



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
(*Drymaria ovata*), (*Senna macrophylla*) Y (*Tagetes filifolia* Lag)”**

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO

PRESENTADO POR:

JULIO LENIN REA MARTINEZ

RIOBAMBA – ECUADOR

2012

DEDICATORIA

Todo el sacrificio y el esfuerzo queda marcado después de culminar un trabajo que te llena de satisfacción, gracias a la constancia y dedicación, no importa si querías rendirte o renunciar, los deseos de alcanzar el objetivo fortalecieron cuerpo y mente, sacando fuerzas, el apoyo; fundamental en mi preparación profesional, nada doblega mi espíritu, siempre constante por ser mejor.

Dedico este trabajo a Dios, mi protector, mi guía, mi amigo, tierno y compasivo, toda mi confianza en ti.

A todos los que me apoyaron y depositaron su confianza en mí, a los buenos y malos elementos que han sido parte de mi vida, los que hablaron bien o mal en mi ausencia.

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo una parte de mi vida entregada a mi formación profesional.

Al Dr. Francisco Portero, por su gran asesoramiento y dirección de la presente tesis, apoyo y completo tiempo para resolver nuestras dudas en la realización de la investigación.

A la Dra. Cumandá Játiva, por su apoyo y asesoramiento desinteresado, por brindar sus conocimientos, orientarnos de la mejor manera, fundamental para la realización del trabajo de tesis.

A los Drs. Miembros del tribunal de Tesis por el aporte brindado en la elaboración del trabajo.

Al guambron y al chiriucho por estar conmigo, toda una vida aun, para seguir siendo amigos.

A mi abuelito, por todo su apoyo, siempre te recordare.

A las personas que se vieron involucradas de cualquier manera para lograr culminar con este trabajo de investigación.

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 (*Drymaria ovata*), (*Senna macrophylla*) Y (*Tagetes filifolia* Lag) ” de responsabilidad del Señor Julio Lenin Rea Martinez, 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, Julio Lenin Rea Martinez, 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.

JULIO LENIN REA MARTINEZ.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection (Colección Americana de tipos de cultivo).
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPc	Adenosin Monofosfato ciclico
ATP	Adenosina trifosfato
ARN	Ácido Ribonucleico
°C	Grados Celsius
CIM	Concentración mínima inhibitoria
CFA	Colonization factor antigens (antígenos del factor de colonización)
DMSO	Dimetil Sulfoxido
EMB	Eosina Metilen blue (eosina azul de metileno)
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
g	Gramos
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
Km	Kilómetros
LT	Toxina termolábil
mg	Miligramos
mL	Mililitros
msnm	Metros sobre nivel del mar
PBPs	Penicillin-binding proteins (Proteínas fijadoras de penicilina)
pH	Potencial hidrogeno
ppm	Partes por millón
RPM	Revoluciones por minuto
SIM	Sulfuro indol motilidad
ST	Toxina termoestable
SUH	Síndrome urémico hemolítico
TSA	Tryptic Soy Agar (agar soya tripticasa)
TSB	Tryptic Soy Broth (Caldo soya tripticasa)

μg	Microgramos
μL	Microlitros
μm	Micrómetro
V	Variante (50-50%)
V ⁺	Variante 75% positivo

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

ÍNDICE DE ANEXOS

INTRODUCCIÓN

1.	MARCO TEÓRICO.	- 18 -
1.1	Medicina Natural.	- 18 -
1.2	Medicina Tradicional.	- 19 -
1.3	Medicina Tradicional En Ecuador.	- 19 -
1.4	Fitoterapia.	- 21 -
1.4.1	Métodos De Extracción.	- 22 -
1.4.1.1	Maceración.	- 22 -
1.4.2	Preparaciones Fitoterapéuticos.	- 22 -
1.4.2.1	Extractos.	- 22 -
1.4.2.1.1	Extractos Alcohólicos.	- 23 -
1.4.2.1.2	Factores Que Influyen En La Extracción.	- 23 -
1.4.3	Tamizaje Fitoquímico.	- 24 -
1.5	Características De La Planta De Estudio Escama De Pescado.	- 25 -
1.5.1	Distribución Geográfica.	- 25 -
1.5.2	Descripción Botánica.	- 26 -
1.5.3	Clasificación Botánica.	- 26 -
1.5.4	Usos.	- 27 -
1.6	Características De La Planta De Estudio Flor Amarilla.	- 27 -
1.6.1	Descripción Botánica.	- 28 -
1.6.2	Clasificación Botánica.	- 28 -
1.6.3	Usos.	- 29 -
1.7	Características De La Planta De Estudio Anisillo.	- 29 -
1.7.1	Descripción Botánica.	- 30 -
1.7.2	Distribución Geográfica.	- 31 -
1.7.3	Composición Química.	- 31 -
1.7.4	Clasificación Botánica.	- 31 -

1.7.5	Usos	- 32 -
1.7.5.1	Comestible	- 32 -
1.7.5.2	Medicinal	- 32 -
1.8	Actividad Antimicrobiana.	- 32 -
1.8.1	Antimicrobianos	- 33 -
1.8.1.1	Agentes Antimicrobianos	- 33 -
1.8.1.2	Resistencia A Los Antimicrobianos.	- 34 -
1.8.1.2.1	Mecanismos De Resistencia	- 34 -
1.9	Crecimiento Bacteriano.	- 35 -
1.9.1	Requerimientos Para El Crecimiento.....	- 36 -
1.9.1.1	Requerimientos Físicos.....	- 36 -
1.9.1.2	Requisitos Químicos.....	- 37 -
1.9.2	Medios De Cultivo.....	- 38 -
1.9.2.1	Medios De Cultivo Líquidos.	- 38 -
1.9.2.2	Medios De Cultivo Sólidos.....	- 38 -
1.9.2.3	Requerimientos Generales Para El Crecimiento De Microorganismos.....	- 39 -
1.9.2.4	Siembra De Microorganismos	- 40 -
1.10	Descripción De Las Bacterias En Estudio.....	- 41 -
1.10.1	<i>Staphylococcus Aureus</i> ATCC 6538	- 41 -
1.10.1.1	Características Macroscópicas.....	- 41 -
1.10.1.2	Patogenia.....	- 42 -
1.10.1.3	Clasificación Científica	- 43 -
1.10.1.4	Características Bioquímicas.....	- 43 -
1.10.2	<i>Escherichia Coli</i> ATCC 9637.....	- 43 -
1.10.2.1	Patogenia.....	- 44 -
1.10.2.2	Clasificación Científica	- 44 -
1.10.2.3	Características Bioquímicas.....	- 44 -
1.10.3	<i>Salmonella Gallinarum</i> ATCC 9184.....	- 45 -
1.10.3.1	Patogenia.....	- 45 -
1.10.3.2	Clasificación Científica.	- 46 -
1.10.3.3	Características Bioquímicas.....	- 46 -

1.10.4	<i>Klebsiella Pneumoniae</i> ATCC 10031	- 46 -
1.10.4.1	Características Macroscópicas.....	- 47 -
1.10.4.2	Patogenia.....	- 47 -
1.10.4.3	Clasificación Científica.	- 47 -
1.10.4.4	Características Bioquímicas.....	- 47 -
1.10.5	<i>Candida Albicans</i> ATCC 10231	- 48 -
1.10.5.1	Características Macroscópicas.....	- 48 -
1.10.5.2	Patogenia.....	- 48 -
1.10.5.3	Clasificación Científica	- 49 -
1.10.5.4	Características Bioquímicas.....	- 49 -
1.10.6	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i> ATCC 27853.....	- 50 -
1.10.6.1	Características Macroscópicas.....	- 50 -
1.10.6.2	Patogenia.....	- 50 -
1.10.6.3	Clasificación Científica	- 51 -
1.10.6.4	Características Bioquímicas.....	- 51 -
2	PARTE EXPERIMENTAL	- 53 -
2.1	Lugar Y Pruebas De Ensayo.....	- 53 -
2.2	Recursos Materiales.....	- 53 -
2.2.1	Materia Prima.	- 53 -
2.2.2	Equipos	- 54 -
2.2.3	Materiales De Laboratorio.....	- 54 -
2.2.4	Reactivos.....	- 55 -
2.3	Factores De Estudio	- 56 -
2.4	Material Biológico	- 56 -
2.5	Metodología.....	- 57 -
2.5.1	Recolección.....	- 57 -
2.5.2	Comprobación Taxonómica E Identificación Botánica.....	- 57 -
2.5.3	Procesamiento De Materia Prima: Limpieza Y Desinfección Del Material Vegetal.....	- 57 -
2.5.4	Obtención Del Extracto	- 58 -
2.5.4.1	Procedimiento	- 58 -
2.5.4.2	Obtención De Los Subextractos.	- 58 -

2.6	Métodos Generales Para El Análisis Del Extracto	- 59 -
2.6.1	Determinación De Los Parametros Organolépticos	- 59 -
2.6.2	Determinación De Los Parametros Físicos.....	- 60 -
2.6.3	Ensayos Realizados Para La Identificación De Grupos Químicos.....	- 61 -
2.7	Reactivación De Cepas Microbiologicas ATCC	- 63 -
2.7.1	Preparación De Medios.....	- 63 -
2.7.2	Suspensión De Microorganismos ATCC	- 65 -
2.7.3	Siembra De Microorganismos ATCC.	- 65 -
2.7.4	Lectura De Cajas Incubadas	- 66 -
2.7.4.1	Procedimiento	- 66 -
2.7.5	Almacenamiento De Cepas ATCC Reactivados	- 67 -
2.8	Ensayo De La Actividad Antimicrobiana Por El Método De Mitscher. ...	- 67 -
2.8.1	Preparación De Medios. (Día 1)	- 67 -
2.8.2	Preparación De Muestras Para El Ensayo (Día 2)	- 68 -
2.8.3	Preparación De La Siembra (Día 3).....	- 71 -
2.8.4	Lectura De Resultados (Días 4 Y 5)	- 73 -
3	RESULTADOS Y DISCUSIONES	- 75 -
3.1	Comprobación Taxonómica E Identificación Botánica.....	- 75 -
3.2	Análisis Del Extracto	- 75 -
3.2.1	Determinación De Los Parámetros Organolépticos De Los Extractos.....	- 75 -
3.2.2	Tamizaje Fitoquímico.....	- 76 -
3.4	Actividad Antimicrobiana	- 79 -
4.	CONCLUSIONES	- 81 -
5.	RECOMENDACIONES	83
6.	RESUMEN	- 84 -
7.	BIBLIOGRAFÍA	- 87 -
8.	ANEXOS	- 97 -

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO No. 1	Determinación de parámetros de calidad para los extractos etanólicos de <i>Drymaria ovata</i> , <i>Senna macrophylla</i> , <i>Tagetes filifolia</i> Lag. LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH.....	75
CUADRO No. 2	Determinación de grupos de compuestos presentes en los extractos etanólicos de <i>Drymaria ovata</i> , <i>Senna macrophylla</i> , <i>Tagetes filifolia</i> Lag. LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH.....	76
CUADRO No. 3	Identificación y caracterización para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS.ESPOCH.....	77
CUADRO No. 4	Identificación y caracterización para <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH.....	77
CUADRO No. 5	Identificación y caracterización para <i>Escherichia coli</i> ATCC 9637, <i>Salmonella gallinarum</i> ATCC 9184, <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853. LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA. FACULTAD DE CIENCIAS.ESPOCH.....	78
CUADRO No. 6	Actividad Antimicrobiana mediante el Test de Mitscher de los Extractos Etanólicos de <i>Drymaria ovata</i> , <i>Senna macrophylla</i> y <i>Tagetes filifolia</i> Lag. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH...	79
CUADRO No. 7	Actividad Antimicrobiana mediante el Test de Mitscher de los Subextractos de <i>Drymaria ovata</i> , <i>Senna macrophylla</i> y <i>Tagetes filifolia</i> Lag. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS.ESPOCH.....	80

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N°1.	Plantilla del test de Mitscher para el estriado de microorganismos.....	73
--------------------	---	----

ÍNDICE DE FOTOGRAFIAS

FOTOGRAFÍA N°1.	Escama de pescado (<i>Drymaria ovata</i>).....	25
FOTOGRAFÍA N°2.	Flor amarilla (<i>Senna macrophylla</i>).....	27
FOTOGRAFÍA N°3.	Anisillo (<i>Tagetes filifolia</i> Lag).....	29

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N°. 1	Tamizaje fitoquímico.....	97
ANEXO N°. 2	Resultados de las siembras de los extractos etanólicos y subextractos etéreo y clorofórmico de <i>Drymaria ovata</i> , <i>Senna macrophylla</i> , <i>Tagetes filifolia</i> Lag a diferentes concentraciones.....	99

INTRODUCCIÓN

En el Ecuador el uso de plantas medicinales está inmerso en la cotidianidad de sus habitantes. Se practica principalmente por habitantes de zonas rurales pero también por ciudadanos de toda clase social, en Sucumbíos la Escama de pescado (*Drymaria ovata*), Flor amarilla (*Senna macrophylla*), son utilizadas con fines medicinales para el control de infecciones cutáneas, el Anisillo (*Tagetes filifolia* Lag) crece de forma silvestre en el sector andino, donde se la utiliza en zonas rurales para aliviar el dolor de estomago.

El presente trabajo investigativo realizado en la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, tiene como objetivo principal determinar la actividad antimicrobiana de los extractos y subextractos de estos tres vegetales como son la Escama de pescado (*Drymaria ovata*), Flor amarilla (*Senna macrophylla*), el Anisillo (*Tagetes filifolia* Lag), para así demostrar científicamente que su uso tradicional en la salud es correcto.

La investigación parte de la preparación de los extractos etanólicos por maceración y subextractos etéreos y clorofórmicos de los tres vegetales por inmiscibilidad, el tamizaje fitoquímico por reacciones de coloración y la actividad antimicrobiana por 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, finalmente se leen los resultados.

Las concentraciones de los extractos probadas fueron de 10.000, 1.000 y 100 µg/mL frente a las cepas de microorganismos ATCC, los resultados son positivos pues se comprobó que los tres vegetales presentan actividad antimicrobiana, al menos frente a un

microorganismo utilizado en el estudio, dada probablemente por la presencia de metabolitos secundarios presentes en los diferentes extractos.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO.

