



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO Y
SUBEXTRACTOS ETÉREO Y CLOROFÓRMICO DE
*Duranta triacanta Juss, Callistemon speciosus, Y Tagetes
minuta L.*”**

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO

PRESENTADO POR:

ROSA ANA UVIDIA ORTIZ

RIOBAMBA – ECUADOR

2012

DEDICATORIA

El camino para llegar a cumplir las metas es largo y arduo, y significa que el sacrificio, la constancia y el amor por lo que se hace son los mejores instrumentos, y se torna célebre cuando sin miedo alguno y sin evadir se enfrentó cada uno de los obstáculos que se presentaron; solo así este camino es digno de ser llamado: éxito alcanzado.

Al culminar este gran paso en mi vida, quiero dedicar este trabajo a mis padres Iván y Norma, por entregarme sus vidas enteras, porque sin mirar defecto alguno me entregan su amor y comprensión, y por enseñarme que las cosas hechas con esfuerzo y perseverancia son las que perduran.

A mis hermanos Gaby, Romel y Carito porque con su ternura, cariño y alegría me regalan esa chispa de inspiración para no desmayar ante las adversidades y luchar por lo quiero y anhelo.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por su majestuosa bondad al regalarme personas extraordinarias e inigualables y por caminar junto a mí cuidando cada uno de mis pasos.

A mis padres, por su apoyo incondicional, por aplaudir mis logros y animarme cuando la tristeza o la decepción quisieron vencerme, gracias a su ejemplo y amor soy lo que soy. Los amo

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, hombres y mujeres hacen reverencia ante ti por ser solemne y grande, gracias por permitir forjar mi conocimiento y mi espíritu en ti.

Al Dr. Francisco Portero, por su grandiosa ayuda brindada a lo largo de este trabajo, por su paciencia y confianza, por sus valiosos conocimientos que permitieron culminar este trabajo de la mejor manera.

A la Dra. Cumandá Játiva, por su colaboración desinteresada, porque con enseñanzas y consejos facilitó la realización de esta investigación.

Al mejor equipo de trabajo, Lenin, Jessy y Gabo, gracias por su apoyo y amistad, por tantas risas y locuras, en especial a ti amiga, por tu confianza y sinceridad, por ponerle una sonrisa en cada tristeza y una palabra de aliento en cada adversidad.

A todas las personas que de alguna manera formaron parte de mi trabajo de investigación, a mi familia, a mis amigas Samy y Eri, mil gracias.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que el trabajo de investigación: “DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO Y SUBEXTRACTOS ETÉREO Y CLOROFÓRMICO DE *Duranta triacanta* Juss, *Callistemon speciosus*, Y *Tagetes minuta* L.” de responsabilidad de la señorita Rosa Ana Uvidia Ortiz, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

| NOMBRE | FIRMA | FECHA |
|---|--------------|--------------|
| Dr. Silvio Álvarez DECANO FAC. CIENCIAS | ----- | ----- |
| Dr. Iván Ramos DIRECTOR ESCUELA BIOQUÍMICA Y FARMACIA | ----- | ----- |
| Dr. Francisco Portero DIRECTOR DE TESIS | ----- | ----- |
| Dra. Cumandá Játiva MIEMBRO DEL TRIBUNAL | ----- | ----- |
| Tc. Carlos Rodríguez DIRECTOR CENTRO DE DOCUMENTACIÓN | ----- | ----- |
| NOTA DE TESIS | | ----- |

Yo, Rosa Ana Uvidia Ortiz, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

ROSA ANA UVIDIA ORTIZ

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|---|
| ATCC | American Type Culture Collection |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| °C | Grados Celcius |
| cm | centímetros |
| DMSO | Dimetil Sulfóxido |
| EMB | Agar Eosina azul de metileno |
| EPOC | Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica |
| EtOH | Etanol |
| g | Gramos |
| KIA | Agar con hierro de Kligler |
| m | Metros |
| mm | Milímetros |
| mg | Miligramos |
| mg/ mL | Miligramo por litro |
| min | Minutos |
| mL | Mililitros |
| m.s.n.m. | Metros sobre el nivel del mar |
| pH | Potencial de Hidrógeno |
| ppm | Partes por Millón |
| P/V | Peso por volumen |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| SBA | Agar base sangre |
| TSB | Caldo Soya Tréptica |
| TSA | Agar Soya Tréptica |
| µL | Microlitros |
| µg | Microgramos |
| UV | Ultravioleta |

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

ÍNDICE DE ANEXOS

INTRODUCCIÓN

| | | |
|----------|---|---|
| 1. | MARCO TEÓRICO | 1 |
| 1.1. | Las plantas y la medicina tradicional..... | 1 |
| 1.2. | Fitomedicina y Fitoterapia..... | 2 |
| 1.3. | Fitomedicamentos y Fitofármacos..... | 3 |
| 1.4. | Especies vegetales estudiadas..... | 4 |
| 1.4.1. | Espino chivo (<i>Duranta triacanta Juss</i>)..... | 4 |
| 1.4.1.1. | Clasificación taxonómica..... | 4 |
| 1.4.1.2. | Descripción botánica..... | 5 |
| 1.4.1.3. | Uso etnobotánico..... | 5 |
| 1.4.2. | Cepillo (<i>Callistemon speciosus</i>)..... | 5 |
| 1.4.2.1. | Clasificación taxonómica..... | 6 |
| 1.4.2.2. | Descripción botánica..... | 6 |
| 1.4.2.3. | Composición química..... | 7 |
| 1.4.2.4. | Propiedades Farmacológicas..... | 7 |
| 1.4.3. | Tzinso (<i>Tagetes minuta L.</i>)..... | 8 |
| 1.4.3.1. | Clasificación taxonómica..... | 8 |
| 1.4.3.2. | Descripción botánica..... | 8 |
| 1.4.3.3. | Composición química..... | 8 |
| 1.4.3.4. | Propiedades Farmacológicas..... | 9 |
| 1.4.3.5. | Toxicidad..... | 9 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 1.5. | Drogas Vegetales..... | 10 |
| 1.5.1. | Procesamiento de drogas vegetales..... | 10 |
| 1.5.2. | Métodos de extracción de drogas vegetales..... | 11 |
| 1.6. | Extractos vegetales..... | 12 |
| 1.6.1. | Tipos..... | 12 |
| 1.7. | Tamizaje Fitoquímico..... | 14 |
| 1.7.1. | Pruebas Cualitativas..... | 14 |
| 1.8. | Actividad Antimicrobiana de las Plantas..... | 16 |
| 1.8.1. | Grupos Fitoquímicos con actividad antimicrobiana..... | 16 |
| 1.9. | Determinación de la Actividad Antimicrobiana de productos vegetales..... | 19 |
| 1.9.1. | Método de Mitscher para la determinación de la actividad antimicrobiana..... | 22 |
| 1.10. | Descripción de bacterias en estudio..... | 27 |
| 1.10.1 | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538..... | 27 |
| 1.10.1.1. | Taxonomía..... | 27 |
| 1.10.1.2. | Morfología..... | 27 |
| 1.10.1.3. | Crecimiento..... | 28 |
| 1.10.1.4. | Patogenia..... | 28 |
| 1.10.1.5. | Características bioquímicas..... | 29 |
| 1.10.1.6. | Características generales de cultivo de <i>S. aureus</i> | 29 |
| 1.10.2 | <i>Escherichia coli</i> ATCC 9637..... | 29 |
| 1.10.2.1 | Taxonomía..... | 30 |
| 1.10.2.2. | Morfología..... | 30 |
| 1.10.2.3. | Crecimiento..... | 30 |
| 1.10.2.4. | Patogenia..... | 30 |
| 1.10.2.5. | Características bioquímicas..... | 32 |
| 1.10.2.6. | Características generales de cultivo..... | 32 |
| 1.10.3 | <i>Salmonella gallinarum</i> ATCC 9184..... | 32 |
| 1.10.3.1. | Taxonomía..... | 32 |
| 1.10.3.2. | Morfología..... | 33 |
| 1.10.3.3. | Patogenia..... | 33 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 1.10.3.4. | Características bioquímicas..... | 33 |
| 1.10.4. | <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031..... | 34 |
| 1.10.4.1. | Taxonomía..... | 34 |
| 1.10.4.2. | Morfología..... | 34 |
| 1.10.4.3. | Crecimiento..... | 34 |
| 1.10.4.4. | Patogenia..... | 34 |
| 1.10.4.5. | Características bioquímicas..... | 35 |
| 1.10.5. | <i>Candida albicans</i> ATCC 10231..... | 35 |
| 1.10.5.1. | Taxonomía..... | 35 |
| 1.10.5.2. | Morfología..... | 36 |
| 1.10.5.3. | Crecimiento..... | 36 |
| 1.10.5.4. | Patogenia..... | 36 |
| 1.10.5.5. | Características bioquímicas..... | 37 |
| 1.10.5.6. | Características generales de cultivo de <i>Candida albicans</i> | 37 |
| 1.10.6. | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853..... | 38 |
| 1.10.6.1. | Taxonomía..... | 38 |
| 1.10.6.2. | Morfología..... | 39 |
| 1.10.6.3. | Patogenia..... | 39 |
| 1.10.6.4. | Características bioquímicas..... | 39 |
| 1.10.6.5. | Características generales de cultivo de <i>P. aeruginosa</i> | 40 |
| 2. | PARTE EXPERIMENTAL | 41 |
| 2.1. | Lugar y pruebas de ensayo..... | 41 |
| 2.2. | Recursos materiales..... | 41 |
| 2.2.1. | Material vegetal..... | 41 |
| 2.2.2. | Material Biológico..... | 42 |
| 2.2.3. | Equipos..... | 42 |
| 2.2.4. | Materiales de Laboratorio..... | 43 |
| 2.2.5. | Reactivos..... | 44 |
| 2.2.6. | Medios de cultivo..... | 44 |
| 2.3. | Factores de estudio..... | 45 |
| 2.4. | Metodología..... | 45 |

| | | |
|----------|---|----|
| 2.4.1. | Recolección..... | 45 |
| 2.4.2. | Comprobación taxonómica e identificación botánica..... | 46 |
| 2.4.3. | Procesamiento de materia prima: limpieza y desinfección del material vegetal..... | 46 |
| 2.4.4. | Obtención del extracto..... | 47 |
| 2.4.4.1. | Procedimiento..... | 47 |
| 2.4.5. | Obtención de los subextractos clorofórmicos y etéreos..... | 48 |
| 2.4.6. | Métodos generales para el análisis del extracto..... | 49 |
| 2.4.6.1. | Determinación de los requisitos organolépticos..... | 49 |
| 2.4.6.2. | Determinación de los requisitos físicos..... | 49 |
| 2.4.6.3. | Análisis Físicoquímico cualitativo..... | 51 |
| 2.4.7. | Reactivación de las cepas microbiológicas ATCC..... | 54 |
| 2.4.7.1. | Preparación de los medios..... | 54 |
| 2.4.7.2. | Suspensión de los microorganismos ATCC..... | 56 |
| 2.4.7.3. | Siembra de los microorganismos ATCC..... | 56 |
| 2.4.7.4. | Lectura del crecimiento e identificación de los microorganismos..... | 56 |
| 2.4.7.5. | Almacenamiento de los microorganismos ATCC reactivados..... | 57 |
| 2.4.8. | Ensayo de la actividad antimicrobiana por el método de Mitscher en los extractos etanólicos de Espino chivo (<i>Duranta triacanta</i> Juss), Cepillo (<i>Callistemon speciosus</i>) y Tzinso (<i>Tagetes minuta</i> L.) y sus respectivos subextractos clorofórmicos y etéreos..... | 57 |
| 2.4.8.1. | Preparación de los medios..... | 57 |
| 2.4.8.2. | Preparación de las muestras para el ensayo..... | 58 |
| 2.4.8.3. | Preparación de la siembra..... | 61 |
| 2.4.9. | Lectura de los resultados..... | 63 |
| 3. | RESULTADOS Y DISCUSIONES | 64 |
| 3.1. | Análisis de la especie vegetal..... | 64 |
| 3.1.1. | Comprobación taxonómica e identificación botánica..... | 64 |
| 3.1.2. | Estudio macromorfológico de los vegetales..... | 64 |
| 3.2. | Obtención de los extractos etanólicos y subextractos etéreos y clorofórmicos..... | 65 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.3. | Análisis de los extractos..... | 66 |
| 3.3.1. | Determinación de las características organolépticas de los extractos..... | 66 |
| 3.3.2. | Análisis fisicoquímico cualitativo mediante reacciones de caracterización..... | 66 |
| 3.4. | Reactivación bacteriana (Cepas ATCC)..... | 68 |
| 3.5. | Preparación de los extractos para la determinación de la actividad antimicrobiana..... | 69 |
| 3.6. | Actividad antimicrobiana..... | 70 |
| 4. | CONCLUSIONES | 75 |
| 5. | RECOMENDACIONES | 77 |
| 6. | RESUMEN | 78 |
| 7. | BIBLIOGRAFÍA | 82 |
| 8. | ANEXOS | 90 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | | |
|-------------------|---|----|
| CUADRO N°1 | Comprobación taxonómica e identificación botánica de los vegetales estudiados. HERBARIO ESPOCH..... | 64 |
| CUADRO N°2 | Extractos etanólicos y subextractos etéreos y clorofórmicos de espino chivo, cepillo y tzinso. LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH..... | 65 |
| CUADRO N°3 | Características organolépticas y físicas de los extractos etanólicos. LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH..... | 66 |
| CUADRO N°4 | Características organolépticas de los extractos etanólicos. LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH..... | 66 |
| CUADRO N°5 | Grupos fitoquímicos identificados en los extractos de espino chivo (<i>Duranta triacanta Juss</i>), cepillo (<i>Callistemon speciosus</i>), tzinso (<i>Tagetes minuta L.</i>). LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH... | 68 |
| CUADRO N°6 | Identificación y caracterización para <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO. FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH..... | 69 |
| CUADRO N°7 | Identificación y caracterización para <i>Escherichia coli</i> ATCC 9637, <i>Salmonella gallinarum</i> ATCC N° 9184, <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC N° 10031, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC N° 27853. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO. FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH..... | 69 |
| CUADRO N°8 | Determinación del volumen de extractos y subextractos equivalente a 40mg. LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH..... | 70 |
| CUADRO N°9 | Actividad antimicrobiana en siembra radial en placa de petri del extracto etanólico de Espino chivo (<i>Duranta triacanta Juss</i>). LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH..... | 71 |

| | | |
|--------------------|---|----|
| CUADRO N°10 | Actividad antimicrobiana de los subextractos etéreo, clorofórmico y etanólico de Espino chivo (<i>Duranta triacantha Juss</i>). LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH..... | 71 |
| CUADRO N°11 | Actividad antimicrobiana en siembra radial en placa de petri del extracto etanólico de Cepillo (<i>Callistemon speciosus</i>). LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH..... | 72 |
| CUADRO N°12 | Actividad antimicrobiana de los subextractos etéreo, clorofórmico y etanólico de Cepillo (<i>Callistemon speciosus</i>). LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH..... | 72 |
| CUADRO N°13 | Actividad antimicrobiana en siembra radial en placa de petri del extracto etanólico de Tzinso (<i>Tagetes minuta L.</i>). LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH..... | 73 |
| CUADRO N°14 | Actividad antimicrobiana de los subextractos etéreo, clorofórmico y etanólico de Tzinso (<i>Tagetes minuta L.</i>). LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH..... | 73 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|------------------|---|----|
| TABLA N°1 | Grupos químicos más importantes con actividad antimicrobiana obtenido de plantas..... | 19 |
| TABLA N°2 | Clasificación taxonómica de <i>Staphylococcus aureus</i> | 27 |
| TABLA N°3 | Clasificación taxonómica de <i>Escherichia coli</i> | 30 |
| TABLA N°4 | Mecanismos patogénicos de los tipos de <i>E. coli</i> | 31 |
| TABLA N°5 | Clasificación taxonómica de <i>Salmonella gallinarum</i> | 33 |
| TABLA N°6 | Clasificación taxonómica de <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 34 |
| TABLA N°7 | Clasificación taxonómica de <i>Candida albicans</i> | 35 |
| TABLA N°8 | Clasificación taxonómica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 38 |
| TABLA N°9 | Características bioquímicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 39 |

ÍNDICE DE FIGURAS

IMAGEN N°1 Plantilla del test de Mitscher para el estriado de microorganismos.. 62

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

| | | |
|-----------------------|--|---|
| FOTOGRAFÍA N°1 | ESPINO CHIVO (<i>Duranta triacanta Juss</i>)..... | 4 |
| FOTOGRAFÍA N°2 | CEPILLO (<i>Callistemon speciosus</i>) (Bonpl.) Sweet..... | 5 |
| FOTOGRAFÍA N°3 | TZINSO (<i>Tagetes minuta L.</i>)..... | 7 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | | |
|------------------|---|----|
| ANEXO N°1 | Tamizaje fitoquímico de los extractos etanólicos..... | 88 |
| ANEXO N°2 | Resultados de las siembras en placa petri del extracto etanólico y subextractos etéreo y clorofórmicos de Espino chivo (<i>Duranta triacanta Juss</i>)..... | 89 |
| ANEXO N°3 | Resultados de las siembras en placa petri del extracto etanólico y subextractos etéreo y clorofórmicos de Cepillo (<i>Callistemon speciosus</i>)..... | 90 |
| ANEXO N°4 | Resultados de las siembras en placa petri del extracto etanólico y subextractos etéreo y clorofórmicos de Tzinso (<i>Tagetes minuta L.</i>)..... | 91 |

INTRODUCCIÓN

Desde tiempos prehistóricos el hombre ha utilizado plantas con fines curativos, tanto físicos como espirituales, alimenticios y cosméticos. En algunos casos las plantas dotadas de poderes mágicos y sagrados, han servido para una intervención directa en la vida y el destino de los hombres, pues muchos tratamientos tradicionales a base de plantas fueron y son extraordinariamente eficaces. A pesar de ello a la medicina herbolaria, hace tiempo se la consideró producto de superstición e ignorancia, haciendo que cayera en desgracia; pero ahora se viene dando un proceso de revalorización dado el rechazo mundial que están teniendo los productos sintéticos medicinales por las reacciones adversas que provocan en los pacientes y la contaminación ambiental que genera su fabricación.

La importancia que hoy por hoy tiene la medicina herbolaria para procurar salud y bienestar en la población es muy evidente y más aún en comunidades rurales, quienes dependen casi exclusivamente de los recursos vegetales para curar y prevenir sus enfermedades y dolencias.

Microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella gallinarum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, entre otros son responsables de graves infecciones que pueden afectar órganos internos, membranas, mucosas de boca, garganta, tracto genital, urinario y otras. Y es así que en la actualidad, las enfermedades infecciosas muestran una tendencia emergente, y cada vez más crítica, debido a la alta tasa de mortalidad y secuelas producidas, por lo que el conocimiento de los antibióticos y antifúngicos es de suma importancia y aún más trascendente resulta las investigaciones aportadas de nuevos productos de origen vegetal, ya que estos han constituido desde siempre la principal fuente de agentes terapéuticos para la humanidad y generadores de sustancias con actividad biológica, con fórmulas cada vez más eficaces y menos tóxicas para el tratamiento de diferentes afecciones.

Aportar a esta gran necesidad de generar productos medicinales de origen vegetal con investigaciones afines es un objetivo crucial, y como respuesta al mismo existen ya

varios trabajos publicados sobre actividades biológicas que presentan un sin fin de vegetales y muchos de estos estudios se basan en la determinación y evaluación de la actividad antimicrobiana.

En base a esto, el presente trabajo investigativo realizado en la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, tiene como objetivo principal determinar la actividad antimicrobiana de especies vegetales como Espino chivo (*Duranta triacanta*), Cepillo o molle (*Callistemon speciosus*) y Tzinso (*Tagetes minuta*), y así comprobar lo que el conocimiento popular afirma, de que son eficaces para tratar infecciones.

