, G., Patil, S., Surwase, U., & Bhatbhage, P. (2010). Supercritical Fluid Extraction. *Sadguru Publications*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00675-9>
- Sarauz, L. (2021). Conocimiento ancestral de plantas medicinales en la comunidad de Sahuangal, parroquia Pacto, Pichincha, Ecuador. *Revista Vive*, 4(10), 72–85. <https://doi.org/10.33996/revistavive.v4i10.77>
- Schaenzer, A., & Wright, G. (2020). Antibiotic Resistance by Enzymatic Modification of Antibiotic Targets. *Trends in Molecular Medicine*, 26(8), 768–782. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.05.001>
- Senescyt. (2016). *Científica ecuatoriana rescata la medicina ancestral*. <https://www.educacionsuperior.gob.ec/cientifica-ecuatoriana-rescata-la-medicina-ancestral/>
- Serra, M. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Medicas*, 16(3), 402–419. <http://scielo.sld.cu/pdf/rhcm/v16n3/rhcm11317.pdf>
- Sharma, S., & Kumar, R. (2018). Influence of Harvesting Stage and Distillation Time of Damask Rose (*Rosa damascena* Mill.) Flowers on Essential Oil Content and Composition in the Western Himalayas. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 21(1), 92–102. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2017.1399089>
- Thouri, A., Chahdoura, H., El Arem, A., Omri, A., Ben, R., & Achour, L. (2017). Effect of solvents extraction on phytochemical components and biological activities of Tunisian date seeds (var.

- Korkobbi and Arehti). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1186/s12906-017-1751-y>
- Tituaña, G. (2013). Estudio del proceso de obtención de extractos de plantas medicinales cultivadas por la asociación flor de campo en la estancia y mushukwiñary en Tambalo de Pasa para promover su desarrollo. *Universidad técnica de Ambato*, 15–17.
<https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/8563/1/MAI05.pdf>
- Vanegas, J., & Jiménez, J. (2020). Antimicrobial resistance in the 21st century: Towards a post-antibiotic era? *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 38(1).
<https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.v38n1e337759>
- XiangHu Technologies. (2021). *Intelligent Microwave Catalytic Synthesis Extractor*.
<http://en.xianghukeji.com/product/43.html>
- Yildiz, H. (2016). Chemical Composition, Antimicrobial, and Antioxidant Activities of Essential Oil and Ethanol Extract of *Coriandrum sativum* L. Leaves from Turkey. *International Journal of Food Properties*, 19(7), 1593–1603. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1092161>
- Yu, H., Han, X., & Quiñones, D. (2021). La humanidad enfrenta un desastre: la resistencia antimicrobiana. *revista Habanera de Ciencias Medicas*, 20(3), 1–9.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180467416014>
- Zarghami, P., Kamali, H., Imani, M., & Mohammadi, A. (2016). *Antibacterial activity of Artemisia absinthium essential oil from the Northeast of Iran*. December 2018.
https://www.researchgate.net/publication/329864133_Antibacterial_activity_of_Artemisia_absinthium_essential_oil_from_the_Northeast_of_Iran
- Zhang, Q., Lin, L., & Ye, W. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine (United Kingdom)*, 13(1), 1–26.
<https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>