1.1 MEDICINA NATURAL.

Natura medicatrix "la naturaleza es la que cura" definido como un método no intervencionista, dedicado a coadyuvar en el proceso espontaneo o natural de recuperación de la salud. La medicina natural es parte de la ley de la vida y constantemente colabora al bienestar del hombre, defendiendo siempre la salud y la vida ya que todo síntoma representa una actividad defensiva y salvadora del organismo, llevando en si el sello de la lucha del convencionalismo escolar. (3) (13)

La medicina natural es un concepto amplio que nos permitirá tratar una gran variedad de medicinas complementarias y alternativas, incluyendo: medicina herbaria, suplementos dietéticos, homeopatía, acupuntura, terapia neural, biomagnetismo, digitopuntura, y otras de las muchas medicinas alternativas que existen actualmente. Habla de métodos curativos o paliativos de diversas enfermedades, con prácticas que se encuentran por fuera del avance de la medicina tradicional y farmacológica. La diferencia sustancial se encuentra entre los preparados que la medicina natural emplea para los tratamientos de salud. El punto de partida de este tipo de terapias, muchas veces, es buscar el mismo principio activo de los medicamentos pero en su estado natural. De esa manera, se pueden buscar los beneficios naturales de los elementos que servirán de reemplazo del medicamento, sin tener que emplear químicos, ni otras sustancias nocivas para el organismo. Últimamente, está siendo una manera bastante habitual de tratar enfermedades y malestares, de una manera alternativa a la medicina convencional, se emplea directamente para relacionar cualquier práctica con intenciones curativas que se basen en métodos naturales, por fuera del desarrollo de la medicina y la farmacología.

Dentro de la consideración de la Organización Mundial de la Salud, medicina natural es aquella que se basa en los sistemas de la medicina tradicional y también los métodos curativos que supieron emplear los aborígenes, tiempo atrás. (58) (59)

La teoría del poder curativo de la naturaleza comenzó alrededor del siglo V y IV antes del Cristo y fue descrito por seguidores de Hipócrates y Galeno entre los años 460 y 200 A.C e históricamente se considera a Hipócrates como el padre de la medicina convencional que hoy conocemos, pero así mismo también en ser el primero en desarrollar la medicina natural con criterios científicos. La doctrina sostiene que la naturaleza dota al organismo humano con poderes internos para restaurarse a si mismo su salud. Esta teoría explica la diarrea, la inflamación y la fiebre (entre otros síntomas y signos fisiológicos) como intentos del organismo para alcanzar la homeostasis. (59) (60)

1.2 MEDICINA TRADICIONAL.

La medicina tradicional es la suma completa de conocimientos, técnicas y prácticas fundamentadas en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas y que se utilizan para mantener la salud y prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar trastornos físicos o mentales. La medicina tradicional que ha sido adoptada por otras poblaciones (distintas de su cultura de origen) suele denominarse medicina alternativa o complementaria, se viene utilizando desde hace miles de años, y sus practicantes han contribuido enormemente a la salud humana, en particular como proveedores de atención primaria de salud al nivel de la comunidad. La medicina tradicional ha mantenido su popularidad en todo el mundo. A partir del decenio de 1990 se ha constatado un resurgimiento de su utilización en muchos países desarrollados y en desarrollo. (63)

1.3 MEDICINA TRADICIONAL EN ECUADOR.

La medicina tradicional ha constituido un campo de estudio desde comienzos del siglo XX. La investigación de de la medicina tradicional se origino como parte de un creciente interés por la cultura indígena, su historia y su arqueología. Este interés por los pueblos americanos del pasado se extendió a sus herederos, los pueblos indígenas de la

actualidad, bajo el cobijo de una nueva disciplina: la etnografía o antropología cultural. Estos pueblos tienen una forma diferente de concebir la salud y la enfermedad, abordando la salud desde una visión más holística, integrando las dimensiones, física, espiritual y mental. (30) (45)

Estos pueblos conciben la salud como una preservación de la Vida, de la reproducción social de todo el grupo étnico, como una compleja red de interrelaciones de los niveles con el medio ambiente. Así pues, podemos entender el concepto de salud indígena como un estado de normalidad o de equilibrio dinámico de la persona consigo mismo, con los demás miembros de su familia o del grupo social y con su medio ambiente o los espíritus o fuerzas naturales que son presentes en la naturaleza. La enfermedad viene cuando se rompe este equilibrio y siguiendo este enfoque, la enfermedad es interpretada como el resultado de esta ruptura. En las comunidades indígenas la medicina tradicional se ha desarrollado y sobrevivido a por siglos sin ayuda y promoción ajena. (9) (45)

La cultura médica indígena es una parte inalienable de los demás aspectos de la vida social, cultural y económica de las comunidades, los mayores peligros actuales son los que amenazan la vida digna y sana de las poblaciones indígenas, tanto rurales como urbano- marginales. En la amazonia la amenaza consiste sin duda, en los cambios radicales del contexto ecológico, económico y social, sin poder contrastar la pérdida de tierras y la destrucción ambiental. (9)

Los prestadores tradicionales de salud, se formaron siguiendo la tradición de la familia o influenciados por prestadores ancestrales de grande poder o fama. La transferencia sistemática del conocimiento se inicia cuando son pequeños o descubren su vocación. Abarcan fuerzas metafísicas adquiridas durante rituales especializados, conocimientos de plantas medicinales y otros recursos terapéuticos materiales como destrezas manuales. Los prestadores tradicionales de salud están especializados según los males. El mancharishka o “espanto” requiere de entrenamiento especial por parte de las mujeres u hombres de edad. Para el mal aire, se requiere que la persona tenga un buen Sinchi o fuerza. EL Hampi-kiwankuna (hierbateros/eras), son personas que han aprendido desde niños, en el seno de la familia o de algún personaje sabio de la comunidad, la calidad de

las plantas. Su poder estriba en que tiene una relación estrechada con el espíritu de la planta es el encargado de recoger las plantas que necesita para la curación. (9) (45)

El Hampi-Yachak (hombre y mujer medicina) requiere tener años de preparación y muchos años más para declararse especialista, aprenden sobre plantas psicoestimulantes como el ayahuasca en la selva, y en la sierra el uso del guantuc plantas que les transporta al mundo espiritual. Los Yachacs son los terapeutas máximos están en capacidad de curar las enfermedades del campo, conocidas también como un mal de calle o males que se escapan de la competencia de la Medicina Occidental. El tratamiento de las enfermedades es fundamentalmente persuasivo y las plantas medicinales están siempre presentes en todo acto terapéutico. (9) (24)

1.4 FITOTERAPIA

Se define como la ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, para atenuar o para curar un estado patológico. La extensión de los conocimientos sobre diferentes hierbas medicinales le ofrece al ser humano la posibilidad de tener a su alcance otros medios para hacer frente a nuevas enfermedades, unas veces será suficiente para prevenir o curar un estado patológico, otras como coadyuvante, o simplemente como medicina paliativa de determinados síntomas. Por ello aspira a ocupar un espacio en la asistencia sanitaria, especialmente en el tratamiento de afecciones leves o moderadas y en enfermedades crónicas, no solo para huir de la yatrogenia medicamentosa, sino para enriquecer sus posibilidades terapéuticas. (14) (27) (53)

Es el estudio del interés terapéutico de las plantas, que contienen componentes activos utilizados para el tratamiento de diversas enfermedades. Estos principios activos son estudiados y extraídos por diferentes métodos. Para que una planta común tenga propiedades medicinales se deben respetar ciertas reglas de recogida, desecación, almacenamiento y finalmente la presentación final en infusiones, extractos, capsulas etc. La acción farmacológica de una determinada planta medicinal depende en la mayoría de los casos de varios principios activos y no sólo de uno aislado, existiendo sinergismos y

acciones coadyuvantes entre ellos, de modo que por lo general resulta más adecuada la acción de toda la planta en su conjunto que en la de un determinado compuesto. (27) (54)

1.4.1 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

1.4.1.1 Maceración.

Es un procedimiento para extraer los principios activos de la droga en frío a temperatura ambiente (15 – 25°C); puede utilizarse agua, alcohol, vino o aceite. La droga se debe limpiar muy bien, triturar, picar, trocear o machacar antes de ponerla en contacto con el solvente durante varios días, 24 h a semanas bien tapados, se agita periódicamente según sea necesario para favorecer la extracción de principios activos. Este proceso conocido como maceración simple o estática es sumamente lento. (10) (25)

Las desventajas son la lentitud en el proceso de maceración y no alcanzar la extracción completa de la droga, para disminuir las pérdidas del extracto en el residuo de extracción, la operación puede repetirse dos a tres veces, después de haber escurrido el solvente de la extracción anterior, disminuyendo la cantidad de extracto retenido en el residuo, pero aumenta la cantidad de solvente a ser recuperado. (25)

1.4.2 PREPARACIONES FITOTERAPÉUTICOS.

1.4.2.1 Extractos.

Son preparados farmacéuticos que por condiciones de higiene y preparación en su fabricación y envasado se realizan en laboratorios especializados, pero a nivel informativo equivale a preparar un jugo, en el que se adiciona agua destilada u otro medio y las plantas medicinales. Son fundamentales para aquellas plantas que no tienen aceites esenciales, pero si otros compuestos activos con variadas propiedades, en general son productos más diluidos que los aceites esenciales, aunque pueden ser bastante concentrados y por eso son recomendables para la fabricación de jabones, jarabes con propiedades cosmética, lociones y alimentos. (15) (16)

Por lo general se consideran tres tipos de extractos:

Los extractos fluidos que son aquellos en los que el volumen del líquido del extracto es igual al volumen de la planta seca que se haya usado, pueden utilizarse directamente en fitoterapia o bien emplearse como materia prima para la fabricación de formas farmacéuticas líquidas o sólidas. (4) (15)

Los extractos blandos son a los que se les ha retirado el agua parcialmente hasta obtener una consistencia de unguento. (15)

Los extractos secos son a los que se les ha retirado en su totalidad el agua y su apariencia es la de un polvo muy fino, estas permiten en muchos casos una dosificación más exacta que las formas líquidas y una mayor concentración de principios activos. (4) (15)

1.4.2.1.1 Extractos alcohólicos.

Se obtienen poniendo a macerar durante algún tiempo, que se recomienda sea de al menos una semana una cantidad de planta con igual peso al alcohol puro (95°). Luego de la maceración, se filtra y se conserva en botellas de vidrio, preferentemente oscuro. La administración de este tipo de preparación se efectúa por gotas. (14)

1.4.2.1.2 Factores que influyen en la Extracción.

- a. La cantidad de agua. Cuanto mayor sea la cantidad de agua, más elevado será el agotamiento de principios activos dentro de la planta.
- b. Las influencias que entre unos y otros principios activos pueden ocurrir, una vez en solución dan lugar a una mayor solubilidad o menor en otros casos.
- c. La temperatura. La infusión o el cocimiento a una temperatura cercana a los 100°C favorecen la extracción. No obstante, a veces conviene hacer la extracción con agua fría, ya que puede interesar no extraer determinados principios activos que solamente pasarían al agua con la ayuda del calor.
- d. El tiempo. La duración del contacto de la planta con el agua.

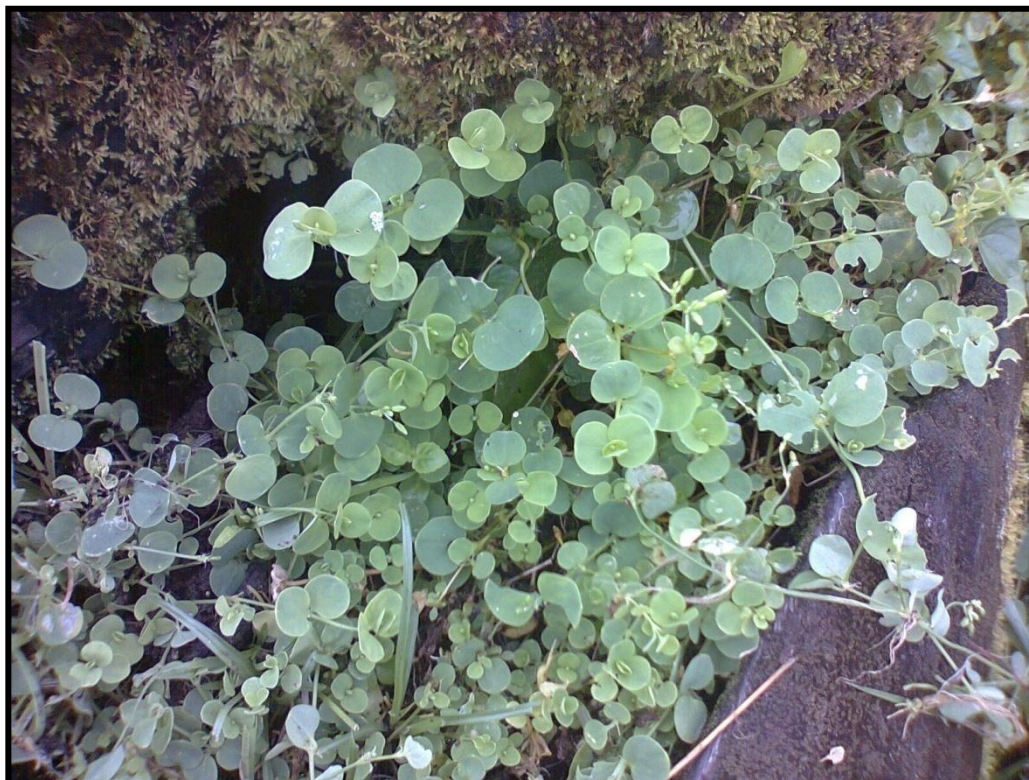
- e. El sistema empleado para la extracción.
- f. El grado de pulverización de la planta. Aumenta la extracción cuanto más troceada esté la planta, pero hasta ciertos límites a partir de los cuales pueden originarse una serie de procesos físicos que dificulten el proceso. Por otro lado, las plantas pulverizadas pueden traer otra serie de problemas.
- g. El solvente escogido debe ser lo más selectivo posible de esto depende que se puedan extraer las sustancias deseadas en una mayor cantidad, teniendo en cuenta el fitocomplejo presente en la droga debe cumplir con los siguientes requisitos:
 - Ser altamente selectivo para los compuestos a extraer.
 - Tener alta capacidad para la extracción en términos de coeficiente de saturación del compuesto en el medio.
 - No reaccionar con los compuestos extraídos o con otro componente.
 - Bajo precio.
 - No ser peligroso.
 - Ser completamente volátil. (2) (52)

1.4.3 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

El tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés.