Del Espino chivo se sabe que es muy utilizado en las comunidades indígenas para tratar problemas cutáneos, el Cepillo en problemas respiratorios al igual que el Tzinso que además se le atribuye propiedades para tratar molestias gástricas; sin embargo de estos vegetales son muy pocas o ninguna las pruebas que se han realizado frente a microorganismos, pero dentro de la ESPOCH se ha experimentado otras actividades como la insecticida que tiene el Tzinso sobre *Premnotrypes vorax* (BALDEON 2012), y *Drosophila melanogaster* (COFRE 2012).

El desarrollo de este estudio parte desde la preparación de los extractos etanólicos por maceración del vegetal y los subextractos etéreos y clorofórmicos, continuando con la correspondiente identificación de los grupos fitoquímicos; y con la aplicación de los extractos mediante el método de Mitscher, frente a microorganismos ATCC: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 9637, *Salmonella gallinarum* ATCC 9184, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, para comprobar el efecto antimicrobiano.

Los resultados obtenidos fueron alentadores pues se comprobó que los tres vegetales presentan actividad antimicrobiana, al menos frente a un microorganismo, esto seguramente debido a la presencia de metabolitos secundarios que contienen los extractos.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 LAS PLANTAS Y LA MEDICINA TRADICIONAL

Las Plantas Medicinales son vegetales que contienen sustancias, en uno o varios de sus órganos, que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica o como precursores para la síntesis química de otros productos farmacéuticos.

Son tan antiguos los orígenes de la utilización de plantas para tratar enfermedades u otras entidades nosológicas, tales como empacho, mal de ojo, el aire, entre otras. Y es así que en los inicios de la humanidad el acto de seleccionar plantas curativas estuvo asociado a las características morfológicas de la planta, raíces, hojas o frutos y su semejanza con la figura humana o de órganos. Posteriormente se basó en las acciones que sus diferentes preparados desencadenaban en los consumidores accidentales o voluntarios, desde esta manera iniciaba una estrategia que más tarde sería fundamental en las ciencias médicas; el principio de observación de un efecto asociado al uso de un determinado recurso terapéutico. (19)

En el Ecuador el uso de plantas medicinales está inmerso en la cotidianidad de sus habitantes. La medicina popular se practica principalmente por habitantes de zonas rurales, pero también por ciudadanos de toda clase social. Se pueden encontrar gran variedad de plantas con usos medicinales que se expenden en mercados de la Sierra, Costa y Amazonía. (47)

Las causas que acentúan el arraigado y extenso empleo de plantas medicinales entre los ecuatorianos son: el bajo poder adquisitivo de la mayoría que no permite el acceso a medicamentos, la carencia de un sistema oficial de salud efectivo y, principalmente, que el conocimiento médico ancestral es inmenso

Por efecto de la conquista española ocurrida en el siglo XVI y del constante ir y venir de gente diversa, se han incorporado elementos y especies medicinales nuevas que se han amalgamado y han enriquecido el conocimiento médico ancestral indígena. Así, en el Ecuador conocemos y utilizamos centenares de especies medicinales nativas e introducidas en las todas las regiones del país.

En la medicina tradicional ecuatoriana, el mundo real y el mágico, poblado de espíritus, dioses y demonios, son las dos caras de una medalla, los planos correspondientes que se complementan y se justifican mutuamente. En este contexto, las enfermedades no son consecuencias de las fallas de los órganos y sus funciones, ni de la invasión de microorganismos patógenos, sino el resultado de las influencias de seres y fuerzas sobrenaturales que están detrás de todas las cosas aparentes de este mundo real, para advertir, premiar o castigar según sus códigos, mandatos, intereses o simpatías. Tanto en el Ecuador como en otros países, es importante y característico el uso de agentes psicotrópicos para la curación mediante rituales. (47) (52)

1.2 FITOMEDICINA Y FITOTERAPIA

La Fitomedicina se define como aquella disciplina de la medicina que emplea en terapéutica a las plantas medicinales o principios activos de origen vegetal en forma de extractos, infusiones, decocciones en sus diversas presentaciones, basado en el conocimiento científico moderno, esto es una base que se sostiene en los pilares fundamentales de la farmacología y la terapéutica moderna: farmacodinamia, farmacocinética, estudios preclínicos, clínicos y la divulgación de éstos a través de medios reconocidamente validados por las comunidades científicas. Esta disciplina engloba tanto a la Fitofarmacología, que es la ciencia que estudia los fitomedicamentos, en cuanto a su mecanismo y sitios de acción (receptores), como a la Fitoterapia, que

aplica los productos de origen vegetal con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, para atenuar o para curar un estado patológico y busca establecer las interacciones medicamentosas, contraindicaciones y efectos adversos. (47)(48)

La Fitoterapia Moderna o Fitomedicina, se nutre del desarrollo de la Fitofarmacología básica y clínica, esto es de los estudios farmacológicos realizados con plantas o sus componentes y lo que la lleva a fundamentarse en el uso racional y científico de productos vegetales con finalidad terapéutica; puede así ser utilizada para prevenir, curar o anular estados patológicos.

En la actualidad se estima que alrededor del 80% de la población utiliza medicina alternativa herbolaria (Fitoterapia) como tratamiento paralelo a la medicina tradicional y su uso ha estado siempre muy arraigado a la tradición. (47)

1.3 FITOMEDICAMENTOS Y FITOFÁRMACOS

Según la Organización Mundial de la Salud, los fitofármacos o medicamentos herbarios: “Son productos medicinales acabados y etiquetados cuyos ingredientes activos estandarizados, están formados por partes aéreas o subterráneas de plantas u otro material vegetal, o combinaciones de éstos, en estado bruto o en forma de preparaciones vegetales. Por material vegetal se entienden: jugos, resinas, aceites vegetales y cualquier otra sustancia de naturaleza semejante”. (16)

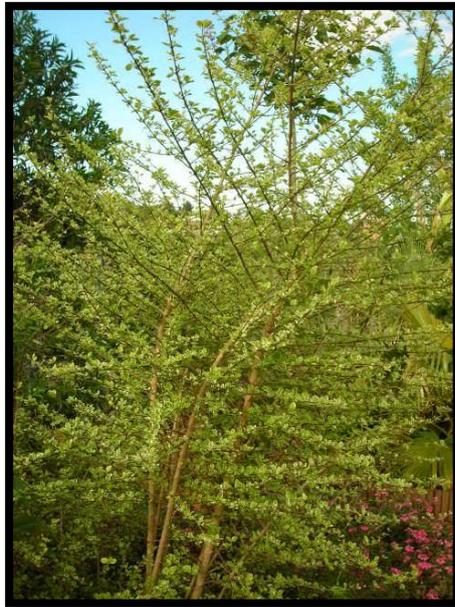
Un medicamento herbolario tiene idéntica importancia que un producto químico farmacéutico; por ello se sujeta a la misma normatividad y tienen las mismas formas de registro en la Secretaría de Salud, se legisla y se comercializa de igual manera. Además, se ofrece al público con las mismas presentaciones: cápsulas, tabletas o jarabe. (51)

Por otro lado, un fitomedicamento es un extracto vegetal estandarizado (Fitofármaco), normalizado y estabilizado y del cual se conoce una acción farmacológica definida y cuantificada, fabricado con tecnología farmacéutica moderna y que su utilización terapéutica está basada en resultados obtenidos de estudios clínicos diseñados y

desarrollados de acuerdo con criterios internacionales. Los fitomedicamentos se producen en variadas formas tales como: tabletas, grageas, comprimidos, cápsulas, gotas y jarabes. (16)

1.4 ESPECIES VEGETALES ESTUDIADAS

1.4.1 Espino chivo (*Duranta triacanta* Juss)



Fuente: <http://jardnsapossessi.blogspot.com/>

FOTOGRAFÍA N°1 ESPINO CHIVO (*Duranta triacanta* Juss)

1.4.1.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Lamiales

Familia: Verbenaceae

Género: *Duranta*

Especie: *triacanta*

1.4.1.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Arbusto característico de zonas montañosas secas, puede alcanzar hasta 3m de alto, con tallo de color gris, sus hojas son verdes y pequeñas, flores que se despliegan en forma de inflorescencia, presencia de espinas tanto en tallo como en ramas. Los frutos son pequeños de color amarillo

1.4.1.3 USO ETNOBOTÁNICO

En la región interandina, en las comunidades Kichwa de la Sierra el espino chivo (*Duranta triacanta*), es ampliamente utilizado para eliminar manchas en la piel, la paspa e irritaciones cutáneas. (8)

1.4.2 Cepillo (*Callistemon speciosus*)



Fuente:http://plants.usda.gov/java/largeImage?imageID=casp30_001_ahp.jpg

FOTOGRAFÍA N°2 CEPILLO (*Callistemon speciosus*) (Bonpl.) Sweet

La especie es originaria de Australia sur occidental donde crece ya sea sobre suelos arenosos que arcillosos en zonas húmedas y pantanosas. El nombre del género es la

combinación de los términos griegos “kallos” = belleza y “stémon” = estambre; el nombre de la especie es, en latín “speciosus” = bello.

Especie muy florífera y de fácil cultivo que se caracteriza por su adaptabilidad a diversas condiciones climáticas, soportando largos períodos de sequía en verano, una vez bien radicada, y a varios tipos de suelo, aunque con preferencia por aquellos ácidos o neutros. La exposición ideal es en pleno sol, pero puede soportar una ligera sombra y en cuanto a las temperaturas soporta tanto altas como bajas, al menos hasta cerca -6 °C. (41)

1.4.2.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Reino: Plantae

Subreino: Traqueobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Myrtales

Familia: Myrtaceae

Género: *Callistemon*

Especie: *speciosus*

1.4.2.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Es un arbusto o pequeño árbol que puede alcanzar hasta los 8 m de alto con corteza gris o marrón, escamosa, con copa globosa y ramas delgadas y penduladas. Las hojas, sobre un corto pecíolo, son de color verde intenso, alternas, simples, lanceoladas con ápice agudo u obtuso, rígidas, largas 4-10 cm por unos 6mm de ancho, aromáticas por la presencia de glándulas oleíferas. Las inflorescencias son espigas terminales densas, cilíndricas, largas 5-15 cm, con numerosas flores con 5 sépalos y 5 pétalos verdes, largos 0,6 cm, y numerosos estambres libres, largos 2,5 cm, de color rojo intenso con anteras amarillas, que son la parte más vistosa de la flor. Los frutos son cápsulas leñosas, globosas, de color gris marrón, de 5-7 mm de diámetro, deprimidas en el ápice, persistente por largo tiempo, conteniendo numerosas semillas minúsculas.

Se reproduce por semillas colocadas superficialmente en sustrato arenoso, mantenido constantemente húmedo, en posición luminosa y a 20-22 °C de temperatura, la germinación se produce entre 4 y 8 semanas con crecimiento inicial más bien lento; se reproduce también por esqueje en verano y acodo aéreo. (29)(40)(41)

1.4.2.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA

Posee un alto contenido de aceites esenciales en sus hojas, en los cuales el 1,8-cineol es el componente mayoritario (45-80%). Otros componentes presentes en esta especie incluyen α -pineno, limoneno y α -terpineol. (29)

1.4.2.4 PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

El aceite esencial extraído de las hojas, que tiene como constituyente principal al cineol (eucaliptol), es conocido por sus propiedades antisépticas, expectorantes y broncodilatadoras. (41)

1.4.3 Tzinso (*Tagetes minuta* L.).



Fuente: <http://www.cantoverde.org/150plantas/e.html>

FOTOGRAFÍA N°3 TZINSO (*Tagetes minuta* L.)

Conocida también como yuyito del amor, chinchilla, chil chil, suico, huacatay (Perú), ruda criolla (Colombia). Es originaria de Sudamérica (Argentina, Chile, Bolivia, Perú, y Paraguay). Fue introducida en Estados Unidos, Australia, África y Asia. (33).

1.4.3.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Reino: Plantae

Subreino: Traqueobionta

Superdivisión: Spermatophyta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Asterales

Género: *Tagetes*

Especie: *minuta*

1.4.3.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Hierba anual, erecta, glabra, de olor penetrante, persistente pero agradable, generalmente mide entre 60 cm a 1m, pero pueden crecer hasta 1,8m de altura. Hojas pinnatisectas con 4-8pares de segmentos lanceolados, aserrados y segmento terminal algo mayor. Las flores, amarillas, se disponen en cimas corimbiformes compactas conteniendo bolsas oleíferas. Se propaga muy bien por semilla. Es muy fácil de observar creciendo en muchas macetas en el jardín. (1)(33)

1.4.3.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA

Contiene flavonoides (quercetagenina, patuletina e isoramnetina), cinerina I y II, patulitrina, piretrina I y II, ácido valeriánico, ácido siríngico. Etimol, sustancia responsable de su aroma.

Planta rica en en esencia (0,5%) que se resinifica con facilidad, contiene diversos terpenos. El aceite esencial contiene bitienil, canfeno, cinerina I y II, citral, ácido fórmico y acético, monometilfumarato, jasmolina I y II, limoneno, linalool, cis-ocimenona, transocimenona, patulitrina, feniletanol, α y β pineno, piretrina I y II, quercetagrina, salicaldehído, ácido siringico, tagetona, cis-tagetona, dihidrotagetona, tiofeno y ácido valeriánico. (1)(13)(23)

1.4.3.4 PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

Es un excelente digestivo y antiparasitario, posee actividad antimicrobiana, antifúngica, insecticida, acaricida y antioxidante comprobadas. Estudios revelan su eficacia para eliminar las larvas de *Aedes aegypti*, el mosquito vector del dengue y la fiebre amarilla, y la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*). (26)(32)(36)

El tzinso también puede ser usado como pesticida (nematicida). Se le atribuyen propiedades medicinales como carminativo y antiabortivo. La infusión de sus hojas se usa para aliviar los dolores gástricos y la decocción de sus flores y hojas frescas para aliviar los catarros y bronquitis. De sus hojas se extrae un aceite esencial utilizado en perfumería. (58)

El extracto clorofórmico 0,125g/L de esta planta demuestra actividad con *Candida albicans*, actividad antiespasmódica, antiviral contra virus de Ranikhet, actividad insectisida contra *Musca domestica* y *Tribolium castaneum*, actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis* y actividad de feromonas para *Aspiculurus tetráptera*, *Dacus dorsalis*. (13)

1.4.3.5 TOXICIDAD

Se ha descrito algunos casos de dermatitis de contacto y reacciones eczematosas. (13)

1.5 DROGAS VEGETALES

Parte de la planta, ya sea hojas, flores, frutos, semillas, raíces, tallos entre otros, que contiene los principios biológicamente activos, con propiedades terapéuticas establecidas.

- Droga cruda: Droga vegetal que ha sufrido de forma general los procesos de recolección y secado.

- Droga fresca: Droga vegetal recién colectada. (20)

1.5.1 PROCESAMIENTO DE DROGAS VEGETALES

La droga vegetal se procesa con la finalidad de viabilizar su uso farmacéutico en la elaboración de fitofármacos o su empleo clínico directo. Los métodos se seleccionan de acuerdo a la naturaleza y la estabilidad de las sustancias químicas que contienen el vegetal.

El procedimiento se da de la siguiente manera:

1. **Secado:** En esta fase se elimina suficiente cantidad de humedad como para conservar la calidad de la droga; éste puede realizarse a la sombra, al sol o en estufa.

2. **Fragmentación:** Posibilita la obtención de una forma más conveniente de la droga para los posteriores procesos. La fragmentación comprende diversas operaciones mecánicas, entre ellas: trituración, contusión, raspado, ralladura, corte, molienda, pulverización, etc.

3. **Homogenización:** Se logra mediante el tamizado o clasificación de partículas por su tamaño.

4. **Separación de los principios solubles:** Se realiza con el objetivo de obtener los extractos que permitan conservar los componentes útiles de la droga de forma concentrada, uniforme y permanente.
5. **Almacenamiento y conservación:** Permite preservar a los mismos de la luz y la humedad, para ellos se conserva en recipientes adecuados, de preferencia vidrio ámbar. (20)

1.5.2 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE DROGAS VEGETALES

Los procesos de extracción varían en función de la escala de producción, de la naturaleza y calidad de la materia prima y de la naturaleza del solvente. Los procesos de extracción pueden ser:

- **Maceración:** El material crudo previamente triturado se pone en contacto duradero con cantidad suficiente de solvente, en un tanque cerrado a temperatura ambiente durante 2-14 días hasta el agotamiento de la droga vegetal. Puede utilizarse agitación. Posterior a este tiempo la mezcla es filtrada, el material insoluble es lavado con el mismo solvente y los filtrados se mezclan para concentrar el extracto.
- **Decocción:** La droga vegetal se cuece junto con el disolvente, generalmente agua, bajo los efectos directos del calor.
- **Digestión:** Es una maceración a temperaturas medias. La droga vegetal se pone en contacto con el disolvente a una temperatura de 55°C, de manera tal que se producen rupturas de las estructuras anatómicas de la planta permitiendo la obtención de los principios activos sin desnaturalizar los mismos. Útil para la obtención a partir de drogas resinosas o para la preparación de aceites medicamentosos con excipientes grasos.

- **Infusión:** La droga vegetal se añade al disolvente, generalmente agua, a la temperatura de ebullición pero retirado de los efectos directos del calor.
- **Percolación o lixiviación:** El material crudo previamente triturado se pone en contacto con cantidad suficiente de solvente de forma tal que el solvente cubra la capa de sólido en el tanque percolador. El solvente se renueva de modo continuo manteniéndose un gradiente de concentración, el disolvente puro desplaza al que contiene la sustancia extraída sin ser necesario aplicar presión. La droga residual es prensada y el fluido obtenido es combinado con el percolado para concentrar el extracto.
- **Repercolación:** Es una percolación en la que el extracto obtenido de un percolador sirve como menstruo del siguiente percolador y así sucesivamente.(21)(20)

1.6 EXTRACTOS VEGETALES

Se define como extracto vegetal el producto líquido obtenido a partir de plantas o parte de ellas. Los extractos de plantas medicinales se utilizan por el hombre desde la antigüedad para la cura de múltiples dolencias. Se obtienen mediante la separación de porciones biológicamente activas presentes en los tejidos de plantas, con el uso de un solvente (alcohol, agua, mezcla de estos u otro solvente selectivo) y un proceso de extracción adecuado. (27) (43)

1.6.1 TIPOS

Los extractos se clasifican de acuerdo a su consistencia y al método de obtención en los siguientes:

- A. **Extractos fluidos:** Preparaciones líquidas en la que se utiliza como disolvente el alcohol. Se obtienen por agotamiento de la droga en 2 lixivaciones sucesivas, y concentrando la segunda fracción que se añade a la primera, de modo que el peso del

producto final corresponda exactamente al peso de droga seca de partida; es decir, que la relación droga/extracto sea 1:1.

- B. **Extractos blandos:** Son semi-sólidos, de consistencia semejante a la miel. En general en desuso.
- C. **Extractos firmes:** De contenido de agua del 30%. Muy viscosos y no vertibles. Difíciles de conservar. Muy poco usados.
- D. **Extractos secos:** Son sólidos, polvos o granulados, con un contenido de agua entre 5-8%. De consistencia seca y fácilmente pulverizable. Los principios activos están bien concentrados (1 g de extracto seco corresponde a 5 g de planta). Muy hidrosfópicos, lo cual dificulta su conservación y manipulación.
- E. **Extractos nebulizados:** Se obtienen atomizando la solución extractiva en presencia de una corriente de aire a alta temperatura, lo cual permite una rápida evaporación del disolvente y una menor exposición al calor de los principios activos.
- F. **Extractos glicólicos:** Se utiliza como disolvente el propilenglicol para su obtención. Muy útiles para la elaboración de formas tópicas en gel o crema.
- G. **Extractos hidroalcohólicos glicerizados:** Obtenidos por extracción triple en alcohol, agua y glicoles.
- H. **Extractos hidroglicerizados:** Obtenidos con agua y glicol.
- I. **Extractos aceitosos:** Preparados oleosos y emulsificables en un excipiente adecuado para su administración, se obtienen por digestión de la planta en aceite de tornasol y posterior turboextracción. (4) (20)

1.7 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

El tamizaje fitoquímico o “screening” fitoquímico permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta, como: alcaloides, heterósidos, saponinas, flavonoides, taninos, etc.