El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacción de color y precipitación. Debe de permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente en una orientación y debe de interpretarse en conjunto con los resultados del screening farmacológico. (25)

1.5 CARACTERÍSTICAS DE LA PLANTA DE ESTUDIO ESCAMA DE PESCADO.



FOTOGRAFIA N°1 ESCAMA DE PESCADO (*Drymaria ovata*)

Pubescente Anual. Hojas ovadas, opuestas y con forma de riñón (longitud: 25-35 mm, ancho: 20-25 mm), los márgenes enteros, el ápice agudo, el pecíolo pubescente (longitud: 6 mm). Las flores blancas y los sépalos oblongos, frutos son cápsulas secas con numerosas semillas con, los pétalos bífidos, agrupadas en cimas terminales. Son plantas herbáceas caducas o perennes, de poca altura, delicadas y laxas. (47) (49)

1.5.1 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.

Drymaria es un género de plantas con flores con 115 especies, perteneciente a la familia Caryophyllaceae. Natural de América, se encuentra desde México a Perú. También en China, India, Nepal e Indonesia. La *Drymaria ovata* se encuentra distribuida por los Andes de Ecuador, Perú, Colombia. (47)

1.5.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.

Hierba anual o perenne, a menudo ramificados, raíces primarias delgadas y alargadas.

Tallos: extensas a erecto, sencillo o ramificado proximal o largo, cilíndricos.

Hojas: contrarias o que aparecen verticiladas, estípulas 2 por nodo, simples o divididas en segmentos, subuladas a filiformes, hoja 1-5-nervada, linear a lanceoladas, espatuladas, ovadas, reniforme o orbiculares, no suculentas, ápice redondeado a acuminado. Inflorescencias terminales o axilares abierto, bracteadas cimas o umbeliforme racimos o flores solitarias, axilares; brácteas emparejado, escarioso o central parte herbácea. Pedicelos: erectos a difundir o reflexos.

Flores: periantio y androceo hipogyno; sépalos 5, claros, blancos, lanceoladas a oblongo orbiculares, ovadas, herbáceo, los márgenes blancos de purpura, acuminadas escariosos, ápice a redondeadas, con capucha o no; pétalos (3 – 5), a veces ausente, blanco, garra estrecho, disminuyendo distalmente o con oblongas o expandidos, sésiles o cortas con garras- tronco, Aurículas ápice ausente, hoja dividida en 2 o 4 lóbulos; nectarios en la base de filamentos opuestos sépalos, estambres 5; filamentos separados o connados brevemente proximal; estilos 3, 2 veces, marcan proximalmente por 2 de longitud, rara vez casi distinta (*D. cordata*), filiformes, de 0.1-0.3 mm, glabro proximalmente; estigmas 3, 2 veces, lineal a lo largo adaxial superficies de estilos (o ramas).

Cápsulas elipsoides a globosos, abriendo por (2 – 3) extendiendo a recurvadas válvulas; carpóforo ausentes.

Semillas 3-25, bronceado, marrón rojizo, marrón oscuro, negro o transparente (blanco embrión visible), de herradura, concha de caracol, o en forma de lágrima, comprimido lateralmente, por lo menos en cierta medida, tuberculada, marginal ala ausente, apéndice ausente. (46)

1.5.3 CLASIFICACIÓN BOTÁNICA.

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida

Orden: Caryophyllales
Familia: Caryophyllaceae
Género: *Drymaria*
Especie: *ovata*. (42)

1.5.4 USOS.

Se reporta uso como alimento y medicina. Existe un reporte sobre sus propiedades contra tos y otro contra varias bacterias. Se propone que es una buena cobertura en café, debido a su hábito bajo. Es probable que se use como forraje, pero no se encontraron referencias. (78)

Para prevenir y curar la enfermedad del mal de ojo de los animales bovinos. (7)

Drymaria ovata en los Andes del Ecuador es conocida como guarmipoleo, la utilizan como una planta medicinal para tratar afecciones estomacales, bronquitis, espasmos e inflamaciones. (5)

1.6 CARACTERÍSTICAS DE LA PLANTA DE ESTUDIO FLOR AMARILLA.



FUENTE: <http://datos.sndb.mincyt.gob.ar/porta/species/browse/resource/80/taxon/576786/>

FOTOGRAFÍA N°3 FLOR AMARILLA (*Senna macrophylla*)

El género *Senna* está compuesto por árboles, arbustos y hierbas de hojas paripinnadas y peciolo engrosados en su base; flores amarillas o anaranjadas, conspicuas, cáliz con 3-4 lóbulos y corola zigomorfa con 5 pétalos, estambres de 4-10, fruto en legumbre plana o cilíndrica. Consta de unas 350 especies distribuidas en regiones tropicales, de las cuales muchas son usadas como ornamentales.

La mayor parte de las especies son arbustos o hierbas, las cuales crecen en sitios abiertos o como malezas en potreros. Una de las especies más abundantes es *Senna macrophylla* (K.) Irwin & Barneby, un arbusto de bordes y cañadas por debajo de los 1800 metros; sus hojas con pinnas grandes, de hasta 15 cm de longitud y con pubescencia suave, Son por lo general arbustos de ramas verdes, delgadas y arqueadas. Se cultivan en chacras. (6) (28)

1.6.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Nombres comunes: Yema de Huevo, remedio de monte, flor amarilla.

Árbol pequeño de 4m que presenta las hojas pinnadas compuestas, con estípulas setáceas, los dos pares de folíolos ampliamente ovalados con la glándula entre el par inferior, peciolo y pedúnculos de los racimos axilares puberulentos o glabros; folíolos membranáceos, ligeramente lustrosos por la haz, con venación reticulada, oblicuamente redondeada en la base, generalmente de 20-30 cm de largo y 10-15 cm de ancho, pedúnculos de 1-3 cm de largo; sépalos de 6-8 mm de largo, obtusos, los que se secan en color negruzco, pétalos de color amarillo, 16-20 mm de largo, venosos, anteras 7, ovario un poco puberulento, las flores generalmente nacen en los tallos viejos; legumbres de 25 cm de largo. (6) (8)

1.6.2 CLASIFICACIÓN BOTÁNICA

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Fabales

Familia: Fabaceae
Subfamilia: Caesalpinioideae
Género: *Senna*
Epíteto Específico: *macrophylla*
Autor Epíteto Específico: (Kunth) H.S. Irwin & Barneby. (8) (74)

1.6.3 USOS

Para curar el dolor de oídos y de cabeza, se lava la parte afectada con la infusión de la planta; y también se bebe el agua. (6)

1.7 CARACTERÍSTICAS DE LA PLANTA DE ESTUDIO ANISILLO.



FUENTE: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/tagetes-filifolia/imagenes/rama.jpg>

FOTOGRAFIA N° 2 ANISILLO (*Tagetes filifolia* Lag)

Hierba anual muy aromática de 10 a 50 cm de altura. Con olor a anís. Sus hojas 3cm largo semejan listones porque están muy divididas. Las flores están agrupadas en cabezuelas, son amarillas y se encuentran encerradas en unos tubos en las puntas de las ramas, a veces la cabezuela presenta una o dos flores con lengüeta blanca. El fruto es seco y las semillas peludas. Florece de septiembre a noviembre. Crece en caminos y potreros en regiones con bosque mesófilo. Planta silvestre que crece a las orillas de caminos, está asociada a bosques tropicales caducifolio y perennifolio, matorral xerófilo, bosques de encino, de pino y mixto de pino - encino. (29) (39)

1.7.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.

Nombre comunes usados en español: Anisillo, cirucumín, flor de Santa María, hierba anís, pericón, periquillo y manzanilla.

Hábito y forma de vida: Planta herbácea, anual, erecta.

Tamaño: Hasta de 50 cm de alto, pero generalmente entre 10 y 20 cm.

Tallo: Generalmente muy ramificado, estriado, a veces con pelillos.

Hojas: Las hojas inferiores opuestas, superiores a menudo subopuestas, pinnadas, entre 1 y 5 cm de largo y entre 0,5 y 3,5 cm. de ancho, con 3 a 19 pinnas, estas últimas lineares, más grande hasta 2 cm. de largo y 0,1 cm. de ancho, enteras o hasta con 2 pares de dientes.

Inflorescencia: Cabezuelas generalmente numerosas sobre pedúnculos de 0.5 a 2 cm de largo o a veces sésiles;

Cabezuela/Flores: Cabezuela con pequeñas flores sésiles dispuestas sobre un receptáculo plano o convexo que no presenta brácteas (páleas) sobre él; involucre (brácteas que rodean las flores) fusiforme o cilíndrico y a veces 5 angulado en la base, de tamaño desigual, unidas entre sí hasta cerca del ápice, los ápices truncados pero terminados en una punta corta y aguda, y provistas de 2 hileras de glándulas translúcidas. Flores liguladas 0 a 3, corola blanca, elíptica, de 1 a 1.5 mm de largo; flores del disco 5 a 25, corola amarilla dividida en lóbulos, de 3 a 4 mm de largo; los estambres alternos con los lóbulos de la corola, sus filamentos libres y no sobrepasan el tubo de la corola, anteras soldadas entre sí formando un tubo alrededor del estilo; el ovario ínfero.

Frutos y semillas: Aquenio con una sola semilla, linear, de 3 a 6 mm de largo, estriado, negruzco, con pelillos, vilano de 2 escamas con forma de arista, de 3 a 4 mm de largo y 2 o 3 escamas de 0.5 a 2 mm de largo, con el ápice obtuso, unidas entre sí.

Características especiales: Con olor a anís al estrujarse. (57) (72)

1.7.2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.

Comprende 151 especies descritas y de estas, solo 47 aceptadas. Originaria de México, se extiende por Centroamérica hasta Argentina. El anís habita en climas cálido, semicálido y templado, entre los 300 y hasta los 2400 msnm. (48) (57)

1.7.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA

Esta planta contiene un aceite esencial en el que se han identificado los monoterpenos citral, citrol, limoneno y tagetona; los sesquiterpenos beta-cariofileno, cedreno y alfa-humuleno; y los lignanos transanetol, estragol y el éter metílico de eugenol. En la raíz se han detectado los componentes azufrados 5-(4-acetoxi-1-butenil)-2-2'-bitienilo, 5-(but-3-en-1-inil) 2-2'-bitienilo y alfa-tertienilo. (48)

1.7.4 CLASIFICACIÓN BOTÁNICA.

Reino:	Plantae
Subreino:	Traqueobionta
Superdivisión:	Spermatophyta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Asteridae
Orden:	Asterales
Familia:	Asteraceae
Género:	<i>Tagetes</i>
Epíteto Específico:	<i>filifolia</i>
Autor Epíteto Especifico:	Lag. (57) (73)

1.7.5 USOS

1.7.5.1 Comestible

El té se consume durante las comidas, también se utiliza para batir la harina con la cual se va a preparar el pan para proporcionarle sabor; macerado en aguardiente se consume como aperitivo. Como saborizante anisado de cañas de maíz para masticar, para la elaboración de mezcal y de licor, como esencia de anís para saborizar cualquier bebida. (29) (31)

1.7.5.2 Medicinal

Se recurre a las propiedades medicinales del anís principalmente cuando hay dolor de estómago. Sugieren tomar un té de esta planta cuando se presenta el dolor. También aconsejan ingerir caliente la cocción de la parte aérea, antes de cada alimento o administrado tres veces al día a los niños cuando tienen cólicos y en cólicos menstruales. Además, esta infusión se puede emplear para tratar otros trastornos digestivos como la diarrea. El cocimiento de las hojas o del tallo se usa para los nervios, la debilidad y la tos. Aunque también para la tos y gripa se hace una cocción de las ramas, antes de dormir se toman dos tazas de té caliente y se cubre bien al enfermo para que sude.

La cocción de las hojas suele utilizarse para dar baños en general. Aunque también se aconseja ingerirla o en frotación, con la finalidad de bajar la calentura y quitar escalofríos. Para dolores corporales las hojas mezcladas con tabaco. (48) (18)

El aceite esencial se utiliza para descongestionar las vías respiratorias. (31)

1.8 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

Se define como la habilidad específica o capacidad de un producto de lograr su efecto planeado y se basa en la medición de algún atributo del producto, por ejemplo, su efecto inhibitorio frente a un determinado microorganismo (Halo de inhibición) se determina

por el método analítico más adecuado, normalmente métodos de análisis microbiológicos.

La actividad de un antibiótico puede ser demostrada mediante el efecto inhibitorio de la sustancia en cuestión cuando es evaluado frente a un microorganismo. En los análisis de potencia o actividad, se compara cuantitativamente el efecto de una muestra sobre un sistema biológico con el sistema producido por una preparación estándar en las mismas condiciones y para la cual ya se ha determinado exactamente su actividad, obteniendo así un valor de actividad relativo al del estándar de referencia. (33)

1.8.1 ANTIMICROBIANOS

Los antimicrobianos se definen, como medicamentos que destruyen los microorganismos o impiden su multiplicación o desarrollo. Son sustancias naturales producidas por microorganismos y las obtenidas por modificaciones químicas, a partir de ellas, que poseen acción tóxica selectiva sobre funciones o estructuras de otros microorganismos. Se incluyen también los compuestos obtenidos por síntesis química (quimioterápicos). (11) (35)

1.8.1.1 Agentes Antimicrobianos

Bacteriostático: impide el desarrollo del germen sin causar su destrucción, pueden multiplicarse nuevamente al desaparecer el agente.