Consiste en la determinación de compuestos químicos presentes, con la aplicación de pruebas preliminares sencilla, rápidas, que se evidencian con la formación de precipitados, coloraciones u otros. Estas reacciones son selectivas para cada grupo de compuestos estudiados y detectan la mínima cantidad posible.

Existen diversos métodos de tamizaje fitoquímico, cada uno con una especificidad diferente. La cantidad de material vegetal necesario para hacer las pruebas varía de 5g a 200g. (11)(12)(21)

1.7.1 PRUEBAS CUALITATIVAS

- A. Ensayo de Sudán III:** Permite reconocer compuestos grasos, la prueba se considera positiva si aparecen gotas o una película coloreada de rojo en el seno del líquido o en las paredes del tubo de ensayos, respectivamente.

- B. Ensayo de Dragendorff, Mayer y Wagner:** Permiten identificar alcaloides, para ello al extracto se añade 1 gota de ácido clorhídrico concentrado, obteniéndose una solución ácida. Si al añadir 2 o 3 gotas de la solución reactiva de Dragendorff, Mayer o Wagner respectivamente, se observa opalescencia, turbidez definida, precipitado coposo, entonces se considera positiva la presencia de este tipo de metabolito. En el caso de alcaloides cuaternarios y/o aminoácidos libres, estos sólo se encontrarán en el extracto acuoso y para considerar su presencia debe observarse la aparición de turbidez definida o precipitado coposo en todos los casos, ya que la aparición de opalescencia puede dar un resultado falso, pues puede provenir de una extracción incompleta de bases primarias, secundarias o terciarias.

- C. Ensayo de Baljet:** Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular coumarinas, aunque otros compuestos láctónicos pueden dar también positivo este ensayo. En estas condiciones se considera la presencia de esta familia de compuestos por la aparición de una coloración y un precipitado.
- D. Ensayo de Borntrager.** Para la identificación de quinonas. Si la fase acuosa alcalina se colorea de rosado a rojo, el ensayo se considera positivo.
- E. Ensayo de Liebermann – Burchard.** Determina la presencia de triterpenos y/o esteroides, debido a que ambos tipos de productos poseen un núcleo de androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6. Para ello redissolver el extracto en 1mL de cloroformo y se añade 1mL de anhídrido acético, mezclar bien. Por la pared del tubo dejar resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. El ensayo positivo presenta los siguientes cambios de color:
1. Rosado-azul muy rápido
 2. Verde intenso-visible aunque rápido
 3. Verde oscuro-negro final de la reacción.
- F. Ensayo de Ninhidrina:** La presencia de aminoácidos libres o de aminas en general se realiza a través de este ensayo. Se considera positivo cuando se desarrolla un color violáceo.
- G. Ensayo de Shinoda:** Permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto vegetal. El ensayo se considera positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo, intensos en todos los casos.
- H. El ensayo de antocianidinas:** Permite identificar en los extractos la existencia en estas estructuras de secuencia C6-C3-C6 del grupo de los flavonoides. La aparición de un color rojo a marrón en la fase amílica es indicativa de un ensayo positivo.

- I. La presencia de estructuras tipo polisacárido, que forma un coloide hidrófilo de alto índice de masa, que aumenta la densidad del agua donde se extrae, denota la presencia de **mucílagos**.
- J. **El ensayo de espuma:** Permite reconocer la presencia de saponinas, tanto del tipo esteroideal como triterpénicas.
- K. **Ensayo de Fehling:** Para reconocer la presencia de azúcares reductores. Se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece un precipitado rojo.
- L. **Ensayo de resina** permite identificársete este tipo de compuestos y se considera positivo cuando aparece un precipitado. (30)

1.8 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS PLANTAS

Las plantas aportan un sinnúmero de compuestos químicos con actividad antimicrobiana, muchas veces comparable con otros antimicrobianos utilizados en clínica. La razón de cómo actúan no es clara hasta el momento, pero existen teorías de que podrían ser compuestos con diferentes funciones y que de forma accidental operan como antimicrobianos, o que realmente tienen dicha actividad. (28)

1.8.1 GRUPOS FITOQUÍMICOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Las plantas tienen una capacidad impresionante para sintetizar compuestos, la mayoría relacionados con el fenol y sus derivados.

Los compuestos fitoquímicos antimicrobianos útiles pueden ser agrupados en varias categorías, como las siguientes:

- A. **Fenoles y Polifenoles:** Algunos ejemplos los constituyen: el ácido cafeico y el cinámico con acción antimicrobiana, antiviral y antifúngica. También se pueden mencionar a los fenoles simples y ácidos fenólicos, catecoles y eugenoles (estos

últimos considerados bacteriostáticos). Los lugares y el número de grupos hidroxilos (OH) en el anillo parecen que están relacionados directamente con la toxicidad frente a los microorganismos, de manera que un aumento de hidroxilación está ligado a una mayor toxicidad. Plantas productoras de compuestos de estas características son el tomillo, la manzanilla y la gayuba, cuyo principio activo, la arbutina, ha sido utilizado a lo largo de los años en el tratamiento de infecciones urinaria.

B. Quinonas: Son anillos aromáticos con dos funciones ceto. Poseen una alta reactividad, formando complejos con los aminoácidos inactivando la proteína y anulando su función, debido a esto el rango de la actividad antimicrobiana de las quinonas es amplio.

C. Flavonas, flavonoides y flavonoles: Son estructuras que contienen un grupo carbonilo, constituyen la familia más amplia de fenoles naturales. Estos compuestos son sintetizados por las plantas en respuesta a la infección antimicrobiana, y su actividad sobre las bacterias probablemente se deba a su capacidad de generar complejos con proteínas extracelulares y proteínas solubles y extracelulares y con las células de pared bacteriana de forma similar a la de las quinonas. Los flavonoides poseen actividad antiviral. Las catequinas, derivados de los flavonoides, ejercen actividad sobre *Vibrio cholerae* O1, *Streptococcus mutans* y *Shigella*, y otros microorganismos. Las catequinas tienen una actividad inactivadora sobre la toxina de *Vibrio cholerae* e inhibe las glicosil transferasas en *S. mutans*.

D. Taninos: Se cree que la actividad antimicrobiana de estos compuestos se debe a su interacción sobre las adhesinas, proteínas de la pared celular, y a su capacidad de unirse a polisacáridos. Estas sustancias son compuestos fenólicos estables hidrosolubles no nitrogenados, que pueden prevenir la expresión de las fimbrias P de *E. coli* dentro de sus actividades antibacterianas, y además tienen actividades antivirales, antiadherentes o antioxidantes. Se distribuyen principalmente en las raíces, la corteza, y de vez en cuando en las hojas de la planta. Estos compuestos tienen propiedades antibacterianas, astringentes y antisépticas. Se encuentran especialmente en las familias de las Ericáceas, Leguminosas, Rosáceas y Salicáceas.

- E. Cumarinas:** Son compuestos derivados de la benzo- α -pirona, como la cumarina, la esculetina, la umbeliferona y la escopoletina. Su mecanismo de acción antimicrobiano al parecer se da mediante interacción con el ADN eucariota, explicando así también su acción antiviral.
- F. Terpenoides y aceites esenciales:** Son activos contra bacterias, virus, hongos y protozoarios. Se ha reportado que los terpenoides actúan contra *Listeria monocytogenes*. Se cree que esta actividad antimicrobiana se debe a una perturbación de la estructura de la membrana celular por su naturaleza lipofílica. La capsaicina tiene actividad bactericida sobre *Helicobacter pylori*; aunque tiene un poder muy irritante sobre la mucosa gástrica. El ácido betulínico es un triterpenoide que muestra actividad inhibitoria del virus VIH. El petalostemumol presenta una actividad excelente contra *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, aunque tiene una menor actividad sobre bacterias Gram negativas y *Candida albicans*.
- G. Alcaloides:** Son compuestos nitrogenados heterocíclicos. Los Glicoalcaloides de especies de *Solanum* podrían ser útiles contra la infección por VIH y también contra las infecciones intestinales relacionadas con el SIDA. La berberina es un alcaloide representativo por su actividad potencialmente efectiva contra *Tripanosoma* y *Plasmodium*. La quinina y quinidina son utilizados en el tratamiento de la malaria. Se cree que su mecanismo de acción se debe a la intercalación entre la pared celular y el ADN del microorganismo.
- H. Lectinas y Polipéptidos:** Su mecanismo de acción principalmente se explica como la formación de canales iónicos en la membrana del microorganismo o la inhibición competitiva de la adhesión de proteínas a los receptores polisacáridos del hospedero.(25)(28)(50)

TABLA 1. GRUPOS QUÍMICOS MÁS IMPORTANTES CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA OBTENIDO DE PLANTAS

| GRUPO QUÍMICO | COMPUESTO | ACTIVIDAD |
|------------------------|------------------|-------------------------------------|
| Fenoles simples | Timol | Bacterias, hongos, virus |
| | Ácido antémico | <i>S. aureus, S. typhimurium</i> |
| | Petalostemulol | Bacterias y hongos |
| Quinonas | Hipericina | VIH |
| Taninos | | Bacterias y virus |
| Cumarinas | | Virus |
| Flavonas | Catequina | <i>Shigella, Vibrio, S. mutans,</i> |
| | Isoflavona | <i>Schistosoma</i> |
| Alcaloides | Coca | Cocos Gram positivos |
| | Piperina | Hongos, <i>Lactobacillus</i> |
| | Berberina | <i>Tripanosoma, Plasmodium</i> |

FUENTE: DOMINGO D., LOPEZ M.; Revista Esp Quimioterap; 2003

1.9 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PRODUCTOS VEGETALES

Los métodos para evaluar la actividad antibacteriana están clasificados, en tres grupos principales: Métodos de difusión, métodos de dilución y bioautografía, un cuarto método es el análisis conductimétrico, el cual detecta el crecimiento microbiano como un cambio en la conductividad eléctrica o impedancia del medio de cultivo.

En general se propone usar los métodos de difusión (en papel o en pozo) para estudiar compuestos polares, y los métodos de dilución para sustancias polares y no polares.

Los medios de cultivo más utilizados en dichas técnicas son el agar Mueller Hinton y agar tripticasa soya, ya que sus componentes facilitan el crecimiento de diferentes cepas bacterianas y mayor difusión de las muestras. Algunos investigadores utilizan el agar nutritivo. (31)

A. Método de dilución:

Este método se basa en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar).

Tradicionalmente este método se ha venido usando para la determinación de la CMI y la concentración mínima bactericida (CMB) de los antimicrobianos. En la mayoría de los casos se preparan diluciones del antimicrobiano en progresión geométrica en base 2 utilizando un medio de cultivo adecuado; posteriormente se inocula dicho medio y tras la correspondiente incubación para permitir el crecimiento del microorganismo se realiza la lectura, determinando qué concentración causa la inhibición del crecimiento del microorganismo. Si se realiza un subcultivo en medio sin antimicrobiano de los medios sembrados previamente puede determinarse también la actividad bactericida. (53)

B. Método de difusión en placa:

Se basa en la difusión radial de una solución de extracto o de antibiótico desde un reservorio a través de una capa de agar que ha sido inoculada con un microorganismo sensible al antibiótico. Se confrontan diferentes medidas de la sustancia a ensayar en placas con medios de cultivo sólido inoculado con microorganismos adecuados. Las placas se incuban para permitir el desarrollo del microorganismo. Durante la incubación, el antibiótico difunde desde su reservorio (que puede ser un disco de papel filtro, un pozo excavado en el mismo medio de cultivo con inóculo bacteriano, o pequeños cilindros colocados en la superficie del medio) mientras la población microbiana aumenta por división celular. La respuesta obtenida es una zona clara o halo de inhibición del crecimiento bacteriano en torno a los reservorios. El límite de la zona de inhibición se forma cuando se alcanza la concentración crítica del antibiótico, es decir, la mínima concentración que inhibe el crecimiento de la población microbiana presente.

Los halos de inhibición se miden con la mayor precisión posible: se utiliza regla, vernier ó un sistema de ampliación de imagen y proyección sobre una pantalla. La base cuantitativa del ensayo es la relación entre el diámetro de la zona de inhibición y la concentración del antibiótico. La determinación de sensibilidad por difusión en agar es habitualmente suficiente; sin embargo, en ciertas situaciones se recomienda la determinación del MIC por métodos turbidimétricos

El gradiente de concentración es inversamente proporcional a la distancia de la fuente y depende del volumen de la sustancia en ella, y el crecimiento de microorganismos depende de la población inicial y de la velocidad de crecimiento. (25)

C. Bioautografía

Este ensayo puede representar una herramienta útil para la purificación de sustancias antibacterianas, o como una técnica de tamizaje fitoquímico preliminar, o un fraccionamiento bio guiado, realizando el ensayo a través de cromatogramas, que permitan la localización de los compuestos activos, incluso en matrices complejas como los derivados de productos naturales. Se puede definir como una variación de los métodos de difusión en agar, donde el analito es absorbido dentro de una placa de cromatografía delgada TLC. El método consiste en colocar las muestras a evaluar en placas de TLC, seleccionar la fase móvil que de mejor separación, posteriormente esta placa es llevada y colocada en forma invertida sobre una caja de petri previamente inoculada con el microorganismo a evaluar, se deja de 8 a 12 horas en la nevera para facilitar la difusión de los extractos en el medio, luego se retira la placa y se lleva la caja a incubación según los requerimientos del microorganismo; luego se observa el halo de inhibición donde está el compuesto activo. Para visualizar mejor los resultados se puede utilizar alguna sal de tetrazolium.

Es importante tener en cuenta que solventes ácidos o demasiado alcalinos pueden permanecer en las placas de TLC, después del secado, inhibiendo el crecimiento bacteriano. (31)

1.9.1 Método de Mitscher para la determinación de la actividad antimicrobiana

DIA 1

A. Preparación de las muestras para el ensayo.

- Extractos Crudos.

Se pesa con precisión 10 a 20mg de extracto crudo, se disuelve en una cantidad apropiada de DMSO (ej. Para 20mg se usa 0.2mL). Para propósitos prácticos no es necesario preparar 20mg pues se dificulta pipetear 100µL.

Una porción de esta disolución 10000µg/100µL se pipetea 100µL en una caja Petri marcada. Todo este proceso se lo realiza asépticamente. Dejar las cajas a temperatura ambiente, o refrigeradas de ser necesario.

Cuando los extractos muestran actividad a este nivel, se lleva a cabo un nuevo experimento. Para este ensayo deben pesarse 20-30mg de extracto y se disuelve en un volumen apropiado de DMSO. Se pipetea 100µL de esta dilución en una caja Petri; el remanente de esta disolución (0.1mL) se diluye en DMSO, y se da origen a una segunda dilución 1000/100µL, de la cual se pipetea 100µL en otra caja Petri.

- Compuestos puros.

Se pesan 2.0mg muestra pura, se disuelven en 0.2mL DMSO. Se añade una porción de 0.1mL de esta disolución a una caja Petri Marcada. (Cada caja contendrá 1000µg de muestra). La porción remanente de esta disolución se diluye con un volumen igual de DMSO (generalmente 0.1mL + 0.1mL= 0.2mL). Una porción de 0.1mL (100µL) de esta disolución se añade a una caja Petri vacía y marcada. Esta caja contendrá 500ug de muestra. La porción restante de la solución antes preparada se diluye con un volumen igual de DMSO. Una porción de esta disolución se añade a una caja Petri. Esta caja contendrá 250µg de muestra.

De la misma manera se preparan cajas que contendrán 125, 62.5, 31.25 y 15.6 μ g de muestra continuándose las diluciones hasta que no haya inhibición.

- **Preparación stock de sulfato de estreptomicina.**

Como patrón, se pesan cuidadosamente 100mg de sulfato de estreptomicina, se disuelven en 10mL de agua destilada estéril.

Esta disolución contiene 1000 μ g/100 μ L (1mg/0.1mL). Una porción de esta disolución se añade asepticamente a una caja Petri marcada. Una porción ,200 μ L; de la misma disolución stock se pipetea bajo condiciones estériles en un vial que contiene 200 μ L de agua destilada estéril (concentración resultante 500 μ g/mL), se transfieren 200 μ L de esta dilución a otro vial que contiene 200 μ L de agua estéril (concentración resultante 250 μ g/mL). Las diluciones se continúan hasta conseguir una de 15,625 μ g/L; de cada vial se toma 100 μ L y se adiciona en una caja Petri individualmente.

B. Preparación de los medios.

- **Trypticase Soy Agar (TSA)**

Se disuelven 40g de TSA en un litro agua destilada. Calentar hasta que la solución esté clara. Transferir a tubos con tapa (10mL/tubo) y a erlenmeyer, esterilizar en autoclave por 15minutos a 121°C.

- **Tryptic Soy Broth (TSB)**

Disolver 30g TSB en un litro agua destilada. Disolver completamente. Calentar hasta que la solución esté clara. Transferir 10mL de TSB con una jeringuilla a los erlenmeyer individuales de 25mL. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Nota: Se puede emplear el medio Mueller-Hinton a cambio de los medios anteriores.

- Preparación de la disolución salina.

Se prepara disolución salina al 0.9%. Se esteriliza en autoclave a 121°C por 15 minutos. Tapar adecuadamente y conservar a temperatura ambiente.

C. Preparación de las suspensiones de microorganismos.

Se inoculan 10mL de TSB, con una o dos asadas de los microorganismos. Estas suspensiones de microorganismos en TSB, se incuban a 37°C por 24 horas.

D. Preparación de las cajas.

Después de que se esteriliza, el agar se deja enfriar aproximadamente a 55°C. Asépticamente, se añaden 10mL de agar a cada caja Petri. Luego se agita suavemente la muestra para homogenizar lo más posible. Una vez solidificados los medios se dan vuelta las cajas y conservan a temperatura ambiente toda la noche.

E. Preparación de los tubos inclinados de los microorganismos. (Slants)

Después de la preparación del TSA, se llenan 21 tubos con 10mL de agar. Se esterilizan en autoclave 121°C por 15 minutos. Los tubos se inclinan sobre algún soporte hasta que se solidifiquen.

DIA 2.

A. Preparación de las suspensiones de los microorganismos.

Todos los erlenmeyers con los microorganismos para el ensayo deben estar visiblemente turbios. A continuación se realizan suspensiones en 10mL de solución salina de la siguiente forma:

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 100µL susp/ 10mL sol. Salina

- | | |
|---|------------------------------|
| 2. <i>Escherichia coli</i> ATCC 9637 | 100µL susp/ 10mL sol. Salina |
| 3. <i>Salmonella gallinarum</i> ATCC 9184 | 100µL susp/ 10mL sol. Salina |
| 4. <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031 | 100µL susp/ 10mL sol. Salina |
| 5. <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 | 1mL susp/ 10mL sol. Salina |
| 6. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | 100µL susp/ 10mL sol. Salina |

B. Rayado de microorganismos

En la superficie de las cajas Petri preparadas el Día 1, las mismas que deben estar sin contaminación visible, se marca con una línea que representa al microorganismo #1 que posteriormente será rayado.

Con un asa de Henle estéril para cada aplicación, se toma cada microorganismo en su turno. El asa con el microorganismo es entonces rayado en un patrón radial de cada caja Petri, siguiendo la plantilla. Agitar las suspensiones de microorganismo para evitar sedimentación.

El rayado es más seguro si se lleva a cabo desde la región cercana al límite de la caja hacia el punto cerca de la zona clara del centro de la caja. El trazado no debe llegar exactamente al centro de la caja pues hay peligro de contaminación cruzada por pasar sobre una línea de microorganismos previamente rayada. Una vez sembradas en todas las cajas, incubarlas a 37°C por 48 horas boca abajo, para evitar que las gotas de agua condensadas puedan caer sobre los microorganismos y dispersen su crecimiento.

Se prepara y marca una caja Petri con TSA puro y estéril, luego se realiza el ensayo con el resto de las cajas. Esta caja se prepara con el fin de determinar si el rayado de los microorganismos ha sido realizado correctamente. Este es el control negativo.

Cada ensayo debe tener un control positivo (series de sulfato de estreptomicina). Las cajas de control deben tener la apariencia esperada (crecimiento en todas las líneas en la caja de control negativo y la potencia apropiada en las cepas de control positivo de sulfato de estreptomicina), de no ser así el experimento ha fallado y debe ser repetido.

C. Inoculación de los tubos inclinados.

Para la inoculación se necesitan cultivos frescos de microorganismos. Con un asa de inoculación estéril se transfiere una asada de microorganismos a cada tubo inclinado. Cada microorganismo se aplica en tres tubos diferentes. La asada de inoculación se lo realiza por la superficie del agar, en forma de zigzag, para incrementar el área de crecimiento de los microorganismos, comenzando desde el fondo hacia arriba.

Los tubos se marcan con cuidado y se incuban a 37°C por 24 horas.

DIA 3 y 4.

Se sacan las cajas de la incubadora y se examinan al día 3. Si todos los cultivos crecieron, el examen es válido. Si alguno no creció se debe reincubar y leer al día 4.

Hay actividad antibiótica cuando no hay crecimiento visible en las cajas rayadas. La concentración inhibitoria mínima (CMI) es la menor concentración de las diluciones en la cual no hay crecimiento del microorganismo.

Si el microorganismo es morfológicamente alterado, o si no crece bien, la caja puede ser reportada como P (actividad parcial)

La presencia de pocas colonias en una raya es señal de resistencia.

La presencia de pocas colonias aisladas en la caja, lejos de las líneas rayadas, es señal de contaminación y se pueden generalmente ignorar. (7)(34)(35)

1.10 DESCRIPCIÓN DE LAS BACTERIAS EN ESTUDIO

1.10.1 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Staphylococcus aureus se destaca como un importante patógeno humano, produce infecciones tanto en la comunidad como a nivel hospitalario. En la comunidad, las infecciones por *S. aureus* son a menudo agudas, piogénicas y superficiales, aunque también puede producir, con menor frecuencia, infecciones profundas como osteomielitis, neumonía y endocarditis aguda. A nivel nosocomial *S. aureus* es un importante agente de infecciones de herida quirúrgica, de prótesis y otras. Es causa de una serie de infecciones producidas por toxinas como el síndrome del shock tóxico, la intoxicación alimentaria y el síndrome de piel escaldada (49)

1.10.1.1 Taxonomía

TABLA N°2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Staphylococcus aureus*

| Categoría Taxonómica | Clasificación Científica |
|----------------------|--------------------------|
| Dominio | Bacteria |
| Reino | Prokaryotae |
| División | Firmicutes |
| Clase | Bacilis |
| Orden | Bacillales |
| Familia | Micrococcaceae |
| Género | <i>Staphylococcus</i> |
| Especie | <i>aureus</i> |

FUENTE: Jawetz, Melnick y Adelberg. 2002

1.10.1.2 Morfología

Cocos Gram positivos que poseen tendencia a agruparse en racimos, pero también pueden observarse aislados, en parejas, en cadenas cortas o en tétradas. Tienen una forma

esférica y un diámetro de alrededor de 0,5 a 1 micra, inmóviles, normalmente acapsulados, no forman esporas. (3) (49)

1.10.1.3 Crecimiento

Los estafilococos crecen eficazmente patógenas bajo condiciones aeróbicas en la mayoría de los medios bacteriológicos usuales de extracto de carne y peptona, pero lo hacen de manera más profusa en agar sangre que se usa por lo común para aislar formas. Estos crecen rápidamente a 37°C, pero tienden a formar pigmentos mejor a temperatura ambiente (20°C). Las colonias en medio sólido son redondeadas, uniformes, sobresalientes y resplandecientes. Pueden formar varios tipos de pigmentos: *Staphylococcus aureus* presenta un color amarillo oro intenso. (5)

1.10.1.4 Patogenia

S. aureus es un patógeno piógeno conocido por su capacidad de formar abscesos en los focos de infección tanto locales como metastásicos. Esta respuesta patológica clásica a *S. aureus* define el marco dentro del que evolucionará la infección. Las bacterias de este tipo desencadenan una reacción inflamatoria que se caracteriza al principio por una respuesta intensa de leucocitos polimorfonucleares (PMN) y una infiltración ulterior de macrófagos y fibroblastos. Si la respuesta celular del hospedador (incluido el depósito de fibrina y colágena) no frena la infección, ésta se propaga a los tejidos vecinos o al torrente circulatorio.

Generalmente la adquisición puede ser exógena o endógena. La transmisión exógena puede llevarse a cabo a través de la contaminación de tejido traumatizado (heridas o quemaduras); a través de la introducción al tejido de material médico contaminado y la ingestión de alimentos o leche contaminados.

Por otro lado infección endógena se trata de la entrada de microorganismos desde la piel, a través de fracturas, heridas o cuerpos extraños desde un lugar en donde el microorganismo es comensal. La infección se ve favorecida en cualquier caso, si el

paciente es inmunodeprimido, tiene diabetes, malnutrición o cursa una terapia antibiótica de amplio espectro. (14) (17)

1.10.1.5 Características bioquímicas

- Agar sales y manitol positivo (color amarillo).
- Prueba de coagulasa positivo.
- Sensibilidad a vancomicina positivo.
- Pigmentación amarilla en agar.
- DNAasa positiva.
- Catalasa positiva
- Fosfatasa positiva
- Reducción Nitrito a Nitrato positivo (3)

1.10.1.6 Características generales de cultivo de *S. aureus*

En medios no selectivos, *S. aureus* presenta colonias de 1 a 3mm de diámetro, lisas, levemente elevadas, de bordes enteros, levemente convexas y generalmente pigmentadas con un color que puede ir desde blanco cremoso hasta al amarillo. La producción de pigmento se ve favorecida si se incuban los cultivos por 24 a 48 horas adicionales a temperatura ambiente. Cuando crecen en agar sangre ovina se puede observar una zona de β -hemólisis alrededor de las colonias. (49)

1.10.2 *Escherichia coli* ATCC 9637

Es una bacteria común que vive en los intestinos de animales y humanos. Existen muchas cepas de *E. coli*, inofensivas en su mayoría, aunque *E. coli* 0157: H7 produce una potente toxina (Shiga) que puede ocasionar enfermedades graves como el Síndrome Urémico Hemolítico, que puede acabar en fallo renal. (45)

1.10.2.1 Taxonomía

TABLA N°3. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Escherichia coli*

| Categoría Taxonómica | Clasificación Científica |
|----------------------|--------------------------|
| Dominio | Bacteria |
| Reino | Procariota |
| Filo | Proteobacteria |
| Clase | Gammaproteobacteria |
| Orden | Enterobacterales |
| Familia | Enterobacteriaceae |
| Género | <i>Escherichia</i> |
| Especie | <i>coli</i> |

FUENTE: <http://blog.ciencias-medicas.com/archives/1373>

1.10.2.2 Morfología

Bacterias Gram-negativas, bacilos de 1 a 3µm por 0,5µm, sus formas varían desde cocos a pequeños bastoncillos, que se presentan solos, en pares, en cortas cadenas o agrupados; móviles por flagelos peritricos aunque existen variantes móviles no flageladas. No forman esporas. (45)

1.10.2.3 Crecimiento

La temperatura óptima de crecimiento es de hasta 42°C. De acuerdo con sus requerimientos de oxígeno son aeróbicas o anaeróbicas facultativas. Los requerimientos de nutrientes en el metabolismo no son altamente exigentes y crecen de manera muy similar, cualquiera de sus especies, en la mayoría de los medios que se utilizan. (15)

1.10.2.4 Patogenia

E. coli es la especie bacteriana más comúnmente recuperada en los laboratorios clínicos y ha sido incriminada en enfermedades infecciosas que involucran virtualmente todos los

tejidos humanos y sistemas de órganos. *E. coli* es uno de los organismos comunes involucrados en sepsis Gram negativa y shock inducido por endotoxinas. Las infecciones del tracto urinario y de las heridas, la neumonía en pacientes hospitalizados inmunosuprimidos y las meningitis en los neonatos son otras formas comunes de infección causada por *E. coli*.

La *Escherichia coli* puede causar infecciones intestinales y extraintestinales graves, tales como: infecciones del aparato excretor, cistitis, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía Gram-negativa.

Las infecciones intestinales están limitadas a las producidas por las seis clases de *E. coli* que en la actualidad se consideran como patógenas entéricas.

TABLA N°4. MECANISMOS PATOGENICOS DE LOS TIPOS DE *E. coli*

| TIPO DE <i>E. coli</i> | EPIDEMIOLOGÍA | MECANISMO PATOGENICO |
|-------------------------------|--|--|
| Enterohemorrágica | Colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico en todas las edades y síndrome postdiarreico en los adultos. | Adherencia y borramiento. Producción de citotoxinas |
| Enteropatogénica | Diarrea aguda o crónica, endémica o epidémica en los lactantes | Adherencia y borramiento |
| Enteroinvasivas | Diarrea con fiebre a todas las edades | Adherencia, invasión de las mucosas e inflamación |
| Entorotoxigénica | Diarreas de los lactantes en los países subdesarrollados y diarreas de los viajeros a todas las edades | Adherencia y producción de endotoxinas |
| Enterogregativa | Diarrea aguda o crónica en los lactantes | Adherencia, daño de la mucosa |

Fuente: <http://blog.ciencias-medicas.com/archives/1373>

1.10.2.5 Características bioquímicas

| | |
|---------------------------|-------------|
| - Glucosa | Positivo |
| - Gas/glucosa | Positivo |
| - Lactosa | Positivo |
| - SH ₂ | Negativo |
| - Citrato | Negativo |
| - Fenilalanina desaminasa | Negativo |
| - Indol | Positivo |
| - Lisina descarboxilasa | Positivo |
| - Manitol | Positivo |
| - Ureasa | Negativo(2) |

1.10.2.6 Características generales de cultivo

En los medios sólidos se observan colonias relativamente grandes, de color grisáceo, en agar sangre se presentan colonias de aspecto grande con un brillo metálico de color verdoso, con olor característico y fuerte, de aspecto húmedo y de bordes definidos. (15)

1.10.3 *Salmonella gallinarum* ATCC 9184

1.10.3.1 Taxonomía

TABLA N°5. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Salmonella gallinarum*

| Categoría Taxonómica | Clasificación Científica |
|----------------------|--------------------------|
| Familia | Enterobacteriaceae |
| Género | <i>Salmonella</i> |
| Especie | <i>gallinarum</i> |

FUENTE: <http://blog.ciencias-medicas.com/archives/1373>

1.10.3.2 Morfología

Bacilos, generalmente móviles por flagelos peritricos, puede haber mutaciones no móviles. De forma bacilar de 1 a 3µm por 0,6µm; se presentan solos o en pares, no forman esporas ni cápsulas. (19)

1.10.3.3 Patogenia

Salmonella gallinarum, puede ser transportada por cualquier animal, ave doméstica o algunos vertebrados de sangre caliente y sangre fría. Muchos de los brotes que se dan en los humanos provienen de reservorios de tortugas caseras, polluelos, patos, gallinas, ganado y otros animales domésticos. (19)

1.10.3.4 Características bioquímicas

| | |
|---------------------------|--------------|
| - Glucosa | Positivo |
| - Gas/glucosa | Positivo |
| - Lactosa | Negativo |
| - SH ₂ | Positivo |
| - Citrato | Positivo |
| - Fenilalanina desaminasa | Negativo |
| - Indol | Negativo |
| - Lisina descarboxilasa | Positivo |
| - Manitol | Positivo |
| - Movilidad | Positivo |
| - Ureasa | Negativo (2) |

1.10.4 *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031

1.10.4.1 Taxonomía

TABLA N°6. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Klebsiella pneumoniae*

| Categoría taxonómica | Clasificación científica |
|----------------------|--------------------------|
| Orden | Eubacteriales |
| Familia | Enterobacteriaceae |
| Género | <i>Klebsiella</i> |
| Especie | <i>pneumoniae</i> |

FUENTE: PELZCAR, Michael. 1984

1.10.4.2 Morfología

Son bacilos Gram negativos, no móviles, con cápsula, de 0,3-1,5µm por 0,6-6,0µm, dispuestos aislados, en parejas o en cadenas cortas. (19)

1.10.4.3 Crecimiento

Crecen en medios con extracto de carne produciendo colonias en forma de cápsula, colonias deslizantes, de diverso grado de pegajosidad. No tienen especiales requerimientos para crecer y la mayoría de las cepas pueden utilizar glucosa y citrato como únicas fuentes de carbono, y amoníaco como única fuente de nitrógeno. La temperatura óptima para el crecimiento es de 35-37°C. (19)

1.10.4.4 Patogenia

Es el agente etiológico de un 3% de las neumonías de origen bacteriano. Es causa común de la neumonía lobar adquirida en la comunidad, particularmente frecuente en individuos alcohólicos, diabéticos y en pacientes con EPOC, responsable también de cuadros como bronconeumonía y bronquitis.

1.10.4.5 Características bioquímicas

| | |
|---------------------------|--------------|
| - Glucosa | Positivo |
| - Gas/glucosa | Positivo |
| - Lactosa | Positivo |
| - SH ₂ | Negativo |
| - Citrato | Positivo |
| - Fenilalanina desaminasa | Negativo |
| - Indol | Negativo |
| - Lisina descarboxilasa | Positivo |
| - Manitol | Positivo |
| - Movilidad | Negativo |
| - Ureasa | Positivo (2) |

1.10.5 *Candida albicans* ATCC 10231

1.10.5.1 Taxonomía

TABLA N°7. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Candida albicans*

| Categoría taxonómica | Clasificación científica |
|----------------------|--------------------------|
| Reino | Hongo |
| División | Deuteromycota |
| Clase | Blastomycetes |
| Familia | Cryptococcaceae |
| Género | <i>Candida</i> |
| Especie | <i>albicans</i> |

FUENTE: Jawetz, Melnick y Adelberg. 2002

1.10.5.2 Morfología

Hongo dimorfo que forma largas pseudohifas, hifas y blastoconidios (células gemantes subesféricas de 3-8 x 2-7 μm). Asimilan y fermentan azúcares. Numerosas clamidosporas unicelulares, redondas u ovaladas, con gruesa pared refringente (8-16 μm de diámetro), situadas al final de las hifas, pseudohifas o laterales sobre blastoconidios ovalados.

Colonias de crecimiento rápido, circulares, lisas, blancas o cremosas, pastosas y blandas, de bordes precisos, centro ligeramente prominente, con olor a levadura. (42)

1.10.5.3 Crecimiento

Las especies de *Candida* crecen bien en medios de cultivo con agar, peptona, dextrosa, maltosa o sacarosa. Las colonias muy pequeñas aparecen en un lapso de 24 a 36 horas en Agar Sabouraud y miden de 1,5 a 2 mm. de diámetro después de 5 a 7 días. Las colonias son típicamente blancas por completo, pero adquieren un color crema o requemado al continuar envejeciendo.

Las colonias de *Candida* crecen “in vitro” en condiciones de aerobiosis en medios de cultivo a pH con rango entre 2,5 y 7,5 y temperatura que oscila entre 20°C y 38°C. El crecimiento de colonias se puede detectar entre 48 y 72 horas después de la siembra.

La habilidad de las levaduras de crecer a 37°C es una característica importante a ser considerada en su identificación a partir de muestras clínicas. Las levaduras más virulentas crecen rápidamente a temperaturas que oscilan entre 25°C y 37°C, mientras que las poco virulentas dejan de crecer a 37°C. (18)

1.10.5.4 Patogenia

Candida albicans puede producir infecciones superficiales que afectan a piel, uñas y mucosas. La piel húmeda y las mucosas oral y vaginal son lugares donde la infección candidiásica es frecuente. Sin embargo, las candidiasis más graves se observan en

personas inmunosuprimidas o con enfermedades subyacentes que predisponen a sufrir esta infección. Durante el embarazo, la vejez o la infancia son frecuentes las candidiasis superficiales y lo mismo sucede en personas portadoras de prótesis dentales y en diabéticos.

Candida albicans es la especie más patógena y su virulencia se debe a un conjunto de atributos relacionados con su habilidad para evadir a los mecanismos de defensa del hospedador, de resistir al tratamiento antifúngico, o de lesionar las células y tejidos que invade. Los factores de virulencia están controlados por diferentes genes que se expresan en un número determinado y momento concreto y que determinan el fenotipo y virulencia de cada aislamiento. (42)

1.10.5.5 Características bioquímicas

| | |
|-------------|------------------|
| - Maltosa | Positivo |
| - Sacarosa | Positivo |
| - Trehalosa | Positivo |
| - Galactosa | Positivo |
| - Celobiosa | Negativo |
| - Xilosa | Positivo |
| - Rafinosa | Negativo |
| - Lactosa | Negativo |
| - Dulcitol | Negativo |
| - Melibiosa | Negativo |
| - Ureasa | Negativo (2)(10) |

1.10.5.6 Características generales de cultivo de *Candida albicans*

En Agar Sabouraud o en otros medios de cultivo similares, las colonias que crecen son lisas, suaves, húmedas y de color y aspecto cremoso. Estas colonias tienen un tamaño que oscila entre 1,5 y 2 mm. de diámetro, con aspecto de levadura, de consistencia blanda y

rápida y proyectan filamentos hasta la profundidad del agar. Después de 4-5 días se percibe un olor característico de levadura. Otros medios de cultivo en los cuales puede crecer *C. albicans* son: Pagano-Levin, en el cual las colonias se observan de color crema, Albicans ID (Biomérieux), donde las colonias se observan de color azul y CHROMagar® Candida (CHROMagar), observándose las colonias de esta especie de color verde. (18)

1.10.6 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Es la especie más importante y la que con mayor frecuencia produce infecciones en el hombre (muchas de ellas graves). Más de la mitad de los aislamientos clínicos producen piocianina, un pigmento que confiere un color azul-verdoso al medio de cultivo. Tienen un olor dulzón debido a la producción de 2-aminocetofenona y en ocasiones las colonias presentan un brillo metálico. Muestra una especial predilección por los ambientes húmedos (equipos respiratorios, desinfectantes, las piscinas de fisioterapia.). La mayoría de las infecciones que produce son hospitalarias, y en pacientes inmunodeprimidos o con alteraciones de las barreras normales -piel y mucosas- (quemaduras / cirugía / cateterismo / intubación). (56)

1.10.6.1 Taxonomía

TABLA N°8. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Pseudomonas aeruginosa*

| Categoría taxonómica | Clasificación científica |
|----------------------|--------------------------|
| Reino | Bacteria |
| Filo | Proteobacteria |
| Clase | Gamma Proteobacteria |
| Orden | Pseudomonadales |
| Familia | Pseudomonadaceae |
| Género | <i>Pseudomonas</i> |
| Especie | <i>aeruginosa</i> |

FUENTE: Jawetz, Melnick y Adelberg. 2002

1.10.6.2 Morfología

Células aisladas, rectas o curvadas, bacilares pero no helicoidales. Dimensiones de 0,5 a 1 µm por 1,5 a 4 µm. móviles por flagelos polares, monótricos o multítricos. No producen vainas ni prostecas. No se conocen etapas de reposo. Gram negativos, quimioorganotrofos y aerobios estrictos. (19)

1.10.6.3 Patogenia

Tiene como hábitat el agua. Produce enfermedad por sus propiedades invasivas y toxigénicas, ya que puede producir una exotoxina termolábil. Es muy resistente a los antibióticos. Presentan una gran susceptibilidad a las infecciones por este microorganismo los lactantes y prematuros, pacientes quemados, y los que han sufrido intervenciones quirúrgicas o diagnósticas. La *P. aeruginosa* causa infecciones de heridas (donde origina un pus verde - azulado de donde proviene su nombre común bacilo piocianico), meningitis, septicemia, infecciones urinarias, neumonía, otitis, conjuntivitis, entre otras. (10)

1.10.6.4 Características bioquímicas

TABLA N°9. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE *P. aeruginosa*

| | |
|--|--------------------|
| Piocianina | Positivo |
| Pioverdina | Positivo |
| Desarrollo o crecimiento a 42°C | Positivo |
| O-F glucosa | Oxidativo o inerte |
| oxidasa | Positivo |
| Movilidad | Positivo |
| Arginina dehidrolasa | Positivo |
| Hidrólisis de la gelatina | Positivo |
| Ureasa | Variante |
| Reducción de nitrato (NO₃) | Positivo |

| | |
|----------------------|------------|
| Gluconato | Positivo |
| Manitol | Variante |
| Indol | Negativo |
| Citrato | Positivo |
| catalasa | Positiva |
| Kanamicina | Resistente |
| Carbenicilina | Sensible |

FUENTE: ELMER W. et. al. 2001

1.10.6.5 Características generales de cultivo de *P. aeruginosa*

En caldo simple se desarrolla en exceso, forma una fuerte turbiedad, anillo y película, forma un denso agrado que parece polvo de tiza fácilmente desintegrable, es característico un olor intenso debido a la trimetil-amina, el medio se torna de color verdeazulado.