Bactericida: producen la destrucción de los microorganismos mediante cuatro mecanismos:

- Inhibición de la pared celular (penicilinas, aminopenicilinas, carboxipenicilinas, cefalosporinas, B-lactámicos, carbapenemes.)
- Alteración de la permeabilidad celular (Polimixinas, Imidazoles, y polienos.)
- Inhibición de la síntesis de proteínas (Tetraciclinas, macrólidos, aminoglucósidos, anfenicoles, lincosamidas,)
- Inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos (sulfonamidas, quinolonas, diaminopirimidinas, ansamicinas). (34)

1.8.1.2 Resistencia a los antimicrobianos.

Es el fenómeno por el cual un microorganismo deja de verse afectado por un antimicrobiano al que anteriormente era sensible. Los microorganismos resistentes (entre ellos las bacterias, los virus y algunos parásitos) son inmunes a los efectos de los antimicrobianos, como los antibióticos, los antivíricos o los antipalúdicos, de modo que los tratamientos habituales se vuelven ineficaces y las infecciones persisten y pueden transmitirse a otras personas. La resistencia es una consecuencia del uso de los antimicrobianos, y en particular de su abuso, y surge por mutación del microorganismo o adquisición de genes de resistencia. (64)

1.8.1.2.1 Mecanismos de Resistencia

- Destrucción o inactivación enzimática.- Es la perduración de β - lactamasas, que son enzimas que actúan rompiendo la unión amiga, hidrolizando los agentes antimicrobianos
- Alteración de la membrana bacteriana.- Las bacterias Gram negativas pueden volverse resistentes a los antibióticos beta-lactámicos mediante el desarrollo de barreras de permeabilidad. Esto es usualmente provocado por porinas alteradas en la membrana externa que ya no permiten la entrada y el tránsito de las moléculas del antibiótico dentro de la célula. Cuando los beta-lactámicos no pueden alcanzar las PBPs, la célula es resistente.
- Cambios en la permeabilidad de la membrana interna.- es la alteración de la producción energética que no permite el paso del antibiótico de la capa externa a la interna de la membrana; este transito consume energía y se efectúa mediante un transportador aniónico; al alterar la bacteria este mecanismo se defiende del ataque del antibiótico.
- Alteración del blanco ribosomal.- Las PBPs tanto en bacterias Gram positivas y Gram negativas pueden ser alteradas mediante mutación de manera que los beta-lactámicos no puedan unirse a ellas; por tanto la célula es resistente a agentes antimicrobianos. Los ribosomas, la metilación del ARN ribosómico confiere resistencia a los macrólidos. ADN girasa y topoisomerasa IV, mutaciones en los

genes cromosómicos de ADN girasa y topoisomerasa IV confieren resistencia a las quinolonas.

- Modificación enzimática.- modifica los antibióticos aminoglucósidos; esta resistencia de las bacterias aeróbicas es debida al cambio enzimático codificado por el gen del plásmido o del cromosoma. Las bacterias Gram negativas pueden producir enzimas adenilantes, fosforilantes o acetilantes que modifican un aminoglucósido para inactivarlo.
- Extracción activa del antibiótico.- este mecanismo altera la producción de energía y disminuye así no solamente la entrada del antibiótico sino que a su vez las bacterias reducen la concentración del antibiótico y promueve la extracción activa del mismo y su efecto se reduce.
- Alteraciones de los precursores de la pared.- Por este mecanismo de resistencia mediado por un gen cromosomal, el peptidoglicano precursor es cambiado al modificar la terminación D - alanina por D - alanina -D- lactato y de esta manera se logra que el antibiótico no se pueda unir al precursor de la membrana. Este mecanismo se ha estudiado con vancomicina y antibióticos glicopeptídicos. (20)
(62)

1.9 CRECIMIENTO BACTERIANO.

Se refiere al número de células, no al tamaño de las células. Los microbios que están en etapa de crecimiento aumentan en cantidad y se agrupan en colonias (grupos de células lo suficientemente grandes como para ser observadas sin el microscopio) de cientos de miles de células, o poblaciones de miles de millones de células. Las poblaciones microbianas pueden tornarse increíblemente grandes en un tiempo muy corto, cuando se siembran microorganismos en un medio de cultivo apropiado, los mismos comienzan a dividirse activamente empleando los nutrientes que le aporta el medio de cultivo para "fabricar" nuevos microorganismos. Este proceso continúa hasta que algún nutriente del medio de cultivo se agota (sustrato limitante) y el crecimiento se detiene. También puede detenerse el crecimiento por acumulación de alguna substancia inhibidora formada por los mismos microorganismos. Luego hay dos aspectos claramente diferenciables que hacen al crecimiento microbiano: uno estequiométrico, por el cual la concentración final

de microorganismos obtenidos dependerá de la concentración y composición del medio de cultivo, y el otro cinético, el que dirá con qué velocidad se lleva a cabo el proceso. (26) (43)

1.9.1 REQUERIMIENTOS PARA EL CRECIMIENTO.

1.9.1.1 Requerimientos Físicos.

a. TEMPERATURA

La temperatura a crecimiento óptimo permite el crecimiento más rápido de las bacterias durante un período de tiempo, usualmente entre 12 y 14 horas. La temperatura mínima de crecimiento es aquella temperatura menor a la cual la especie puede crecer. La Temperatura de crecimiento máximo es la temperatura mayor en la cual el crecimiento es posible. Psicrófilos son microbios con afinidad por el frío son capaces de crecer a 0°C ó menos, pero crecen mejor a una temperatura mayor. Estas bacterias son capaces de crecer a 0°C, pero tienen una temperatura óptima de 15°C ó menos y una máxima de aproximadamente 20°C. Los mesófilos crecen mejor a temperaturas que fluctúan de entre 25°C a 40°C. Aquí encontramos los patógenos de humanos y animales de sangre caliente, éstos crecen mejor a 37°C. Los termófilos son bacterias que crecen a una temperatura óptima sobre los 45°C. Los termófilos extremos crecen a una temperatura mayor de 90°C. (26) (44)

b. pH.

La mayoría de las bacterias crecen mejor en un rango de pH estrecho cercano a la neutralidad (6,5 y 7,5) y muy pocas bacterias crecen en un pH ácido (debajo de 4). (26)

Los microorganismos regulan su pH interno mediante un sistema de transporte de protones que se encuentra en la membrana citoplasmática, que incluye una bomba de protones ATP dependiente. El rango de pH óptimo para el desarrollo de microorganismo

es estrecho debido a que frente a un pH externo muy desfavorable se requiere un gran consumo de energía para mantener el pH interno. (67)

c. PRESIÓN OSMÓTICA

Una presión osmótica alta causa pérdida de agua y plasmólisis de la célula, por lo que se utiliza este fenómeno para conservar los alimentos ya sea añadiendo sal o azúcar, lo que previene el crecimiento bacteriano. Algunas bacterias se han adaptado a altas concentraciones de sal, a éstas se les conoce como halófilos extremos. Los halófilos facultativos no requieren una alta concentración de sal, pero pueden crecer hasta una concentración de 2%. Otras bacterias pueden tolerar hasta un 15% de sal. (44)

1.9.1.2 Requisitos Químicos.

a. OXÍGENO

No todos los microorganismos necesitan O_2 , sin embargo, muchas formas de vida requieren oxígeno para llevar a cabo respiración aeróbica. Los microorganismos que utilizan oxígeno molecular son llamados aeróbicos. Estos se clasifican en aeróbicos obligados que son los que requieren oxígeno molecular para vivir, y los aeróbicos facultativos los cuales utilizan el oxígeno molecular cuando está presente, pero en su ausencia continúan su crecimiento por la vía de fermentación o respiración anaeróbica. (44)

b. CARBONO

La mitad del peso seco de una célula bacteriana típica es carbono. Los quimioheterótrofos obtienen la mayor parte de su carbono de la fuente de su energía, materiales orgánicos como proteínas, hidratos de carbono y lípidos. Los quimioautótrofos y los fotoautótrofos obtienen su carbono del dióxido de carbono. (47)

c. NITRÓGENO, AZUFRE Y FÓSFORO.

La síntesis de proteínas requiere cantidades considerables de nitrógeno sobre todo para formar el grupo amino de los aminoácidos, así como algo de azufre. La síntesis de DNA y RNA también requiere nitrógeno y algo de fósforo, lo mismo que la síntesis de ATP. El nitrógeno constituye cerca del 14% del peso seco de la célula bacteriana y el azufre y el fósforo juntos constituyen un 4%. (26)

1.9.2 MEDIOS DE CULTIVO

Son el material nutritivo empleado para el crecimiento de los microorganismos, los medios deben contener los elementos necesarios para permitir la multiplicación de bacterias. (19) (26)

La mayoría de las bacterias patógenas requieren nutrientes complejos similares en composición a los líquidos orgánicos del cuerpo humano. Por eso, la base de muchos medios de cultivo es una infusión de extractos de carne y Peptona a la que se añadirán otros ingredientes. (61)

1.9.2.1 Medios de cultivo líquidos.

Favorecen mucho el desarrollo y multiplicación de las bacterias porque al difundirse con estas por todo el medio encuentran con facilidad las sustancias que necesitan para nutrirse. (41)

1.9.2.2 Medios de cultivo Sólidos.

Tienen una sustancia gelificante como el agar en polvo que se disuelve por ebullición, al enfriarse convierte el medio líquido en sólido. En ellos las bacterias crecen con mayor dificultad pues los nutrientes se agotan con rapidez en el punto donde se desarrollan, son de gran utilidad para el estudio de las características de crecimiento, de la producción de hemólisis y otras peculiaridades. (11) (26)

1.9.2.3 Requerimientos Generales para el crecimiento de microorganismos.

a. DISPONIBILIDAD DE NUTRIENTES ADECUADOS

Contienen como mínimo, carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y sales inorgánicas. En muchos casos ciertas vitaminas y otras sustancias inductoras del crecimiento. Sustancias adecuadas para ejercer de donantes o captadores de electrones para las reacciones químicas, ciertos colorantes, como indicadores de ciertas actividades metabólicas o bien por sus capacidades de ejercer de inhibidores selectivos de ciertos microorganismos.

b. CONSISTENCIA ADECUADA DEL MEDIO

Un medio líquido podemos modificar su consistencia añadiendo productos como albúmina, gelatina o agar, con lo que obtendríamos medios en estado semisólido o sólido.

c. PRESENCIA (O AUSENCIA) DE OXÍGENO Y OTROS GASES

Gran cantidad de bacterias pueden crecer en una atmósfera con tensión de oxígeno normal. Algunas pueden obtener el oxígeno directamente de variados sustratos. Pero los microorganismos anaerobios estrictos sólo se desarrollarán adecuadamente en una atmósfera sin oxígeno ambiental. Los anaerobios facultativos tienen un metabolismo capaz de adaptarse a cualquier condición de oxígeno.

d. CONDICIONES ADECUADAS DE HUMEDAD

Es imprescindible para un buen desarrollo de las células vegetativas microbianas en los cultivos. Estas condiciones mínimas en las estufas de cultivo a 35-37°C proporcionan una fuente adecuada de agua que mantiene la humedad necesaria para el crecimiento de los cultivos y evita que se desecue el medio.

e. LUZ AMBIENTAL

La mayoría de los microorganismos crecen mucho mejor en la oscuridad que en presencia de luz solar. Hay excepciones como los microorganismos fotosintéticos.

f. pH

La mayoría se desarrollan mejor en medios con un pH neutro, aunque los hay que requieren medios más o menos ácidos.

g. TEMPERATURA

Los microorganismos mesófilos crecen de forma óptima a temperaturas entre 15 y 43°C. Otros como los psicrófilos crecen a 0°C y los termófilos a 80°C o incluso a temperaturas superiores (hipertermófilos). Los patógenos humanos crecen en rangos de temperatura mucho más cortos, alrededor de 37°C, y los saprofitos tienen rangos más amplios.

h. ESTERILIDAD DEL MEDIO

Todos los medios de cultivo han de estar perfectamente estériles para evitar la aparición de formas de vida que puedan alterar, enmascarar o incluso impedir el crecimiento microbiano normal del o de los especímenes inoculados en dichos medios. (41)

1.9.2.4 Siembra de microorganismos

La técnica para el aislamiento comienza preparando un inóculo de siembra, que es la deposición de una pequeña porción de la muestra en el medio o en los medios de cultivo adecuado, en función de las especies microbianas que se espera encontrar. Existen distintos métodos o tipos de siembra, en función de la muestra de partida, del medio en el que se siembra y de la finalidad del estudio. (76)

Siembra en estría: se vierte sobre una placa de Petri el medio de cultivo fundido y se deja solidificar. El objeto es obtener colonias aisladas, consiste en cargar el asa con la muestra y hacer estrías paralelas en la cuarta parte de la superficie de la placa, se quema el asa, se enfría, se gira la placa a 90° y se vuelve a estriar tocando 3 o 4 veces el área sembrada inicialmente y cubriendo otro cuarto de la placa. Por último, sin quemar el asa, se estria el resto de la superficie sin sembrar. (68)

Siembra en agar en tubo inclinado: en este caso se colocan 5 ml de medio de cultivo fundido y estéril, se inclina el tubo y se deja enfriar. En profundidad con asa de punta: se pica con el asa el cultivo a sembrar y se introduce mediante punción en el medio contenido en la parte inferior del tubo. En superficie con asa de aro: se pica con el asa el cultivo a sembrar y se esparce el mismo sobre la superficie en bisel en forma de zigzag. (68)

1.10 DESCRIPCIÓN DE LAS BACTERIAS EN ESTUDIO.

1.10.1 *Staphylococcus aureus* ATCC6538

Son cocos Gram positivos, con 1 µm de diámetro. No suelen poseer cápsula, son inmóviles, anaerobios facultativos, productores de catalasa, (enzima que hidroliza el agua oxigenada), son bastante resistentes al frío y al calor y toleran altas concentraciones de salinidad (7,5 % de NaCl). El género *Staphylococcus* posee alrededor de 30 especies. Por lo común no requieren medios enriquecidos para crecer, aunque algunas cepas excepcionales necesitan la presencia de CO₂ o factores de enriquecimiento como hemina y menadiona para su desarrollo, la mayoría de las especies crecen después de 18- 24 horas de incubación. (17) (55)

1.10.1.1 Características Macroscópicas

En medios no selectivos, el *S. aureus* presenta colonias de 1 a 3 mm de diámetro, lisas, levemente elevadas, de bordes enteros, levemente convexas y generalmente pigmentadas con un color que puede ir desde crema a 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. (51)

1.10.1.2 Patogenia

Lesiones en piel y mucosas: son las más comunes. Forúnculo: infección de un folículo piloso, una glándula sudorípara o sebácea. Orzuelo común: en la base de la pestaña. Ántrax estafilocócico: unión de varios forúnculos que alcanzan regiones más profundas. Impétigo: infección superficial de la piel conformación de pústulas y ampollas. Paroniquias: infección del tejido blando contiguo a las uñas. Infección de heridas: quirúrgicas o traumáticas.