En agar simple, las colonias son grandes redondas, brillantes, de borde continuo u ondulado, grisáceas con el centro opaco y periferia traslucida, pH 6.8 a 7.2, la colonia no toma color por el pigmento elaborado, este se difunde al medio proporcionándole una tonalidad verdosa fluorescente en los primeros días, y posteriormente parda. (9)

CAPÍTULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. LUGAR Y PRUEBAS DE ENSAYO

La presente investigación se desarrolló en:

- Laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2. RECURSOS MATERIALES

2.2.1. MATERIAL VEGETAL

Frutos de Cepillo (*Callistemon speciosus*), que se recolectaron en la avenida de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, la misma que se halla a una altura de 2754msnm.

Espino chivo (*Duranta triacanta Juss*), vegetal que se consiguió en el sector de la colina de Lluishi del cantón Guano, ubicada a 8Km de la ciudad de Riobamba a una altura de 2360msnm.

Tzinso (*Tagetes minuta L.*), recogido en la comunidad Tutupala, perteneciente a la parroquia San Isidro del cantón Guano, ubicada a 16Km de la ciudad de Riobamba y con una altura de 2390msnm.

2.2.2. MATERIAL BIOLÓGICO

Para la determinación de la actividad biológica se utilizó los siguientes microorganismos tipificados por la ATCC:

Staphylococcus aureus ATCC 6538

Escherichia coli ATCC 9637

Salmonella gallinarum ATCC 9184

Klebsiella pneumoniae ATCC 10031

Candida albicans ATCC 10231

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

2.2.3. EQUIPOS

- Molino manual
- Balanza (BOECO)
- Rotavapor (HEIDOLPH TYPE HEIZBAD HEI-VAP)
- Bomba de presión
- Refrigeradora (ECASA)
- Congelador (ECASA)
- Autoclave (PELTON Y CRANE)
- Vortex (LW Scientific)
- Ultrasonido (BRANSON)
- Baño María (MLW)
- Estufa bacteriológica (FANEM)
- Estufa de secado MEMMERT
- Reverbero eléctrico (HACEB)
- Cámara digital
- Computadora

2.2.4. MATERIALES DE LABORATORIO

- Frascos ámbar
- Probeta de 500mL
- Probeta de 100mL
- Embudos
- Algodón
- Pipetas de 10ml
- Pipetas de 5mL
- Pipetas de 1mL
- Tubos de ensayo
- Gradillas
- Embudos de separación con tapa
- Trípodes
- Balones de destilación de 250mL
- Balones de destilación de 100mL
- Cápsulas
- Desecador
- Guantes
- Mascarillas
- Gorros
- Zapatones
- Mecheros de alcohol
- Pipeta Graduada de 10 μ L
- Pipeta Graduada de 50 μ L
- Pipeta Graduada de 100 μ L
- Pipeta Graduada de 500 μ L
- Pipeta Graduada de 1000 μ L
- Puntas amarillas y azules
- Termómetro

- Aplicadores estériles
- Erlenmeyers de 125mL
- Cajas petri descartables
- Asa de platino
- Tubos de ensayo 100x13 con tapa
- Tubos de ensayo 100x7.5
- Viales
- Cinta testigo
- Gasas
- Papel aluminio
- Parafilm
- Cinta adhesiva
- Fundas de tela
- Fundas plásticas (transparentes, rojas y negras)

2.2.5. REACTIVOS

- Agua destilada
- Alcohol potable
- Reactivos para el tamizaje fitoquímico
- Éter
- Cloroformo
- DMSO
- Cloruro de sodio al 0,85%
- Sulfato de estreptomicina
- Reactivo de urea al 20%
- Reactivo de Ehrlich

2.2.6. MEDIOS DE CULTIVO

- Caldo Soya Trípica MERCK

- Agar Base Sangre MERCK
- Agar Eosina Azul de Metileno MERCK
- Agar Sabouraud MERCK
- Agar Soya Tríptica MERCK
- Agar Manitol MERCK
- Agar Mueller Hinton MERCK
- Agar Kligler MERCK
- Agar SIM MERCK
- Agar Christensen MERCK
- Agar citratato de Simmons MERCK

2.3. FACTORES DE ESTUDIO

Los factores de estudio de esta investigación fueron:

- Elaboración de los extractos etanólicos y subextractos etéreos y clorofórmicos de *Duranta triacanta* Juss, *Callistemon speciosus* y *Tagetes minuta*.
- Identificación de los grupos fitoquímicos de los extractos etanólicos.
- Determinación *in vitro* de la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos y sus correspondientes subextractos, etéreos y clorofórmicos, sobre microorganismos ATCC como: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella gallinarum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*.

2.4. METODOLOGÍA

2.4.1. RECOLECCIÓN

Los frutos de Cepillo (*Callistemon speciosus*) fueron recolectadas en la avenida de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, el 05 de junio de 2012, teniendo en cuenta de que éstas debían tener el color característico gris marrón, ser globosas, poseer un tamaño considerable, con diminutas semillas en su interior y estar buen estado.

En el caso del Espino chivo (*Duranta triacantha Juss*), fue necesario dirigirse a la colina Lluishi del cantón Guano, donde se recogió la planta en base al criterio de que debe estar en flor (violetas), con frutos de ser posible maduros, hojas verdes y espinas de tamaño normal. Esta recolección se la realizó el 06 de junio de 2012.

El Tzinso (*Tagetes minuta L.*) se obtuvo en los sembríos de maíz de la comunidad Tutupala de la parroquia San Isidro del cantón Guano, la misma que debía tener flores blancas, hojas verdes, y todas las partes de la planta en perfectas condiciones. Este vegetal fue recolectado el 06 de junio de 2012.

2.4.2. COMPROBACIÓN TAXONÓMICA E IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA

Se tomaron muestras de los vegetales estudiados, las mismas que incluyeron tallos con ramas, hojas, flores, frutos y semillas, luego de prensar las mismas, fueron llevada al herbario de la ESPOCH, dirigido por el Ing. Jorge Caranqui, quien certificó los ejemplares.

2.4.3. PROCESAMIENTO DE MATERIA PRIMA: LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

- Una vez recolectados los vegetales se procedió a separar las partes secas y a eliminar el polvo que se hallaba en los mismos.
- Se sumergió, por separado, cada uno de los vegetales en un recipiente que contiene agua con hipoclorito de sodio a 10ppm y dejándolo en esta solución por 5 minutos.
- Culminado ese tiempo se los retiraron y lavaron con abundante agua hasta eliminar todo el cloro que pudo haberse adherido a las plantas.
- Se colocó sobre papel para escurrir, y así conseguir que se secaran completamente.
- Ya seco el material vegetal, se pasó a la etapa de trituración, en el caso del Espino chivo y el Tzinso, se cortó muy finamente todas las partes de la planta con tijeras, para el Cepillo primero se tostó las semillas para luego molerlas en un molino manual.

2.4.4. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO

Para la obtención de los extractos etanólicos del Espino chivo (*Duranta triacanta Juss*) y el Tzinso (*Tagetes minuta L.*) se utilizó toda la planta excepto la raíz, y en el caso del Cepillo (*Callistemon speciosus*) únicamente las semillas; aplicando el siguiente procedimiento.

2.4.4.1. Procedimiento

1. Se pesó la planta seca y triturada y se la colocó dentro de un recipiente ámbar de vidrio con tapa, seguidamente se humedeció el contenido con etanol al 96%, empleando 3mL por cada 1g de material vegetal. Se agitó para conseguir que se mezclaran correctamente; y se dejó macerar de 3-4 días.
2. Al término de los 3-4 días, utilizando un embudo y algodón para cubrir el orificio de salida del mismo, se filtró todo el material líquido resultado de la maceración, recibiendo éste en un recipiente limpio, seco y oscuro; de esta manera se eliminó las impurezas que pudo contener el extracto.
3. El líquido filtrado se trasvasó a un balón esmerilado para iniciar el proceso de concentración en el rotavapor a una temperatura no mayor a 50°C y a 200rpm, hasta la completa eliminación del etanol.
4. Se recogió la porción restante del balón (extracto concentrado), y se envasó en un recipiente limpio, seco y oscuro, dejándolo en refrigeración por 24 horas para conseguir la decantación de las clorofilas.
5. Transcurridas las 24 horas, se procedió a separar las clorofilas filtrando con algodón, recogiendo así el extracto puro y libre de clorofilas. Se tapó herméticamente y se almacenó en refrigeración a 4°C.

2.4.5. OBTENCIÓN DE LOS SUBEXTRACTOS CLOROFÓRMICOS Y ETÉREOS

Dentro de esta investigación también se incluye la determinación de la actividad antimicrobiana de los subextractos clorofórmicos y etéreos de cada una de las plantas estudiadas, los mismos que se obtuvieron de la siguiente manera:

- En un embudo de separación con tapa se colocó 50mL de extracto y se añadió otros 50 de éter. Se agitó suavemente y se dejó en reposo para su separación en dos fases, una etérea (superior) y otra etanólica (inferior).
- Se separó la porción etérea en un balón esmerilado seco y pesado.
- A la porción etanólica se volvió a añadir otros 50mL de éter repitiendo el procedimiento ya detallado, hasta que la fase etérea ya no presentaba turbidez ni coloración.
- De igual forma se realizó con el cloroformo, en el mismo embudo de separación, a la porción etanólica restante se añadió 50mL de cloroformo, se agitó despacio con giro del embudo y se dejó reposar para su separación en dos fases: una clorofórmica (inferior) y una etanólica (superior).
- Se separaron las fases, colocando la clorofórmica en un balón esmerilado seco y pesado.
- Se volvió a añadir 50mL de cloroformo a la parte etanólica hasta su completa extracción.
- La fase etanólica, constituye el extracto etanólico final, el mismo que se lo colocó en un recipiente oscuro y tapado herméticamente para su conservación en refrigeración.
- Se concentraron en rotavapor los subextractos, a una temperatura no mayor a 50°C, hasta la completa eliminación del éter y el cloroformo.
- Si los subextractos resultaban líquidos o semilíquidos, se los envasó en recipientes adecuados para su conservación, pero si éstos eran sólidos se los mantenía en el mismo balón pero protegido de la luz y completamente cerrados.
- Se conservó en refrigeración.

2.4.6 MÉTODOS GENERALES PARA EL ANÁLISIS DEL EXTRACTO

2.4.6.1 Determinación de los requisitos organolépticos

A. Determinación de olor

Se introdujo un extremo de una tira de papel filtro de 1x10cm en el extracto, se percibió y determinó el olor que éste poseía.

B. Determinación del color

En un tubo de ensayo se colocó extracto hasta cubrir la base del mismo y se observó el color.

C. Determinación del aspecto

En un tubo de ensayo se colocó una alícuota de extracto y a contra luz se determinó el aspecto del mismo, su transparencia y la presencia de partículas o de fases.

2.4.6.2 Determinación de los requisitos físicos

A. Determinación de la densidad relativa

Se pesó el picnómetro vacío y seco, posterior se lo llenó con la porción de ensayo hasta el nivel indicado y se tapó, con una tira de papel se extrajo el exceso y se secó exteriormente el picnómetro. Luego se pesó cuidadosamente el picnómetro con la porción de ensayo.

En los resultados la densidad relativa se calculó con la siguiente fórmula:

$$\delta = \frac{P2-P1}{VP}$$

Donde:

P1: peso del picnómetro vacío (g)

P2: peso del picnómetro con muestra (g)

VP: volumen del picnómetro (mL)

B. Determinación del índice de refracción

Para ajustar el equipo, se colocó sobre el prisma de medición una gota de agua destilada, utilizando para ello una varilla de vidrio que no tenga cantos agudos, y se seleccionó la zona del espectro visible que aparece en la línea límite del campo visual, moviendo el compensador cromático y colocando la intersección del retículo sobre la línea límite de los campos claro y oscuro.

Se colocó una gota de la muestra de ensayo sobre el prisma de medición, se cerró el termo prisma y se enfocó la luz por medio del espejo, de modo tal que la misma incidió sobre la apertura de entrada del prisma de medición, y se procedió igual que con el agua.

C. Determinación del pH

Se ajustó el equipo con la solución reguladora de pH adecuada al rango en que se realizó la determinación del valor del pH de la muestra. Se introdujo directamente los detectores del pH-metro en la muestra y se realiza la lectura.

2.4.6.3 Análisis fisicoquímico cualitativo

A. Ensayo de la espuma

Este ensayo permite determinar la presencia de saponinas tanto esteroidales como triterpénicas para lo cual en un tubo de ensayo se colocó aproximadamente 2mL de extracto y se añadió igual cantidad de agua. Se agitó vigorosamente.

La reacción es positiva cuando sobre la superficie del extracto se forma espuma de más de 2mm de altura y persiste por más de 2 minutos.

B. Ensayo con H₂SO₄ concentrado

A la solución resultante de la prueba de la espuma se le añadió gotas de H₂SO₄ concentrado.

La prueba es positiva cuando hay coloración:

- Fuertemente amarilla para Flavonas y Flavonoides
- Anaranjada o guinda para Flavononas
- Rojo guinda o rojo azulado para Chalconas y Auronas

C. Ensayo de FeCl₃

Este ensayo permite reconocer en un extracto la presencia de taninos y compuestos fenólicos. En un tubo de ensayo se colocó una alícuota de extracto y se adicionó 2-3 gotas de FeCl₃.

Se considera positiva cuando hay coloración:

- Rojo-vino para Compuestos fenólicos libres

- Verde intenso para Taninos pirocatéquicos.
- Azul para Taninos pirogálicos

D. Ensayo de Shinoda

Permite determinar la presencia de flavonoides. En un tubo de ensayo se coloca una alícuota de extracto, con la ayuda de una paleta se agrega una pequeña cantidad de limaduras de Mg y unas gotas de HCl concentrado.

La reacción se considera positiva cuando se presenta coloración amarilla, naranja, carmelita, rosada o rojo guinda; intensos en todos los casos.

E. Ensayo de Borntrager

Con este ensayo se determina la presencia de quinonas, para lo cual se tomó una alícuota de extracto en un tubo de ensayo y se agregó gotas de NaOH5%, finalmente se añadió 1mL de cloroformo y se observó la coloración de la fase acuosa alcalina.

El ensayo es positivo cuando se presenta las siguientes coloraciones:

- Amarillo para Benzoquinonas
- Rosado para Naftoquinonas
- Violeta para Antraquinonas

F. Ensayo de Wagner

A la solución formada en el ensayo de Borntrager, se le evaporó el cloroformo, obteniéndose un residuo al que se añadió 1mL de EtOH, una gota de HCl y unas gotas del reactivo de Wagner (2g de yodo y 2g de yoduro de potasio aforados a 100mL con agua), se agitó suavemente.

Esta prueba es positiva para alcaloides en el siguiente orden:

- Opalescencia (+)
- Turbidez (++)
- Precipitado (++++)

G. Ensayo de Rosenthaler

Permite comprobar en los extractos etanólicos la presencia de terpenos. Se tomó una alícuota de extracto etanólico, se adicionó gotas de reactivo de Rosenthaler (solución 1% de vainillina en EtOH y 5mL de H₂SO₄ concentrado) y se calentó.

Se considera positivo cuando se forma una coloración en gama de rosada a violeta o pardas.

H. Ensayo de Baljet

En un tubo de ensayo se colocó una pequeña porción de extracto etanólico y se añadió 2-3 gotas de Ácido Pícrico y gotas de KOH 5%.

Una coloración anaranjada o rojiza indica que la prueba es positiva para sesquiterpenolactonas.

I. Ensayo de Sudan III

La presencia de monoterpenos es determinada por este ensayo que consistió en tomar una alícuota de extracto y añadir 2-3 gotas de reactivo (solución al 6% de Sudan III en partes iguales de alcohol y glicerina), se calentó por 3 minutos y se dejó enfriar.

La formación de una película de color rojo indica que la prueba es positiva.

J. Ensayo de Marini Bettolo

A una alícuota de extracto se le añadió gotas de SbCl_3 , se calentó y dejó enfriar. La prueba se considera positiva cuando se la presencia de las siguientes coloraciones:

- Amarillo o anaranjado para Flavonas
- Rojo oscuro o violeta para Chalconas

K. Ensayo de Liebermann Burchard

Mediante esta reacción se determina triterpenos, esteroides y esteroides. En un tubo colocar una alícuota de extracto etanólico, se evaporó a sequedad. El evaporado se disolvió en 1mL de cloroformo y se añadió, por las paredes del tubo, 1mL de reactivo (anhídrido acético: H_2SO_4 , 40:1), sin agitar.

Si forma un anillo verde la prueba será positiva o puede darse el siguiente cambio (rápido) de coloración de verde-azul, pasando por verde intenso hasta llegar a negro en la interfase.

2.4.7 REACTIVACIÓN DE CEPAS MICROBIOLÓGICAS ATCC

2.4.7.1 Preparación de medios

A. Preparación de caldo soya tríptica

Se preparó una cantidad suficiente de caldo soya tríptica, y se repartió 25mL en cada uno de los 12 erlenmeyers de 125mL previamente esterilizados, con tapones de gasa y algodón. Se autoclavó por 15 minutos a 15psi y 121°C , se dejó enfriar para la suspensión de los microorganismos.

B. Preparación de Agar Base Sangre (SBA), Agar de Eosina y azul de metileno(EMB), agar Sabouraud y Agar Manitol.

Se preparó una cantidad suficiente de agar Base Sangre, Eosina Azul de Metileno, Sabouraud y Manitol en 4 erlenmeyers de 250mL respectivamente. Se autoclavó por 15 minutos a 15psi y 121°C. Posteriormente se repartió una cantidad aproximada de 15mL de medio en cajas Petri. Se dejó enfriar, se colocó dentro de fundas plásticas y se almacenó en refrigeración.

Para el agar base sangre, antes de ser repartido en las cajas Petri, es necesario añadir una cantidad de sangre equivalente al 5-10% del medio, cuando éste se halle a una temperatura entre 45-50°C.

C. Preparación de agares para pruebas bioquímicas

Se preparó una cantidad suficiente de agar hierro Kligler, agar SIM, agar citratado de Simmons y Christensen (base para urea) en varios erlenmeyers de 250mL respectivamente. Se autoclavaron a 15psi y a temperatura de 121°C por 15 minutos. El agar Christensen se enfrió hasta 50-55°C, para añadir la urea al 20% previamente esterilizada y filtrada. Se repartió aproximadamente 5mL de cada agar preparado tubos estériles con tapa. Cada uno de los tubos se inclinó para que se formara el pico de flauta, excepto el SIM (agar semisólido).

Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se los almacenó en gradillas cubiertos con fundas plásticas y en refrigeración.

D. Preparación de Agar Soya Trypticosa (TSA)

En un erlenmeyer de de 250mL se preparó una cantidad suficiente de agar Soya Trypticosa (TSA), se llevó a ebullición y se repartió aproximadamente 5 mL en tubos individuales 100x13 parcialmente tapados. Se autoclavaron a 121°C a 15psi por 15

minutos. Cada uno de los tubos se inclinó de tal modo que se formase el pico de flauta. Se conservó en refrigeración en gradillas y envueltos en fundas plásticas.

2.4.7.2 Suspensión de los microorganismos ATCC

Se utilizó cepas ATCC que se hallaban almacenadas en el laboratorio. Con hisopos estériles se tomó una cantidad considerable de los microorganismos y se suspendieron en los 25mL de caldo Soya Trípica, para ello se inclinó a 45° los erlenmeyer que contenían el medio, se introdujo el hisopo y con ligeros movimientos circulares sobre las paredes se depositó los microorganismos, se mezcló suavemente. Se incubaron a 35°C durante 18-24 horas.

2.4.7.3 Siembra de los microorganismos ATCC

Previo a la siembra se realizó una verificación del crecimiento, para lo cual se observó la turbidez en los medios contenidos en los erlenmeyers. Con un asa estéril y fría se tomó una cantidad de muestra y se sembró en los 3 sectores de la caja previamente codificada.

Se sembró por duplicado en SBA y EMB todos los microorganismos excepto la *Candida albicans* que se lo realizó en Sabouraud. Finalmente se incubó a 35°C por 18-24 horas.

2.4.7.4 Lectura del crecimiento e identificación de los microorganismos

Después de transcurrido el tiempo requerido para que los microorganismos crezcan, se tomaron las cajas para observar las características macroscópicas de cada uno y posteriormente se realizó las pruebas de identificación para comprobar si eran los microorganismos requeridos. Para la identificación se aplicó el siguiente procedimiento

- Para *Staphylococcus aureus*, con el asa estéril y fría se tomó una colonia de la siembra en SBA y se sembró en agar Manitol. Se dejó incubar a 35°C por 18-24 horas.

- En el caso de *Candida albicans* sembrada en Sauboraud, se observó sus características macroscópicas que son claramente distinguibles al igual que su olor.
- Para el resto de microorganismos se realizan las pruebas bioquímicas para su comprobación. Para ello con una aguja de inoculación se toma una colonia crecida en EMB y en los tubos que contienen los agares se siembra con picadura y estriamiento en Kligler, únicamente estriamiento en Citrato y Urea, y picadura en SIM. Se dejaron en incubación los tubos por 24-48 horas a 35°C y parcialmente tapados.

2.4.7.5 Almacenamiento de microorganismos ATCC reactivados

Después de que ya se comprobó que las cepas requeridas eran las correctas se procedió a sembrar en los tubos slant que contienen agar Soya Tríptica (STA), para lo cual con un asa esteril y fría se tomó una colonia de las cajas Petri con agar manitol en el caso del *S. aureus*, con Sabouraud para *C. albicans*, y del EMB para el resto de bacterias. Se codificó y tapó parcialmente cada tubo, se incubó a 35°C por 18-24 horas. Después de este tiempo se taparon herméticamente con parafilm cada uno de los tubos y se conservaron en refrigeración cubiertos con fundas plásticas.

2.4.8 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE MITSCHER EN LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE ESPINO CHIVO (*Duranta triacanta* Juss), CEPILLO (*Callistemon speciosus*) Y TZINZO (*Tagetes minuta* L.) Y SUS RESPECTIVOS SUBEXTRACTOS CLOROFÓRMICOS Y ETÉREOS

2.4.8.1 Preparación de medios. (Día 1)

A. Preparación de solución salina (0,85%)

Se preparó cantidad suficiente de solución salina al 0,85% y se repartió 10mL en tubos con tapa. Se autoclavó a 121°C y 15psi por 15 minutos. Se conservó en refrigeración a 4°C hasta el momento de usar.

B. Esterilización de materiales

Se preparó material suficiente para el ensayo: puntas, hisopos, paletitas envueltos en papel, viales, tubos, frascos, pipetas, todo esto se colocó dentro de fundas de papel y se autoclavó a 121°C por 15 minutos a 15 psi, posteriormente se colocó en un esterilizador seco a 90°C para secarlos y conservarlos hasta su utilización.

2.4.8.2 Preparación de muestras para el ensayo (Día 2)

A. Preparación de los extractos para el ensayo

Fue necesario contar con extractos secos o semisólidos para el ensayo, pero el caso de ciertos extractos que eran líquidos se procedió a la determinación de la concentración en peso de la materia seca de los mismos, para lo cual en cápsulas secas, taradas y pesadas se colocó un volumen exacto de muestra y se dejó secar en estufa, para luego pesar y por diferencia de peso determinar la concentración buscada.

Una vez ya establecida la concentración se procedió igual que con los extractos secos. En un vial seco, estéril y codificado, con la ayuda de una paletita estéril (en el caso de los extractos secos) o de micropipeta (para los extractos líquidos) se pesó con exactitud 40mg de extracto y se añadió 400µL de DMSO, de esta manera se consigue una concentración de 10.000µg/mL, se ultrasonó por 5 minutos para conseguir una mezcla homogénea. Se tapó y dejó en reposo hasta el momento de su uso. Este procedimiento se aplicó a extractos y subextractos de cada uno de los vegetales.

B. Preparación de agar Mueller Hinton

En un erlenmeyer se preparó la cantidad suficiente de agar Mueller Hinton, para realizar el ensayo por duplicado, se repartió 15mL en tubos de pírax de 20mL de capacidad. Se taparon con papel aluminio y autoclavaron a 121°C, a 15psi, por 15

minutos. Una vez autoclavados se mantuvieron en Baño maría a 45°C hasta el momento de su utilización.

C. Preparación de cajas petri con el extracto

- El estudio se realizó por triplicado, para ello se inició con la codificación de las cajas Petri, para cada extracto a concentraciones de 10.000, 1.000, 100µg/mL, y una concentración de 10.000µg/mL para los subextractos.
- En un tubo con agar Mueller Hinton estéril a 45°C, se adicionó 100µL de la disolución del extracto en DMSO cuya concentración es 10.000µg/mL, se mezcló en vortex, seguidamente se colocó en las cajas y se dejó en reposo y al ambiente hasta su completa solidificación.
- Se realizó una dilución 1/10, para ello se tomó 100µL de los extractos preparados en los viales y se adicionó en tubos de ensayo 75x12 limpios, secos y estériles, se agregó además 900µL de DMSO consiguiéndose una concentración final de 1.000µg/mL.
- Se tomó 100µL de la disolución de concentración 1000µg/mL y se adicionó en los tubos que contenían los 15 ml de agar Mueller Hinton a 45°C. Se mezclaron en vortex y se colocó en las cajas Petri previamente codificadas. Se dejó en reposo para su solidificación.
- Se realiza una dilución 1/100 en tubos de ensayo de 75x12 limpios, secos y estériles, para lo cual se tomó 100µL del extracto con concentración 1000µg/L y se ha añadió 900µL de DMSO, consiguiéndose una concentración final de 100µg/mL.
- De igual forma se tomó 100µL de esta última solución y se adicionó a los 15mL de agar Mueller Hinton que se mantenían a 45°C, se mezcló en el vortex e inmediatamente se colocó en las cajas Petri que se hallaban ya codificadas. Se dejó solidificar.
- Ya solidificados los medios con los extractos, se invirtieron las cajas, se colocaron en fundas limpias de tela y se las conservó al ambiente protegidas de la luz y la humedad durante 18-24 horas.

D. Preparación de caldo soya tripticasa (TSB)

Se preparó una cantidad suficiente de caldo de Soya Tríplica (TSB) para luego ser repartidos en 6 erlenmeyers individuales estériles, 25mL de medio. Se autoclavaron a 121°C, a 15psi, por 15 minutos.

E. Preparación de la suspensión bacteriana

- Para el ensayo se utilizó los siguientes microorganismos, previamente activados e identificados:

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
2. *Escherichia coli* ATCC 9637
3. *Salmonella gallinarum* ATCC 9184
4. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031
5. *Candida albicans* ATCC 10231
6. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

- Se dejó enfriar los erlenmeyers que contenía los 25mL de TSB y se codificó cada uno de ellos de acuerdo al microorganismo que se iba a suspender dentro de éste.

- Con un hisopo estéril se tomó una cantidad considerable de cada microorganismo ATCC de los tubos slant que los contenían e inmediatamente se procedió a la suspensión en los erlenmeyers.

- Se dejó en incubación a 35°C por 18-24 horas.

F. Preparación de cajas blanco

- Se elaboraron blancos del agar Mueller Hinton y del DMSO, por triplicado. Para ello se codificaron dos cajas Petri para cada blanco.

- En el caso del agar, se colocó el contenido de un tubo que se mantenía a 45°C en una caja Petri y se dejó solidificar.

- Para el DMSO se tomo pipetearon 100µL de éste y se ubicó en un tubo que contenía agar Mueller Hinton a 45°C. Se mezcló en vortex y seguidamente se añadió a los tubos que contenían TSA 45°C. Se mezclaron con la ayuda de un vortex e inmediatamente se colocó en una caja Petri. Se dejó solidificar.
- Ya solidificados los blancos se invirtieron, se introdujeron dentro de bolsas de tela y se dejaron al ambiente durante 18-24 horas, protegidas de la luz y la humedad.

2.4.8.3 Preparación de la siembra (Día 3)

A. Preparación de cajas Petri

- Se verificó la ausencia total de contaminación en las cajas preparadas en el día 2, solo de esta manera se puede realizar el ensayo.
- A cada una de ellas se las dividió en 6 partes iguales identificando cada parte con un número que corresponderá al microorganismo ATCC que se sembrará allí.

B. Preparación de suspensiones salinas de los microorganismos

- Se sacó los tubos con suero fisiológico que se prepararon el día 1, se dejó que tomaran la temperatura del ambiente y se codificaron.
- En los erlenmeyers dejados en incubación desde el día 2 se verificó el crecimiento de los microorganismos, lo que se confirmó por la turbidez presentada.
- Se homogenizó el contenido de los erlenmeyers y se pipeteó las siguientes cantidades para las suspensiones en el NaCl 0.85%

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
100µL susp. /10mL sol. Salina
2. *Escherichia coli* ATCC 9637
100µL susp. /10mL sol. Salina
3. *Salmonella gallinarum* ATCC 9184
100µL susp. /10mL sol. Salina

4. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031
100µL susp. /10mL sol. Salina
5. *Candida albicans* ATCC 10231
1mL susp. /10mL sol. Salina
6. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
100µL susp. / 10mL sol. Salina

- Una vez tomadas las cantidades indicadas, se añadió en los tubos que contienen la solución salina, se mezcló en el vortex. Se tapó y se conservó a temperatura hasta su utilización.

C. Estriado de microorganismos

- Con la ayuda de varias asas microbiológicas de 5µL de capacidad, esterilizadas y frías, se tomó un asada individualmente de cada microorganismos en turno suspendidos en el suero fisiológico y se estrió en un patrón radial en cada caja petri, siguiendo la plantilla, a 0,5cm del borde y del centro de la caja para evitar contaminaciones.

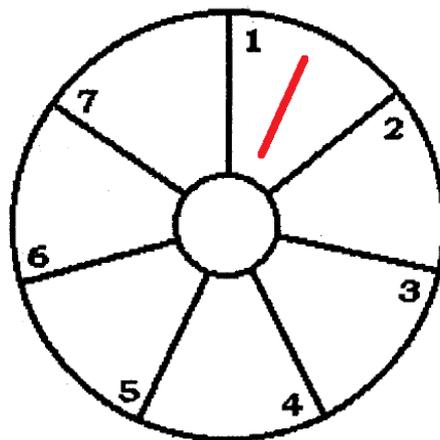


FIGURA N° 1. PLANTILLA DEL TEST DE MITSCHER PARA EL ESTRIADO DE MICROORGANISMOS
(7)

- Durante el trabajo se agitó las suspensiones cada 10 siembras, para evitar la sedimentación de los microorganismos.

- Culminado el estriado de los microorganismos en todas las cajas, incluidos los blancos, éstas se invirtieron y dejaron en incubación a 35°C por 18-24 y de ser necesario por 48 horas.

2.4.9 LECTURA DE RESULTADOS (Días 4 y 5)

- Transcurridas las 18-24 horas se sacaron las cajas de la estufa para dar lectura a los resultados, comparando frente a los blancos preparados. De igual forma a las 48 horas.
- Si todos los cultivos crecieron, el examen es válido. Si alguno no creció se dejó, incubar por 18-24 horas más.
- Existe actividad antibiótica cuando no hay crecimiento visible en las cajas rayadas. La concentración inhibitoria mínima CIM es la menor concentración de las diluciones en la cual no hay crecimiento del microorganismo.
- A éste estudio se lo clasifica en tres parámetros de lectura:

A = Activo (no existe crecimiento)

P = Parcialmente Activo (poco crecimiento)

I = Inactivo (existe crecimiento)

- Si el microorganismo es morfológicamente alterado, por ejemplo si *P. aeruginosa* no muestra su pigmento verde característico, o si no crece bien, la caja puede ser registrada como **P**.
- Las cajas petri de control debe tener la apariencia esperada (crecimiento en todas las líneas en las cajas de control negativo blanco y la potencia apropiada en las cajas de control positivo de sulfato de estreptomicina), de no ser así, el experimento ha fallado y debe ser repetido.
- La presencia de pocas colonias en una raya es señal de resistencia. La presencia de pocas colonias aisladas en la caja lejos de la línea rayadas, es señal de contaminación se pueden generalmente ignorar.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. ANÁLISIS DE LA ESPECIE VEGETAL

3.1.1. COMPROBACIÓN TAXONÓMICA E IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA

La comprobación taxonómica e identificación botánica fue realizada por el curador del Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, el Ing. Jorge Caranqui, el mismo que reportó lo siguiente sobre los vegetales en estudio:

CUADRO N°1. COMPROBACIÓN TAXONÓMICA E IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE LOS VEGETALES ESTUDIADOS. HERBARIO ESPOCH. RIOBAMBA JUNIO 2012

| NOMBRE COMÚN | FAMILIA | GÉNERO | ESPECIE | NOMBRE CIENTÍFICO |
|---------------------|----------------|--------------------|------------------|-------------------------------|
| ESPINO CHIVO | Verbenaceae | <i>Duranta</i> | <i>triacanta</i> | <i>Duranta triacanta</i> Juss |
| CEPILLO | Myrtaceae | <i>Callistemon</i> | <i>speciosus</i> | <i>Callistemon speciosus</i> |
| TZINSO | Asteraceae | <i>Tagetes</i> | <i>minuta</i> | <i>Tagetes minuta</i> L. |

3.1.2. ESTUDIO MACROMORFOLÓGICO DE LOS VEGETALES

El Espino chivo silvestre fue identificado de acuerdo a características como: Arbusto característico de zonas montañosas secas, de hasta 3m de alto, con tallo de color gris, hojas verdes y pequeñas, flores que se despliegan en forma de inflorescencia, espinas tanto en tallo como en ramas y frutos pequeños de color amarillo.

El Cepillo se lo identificó como un árbol ornamental que presenta un tronco más o menos recto de aproximadamente 13cm de diámetro, la corteza escamosa y de color gris marrón. Copa frondosa, con ramas delgadas y péndulas. Hojas alternas angostamente lanceoladas

o lineares, agudas en el ápice, atenuadas en la base, de 5 a 9 cm de largo por unos 6 mm de ancho, de nervio central prominente. Las flores de color rojo intenso agrupadas en racimos muy vistosos, cilíndricos terminales y péndulos, de unos 10 cm de largo. Frutos de más o menos 4 mm de largo por un poco menos de ancho, de color gris marrón.

Para identificar el Tzinso silvestre, se observó su altura que oscilaba entre los 30-80cm; tallos de color marrón, hojas verdes pinnatisectas, aserradas y segmentadas, flores pequeñas y amarillas; y un olor aromático característico.

3.2. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS Y SUBEXTRACTOS ETÉREOS Y CLOROFÓRMICOS

CUADRO N°2. EXTRACTOS ETANÓLICOS Y SUBEXTRACTOS ETÉREOS Y CLOROFÓRMICOS DE ESPINO CHIVO, CEPILLO Y TZINSO. LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA JULIO 2012

| | ESPINO CHIVO | CEPILLO | TZINSO |
|---------------------------------|--------------|---------|---------|
| Peso empleado | 455g | 265g | 838g |
| Extracto alcohólico | 132,5mL | 23mL | 286,8mL |
| % de Rendimiento | 29,63% | 9,37% | 34,36% |
| Subextracto etéreo | 7,2mL | 34,3mL | 10,2mL |
| % de Rendimiento | 14,4% | 68,6% | 20,4% |
| Subextracto clorofórmico | 1,3g | 0,35g | 0,9g |
| % de Rendimiento | 2,56% | 0,65% | 1,79% |
| Extracto etanólico final | 37,6mL | 11,3mL | 26,1mL |
| % de Rendimiento | 75,2% | 22,6mL | 52,2mL |

En el cuadro N°2 se detalla la cantidad de extracto alcohólico obtenido a partir del peso indicado de planta fresca y utilizando la maceración como método de extracción, de los cuales se nota un volumen y rendimiento aceptables; pues es claro que mientras menos volumen extraído la concentración de principios activos será mayor. Se indica además el volumen de los subextractos etéreos, y extractos etanólicos finales y el peso de los subextractos clorofórmicos, conseguidos a partir de 50mL de extracto etanólico, luego de ser concentrados en rotavapor, y sus correspondientes porcentajes de rendimiento.

3.3. ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS

3.3.1 DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS Y FÍSICAS DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS

Estas pruebas se realizaron en cada uno de los extractos, obtenidos a partir de la droga cruda, comprobándose que poseen características organolépticas muy particulares que claramente permite diferenciarlos, sus densidades e índices de refracción son mayores a los del agua, y sus pH indican que son ácidos, los resultados se reportan en el cuadro N°3.

CUADRO N°3. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS Y FÍSICAS DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS. LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA JULIO 2012.

| PARÁMETRO | ESPINO CHIVO | CEPILLO | TZINSO |
|----------------------|----------------|----------------|--------------------------|
| ASPECTO | Opalescente | Traslúcido | Traslúcido |
| COLOR | Pardo verdoso | Amarillo claro | Amarillo Pardo |
| OLOR | Característico | Aromático | Aromático característico |
| DENSIDAD | 1,0175 | 1,0793 | 1,0039 |
| pH | 5,51 | 3,71 | 4,51 |
| ÍNDICE DE REFRACCIÓN | 1,358 | 1,43 | 1,366 |

3.3.2 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS CUALITATIVO MEDIANTE REACCIONES DE CARACTERIZACIÓN

CUADRO N°4. GRUPOS FITOQUÍMICOS IDENTIFICADOS EN LOS EXTRACTOS DE ESPINO CHIVO (*Duranta triacanta* Juss), CEPILLO (*Callistemon speciosus*), TZINSO (*Tagetes minuta* L.). LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA JULIO 2012

| DETERMINACIÓN | EXTRACTOS | | |
|---------------|--------------|---------|--------|
| | Espino chivo | Cepillo | Tzinso |
| ESPUMA | | | |
| Saponina | (-) | (-) | (-) |

| | | | |
|--------------------------|-------|-------|-------|
| ÁCIDO SULFÚRICO | | | |
| Flavonas – Flavonoides | (-) | (-) | (++) |
| Flavononas | (-) | (-) | (-) |
| Chalconas - Auronas | (-) | (++) | (-) |
| COLORURO FÉRRICO | | | |
| Compuestos fenólicos | (-) | (-) | (+) |
| Taninos catéquicos | (+++) | (-) | (+++) |
| Taninos pirogálicos | (-) | (-) | (-) |
| SHINODA | | | |
| Flavonoides | (+) | (-) | (++) |
| BORNTRAGER | | | |
| Benzoquinonas | (++) | (-) | (-) |
| Naftoquinonas | (-) | (-) | (-) |
| Antraquinonas | (-) | (-) | (-) |
| WAGNER | | | |
| Alcaloides | (+++) | (-) | (-) |
| ROSENTALER | | | |
| Terpenos | (-) | (-) | (++) |
| BALJET | | | |
| Sesquiterpenolactonas | (+) | (++) | (+) |
| SUDAN III | | | |
| Monoterpenos | (-) | (+++) | (+++) |
| MARINI BETTOLO | | | |
| Flavonas | (-) | (-) | (+++) |
| Chalconas | (-) | (-) | (-) |
| LIEBERMANN | | | |
| BURCHARD | | | |
| Triterpenos - esteroides | (++) | (-) | (+) |

Interpretación: (-) Negativo, (+) Baja evidencia, (++) Evidencia, (+++) Alta evidencia.