Infecciones generalizadas (bacteriemia): se origina por el paso de la bacteria desde el foco localizado al torrente sanguíneo, lo cual puede producir una diseminación en otros órganos como endocardio, riñón, pulmones o huesos.

Infecciones localizadas en vísceras: Lesiones del aparato locomotor: la infección más común es la osteomielitis, en la que *S. aureus* es la causa más frecuente. También es frecuente la artritis infecciosa. Endocarditis: Es la infección localizada más común que se desarrolla tras una bacteriemia. Meningitis, abscesos en riñón y pulmón, abscesos epidurales, infecciones pulmonares por embolismos o aspiración, infecciones del tracto urinario bajo. (55)

Síndrome del shock tóxico: es un cuadro grave que en el pasado se ha observado asociado a la utilización de tampones vaginales por parte de mujeres jóvenes. El microorganismo prolifera en el tampón contaminado y produce la toxina del shock tóxico. El cuadro clínico está caracterizado por fiebre, hipotensión, exantema cutáneo en manos y pies, grados variables de vómitos, diarrea, falla renal, cefalea y conjuntivitis. Evoluciona al shock grave en 48 horas. También se asocia a heridas traumáticas o quirúrgicas.

Intoxicaciones alimentarias: se producen por la contaminación de alimentos, que suelen ser de elevado contenido en proteínas e hidratos de carbono como pasteles, helados y salsas, y con pH superior a 5, que permitirán un rápido crecimiento bacteriano. La mala

refrigeración y conservación hacen que el microorganismo proliferen, y si es una cepa productora de enterotoxina termoestable, la libera en cantidad suficiente como para producir intoxicación. El tiempo de incubación es corto (1 a 6 horas) y los síntomas son vómitos y diarrea de hasta 2 días de duración, en general sin fiebre, siendo normalmente de rápida recuperación. Este proceso sólo requiere hidratación y no necesita de tratamiento antibiótico. (51)

1.10.1.3 Clasificación Científica

Reino	Bacteria
Filo	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	Micrococcaceae
Género	<i>Staphylococcus</i>
Especie	<i>aureus</i> (75)

1.10.1.4 Características Bioquímicas

Catalasa	Positivo
Producción de ácido a partir de glucosa	Condiciones aeróbicas y Anaeróbicas
Manitol	Positivo
Fosfatasa	Positivo
Coagulasa	Positivo
Reducción Nitrito a nitrato	Positivo (32)

1.10.2 *Escherichia coli* ATCC 9637

Es un bacilo Gram negativo, generalmente móvil por flagelos, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, tienen forma de barra, es una habitante común de los intestinos de

todos los animales, incluyendo el de los humanos. Es quizás el microorganismo procarionte mas estudiado por el ser humano, es anaeróbico facultativo, no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa. Las cepas poseen antígenos flagelares (H), capsulares (K) y somáticos (O). (22) (40)

Los antígenos O constituyen la parte más externa de los lipopolisacáridos de la pared celular y consisten en unidades repetidas de polisacáridos, aglutinan con anticuerpos IgM. Los antígenos K son externos en relación a los antígenos O. los antígenos H se localizan sobre los flagelos y son desnaturalizados por el alcohol y el calor; aglutinan con anticuerpos anti-H, principalmente IgG. (22)

1.10.2.1 Patogenia

La *Escherichia coli* puede causar infecciones intestinales y extra intestinales generalmente graves, tales como infecciones del aparato excretor, cistitis, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía. (50)

1.10.2.2 Clasificación Científica

Reino	Bacteria
Filo	Proteo bacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	<i>Escherichia</i>
Especie	<i>coli</i> (50)

1.10.2.3 Características Bioquímicas

Glucosa	Positivo
Gas/ glucosa	Positivo
Lactosa	Positivo

SH ₂	Negativo
Citrato	Negativo
Fenilalanina desaminasa	Negativo
Indol	Positivo
Lisina descarboxilasa	Positivo
Manitol	Positivo
Movilidad	Positivo
Ureasa	Negativo (1)

1.10.3 *Salmonella gallinarum* ATCC 9184

El género salmonella corresponde a enterobacterias móviles, con flagelación peritrica no pertenecientes al grupo de los coliformes, ya que no fermenta la lactosa, no producen desaminasas y tienen un carácter más o menos patógeno según especies. Son Gram negativas, de forma bacilar y en general sus especies van a provocar infecciones febriles de carácter entérico, tipo gastroenteritis o incluso fiebres tifoideas o paratifoideas. (12)

1.10.3.1 Patogenia

La enfermedad se difunde a través de la ingestión de alimento y agua contaminada con las excreciones de aves clínicamente afectadas o portadores y por vía transovarica. Síntomas severos como, Náuseas, vómitos, calambres abdominales, diarrea, fiebre y dolor de cabeza. Consecuencias crónicas, Pueden aparecer síntomas artríticos luego de 3 a 4 semanas de iniciados los síntomas severos. Tiempo de aparición 6-48 horas. (70)

La Salmonella evade las defensas intracelulares de las células intestinales sin ser destruida y comienza a dividirse dentro de la célula. Posteriormente, pasa a la sangre y produce una infección sistémica, multiplicándose en macrófagos, y localizándose en hígado, bazo, médula ósea, etc. Se elimina por las heces, y se multiplica en el ambiente, donde es muy resistente. En caso de entrada por vía aerógena, se produce una invasión en las amígdalas y los pulmones. (71)

1.10.3.2 Clasificación Científica.

Reino	Bacteria
Filo	Proteo bacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	<i>Salmonella</i>
Especie	<i>gallinarum</i> (68)

1.10.3.3 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 (1)

1.10.4 *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031

Son bacterias Gram negativas, habita en el intestino del hombre como parte de su microbiota, son bacilos no flagelados, por lo tanto son inmóviles, pero poseen una gran capsula que les caracteriza; solo tienen antígenos O y K. Los factores de patogenicidad de este género son: la capsula, que es un factor antifagocitario, y la endotoxina de pared, que es un lipopolisacárido. Como los otros bacilos de esta familia. (21)

1.10.4.1 Características Macroscópicas.

Forma colonias de gran tamaño, mucoides (es capsulada) y de centro oscuro. (56)

1.10.4.2 Patogenia

La *Klebsiella pneumoniae*, está implicada principalmente en infecciones nosocomiales. Es el agente causal de infecciones del tracto urinario, neumonías, sepsis, infecciones de tejidos blandos, e infecciones de herida quirúrgica. Son especialmente susceptibles los pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos, neonatos, y pacientes con EPOC, diabetes mellitus o alcohólicos. También existe una fuerte teoría que la relaciona con la Espondilitis Anquilosante. (77)

1.10.4.3 Clasificación Científica.

Reino	Bacteria
Filo	Proteo bacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	<i>Klebsiella</i>
Especie	<i>pneumoniae</i> (56)

1.10.4.4 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 (1)

1.10.5 *Candida albicans* ATCC 10231

Es un comensal habitual y patógeno oportunista de la flora microbiana en las persona, encontrándose principalmente en las membranas mucosas del tracto gastrointestinal y en la vagina. También puede encontrarse en el tracto respiratorio de los individuos sanos, cultivándose en su esputo. Solo suele causar infecciones sistémicas graves en pacientes inmunocomprometidos. (23)

Tiene morfología muy parecida a la de los otros hongos de su grupo y al de las levaduras. Es un hongo dimorfo que forma largas pseudohifas, hifas y blastoconidios. Asimilan y fermentan azúcares. Numerosas clamidosporas unicelulares redondas u ovaladas, con gruesa pared refringente, situadas al final de las hifas, pseudohifas o laterales sobre los blastoconidios ovalados. (36) (37)

1.10.5.1 Características Macroscópicas.

Son colonias de crecimiento rápido, circulares, lisas, blancas o cremosas, pastosas y blandas, de bordes precisos, centro ligeramente prominente, con olor a levadura. (36)

1.10.5.2 Patogenia

Candidiasis genital, una de las más habituales, afecta a la mucosa vaginal y/o al endocervix, provocando la aparición de flujo espeso y blanquecino y la aparición de enrojecimiento, quemazón e hipersensibilidad. Es frecuente durante el embarazo debido a los cambios hormonales. Candidiasis oral se manifiesta en forma de manchas de color blanco rosado sobre la lengua, encías, mucosa oral o comisuras de los labios. Puede ser sintomática o producir dolor, ardor o mal sabor de boca. Puede causar grietas, úlceras y

hendiduras. Candidiasis esofágica, aparece en la profundidad de la garganta. Se manifiesta con dolor pectoral y dificultad para deglutir.

Onicomycosis o infección en uñas produce una lesión donde se observa un aumento en el grosor y opacidad de la uña. Provoca dolor y supuración. Candidiasis urinaria afecta normalmente a la vejiga y a la uretra, aunque también puede afectar al riñón.

Candidiasis intestinal, cuando existe una proliferación masiva de las *Candidas* que habitan el intestino. Sus principales síntomas son el estreñimiento o diarrea, indigestión, hinchazón e intolerancias a distintos alimentos. (38)

1.10.5.3 Clasificación Científica

Reino	Fungi
Filo	Deuteromiceta
Subfilo	Saccharomycotina
Clase	Saccharomycetes
Orden	Saccharomycetales
Familia	Saccharomycetaceae
Género	<i>Candida</i>
Especie	<i>albicans</i> (38)

1.10.5.4 Características Bioquímicas

Maltosa	Positivo
Sacarosa	Positivo
Trehalosa	Positivo
Galactosa	Positivo
Celobiosa	Negativo
Xilosa	Positivo
Rafinosa	Negativo
Lactosa	Negativo
Dulcitol	Negativo
Melibiosa	Negativo

Ureasa	Negativo
NO ₃ - NO ₂	Negativo
Pseudohifas	Positivo
Actidiona	R (32)

1.10.6 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Pertenece a la familia Pseudomonadaceae y es un bacilo Gram negativo aerobio con un flagelo polar. Poseen cilios que les permite adherirse a las superficies celulares. Cuando se cultiva en medios adecuados produce piocianina, un pigmento azulado no fluorescente. Muchas cepas producen también el pigmento verde fluorescente pioverdina. *Pseudomonas aeruginosa*, al igual que otras *Pseudomonas* fluorescentes, produce catalasa y oxidasa, así como amoniaco a partir de la arginina, y puede utilizar citrato como única fuente de carbono. Sus dimensiones van de 1 x 2 x 0.3 micrómetros. No afectan a individuos sanos, se comportan como oportunistas en pacientes inmunodeprimidos que han recibido antibioticoterapia, debido a que son altamente resistentes a los antibióticos. (21) (65)

1.10.6.1 Características Macroscópicas.

La morfología colonial pueden ser lisas, rugosas, mucoides y gelatinoides; en agar sangre algunas cepas presentan β hemolisis, produce un olor a uvas o nixtamal, por la producción de trimetilaminas. Producen piocianina de color azul y pioverdina, amarillo verdoso a amarillo café. También un pigmento rojo o café denominado piomelanina. (21)

1.10.6.2 Patogenia

Las *Pseudomonas aeruginosa* pueden causar diversos tipos de infecciones pero rara vez causa enfermedades graves en personas sanas sin algún factor predisponente. Coloniza predominantemente partes dañadas del organismo, como quemaduras y heridas quirúrgicas, el aparato respiratorio de personas con enfermedades subyacentes o las lesiones físicas en los ojos. Desde estos lugares puede invadir el organismo y causar

lesiones destructivas o septicemia y meningitis. Las personas con fibrosis quística o inmunodeprimidas son propensas a la colonización por *P. aeruginosa*, que puede conducir a infecciones pulmonares progresivas graves. Las foliculitis y las otitis relacionadas con el agua se asocian con ambientes húmedos y cálidos como las piscinas y bañeras de hidromasaje provoca infecciones nosocomiales. Muchas cepas son resistentes a diversos antibióticos, lo que puede aumentar su relevancia en el ámbito hospitalario. (21) (65)

1.10.6.3 Clasificación Científica

Reino	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Pseudomonadales
Familia	Pseudomonadaceae
Género	<i>Pseudomona</i>
Especie	<i>aeruginosa</i> (66)

1.10.6.4 Características Bioquímicas

Piocianina	Positivo
Pioverdina	Positivo
Desarrollo o crecimiento a 42°C	Positivo
O-F glucosa	Oxidativo o inerte
Oxidasa	Positivo
Movilidad	Positivo
Lisina decarboxilasa	Negativo
Ornitina decarboxilasa	Negativo
Arginina dehidrolasa	Positivo
Hidrólisis de la gelatina	Positivo
Ureasa	V (50% Positivo)
Reducción de nitrato (NO ₃)	Variable

Gluconato	Positivo
Glucosa	Positivo
Lactosa	Negativo
Maltosa	V- (80 % Negativo)
Fructosa	V+(80% Positivo)
Manitol	V (50 % Negativo)
Indol	Negativo
Citrato	Positivo
Catalasa	Positiva (1)

CAPÍTULO II

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 LUGAR Y PRUEBAS DE ENSAYO

La investigación se desarrolló en:

- Laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2 RECURSOS MATERIALES

2.2.1 MATERIA PRIMA.

La planta conocida como Escama de pescado (*Drymaria ovata*), se recolectó del Cantón Pto. El Carmen - Putumayo en las siguientes coordenadas, 0°06'N75°51'W, a una altitud de 300 msnm a 700 Km de la ciudad de Riobamba de la cual se recolectó toda la planta.