El cuadro N°4 indica los grupos fitoquímicos de los extractos de las plantas estudiadas, y es así que en el Espino chivo presenta alta evidencia de taninos principalmente catéquicos y de alcaloides, también se determinó la presencia de triterpenos, esteroides y benzoquinonas pero con menos certeza, al igual que sesquiterpenolactonas y flavonoides.

BROPHY et al, 1998 afirma la presencia de aceites esenciales en el cepillo, y según este estudio se comprueba dicha afirmación, pues la presencia de monoterpenos es altamente evidente, además contiene sesquiterpenolactonas, auronas y chalconas. En el tzinso se comprobó la presencia de terpenos, principalmente monoterpenos, al igual que flavonas, flavonoides, taninos catéquicos, y con baja evidencia se encontró esteroides, sesquiterpenolactonas y compuestos fenólicos, coincidiendo con COFRE 2012, quien indica la presencia de flavonoides, aceites esenciales, esteroides, quinonas y catequinas.

Ningún extracto dio positivo para saponinas, naftoquinonas, antraquinonas ni taninos pirogálicos.

3.4. REACTIVACIÓN BACTERIANA (CEPAS ATCC)

Para este estudio se trabajó con cepas ATCC puras, las mismas que fueron reactivadas e identificadas. Los microorganismos utilizados fueron: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 9637, *Salmonella gallinarum* ATCC 9184, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Candida albicans* ATCC 10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

En los cuadros 5, 6 y 7 se detalla las pruebas que se realizaron para la determinación de las características de cada microorganismo, comprobándose con ellas que efectivamente se contaba con las cepas requeridas.

CUADRO N°5. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO. FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO 2012

| | |
|---------------------------------|---------------------------------------|
| CRECIMIENTO | Agar Sangre |
| ASPECTO EN PLACA | Colonias grandes de más 1mm, cremosas |
| PIGMENTACIÓN DE COLONIAS | Amarillas doradas |
| FERMENTACIÓN MANITOL | Positivo |

CUADRO N°6. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARA *Candida albicans* ATCC 10231. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO. FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO 2012

| | |
|-------------------------|---|
| CRECIMIENTO | Agar Saubouraud |
| ASPECTO EN PLACA | Colonias blancas cremosas y olor a fermentado |

CUADRO N°7. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARA *Escherichia coli* ATCC 9637, *Salmonella gallinarum* ATCC 9184, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO. FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA JULIO-AGOSTO 2012

| PRUEBA | <i>Escherichia coli</i> | <i>Salmonella gallinarum</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
|-----------------|--------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| CRECIMIENTO | Agar EMB | Agar EMB | Agar EMB | Agar EMB |
| ASPECTO PLACA | Colonias verde metálicas | Colonias blancas | Colonias blancas cremosas | Colonias verdosas cremosas |
| GLUCOSA | (+) | (+) | (+) | (-) |
| GAS/GLUCOSA | (+) | (+) | (+) | (-) |
| LACTOSA | (+) | (-) | (+) | (-) |
| SH ₂ | (-) | (+) | (-) | (-) |
| CITRATO | (-) | (+) | (+) | (+) |
| INDOL | (+) | (-) | (-) | (-) |
| MOVILIDAD | (+) | (+) | (-) | (+) |
| UREASA | (-) | (-) | (+) | (-) |

3.5. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

De acuerdo a la técnica de Mitscher es necesario utilizar 40mg de extracto, pero en este ensayo, los extractos etanólicos, subextractos etéreos y etanólicos después de concentrar se mantenían líquidos, por lo que fue necesario determinar la cantidad de materia seca de cada uno de ellos, excepto para los subextractos clorofórmicos pues estos estaban secos.

En el cuadro N°8 se puntualiza el peso de materia seca obtenido a partir de un volumen conocido (concentración P/V), y el volumen equivalente a 40mg utilizado en el estudio.

CUADRO N°8 DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN DE EXTRACTOS Y SUBEXTRACTOS EQUIVALENTE A 40mg. LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA JULIO 2012

| EXTRACTO | CONCENTRACIÓN | VOLUMEN |
|---------------------------------------|---------------|----------|
| Extracto etanólico Espino chivo | 0,1539g/mL | 259,91µL |
| Extracto etanólico Cepillo | 0,1886g/mL | 212,09µL |
| Extracto etanólico Tzinso | 0,0906g/mL | 441,50µL |
| Subextracto etéreo Espino chivo | 0,0589g/mL | 679,12µL |
| Subextracto etéreo Cepillo | 0,1032g/mL | 387,60µL |
| Subextracto etéreo Tzinso | 0,0517g/mL | 773,69µL |
| Extracto etanólico final Espino chivo | 0,1345g/mL | 297,40µL |
| Extracto etanólico final Cepillo | 0,4470g/mL | 89,49µL |
| Extracto etanólico final Tzinso | 0,0809g/mL | 494,44µL |

3.6. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Mediante este ensayo se determinó si los vegetales en estudio, *Duranta triacanta*, *Callistemon speciosus* y *Tagetes minuta*, presentan o no actividad antimicrobiana frente a microorganismos como: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Escherichia coli* ATCC 9637, *Salmonella gallinarum* ATCC 9184, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 *Candida albicans* ATCC 10231 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Los resultados se evaluaron a cabo de uno y dos días; denotándose el mismo por las siguientes abreviaturas:

A. Indica actividad, es decir ningún tipo de crecimiento en las cajas sembradas.

I. Indica que no posee actividad, es decir el crecimiento en caja es similar al del blanco.

P. Indica actividad parcial, esto quiere decir que hay un crecimiento moderado, atrofiado o la ausencia de alguna característica típica de la bacteria o microorganismo objeto de prueba

CUADRO N°9. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA MEDIANTE MÉTODO DE MITSCHER DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE ESPINO CHIVO (*Duranta triacanta* Juss). LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO 2012

| MICROORGANISMO | 10.000µg/mL | | 1000µg/mL | | 100µg/mL | |
|--|-------------|-----|-----------|-----|----------|-----|
| | 24H | 48H | 24H | 48H | 24H | 48H |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 | A | A | P | P | I | I |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 9637 | I | I | I | I | I | I |
| <i>Salmonella gallinarum</i> ATCC 9184 | I | I | I | I | I | I |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031 | I | I | I | I | I | I |
| <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 | P | P | I | I | I | I |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | I | I | I | I | I | I |

A: Activo, P: Parcialmente activo, I: Inactivo

CUADRO N°10. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS SUBEXTRACTOS ETÉREO Y CLOROFÓRMICO Y EXTRACTO ETANÓLICO FINAL DE ESPINO CHIVO (*Duranta triacanta* Juss). LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO 2012

| MICROORGANISMO | SUBEXTRACTO ETÉREO | | SUBEXTRACTO CLOROFÓRMICO | | EXTRACTO ETANÓLICO | |
|--|--------------------|-----|--------------------------|-----|--------------------|-----|
| | 24H | 48H | 24H | 48H | 24H | 48H |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 | P | P | I | I | P | P |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 9637 | I | I | I | I | I | I |
| <i>Salmonella gallinarum</i> ATCC 9184 | I | I | I | I | I | I |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031 | I | I | I | I | I | I |
| <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 | I | I | I | I | P | P |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | I | I | I | I | I | I |

A: Activo, P: Parcialmente activo, I: Inactivo

El extracto etanólico de *Duranta triacanta* Juss, presenta actividad antimicrobiana para *S. aureus*, a una concentración de 10.000µg/mL, y actividad parcial a una concentración de 1000µg/mL manteniéndose el resultado hasta las 48 horas; además se notó una actividad parcial frente a *Candida albicans* a mayor concentración. El subextracto etéreo presentó actividad parcial para *S. aureus*, y el extracto etanólico final para *C. albicans* y

S. aureus, como se indica en los cuadros 9 y 10; el subextracto clorofórmico no tiene actividad sobre ningún microorganismo.

CUADRO N°11. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA MEDIANTE MÉTODO DE MITSCHER DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE CEPILLO (*Callistemon speciosus*). LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO 2012

| MICROORGANISMO | 10.000µg/mL | | 1000µg/mL | | 100µg/mL | |
|--|-------------|-----|-----------|-----|----------|-----|
| | 24H | 48H | 24H | 48H | 24H | 48H |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 | A | A | A | A | P | P |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 9637 | P | P | I | I | I | I |
| <i>Salmonella gallinarum</i> ATCC 9184 | P | P | I | I | I | I |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031 | P | P | I | I | I | I |
| <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 | A | A | A | A | I | I |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | P | P | I | I | I | I |

A: Activo, P: Parcialmente activo, I: Inactivo

CUADRO N°12. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS SUBEXTRACTOS ETÉREO Y CLOROFÓRMICO Y EXTRACTO ETANÓLICO FINAL DE CEPILLO (*Callistemon speciosus*). LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO 2012

| MICROORGANISMO | SUBEXTRACTO ETÉREO | | SUBEXTRACTO CLOROFÓRMICO | | EXTRACTO ETANÓLICO | |
|--|--|-----|--------------------------|-----|--------------------|-----|
| | 24H | 48H | 24H | 48H | 24H | 48H |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 | A | A | A | A | A |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 9637 | I | I | I | I | I | I |
| <i>Salmonella gallinarum</i> ATCC 9184 | I | I | P | P | I | I |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031 | I | I | P | P | I | I |
| <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 | A | A | A | A | A | A |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | I | I | I | I | I | I |

A: Activo, P: Parcialmente activo, I: Inactivo

En los cuadros 11 y 12 se da a conocer el comportamiento que presentó *Callistemon speciosus*. El extracto etanólico demostró actividad para *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* a la concentración de 10.000µg/mL, y actividad parcial para *Escherichia coli*, *Salmonella gallinarum*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomona*

aeruginosa. A una concentración de 1000µg/mL es activo para *C. albicans* y *S. aureus*, y a concentración de 100µg/mL es parcialmente activo para *S. aureus*.

Los subextractos etéreo y clorofórmico y extracto etanólico final presentan una total actividad para *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. El extracto clorofórmico presentó actividad parcial para *Salmonella gallinarum* y *Klebsiella pneumoniae*.

CUADRO N°13. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA MEDIANTE MÉTODO MITSCHER DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE TZINSO (*Tagetes minuta* L.). LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO 2012

| MICROORGANISMO | 10.000µg/mL | | 1000µg/mL | | 100µg/mL | |
|--|-------------|-----|-----------|-----|----------|-----|
| | 24H | 48H | 24H | 48H | 24H | 48H |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 | P | P | I | I | I | I |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 9637 | I | I | I | I | I | I |
| <i>Salmonella gallinarum</i> ATCC 9184 | I | I | I | I | I | I |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031 | I | I | I | I | I | I |
| <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 | P | P | I | I | I | I |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | I | I | I | I | I | I |

A: Activo, P: Parcialmente activo, I: Inactivo

CUADRO N°14. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS SUBEXTRACTOS ETÉREO Y CLOROFÓRMICO Y EXTRACTO ETANÓLICO FINAL DE TZINSO (*Tagetes minuta* L.). LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO 2012

| MICROORGANISMO | SUBEXTRACTO ETÉREO | | SUBEXTRACTO CLOROFÓRMICO | | EXTRACTO ETANÓLICO | |
|--|--------------------|-----|--------------------------|-----|--------------------|-----|
| | 24H | 48H | 24H | 48H | 24H | 48H |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 | A | A | I | I | I | I |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 9637 | I | I | I | I | I | I |
| <i>Salmonella gallinarum</i> ATCC 9184 | I | I | I | I | I | I |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031 | I | I | I | I | I | I |
| <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 | A | A | I | I | I | I |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | I | I | I | I | I | I |

A: Activo, P: Parcialmente activo, I: Inactivo

En el cuadro 13 se demuestra la actividad parcial que presentó el Tzinso a una concentración de 10.000 $\mu\text{g/mL}$ para *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, pero como se indica en el cuadro 14 el subextracto etéreo presenta una actividad total frente a los mismos microorganismos, esto seguramente se debe a que en este solvente se extraen metabolitos de baja y mediana polaridad que son responsables del efecto.

La actividad antimicrobiana que presentan estos vegetales se debe a los metabolitos secundarios que posee cada una de ellos, grupos fitoquímicos que en este mismo ensayo fueron identificados, y es así que en el espino chivo se asume que la inhibición se debe a la presencia de alcaloides. El cepillo por su parte posee gran cantidad de aceites esenciales, siendo el 1,8-cineol el componente mayoritario en hojas y frutos (Brophy et al, 1998) al igual que el tzinso (Baldeón ESPOCH 2012), es decir que estos pueden ser los responsables de la actividad.

En base a los resultados reportados en los cuadros 9, 10, 11 y 12, también se puede notar que la actividad del espino chivo y el cepillo, tienden a bajar cuando se realizan los subextractos, esto porque como fitocomplejo actúan de mejor manera, pero en el caso del Tzinso presenta mayor actividad cuando se separan los compuestos, y es así que comparando los cuadro 13 y 14 se observa que la actividad parcial que presenta el extracto etanólico se eleva cuando se extrae con éter.

Se puede afirmar entonces que los resultados obtenidos fueron los esperados, a pesar de ello en el caso del Tzinso y el espino chivo se debería buscar que parte específica de la planta brinda mayor efectividad, como el cepillo, que al utilizar solamente los frutos dio mejores resultados.

CAPITULO IV

4. CONCLUSIONES

1. Según los cuadros 9,10,11,12,13 y 14, los extractos etanólicos de *Duranta triacanta* Juss, *Callistemon speciosus* y *Tagetes minuta* L., y sus respectivos subextractos etéreos y clorofórmicos, presentan actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 9637, *Salmonella gallinarum* ATCC 9184, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, ya sea de forma total o al menos parcial, por lo que la hipótesis planteada es positiva.
2. Los extractos etanólicos se obtuvieron por maceración de los vegetales frescos, y posterior concentración del solvente, los mismos que según los cuadros 3 y 4, presentaron las siguientes características: *Duranta triacanta* Juss un % de rendimiento de 29,63 , líquido opalescente, de color pardo verdoso, olor característico, densidad 1,0175, pH 5,51 e índice de refracción de 1,358; *Callistemon speciosus* 9,37% de rendimiento, translúcido, amarillo, aromático, densidad 1,0793, pH 3,71, índice de refracción 1,43; y *Tagetes minuta* L. 34,36% de rendimiento, translúcido, color amarillo pardo, olor característico, densidad 1,0039, pH 4,51 e índice de refracción de 1,366. El tamizaje fitoquímico determinó la presencia de taninos y alcaloides como los compuestos representativos en el Espino chivo, monoterpenos en el cepillo y en el tzinso flavonoides, taninos y aceites esenciales.
3. Al realizar la evaluación de la actividad antimicrobiana mediante el método de Mitscher, de los extractos etanólicos, se determinó que *Duranta triacanta* Juss presenta actividad para *Staphylococcus aureus* a 10.000µg/mL y actividad parcial para *Candida albicans*, según cuadro 9; *Tagetes minuta* L. a 10.000µg/mL fue

parcialmente activo para *S. aureus* y *C. albicans*, de acuerdo a lo demostrado en el cuadro 13; *Callistemon speciosus* a concentración de 10.000µg/mL es activo frente a *S. aureus* y *C. albicans* y parcialmente activo para *S. gallinarum*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, a 1.000µg/mL presenta actividad para *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, y a 100 µg/mL para *S. aureus*, según cuadro 11.

4. Al comprobar la actividad antimicrobiana de los subextractos etéreos y clorofórmicos de los vegetales estudiados, se estableció de acuerdo al cuadro 100, que el subextracto etéreo de Espino chivo solo presenta actividad parcial para *S. aureus*; los subextractos etéreos y clorofórmicos del cepillo son activos para *S. aureus* y *C. albicans*, el subextracto clorofórmico posee además actividad parcial para *S. gallinarum*, y *K. pneumoniae*, según el cuadro 12; en el Tzinso el subextracto etéreo es el responsable de la actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* y *C. albicans*, de acuerdo con el cuadro 14.
5. En base a los cuadros 9, 10, 11 y 12, Espino chivo (*Duranta triacantha Juss*) y Cepillo (*Callistemon speciosus*), presentan mayor actividad cuando se aplica el extracto etanólico, es decir cuando todos sus compuestos actúan juntos, mientras que el Tzinso (*Tagetes minuta L.*), según cuadro 13 y 14, eleva su actividad cuando se aplica el subextracto etéreo, es decir es más activa la fracción que contiene los aceites esenciales.

CAPÍTULO V

5. RECOMENDACIONES

1. Continuar con el estudio de estos vegetales, ya que al poseer varios principios activos en su composición química, pueden valorarse otras actividades biológicas que respondan a los mismos, ya sea antiinflamatorias, colessterémicas, entre otras.
2. Realizar una investigación morfológica, fitoquímica, farmacológica y toxicológica completa sobre el Espino chivo, ya que al ser una planta de monte lo que se conoce de ésta es muy poco, y detalles importantes como composición química, propiedades farmacológicas y toxicidad, difícilmente se encuentra en bibliografía
3. En base al estudio realizado y a los resultados obtenidos, continuar con un estudio que permita la elaboración de un fitofármaco con capacidad de combatir enfermedades infecciosas.

CAPÍTULO VI

6. RESUMEN

La determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y subextractos etéreos y clorofórmicos de *Duranta triacanta*, *Callistemon speciosus* y *Tagetes minuta*, se lo realizó en los Laboratorios de Fitoquímica y Microbiología de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.

Se obtuvieron los extractos etanólicos por maceración de toda la planta y fueron concentrados en rotavapor. Los subextractos se extrajeron en embudo de separación con una alícuota del extracto etanólico y éter etílico inmisible, la fase superior es el éter. Se procedió igual con el cloroformo, la fase inferior es el cloroformo; se eliminó los solventes y se tuvo los subextractos. Por reacciones de coloración o precipitación se comprobó la presencia de aceites esenciales, flavonoides y terpenoides en los extractos etanólicos. Utilizando el método de Mitscher se determinó la actividad antimicrobiana de los extractos frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 9637, *Salmonella gallinarum* ATCC 9184, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

A 10.000 µg/mL, los extractos etanólicos de los vegetales estudiados presentan actividad frente a *S. aureus* y *C. albicans*, y únicamente *Callistemon speciosus* es parcialmente activo para *E. coli*, *S. gallinarum*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*; a 1.000µg/mL el extracto etanólico de *Callistemon speciosus* es activo para *S. aureus* y *C. albicans*. Los subextractos etéreos de Tzinso y Cepillo inhiben *S. aureus* y *C. albicans*, el subextracto clorofórmico de Cepillo es parcialmente activo para *S. gallinarum* y *K. pneumoniae*.

Se comprobó que los extractos etanólicos y subextractos etéreos y clorofórmicos de las especies estudiadas si presentan actividad antimicrobiana, por lo que se recomienda continuar con los estudios para determinar otras actividades biológicas como antiinflamatorias, colessterémicas, entre otras.

ABSTRACT

Determination of the activity of anti microbial extract ethanolic and sub ethereal extracts and formic chlorine of *Duranta triacanta*, *Callistemon speciosus* AND *Tagetes minuta*.

This anti microbial activity determination, it was made in the laboratories of chemical Fito and Micro biology of the Faculty of Science of the ESPOCH.

Ethanol extracts were obtained by maceration of the entire plant and they were concentrated on Rattan steam. The sub extracts were extracted from metal funnel with an aliquot of the extract ethanolic and immiscible ethyl ether. The same procedure was made with chloroform, the lower phase is chloroform; the solvents were removed and they were obtained the sub extracts. The presence of essential oils, flavonoides and Terpenoids in ethanol extracts was found by coloring or precipitation reactions.

Using the method of Mitscher was determined the antimicrobial activity of extracts from *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 9637, *Salmonella gallinarum* ATCC 9184, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Candida albicans* ATCC 10231 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

To 10.000µg/mL, the ethanolic extracts of the vegetables studied present activity against *S. aureus* and *C. albicans*, and only *Callistemon speciosus* is partially active for *E. coli*, *S. gallinarum*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*; to 1.000µg/mL, the sub ethereal extracts of Tzinso and Brush inhibit *S. aureus* and *C. albicans*, the sub chloroform Brush extract is partially active for *S. gallinarum* and *K. pneumoniae*.

It was found that ethanolic extracts and sub ethereal and chloroform extract of the species studied present antimicrobial activity, so it is recommended to continue the studies to determine other biological activities such as anti-inflammatory, cholesteremic, among others.

CAPÍTULO VII

7. BIBLIOGRAFÍA

1. **ALONSO, J.**, Tratado de Fitofármacos y Nutraceuticos., 1a.ed., Rosario-Argentina., Corpus., 2004., Pp. 1001,1002
2. **ÁLVAREZ, V.; Y OTROS.**, Manual de técnicas de Microbiología., s.ed., Madrid-España., s.edt., 1995., Pp. 74 75
3. **BLANCA E.**, Texto de Microbiología., s.ed., Quito-Ecuador., Facultad de Ciencias Químicas-Universidad Central del Ecuador., 1988., Pp. 222, 224, 245, 347-349
4. **BRUNETON, J.**, Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas medicinales., 2a.ed., Zaragoza-España., Acribia., 2001., Pp. 54-77
5. **BURROWS, W.**, Tratado de Microbiología., 1ª.ed., México D.F.-México., Interamericana., 1974., Pp. 358-368
6. **CORDIÉS, L., Y OTROS.**, Principios generales de la terapéutica antimicrobiana., s.ed., México D.F.-México., Acta médica., 1988., Pp. 14
7. **CYTED.**, Manual de Técnicas de Investigación., s.ed., Panamá., Facultad de Ciencias – Universidad de Panamá., 1996., Pp. 63-67

8. **DE LA TORRE, L., Y OTROS.**, Enciclopedia de las Plantas útiles del Ecuador., s.ed., Quito-Ecuador., Quito & Aarhus., 2008., Pp. 105, 109
9. **DIVO, A.**, Microbiología Médica., 4a.ed., México DF-México., Interamericana., 1990., Pp. 158,159.
10. **ELMER W., Y OTROS.**, Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas Color., 5a.ed., Buenos Aires-Argentina., Panamericana., 2001., Pp. 528-535, 818-825, 1015-1017.
11. **FARNSWORTH, N.**, Biological and phytochemical screening of plants. Pharmaceutical. s.ed., USA., s.ed., 1996. Pp. 225-235
12. **GATUSO, M.**, Manual de Procedimientos para el análisis de drogas en polvo., s.ed., Rosario-Argentina., Universidad Nacional de Rosario., 1999., Pp.150
13. **GUPTA, M.**, 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas., 1a.ed., Santafé de Bogotá-Colombia., Convenio Andrés Bello., 1995., Pp. 161,162
14. **JAWETZ. Y OTROS.**, Microbiología Médica., 17a.ed., México D.F.-México., El manual moderno., 2002., Pp. 222-227
15. **LLOP, A., Y OTROS.**, Microbiología y Parasitología Médicas., s.ed., La Habana-Cuba., Ciencias Médicas., V.1., 2001., Pp. 37, 38, 45-50, 73-78, 153, 251, 303, 459
16. **MORALES, M. Y OTROS.**, Plantas medicinales y Medicina natural., 2a.ed., Santiago de Chile-Chile., Sociedad Chilena de Fitoterapia., 2009., Pp. 20-30
17. **MURRAY, P.**, Microbiología medica., 4a.ed., Madrid-España., El Sevier., 2002., Pp. 198-207

18. **NOLTE, W.**, Microbiología Odontológica., 4a.ed., México DF-México., Interamericana., 1986., Pp. 549-590
19. **PELZCAR, M.**, Elementos de Microbiología., s.ed., México D.F.-México., Mc Graw Hill. 1984. Pp. 710-713
20. **RODRIGUEZ, M.**, Introducción a la Fitoterapia y la Medicina Tradicional., México D.F.-México., Herbal., 1998., Pp. 48-66.
21. **SHARAPIN, N.** Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. 1a.ed., Santafé de Bogotá., CAB., 2000., Pp. 35, 40-42, 53-54, 198-203
22. **SUNG, I.**, Fitomedicina 1100 plantas medicinales., s.ed., Lima-Perú., Editorial Isabel., Tomo 1., Pp. 9-20
23. **SUNG, I.**, Fitomedicina 1100 plantas medicinales., s.ed., Lima-Perú., Editorial Isabel., Tomo 2., Pp. 257-258
24. **VOLK, W., Y OTROS.**, Microbiología Médica., 3a.ed., México D.F.-México., Interamericana Mc Graw-Hill., 1989., Pp. 533-560
25. **ARAUJO, J., Y OTROS.**, Actividad antimicrobiana de plantas., Lima-Perú., Universidad Científica del Sur., 2008., Pp. 220-221
26. **ARIAS, B.; Y OTROS.**, Uso de plantas medicinales en relación al estado de conservación del bosque en Córdoba., Vol.20., No2., Córdoba-Argentina., Ecol. Austral., 2010., Pp. 235-246.
27. **CHÁVEZ, A.**, Extractos vegetales con efecto fungicida, insecticida o nematicida., Coronado-Costa Rica., Ministerio de Agricultura y Ganadería agencia de servicios agropecuarios de Coronado. 2008. Pp.2-5

28. **DOMINGO, D. Y OTROS.,** Plantas con acción antimicrobiana. Vol.16., No.4., Madrid-España., Sociedad Española de Quimioterapia., 2003., Pp. 386-388, 392
29. **GUERRA, C., Y OTROS.,** Estudio comparativo de los aceites esenciales de *Callistemon speciosus* DC. recolectado en los Estados Carabobo, Lara y Mérida., Vol.45., No.2., Mérida-Venezuela., Facultad de Farmacia Universidad de Mérida., 2003., Pp. 10-12
30. **PEREIRA, S.,** Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólico, etéreo y acuoso de las hojas de la *Trichilia hirta* L., No.3., Granma-Cuba., Universidad de Granma., 2009., Pp. 196,197
31. **RAMIREZ, L. Y OTROS.,** Metodologías para Evaluar in vitro la Actividad Antibacteriana de Compuestos de Origen Vegetal., Vol. 15., No.42., Pereira-Colombia., Universidad Tecnológica de Pereira., 2009., Pp. 263-266
32. **RUSSO, S., Y OTROS.,** Efecto de *tagetes spp.* sobre dos áfidos plagas de *Lactuca sativa* (L). Vol. 37., No.1., Lima-Perú., Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias., 2005., Pp. 55-59.
33. **VISITIN, A.; BERNADELLO, G.,** Morfología y Anatomía floral de *Tagetes minuta* L. (Asteraceae)., No.12., Córdoba-Argentina., Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal CONICET., 2005., Pp. 8-15
34. **BONILLA, P.,** Evaluación de la Actividad Antimicrobiana del Extracto Etanólico de Carrasquilla (*Berberis hallii*) sobre *Escherichia coli* ATCC N° 9637, *Candida albicans* ATCC N°10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC N° 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC N°6538., Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Facultad de Ciencias., Escuela de Bioquímica y Farmacia., Riobamba-Ecuador., **TESIS.**, 2011., Pp 83-94

35. **BUCAY, L.**, Estudio Farmacognóstico y Actividad Antimicrobiana de la Violetilla (*Hybanthus parviflorus*)., Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Facultad de Ciencias., Escuela de Bioquímica y Farmacia., Riobamba-Ecuador., **TESIS.**, 2009., Pp. 46-51
36. **COFRE, S.**, Determinación de la Actividad Insecticida y/o Anti Alimentario del Aceite Esencial de Tzinsu Tagetes minuta en *Drosophila melanogaster*., Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias., Escuela de Bioquímica y Farmacia., Riobamba-Ecuador., **TESIS.**, 2012., Pp. 60-76.
37. **ESTRADA, S.**, Determinación de la Actividad Antimicrobiana *in vitro* de los extraxtos de Romero (*Rosmarinus officinalis*) y Tomillo (*Thymus vulgaris*)., Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Facultad de Ciencias., Escuela de Bioquímica y Farmacia., Riobamba-Ecuador., **TESIS.**, 2010., Pp. 47-54
38. **RODRIGUEZ, A.**, Evaluación “*in vitro*” de la Actividad Antimicrobiana de los alcaloides del agua de cocción del proceso de desamargado del chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*)., Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Facultad de Ciencias., Escuela de Bioquímica y Farmacia., Riobamba-Ecuador., **TESIS.**, 2009., Pp. 35-42, 47-51
39. **ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PLANTAS MEDICINALES Y AROMÁTICAS USADAS EN BRASIL**
http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_05_7.pdf
2012/05/19
40. ***Callistemon speciosus* (SIMS) DC**
<http://www.siac.net.co/sib/catalogoespecies/especie.do?idBuscar=1782&met hod=displayAAT2012705719>
2012/05/04

41. *Callistemon speciosus*

<http://www.photomazza.com/?Callistemon-speciosus&lang=es>
2012/09/12

42. *Candida albicans*

<http://hongos-alergenicos.reviberoammicol.com/files/025.PDF>
2012/09/02

43. DEFINICION DE EXTRACTOS VEGETALES

<http://www.sanopordentro.com/extractos-vegetales.html>
2012/08/31

44. *Duranta triacantha* JUSS. - VERBENACEAE

[http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/?controlador=ShowObject&accion=s
how&id=247815](http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/?controlador=ShowObject&accion=s
how&id=247815)
2012/05/19

45. *Escherichia coli*

<http://blog.ciencias-medicas.com/archives/1373>
2012/09/03

46. ESTRUCTURA Y ACTIVIDAD DE LOS ANTIFÚNGICOS

http://bvs.sld.cu/revistas/far/vol39_2_05/far12205.pdf
2005/05

47. FITOMEDICINA

[http://www.fitomedicina.cl/files/publicacion/Plantas%20Medicinales,%20Fit
ofarmacos%20y%20Fitomedicamentos.pdf](http://www.fitomedicina.cl/files/publicacion/Plantas%20Medicinales,%20Fit
ofarmacos%20y%20Fitomedicamentos.pdf)
2012/05/19

48. FITOMEDICINA Y FITOTERAPIA

<http://phytomedchile.blogspot.com/2006/04/fitomedicina-y-fitoterapia.html>
2006/04/16

49. GÉNERO STAPHYLOCOCCUS

<http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Staphylococcus.pdf>
2012/09/04

50. GRUPOS PRINCIPALES DE COMPONENTES ANTIMICROBIANOS DE PLANTAS

http://ecpp.ucsur.edu.pe/documentos/cientifica_06.pdf#page=4
2012/05/19

51. LOS FITOFÁRMACOS

http://www.nexusediciones.com/pdf/gine2005_1/gi-6-1-004.pdf
2009/01/03

52. MEDICINA TRADICIONAL ANDINA

<http://ecuador.nutrinet.org/noticias/1/333-plantas-y-medicina-tradicional-andina>
2009/08/04

53. MÉTODOS BÁSICOS PARA EL ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap11.htm>
2012/09/04

54. PLANTAS CON ACCIÓN ANTIMICROBIANA

<http://herbielatino.wordpress.com/fitoterapia/varios/pls-amicrob/>
2012/05/19

55. *Pseudomona aeruginosa*

http://www.ecured.cu/index.php/Pseudomona_aeruginosa

2012/09/02

**56. PSEUDOMONAS Y OTROS BACILOS GRAM NEGATIVOS NO
FERMENTADORES**

http://www.micromadrid.org/pdf/tomo1_tema25.pdf

2012/09/02

57. *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, y *S. saprophyticus*

<http://microbitos.wordpress.com/2011/08/03/staphylococcus/>

2011/08/03

58. *Tagetes minuta*

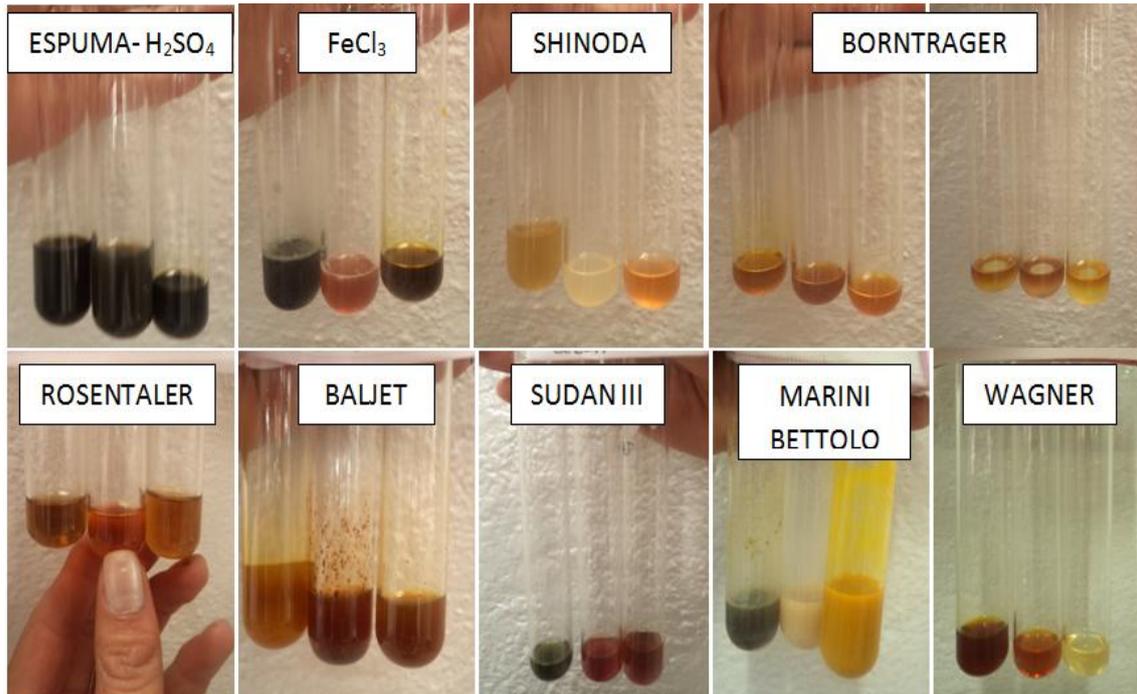
<http://www.hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1993/V2-649.html>

2012/08/29

CAPÍTULO VIII

8. ANEXOS

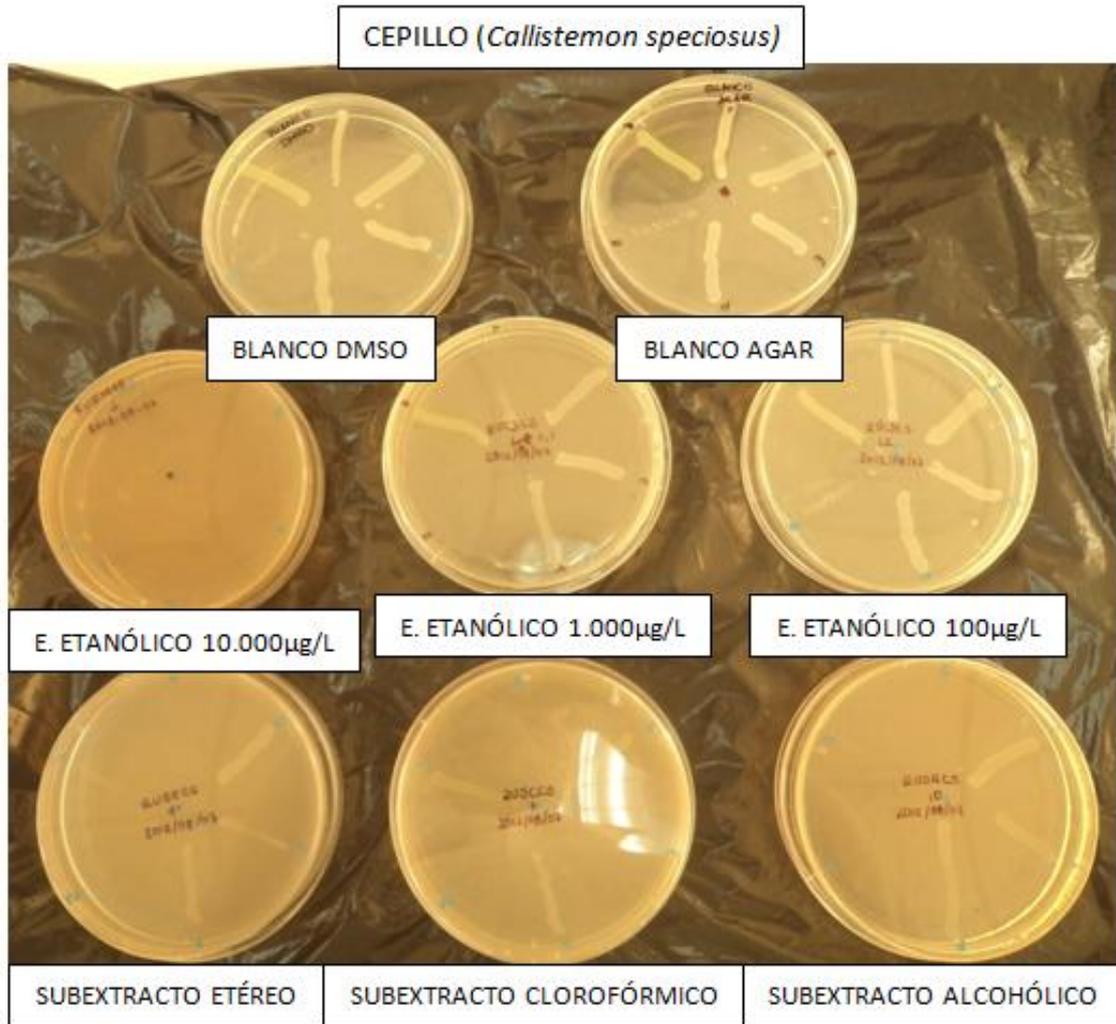
ANEXO N°1. TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS



ANEXO N°2. RESULTADOS DE LAS SIEMBRAS EN PLACA PETRI DEL EXTRACTO ETANÓLICO Y SUBEXTRACTOS ETÉREO Y CLOROFÓRMICOS DE ESPINO CHIVO (*Duranta triacanta* Juss).



ANEXO N°3. RESULTADOS DE LAS SIEMBRAS EN PLACA PETRI DEL EXTRACTO ETANÓLICO Y SUBEXTRACTOS ETÉREO Y CLOROFÓRMICOS DE CEPILLO (*Callistemon speciosus*).



ANEXO N°4. RESULTADOS DE LAS SIEMBRAS EN PLACA PETRI DEL EXTRACTO ETANÓLICO Y SUBEXTRACTOS ETÉREO Y CLOROFÓRMICOS DE TZINSO (*Tagetes minuta* L.).