La Flor amarilla (*Senna macrophylla*), igualmente se recolectó en el Cantón Pto. El Carmen - Putumayo de la cual se recolectó las hojas, vainas, y flores para realizar el extracto. El Anisillo (*Tagetes filifolia* Lag), se recolectó en la comunidad Tutupala, Parroquia San Isidro del Cantón Guano a 8 Km de la ciudad de Riobamba a una altura de 2390 msnm.

2.2.2 EQUIPOS

- Rotavapor Heidolph hei-VAP advantage
- Bomba de presión GAST de pistón
- Autoclave Pelton & Crane
- Balanza analítica BOHECO
- Refrigeradora
- Congelador
- Estufa bacteriológica FANEM modelo 002 CB
- Baño María MLW WII
- Cámara Digital
- Computador
- Vortex LW Scientific
- Ultrasonido BRANSON 3510
- Microscopio OLYMPUS
- Estufa de secado Memmert
- Refractómetro
- pH metro HANNA

2.2.3 MATERIALES DE LABORATORIO

- Asas de platino
- Guantes estériles
- Mascarillas
- Gorros
- Mecheros
- Pipetas de 5, 10 mL
- Pipeta Graduada de 10 μ L
- Pipeta Graduada de 20 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
- Probeta de 50 mL
- Probeta de 100 mL
- Probeta de 500 mL
- Reverbero
- Algodón
- Rollos de gasa
- Papel aluminio
- Papel filtro
- Erlenmeyers 125, 250 mL
- Erlenmeyers 1000mL

- Vasos de precipitación 1000 mL
- Marcador permanente
- Lápiz de cera
- Tubos de ensayo 100x13 con tapas
- Tubos de Ensayo 100x75
- Tubos de Ensayo 150x15
- Papel toalla
- Termómetro
- Gradillas
- Capsulas de porcelana
- Trípodes
- Embudos de separación 250 mL
- Varilla de agitación
- Viales estériles ámbar
- Balones esmerilados de 250, 1000mL
- Balón Aforado 100mL
- Frascos ámbar 10, 30, 50 mL
- Cinta indicadora
- Cinta adhesiva
- Jeringuillas
- Cajas petri
- Aplicadores
- Pera de succión
- Puntas amarillas y azules
- Parafilm
- Fundas de tela y plásticas
- Picnómetro

2.2.4 REACTIVOS

- Agua destilada
- Alcohol (etanol 96°)
- Cloroformo
- Éter de petróleo
- Reactivos para tamizaje fitoquímico
- Suero fisiológico 0,85% (NaCl)
- DMSO
- Sulfato de estreptomicina
- Caldo de soya tripticasa MERCK
- Agar de soya tripticasa MERCK
- Agar Sauboraud MERCK
- Agar Base sangre MERCK
- Agar EMB MERCK

- Agar Manitol MERCK
- Agar SIM MERCK
- Reactivo de Ehrlich
- Agar KIA MERCK
- Agar con urea de Christensen MERCK
- Reactivo de Urea al 20%
- Agar citratado de Simmons MERCK
- Cepas ATCC

2.3 FACTORES DE ESTUDIO

Los factores de estudio de esta investigación fueron:

- Evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana del extracto etanólico y subextractos etéreo y clorofórmico de Escama de pescado (*Drymaria ovata*), Flor amarilla (*Senna macrophylla*) y Anisillo (*Tagetes filifolia* Lag).
- Reactivación de microorganismos y crecimiento en sus respectivos medios de cultivo para su análisis y comprobación de actividad frente a los respectivos extractos y subextractos.
- Observación del crecimiento o inhibición en las cepas de bacterias ATCC utilizadas, y su relación con la concentración del vegetal.

2.4 MATERIAL BIOLÓGICO

Los microorganismos ATCC utilizados son los siguientes:

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

2.5 METODOLOGÍA

2.5.1 RECOLECCIÓN

Las plantas se recolectaron en el Cantón Pto. El Carmen, el día 10 de julio del 2012 los ejemplares vegetales de Escama de pescado (*Drymaria ovata*) y Flor amarilla (*Senna macrophylla*), recolectando las que se encontraban en mejor estado. El Anisillo (*Tagetes filifolia* Lag) se recolecto en la comunidad Tutupala Parroquia San Isidro del Cantón Guano, el 3 de Julio de 2012, igualmente recolectando las plantas que se encontraban en mejor estado.

2.5.2 COMPROBACIÓN TAXONÓMICA E IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA.

Se tomaron muestras de los respectivos vegetales, del oriente como son Escama de pescado y Flor amarilla, del Anisillo de la Sierra y se coloco en papel periódico, se preno y fueron trasladadas al herbario de la ESPOCH, donde se analizo el ejemplar, que fue ratificado con ejemplares existentes en la colección dirigida por el Ing. Jorge Caranqui, Curador del Herbario.

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

- Recolectar los vegetales y eliminar impurezas y cuerpos extraños, sacudiéndola.
- Retirar todo cuerpo extraño ajeno al vegetal, hojas secas, vainas dañadas, o podridas.
- Lavar con agua abundante con una solución de hipoclorito de sodio a una concentración de 5 ppm, dejándolas sumergidas por unos 5 min aproximadamente en un recipiente con agua.
- Escurrir toda el agua posible sacudiendo el vegetal.
- Dejar secar a la sombra, por una noche extendiendo todo el vegetal sobre una superficie limpia para un secado uniforme.
- Triturar el vegetal a fragmentos de 1 cm.
- Almacenar el vegetal triturado en bolsas plásticas, evitando el contacto con la luz y humedad.

2.5.4 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO

Se lleva a cabo el siguiente procedimiento para los tres vegetales empleados en el presente trabajo.

2.5.4.1 Procedimiento

- Colocar el vegetal triturado y pesado en un recipiente de vidrio con tapa, humedecer directamente con etanol al 96°, cubrir completamente todo el vegetal con etanol, agitar, para una completa humectación. Macerar por 3- 5 días, agitándolo de 1-2 veces diarias.
- A los 3 - 5 días, transferir el material líquido filtrándolo a recipientes de vidrio ámbar con tapa, etiquetar cada recipiente.
- Dejar en refrigeración el material líquido hasta el día siguiente, filtrar con ayuda de un embudo y papel filtro, dejando impurezas y clorofilas del vegetal en el papel.
- Transferir el material líquido libre de impurezas a un balón esmerilado de 1000 mL, concentrar el extracto en el rotavapor a una temperatura de 50 °C y 165 RPM.
- Transferir el extracto concentrado a envases de vidrio ámbar estéril, cubrirlos con parafilm para evitar contaminación, codificar los envases y llevarlos a congelación hasta su utilización.

2.5.4.2 Obtención de los subextractos.

Procedimiento.

- Colocar 60 mL del extracto concentrado en un embudo de separación con tapa completamente limpio y seco.
- Anadir una alícuota de 20 mL de éter, tapar y agitar, despejar la presión de la tapa abriéndola un poco, esperar la separación de las fases, el éter y los compuestos arrastrados por su polaridad quedan en la parte superior.

- Transferir la parte etérea a un balón esmerilado pesado previamente, realizar las subextracciones hasta que el color de la fase etérea sea de la misma del solvente utilizado, aproximadamente de 4-6 alícuotas de éter añadidas.
- Llevar el volumen obtenido a concentración en rotavapor para eliminar el éter utilizado completamente en la subextracción, a una temperatura de 50 °C y 160 RPM.
- Trasvasar a un frasco ámbar y estéril el residuo obtenido de la concentración, si es líquido, si no lo es dejarlo en el balón esmerilado que fue pesado previamente.
- Sellar con parafilm los frascos, codificarlos y llevarlos a congelación hasta su utilización.
- Repetir la misma operación para la subextracción con cloroformo. La muestra sobrante en el embudo de separación es el subextracto etanólico.

2.6 MÉTODOS GENERALES PARA EL ANÁLISIS DEL EXTRACTO

2.6.1 DETERMINACIÓN DE LOS PARAMETROS ORGANOLÉPTICOS

a. DETERMINACIÓN DEL OLOR

Tomar una tira de papel filtro, introducirlo en la muestra de ensayo, percibir y determinar el olor característico que presente el extracto.

b. DETERMINACIÓN DEL COLOR

Tomar un tubo de ensayo, llenar un volumen de 3 mL, y observar su color, transparencia y si presenta o no turbidez por la presencia de partículas anotando los resultados obtenidos.

c. DETERMINACIÓN DEL SABOR

Colocar una pequeña cantidad de muestra en el borde de la palma de la mano o en el dedo índice e inmediatamente al contacto con la punta de la lengua se realiza la identificación de su sabor.

2.6.2 DETERMINACIÓN DE LOS PARAMETROS FÍSICOS

a. DENSIDAD

Pesar el picnómetro vacío y seco, posteriormente llenar con la porción de ensayo y mantenerlo a la temperatura ambiente, y se lleva el líquido al nivel empleado, limpiar el exceso y secar exteriormente el picnómetro. Pesar cuidadosamente el picnómetro con la porción de ensayo.

Se aplica la siguiente fórmula:

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

Donde:

P1: peso del picnómetro vacío (g)

P2: peso del picnómetro con muestra (g)

VP: volumen del picnómetro (mL)

b. pH

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

c. ÍNDICE DE REFRACCIÓN

Colocar sobre el prisma una gota de agua destilada, con varilla de vidrio, se ajusta el equipo seleccionando 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.

Una vez realizado el ajuste del refractómetro, se coloca una gota de la muestra de ensayo sobre el prisma de medición, se cierra el termo prisma y se enfoca la luz por medio del espejo, de modo tal que la misma incida sobre la apertura de entrada del prisma de medición y se proceda de la misma forma que con el agua.

2.6.3 ENSAYOS REALIZADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS QUÍMICOS

a. ENSAYO DE WAGNER

Para detectar la presencia de alcaloides. Se debe tomar en cuenta que si el extracto está disuelto en solvente orgánico, este debe evaporarse en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de ácido clorhídrico al 1%. A esta solución se le adiciona 2 o 3 gotas del reactivo de Wagner y se reporta los resultados.

Opalescencia (+); turbidez definida (++); precipitado abundante (+++).

b. ENSAYO DE BALJET

Para reconocer compuestos con agrupamiento lactónico, en particular cumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar resultado positivo.

Si la alícuota de la muestra a probar no está en alcohol, se debe evaporar el solvente en baño de agua y redisolverse en 1 mL de alcohol. Seguidamente, se añade 1 mL del reactivo. La prueba es positiva, cuando aparece una coloración o precipitado de color rojo respectivamente.

c. ENSAYO DE BORNTRAGER

Es útil para detectar la presencia de quinonas.

Si la alícuota no está en cloroformo debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de NaOH, KOH o amonio al 5%. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su ulterior separación. El ensayo es positivo cuando la fase alcalina (superior) se colorea de rosado o rojo, en este caso se reporta positivo.

d. ENSAYO DE LIEBERMAN – BUCHARD.

Para determinar la presencia de Triterpenos y/o esteroides, en ambos tipos debe poseer un núcleo androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6. Si la alícuota no está en cloroformo debe evaporarse el solvente en baño de agua, redisolver en 1 mL de cloroformo. Añadir 1 mL de anhídrido acético y mezclar. Añadir 2 – 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado por la pared. Un ensayo positivo tiene un cambio rápido de coloración; rosado – azul muy rápido; verde intenso – visible aunque rápido; Verde oscuro – negro – final de la reacción.

e. ENSAYO DE ESPUMA

Para determinar la presencia de saponinas tanto esteroideal como triterpenica. Si la alícuota esta en alcohol de diluye con 5 veces su volumen y se agita fuertemente durante 5 minutos. Positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2mm de altura por más de 2 minutos.

f. ENSAYO DEL CLORURO FÉRRICO

Para determinar la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. A una alícuota del extracto alcohólico se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina.

Desarrollo de una coloración rojo – vino, compuestos fenólicos en general.

Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.

Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos.

g. ENSAYO DE SHINODA

Para determinar la presencia de flavonoides. Si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen. Positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intenso en todos los casos.

h. ÁCIDO SULFÚRICO

Para determinar la presencia de chalconas dándonos una coloración roja, y leucoantocianidinas con una coloración anaranjada. Se agrega unas gotas de ácido sulfúrico concentrado a la muestra.

2.7 REACTIVACIÓN DE CEPAS MICROBIOLÓGICAS ATCC

2.7.1 PREPARACIÓN DE MEDIOS

a. PREPARACIÓN DE CALDO DE CULTIVO DE SOYA TRIPTICASA.

Pesar y preparar la cantidad suficiente de caldo soya tripticasa (TSB) y se reparten en 12 erlenmeyers de 125 mL limpios y esterilizados, con tapones de gasa y algodón.

Autoclavar a 121 °C por 30 minutos, dejar enfriar para realizar la suspensión bacteriana respectiva por duplicado.

b. PREPARACIÓN DE AGARES: BASE SANGRE, EOSINA AZUL DE METILENO, SABOURAUD Y MANITOL.

- Pesar y preparar la cantidad suficiente de acuerdo a las especificaciones para cada agar en erlenmeyers de 250 mL.
- Llevar la mezcla a ebullición hasta dilución completa y autoclavar a 121 °C por 30 minutos. Una vez esterilizados dejar enfriar hasta una temperatura de 45 – 50 °C y repartir en cajas petri. Dejar solidificar, codificar, invertir y almacenarlas en refrigeración en bolsas plásticas.
- Al agar base sangre, una vez esterilizado dejar alcanzar una temperatura de 45 – 50 °C y añadir en condiciones asépticas del 5- 10 % de sangre (se utilizo sangre humana). Homogenizar suavemente y repartir en las cajas petri.
- Preparar el agar sabouraud con una solución de concentración 0.04 ppm de cloranfenicol, añadir esta solución al agar esterilizado a una temperatura de 45- 50 °C.

c. PREPARACIÓN DEL AGAR SOYA TRIPTICASA (TSA).

Preparar lo suficiente de agar en un erlenmeyer de 500 mL, llevar a ebullición la mezcla hasta dilución completa, autoclavar a 121°C por 30 minutos.

En condiciones estériles añadir unos 6 mL de agar en tubos estériles de 100 x 13 mL, tapar e inclinar hasta que solidifiquen, guardar en refrigeración en fundas plásticas hasta su utilización.

d. PREPARACIÓN DE AGAR PARA PRUEBAS BIOQUÍMICAS.

- Preparar la cantidad suficiente de agar: hierro Kligler, SIM, Simmons Citrato y Urea en 4 erlenmeyers de 125 mL, llevar a ebullición y autoclavar a 121°C por 30 minutos.
- Repartir en tubos estériles 75 x 10 mL con tapa, inclinar en pico de flauta, excepto el SIM. Para el agar Urea dejar enfriar hasta una temperatura adecuada y colocar 1%

de reactivo de Urea al 20% estéril por filtración en membrana, repartir en tubos e inclinar.

- Dejar solidificar los tubos, codificar y almacenar en refrigeración 4°C en gradillas cubiertos con fundas plásticas.

e. PREPARACIÓN DE REACTIVO DE EHRLICH

Utilizar la siguiente fórmula:

- Para-dimetilaminobenzaldehído: 2g.
- Alcohol etílico de 95°: 190 mL.
- Ácido clorhídrico concentrado: 40 mL.

Disolver el aldehído con el alcohol y agregar lentamente el ácido con agitación constante. El reactivo es de color amarillo y se almacena protegido de la luz en un frasco ámbar previamente estéril a 4°C.

f. PREPARACIÓN DEL REACTIVO DE ÚREA

Utilizar una solución de úrea al 20%. Se Pesa 20 gramos de úrea deshidratada y disolver en 100mL de agua destilada. Se esteriliza por filtración. Almacenar protegido de la luz a temperatura de 4°C.

2.7.2 SUSPENSIÓN DE MICROORGANISMOS ATCC

Con la ayuda de hisopos estériles, tomar una pequeña cantidad de las cepas ATCC y suspender en el medio en un ángulo de 45° en cada erlenmeyer que contiene los 25 mL de caldo soya tríptica, codificar y dejar incubar a 35° C de 18 – 24 Horas.

2.7.3 SIEMBRA DE MICROORGANISMOS ATCC.

Verificar si hay crecimiento de los microorganismos reactivados por la turbidez presentada en cada erlenmeyer con los 25 mL de TSB.

Tomar una azada de cada microorganismo ATCC y sembramos:

Staphylococcus aureus - agar sangre.

Pseudomonas aeruginosa - agar sangre y EMB.

Escherichia coli, *Salmonella gallinarum*, *Klebsiella pneumoniae* – EMB.

Candida albicans – Sabouraud.

Codificar cada caja petri y incubar a 35°C por 24 horas invertida excepto la caja con el estriamiento de *Candida albicans*.

2.7.4 LECTURA DE CAJAS INCUBADAS

Después de 24 horas de realizada la siembra se procede a observar si existe crecimiento en cada caja, observándose las características macroscópicas de cada colonia, se realizan pruebas complementarias para constatar si el microorganismo obtenido es el correcto.

2.7.4.1 Procedimiento

- Para el *Staphylococcus aureus* tomar una colonia crecida en agar sangre con el asa estéril y se siembra en agar Manitol. Se deja incubar a 35°C por 24 horas. Observar si hay fermentación del manitol.
- La *Escherichia coli*, con crecimiento en EMB al igual que las otras enterobacterias, tiene un crecimiento por toda la extensión de la placa con un color verde esmeralda característico, siendo verificadas con las pruebas bioquímicas realizadas, el mismo proceso se llevo a cabo con las cajas con crecimiento de *Salmonella gallinarum* y *Klebsiella pneumoniae*.
- Para *Candida albicans* el crecimiento en agar Sauboraud es muy marcada y su característica macroscópica muy clara de sus colonias, también su olor característico, para lo cual se realiza un fresco y Gram observando sus características.
- Para *Pseudomonas aeruginosa* que se sembraron en agar Sangre y EMB, presentan un crecimiento en toda la extensión de la placa, con morfología característica en su crecimiento y olor, se realizan pruebas bioquímicas para su respectiva confirmación.

- Para realizar las pruebas bioquímicas se toma una colonia crecida en EMB con la ayuda de una aguja de inoculación esterilizada, y se procede a sembrar en cada batería de tubos por duplicado, en Kligler y Indol se realiza siembra en profundida y estriamiento en la superficie del pico de flauta, en Citrato y Urea , se realiza solo siembra en el pico de flauta del tubo con el medio, los tubos se incuban a una temperatura de 35°C semi-tapados por 18-24 horas, después de este tiempo revisar los tubos y anotar los resultados obtenidos.

2.7.5 ALMACENAMIENTO DE CEPAS ATCC REACTIVADOS

Después de haber obtenido un crecimiento adecuado de las cepas ATCC reactivadas, con la ayuda de una asa estéril , tomar una asada de una colonia directamente del Agar, para *S. aureus* tomar del agar Manitol donde presento fermentación, para *E. coli*, *S. gallinarum*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* tomar una asada directamente del medio EMB, al igual que para *C. albicans* se toma una asada de Agar Sauboraud, y se proceden a sembrar en tubos Slant de TSA, codificar y incubar por 18-24 horas a 35°C. Al día siguiente se observa si hay crecimiento y almacenar, tapando herméticamente cada tubo cubriéndolos con parafilm, codificar cada uno, colocarlos en una gradilla, cubrirlos con una bolsa de plástico y en refrigeración.

2.8 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE MITSCHER.

2.8.1 PREPARACIÓN DE MEDIOS. (Día 1)

a. PREPARACIÓN DE SUERO FISIOLÓGICO (0,85%)

Preparar 250 mL de suero fisiológico al 0,85% y colocar en un envase de tapa rosca, seca y libre de impurezas que proteja al producto de la luz. Autoclavar a 121°C por 30 minutos, semi-tapado de manera que el vapor esterilice el producto. Mantener en refrigeración a 4°C hasta el momento de su uso.

b. ESTERILIZACIÓN DE MATERIALES

Esterilizar y preparar el material necesario para realizar el ensayo por triplicado, colocar en fundas de tela y embalados en papel los necesarios. Autoclavar a 121 °C durante 30 minutos.

Mantener el material esterilizado en la estufa de esterilización vía seca hasta su utilización.

2.8.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ENSAYO (Día 2)

a. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO PARA EL ENSAYO

Tomar los extractos obtenidos y mantenidos en congelación, colocarlos en viales estériles y pesar con la ayuda de una balanza analítica anotando resultados. Con la ayuda de un aplicador, pesar con precisión 40mg de extracto en los viales.

A estos 40mg de extracto añadir 400µL de DMSO y disolver por ultrasonido durante 5 minutos.

Codificar el vial con el nombre de la planta correspondiente y dilución.

b. PREPARACIÓN DE CALDO SOYA TRIPTICASA (TSB)

Preparar una cantidad suficiente de caldo Soya Trípica (TSB) y repartir 25mL en 12 erlenmeyers individuales de 125 mL previamente estériles y autoclavar a 121°C por 30 minutos.

c. PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN BACTERIANA

Staphylococcus aureus ATCC 6538

Escherichia coli ATCC 9637

Salmonella gallinarum ATCC 9184

Klebsiella pneumoniae ATCC 10031

Candida albicans ATCC 10231

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

- Dejar enfriar los erlenmeyers con TSB y codificar cada uno con el nombre de los microorganismos ATCC (hacerlo por duplicado de la misma cepa)
- Con la ayuda de aplicadores estériles tomar una asada de microorganismos ATCC de los tubos inclinados de TSA y transferirlos a los erlenmeyers codificados.
- Incubar a 35°C por 18-24 horas.

d. PREPARACIÓN DE AGAR SOYA TRIPTICASA (TSA)

Preparar la cantidad suficiente de agar soya trípica (TSA) 820 mL y repartir 15mL en 54 tubos 25X150 mm de pírex individuales cada uno con su tapa o tapón, previamente esterilizados. Autoclavar a 121°C por 15 minutos. Mantener a 45°C en baño maría hasta el momento de usarlos.

e. PREPARACIÓN DE CAJAS PETRI CON EL EXTRACTO Y SUBEXTRACTOS.

- Iniciar con el vial de la disolución del extracto en DMSO, codificar con el nombre del extracto de la planta. Cuya concentración final del extracto fue 10.000 µg/mL. El estudio es por triplicado por lo tanto el mismo procedimiento hacemos tres veces.
- Codificar las cajas Petri estériles con el nombre del extracto, la concentración final y el tratamiento (tres cajas para cada concentración 10.000, 1000, 100 µg/mL). Realizar 3 concentraciones 10.000, 1.000 y 100 µg/mL solo para los extractos etanólico de cada vegetal. Para los subextractos preparar una sola concentración de 10.000 µg/mL.
- En los tubos con TSA estéril a 45 ° C, adicionar 100µL de la disolución del extracto en DMSO, mezclar con ayuda del vortex e inmediatamente dispensar en una caja petri codificada y dejar solidificar.

- Realizar una dilución a 1/10, utilizando tubos de ensayo de 75x100 limpios, secos y estériles a los que se debe añadir 900 μL de DMSO y 100 μL del extracto de la concentración 10.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dando una concentración final de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- Pipetear 100 μL de la disolución de concentración 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a los tubos 25x150mm pírrex que contenían 15 ml de TSA 45°C. Mezclar con la ayuda de un vortex e inmediatamente se pasaron a las cajas Petri previamente codificadas con el nombre del extracto y de la concentración y tratamiento.
- Dejar solidificar.
- Realizar otra dilución 1/100 en tubos de ensayo de 75x100 limpios, secos y estériles a los que se ha añadido 900 μL de DMSO y 100 μL del extracto de la concentración 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, obteniendo una concentración final de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- Pipetear 100 μL de la dilución de concentración 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a los tubos 25x150mm pírrex grandes que contenían 15 ml de TSA 45°C. Mezclar en el vortex e inmediatamente dispensar en las cajas petri previamente codificadas.
- Dejar solidificar los medios con los extractos a diferentes concentraciones y subextractos, invertir las cajas y guardar a temperatura ambiente en bolsas de tela por 18- 24 horas.

f. PREPARACIÓN DE CAJAS CONTROL DE SULFATO DE ESTREPTOMICINA

- Colocar una pequeña cantidad de agua estéril en el balón de 10mL limpio, seco y estéril.
- Pesar con precisión 100 mg de sulfato de estreptomicina y disolver en el agua estéril colocado en el balón de 10 mL limpio, seco y estéril y aforar con el mismo disolvente. Esta solución no se esteriliza en autoclave, si es necesario una esterilización adicional, se puede realizar por ultrafiltración. La concentración final fue de 10000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ equivalente a 1000 $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$.
- Utilizar tubos de ensayo 75 x 100 limpios, secos y estériles, realizar 6 diluciones 1:2 $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$, $\frac{1}{32}$, $\frac{1}{64}$ (Ej. 500 μL de solución de sulfato de estreptomicina + 500 μL de agua estéril). Concentraciones finales 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.

- Codificar 21 cajas petri estériles con el nombre de control estreptomycinina y las concentraciones finales: 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y el tratamiento.
- Pipetear separadamente 100 μL de las diluciones de sulfato de estreptomycinina a los tubos de ensayo que contienen 15 mL de TSA a 45°C. Se mezclaron con la ayuda de un vortex e inmediatamente se pasaron a las cajas petri previamente codificadas.
- Dejar solidificar el medio de cultivo que contiene las diluciones de los controles de sulfato de estreptomycinina, invertir y dejar a temperatura ambiente por 18-24 horas cubiertos por bolsas de tela.

g. PREPARACIÓN DE CAJAS BLANCO

- Se codifican 6 cajas petri estériles con el nombre de blanco (3cajas TSA, 3DMSO).
- Se tomaron tubos de TSA 45°C e inmediatamente se colocaron en las cajas petri previamente codificadas con el nombre blanco TSA. Dejar solidificar.
- Se pipetearon 100 μL de DMSO a los tubos que contenían TSA 45°C. Se mezclaron con la ayuda de un vortex e inmediatamente se dispensaron a las cajas petri previamente codificadas con el nombre blanco y blanco con DMSO. Dejar solidificar.
- Guardar los medios de cultivo que contienen los blancos, invertirlos y dejar a temperatura ambiente durante 18-24 horas recubiertos por bolsas de tela.

2.8.3 PREPARACIÓN DE LA SIEMBRA (Día 3)

a. PREPARACIÓN DE CAJAS PETRI

- Las cajas petri preparadas en el día 2 no deben tener contaminación alguna, si la tienen, se desechan y se debe repetir su preparación con más cuidado.
- Todas las cajas petri se deben dividir con marcador en seis partes iguales y marcar del 1 al 6, representando cada uno a los microorganismos testados.

b. PREPARACIÓN DE SUSENSIONES SALINAS DE LOS MICROORGANISMOS

- Colocar 10mL de suero fisiológico en 4 tubos de 15x150 limpios, secos y estériles. Mantener a temperatura ambiente y codificar con el nombre de cada microorganismo.
- Sacar los erlenmeyer incubados por 24 horas desde el día anterior a 35°C, debiendo estar visiblemente turbios, y mezclar ligeramente para evitar sedimentos, a partir de éstos se realizar las suspensiones de los microorganismos.
- Pipetear 100 µL de la suspensión turbia, a los tubos que contenían los 10mL de suero fisiológico 0,85%. Mezclar con ayuda de un vortex. Siendo éstas las suspensiones:

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
100 µL susp. /10 mL sol. Salina
2. *Escherichia coli* ATCC 9637
100 µL susp. /10 mL sol. Salina
3. *Salmonella gallinarum* ATCC 9184
100 µL susp./10mL sol. Salina
4. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031
100 µL susp./10 mL sol salina
5. *Candida albicans* ATCC 10231
1mL susp. /10mL sol. Salina
6. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
100 µL susp. / 10 ml sol. Salina

c. ESTRIADO DE MICROORGANISMOS

Partir de las suspensiones de los microorganismos en la solución salina y utilizando varias asas de platino (4 asas microbiológicas con una capacidad de 5 µL) esterilizadas y enfriadas entre un estriado y otro, tomar una asada de cada microorganismo en su turno y se estrió en un patrón radial en cada caja petri, a 0,5cm del borde la caja y del centro de la misma, siguiendo la plantilla.

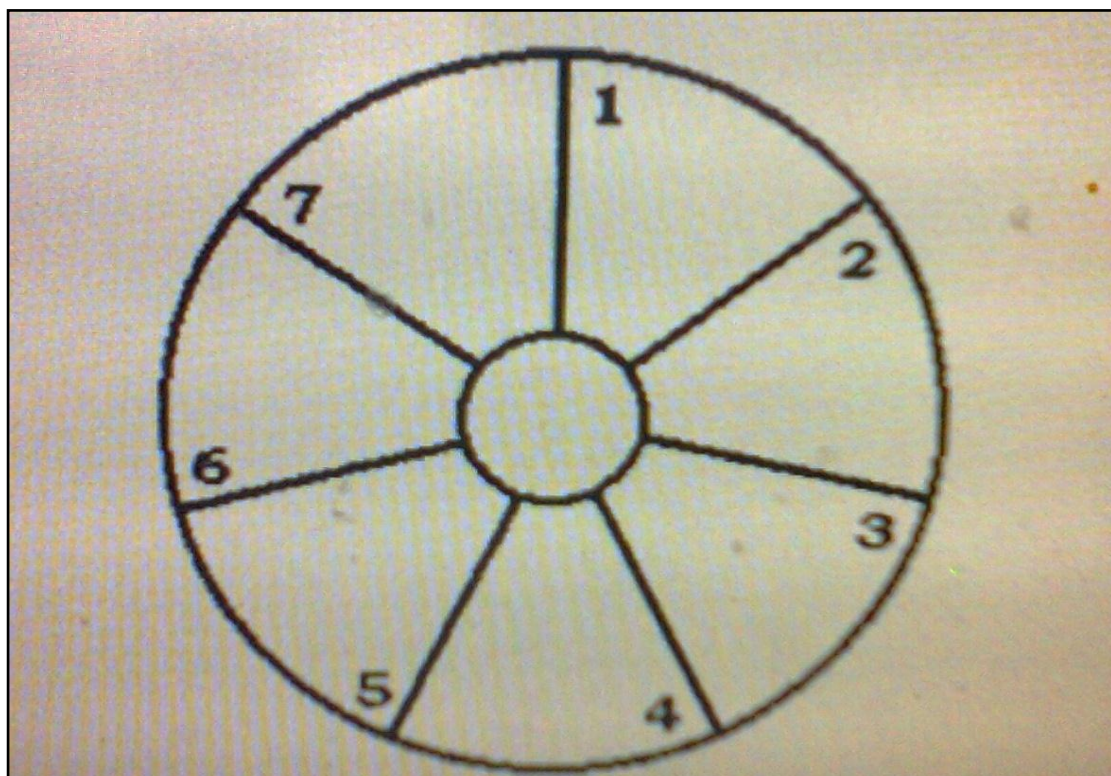


FIGURA Nº1. PLANTILLA DEL TEST DE MITSCHER PARA EL ESTRIADO DE MICROORGANISMOS

- Las suspensiones de los microorganismos se deben agitar en el vortex después de cada 5 aplicaciones para evitar que sedimenten los microorganismos.
- Comenzar en orden el estriamiento de acuerdo a las diluciones y terminar la estriación del microorganismo en todas las cajas antes de empezar con el siguiente.
- Estriar las cajas con todos los microorganismos invertir y incubar a 35°C por 18-24 horas. Se incuban boca abajo para evitar que gotas de agua condensada puedan caer sobre los microorganismos y dispersen su crecimiento. Es necesario dejar incubar por 18-24 horas más, es decir total 48 horas.

2.8.4 LECTURA DE RESULTADOS (Días 4 y 5)

- Examinar las cajas en el 4 y 5 día comparándolo con los blancos
- Si todos los cultivos crecieron, el examen es válido. Si alguno no creció se debe, reincubar y leer el día cinco.

- Sacar las cajas petri de la incubadora y examinar, es más apropiado realizar la lectura al quinto día (especialmente por el crecimiento de *Candida albicans*).
- 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 COMPROBACIÓN TAXONÓMICA E IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA

La comprobación taxonómica e identificación botánica fue realizada por el Ing. Jorge Caranquí, Curador encargado del Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

3.2 ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS

3.2.1 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS ORGANOLÉPTICOS DE LOS EXTRACTOS.

CUADRO N° 1. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE CALIDAD PARA LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *Drymaria ovata*, *Senna macrophylla*, *Tagetes filifolia* Lag. LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA MAYO 2012

PARAMETRO	<i>Drymaria ovata</i>	<i>Senna macrophylla</i>	<i>Tagetes filifolia</i> Lag
Olor	Dulce	Dulce	Dulce
Color	Amarillo	Café claro	Amarillo – rojizo
Aspecto	Turbio, pegajoso	Turbio, pegajoso	Turbio
Sabor	Picante	Dulce	Amargo
pH	5,05	5,10	3,88
Densidad (g/mL)	1,114	1,079	1,194
Índice de Refracción	1,3545	1,357	1,381

3.2.2 TAMIZAJE FITOQUÍMICO.

CUADRO N° 2. DETERMINACIÓN DE GRUPOS DE COMPUESTOS PRESENTES EN LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *Drymaria ovata*, *Senna macrophylla*, *Tagetes filifolia* Lag. LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA MAYO 2012

ENSAYO	GRUPO	<i>Drymaria ovata</i>	<i>Senna macrophylla</i>	<i>Tagetes filifolia</i> Lag
WAGNER	Alcaloides	-	-	-
ESPUMA	Saponinas	-	+	-
FeCl ₃	Fenoles y Taninos	+	-	-
H ₂ SO ₄	Chalconas	-	-	+
SHINODA	Flavonoides	+	+	+
BORNTRAGER	Quinonas	+	+	+
BALJET	Lactonas	+	-	+
M. BETOLO	Flavonas	-	-	+
LIEBERMAN	Triterpenos	-	+	-
BUCHARD	Esteroides			
SUDAN III	Lípidos, aceites esenciales	-	-	+
ROSENTALER	Saponinas triterpénicas	-	+	-

Se determino en los extractos etanólicos los grupos fitoquímicos siguientes: Quinonas, Fenoles y/o Taninos, Flavonoides y Lactonas en *Drymaria ovata*; Saponinas, Flavonoides, Quinonas, Saponinas triterpénicas, Triterpenos y Esteroides en *Senna macrophylla* ; Chalconas , Flavonoides, Quinonas, Lactonas, Flavonas, Lípidos y aceites esenciales en *Tagetes filifolia* Lag.

3.3 IDENTIFICACION DE MICROORGANISMOS ATCC.

CUADRO N°3. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARA *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA JUNIO 2012

PARÁMETRO	OBSERVACIÓN
CRECIMIENTO	Agar sangre
ASPECTO EN PLACA	Colonias grandes de más 1mm, cremosas
PIGMENTACIÓN DE COLONIAS	Amarillas doradas
FERMENTACIÓN MANITOL	Positivo
COLORACIÓN GRAM	Gram positivo
MORFOLOGIA MICROSCÓPICA	Masas en racimos y redondas
CATALASA	Positiva

El microorganismo cumple con las pruebas de identificación expuestas para su confirmación.

CUADRO N°4. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARA *Candida albicans* ATCC 10231. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA NOVIEMBRE 2010

PARÁMETRO	OBSERVACIÓN
CRECIMIENTO	Agar sabouraud
ASPECTO EN PLACA	Colonias de color blanco con olor a levadura - fermentado
MORFOLOGÍA EN FRESCO	Esporas de hongo ovaladas en racimos
COLORACIÓN GRAM GOTA FRESCA	Esporas azules (violeta-morado)

El microorganismo cumple con las pruebas de identificación para *Candida albicans*.

CUADRO N°5. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARA *Escherichia coli* ATCC 9637, *Salmonella gallinarum* ATCC 9184, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA JUNIO 2012

OBSERVACIÓN				
PARÁMETRO	<i>E. coli</i>	<i>S. gallinarum</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>
CRECIMIENTO	EMB	EMB	EMB	EMB
OXIDASA	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
ASPECTO EN PLACA	Colonias verdes brillantes	Colonias de color oscuro	Colonias mucoides, moradas.	Colonias pigmento azul- verdoso
GRAM	Gram negativos	Gram negativos	Gram negativos	Gram negativos
MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA	Bacilos rectos, pequeños	Bacilos rectos, cortos.	Bacilos cortos, rectos	Bastones delgados, unidos o cadenas
GLUCOSA	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
GAS/GLUCOSA	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
LACTOSA	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
SH ₂	Negativo	Positivo	Negativo	No aplicable
CITRATO	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
INDOL	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
MOVILIDAD	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
UREASA	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo

Todos los microorganismos cumplen con las pruebas de identificación expuestos para su confirmación.

3.4 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

CUADRO N°6. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA MEDIANTE TEST DE MITSCHER DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *Drymaria ovata*, *Senna macrophylla* y *Tagetes filifolia* Lag. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO 2012

EXTRACTOS ETANÓLICOS									
E. ETANÓLICOS	<i>Drymaria ovata</i>			<i>Senna macrophylla</i>			<i>Tagetes filifolia</i> Lag		
CONCENTRACIONES µg/mL									
Microorganismo	10.000	1.000	100	10.000	1.000	100	10.000	1.000	100
<i>S. aureus</i> ATCC6538	I	I	I	I	I	I	I	I	I
<i>E. coli</i> ATCC 9637	I	I	I	I	I	I	I	I	I
<i>S. gallinarum</i> ATCC 9184	I	I	I	I	I	I	I	I	I
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031	I	I	I	I	I	I	I	I	I
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	A	I	I	I	I	I	P	I	I
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	I	I	I	I	I	I	I	I	I

A: activo; P: parcialmente activo; I: inactivo.

Se comprueba la actividad para *Candida albicans*, del extracto etanólico de *Drymaria ovata* a una concentración de 10.000 µg/mL, e inactividades para el resto de microorganismos a concentraciones de 10.000, 1.000, 100 µg/mL.

Se comprueba que el extracto etanólico de Flor amarilla (*Senna macrophylla*), a concentraciones de 10.000, 1.000, 100 µg/mL es prácticamente inactivo para todos los microorganismos de prueba.

Los resultados expresados demuestran que el Anisillo (*Tagetes filifolia* Lag), es parcialmente activo contra *Candida albicans* a una concentración de 10.000 µg/mL e inactivo a concentraciones de 1.000 y 100 µg/mL.

CUADRO N°7. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA MEDIANTE TEST DE MITSCHER DE LOS SUBEXTRACTOS DE *Drymaria ovata*, *Senna macrophylla* y *Tagetes filifolia* Lag. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO 2012

SUBEXTRACTOS

	<i>Drymaria ovata</i>			<i>Senna macrophylla</i>			<i>Tagetes filifolia</i> Lag		
	Etéreo	Clorofórmico	Etanólico	Etéreo	Clorofórmico	Etanólico	Etéreo	Clorofórmico	Etanólico
CONCENTRACIÓN 10.000 µg/mL									
<i>S. aureus</i> ATCC6538	I	I	I	I	I	I	A	I	I
<i>E. coli</i> ATCC 9637	I	I	I	I	I	I	I	I	I
<i>S. gallinarum</i> ATCC 9184	I	I	I	I	I	I	I	I	I
<i>K. pneumonia</i> ATCC 10031	I	I	I	I	I	I	I	I	I
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	A	A	A	I	P	I	A	P	P
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	I	I	I	I	I	I	I	I	I

A: activo; P: parcialmente activo; I: inactivo.

Se determino que los subextractos de Escama de pescado (*Drymaria ovata*) demuestran actividad frente a *Candida albicans* a concentraciones de 10.000 µg/mL y son inactivos contra los demás microorganismos de prueba.

El subextracto clorofórmico de Flor amarilla (*Senna macrophylla*), a concentraciones de 10.000 µg/mL demuestra actividad parcial contra *Candida albicans* se inactividades de los subextractos etéreo y etanólico a 10.000 µg/mL de concentración.

Se observa que si existe actividad antimicrobiana del subextracto Etéreo del Anisillo (*Tagetes filifolia* Lag) a concentraciones de 10.000 µg/mL frente a *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* también se registra actividad parcial de los subextractos clorofórmico y etanólico frente a *Candida albicans* a concentraciones de 10.000 µg/mL.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES

1. Los extractos etanólicos y subextractos de la Escama de pescado (*Drymaria ovata*), Flor amarilla (*Senna macrophylla*) y Anisillo (*Tagetes filifolia* Lag) presentan actividad antimicrobiana en al menos un microorganismo según el método de Mitscher a concentraciones de 10.000 µg/mL, motivo por el cual la hipótesis planteada es válida. Cuadro N° 6, N°7.
2. Los extractos etanólicos se obtuvieron por maceración de los vegetales frescos, y fueron concentrados, presentaron las siguientes características: *Drymaria ovata* líquido turbio pegajoso, amarillo, dulce, de sabor picante, pH 5,05, densidad 1,114 g/mL e índice de refracción de 1,354; *Senna macrophylla*, líquido turbio pegajoso, café claro, con olor y sabor dulce, pH 5,1, densidad 1,079 g/mL e índice de refracción 1,357; y *Tagetes filifolia* Lag, líquido turbio, color amarillo rojizo, olor dulce y sabor amargo, pH 3,88, densidad 1,194 g/mL e índice de refracción de 1,381. Cuadro N° 1.
3. Los grupos fitoquímicos determinados en los extractos etanólicos fueron para *Drymaria ovata*: Quinonas, Fenoles y/o Taninos, Flavonoides y Lactonas; para *Senna macrophylla* : Saponinas, Saponinas triterpénicas, Flavonoides, Quinonas, Triterpenos y Esteroides; finalmente para *Tagetes filifolia* Lag se determinó la presencia de grupos fitoquímicos como: Chalconas, Flavonoides, Quinonas, Lactonas, Flavonas, Lípidos y aceites esenciales. Cuadro N° 2.

4. Los resultados de la actividad antimicrobiana utilizando el Test de Mitscher fueron: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538: actividad en el subextracto etéreo de *Tagetes filifolia* Lag a 10.000 µg/mL de concentración.

Candida albicans ATCC 10231: Actividad en el extracto etanólico y subextracto etéreo y clorofórmico de *Drymaria ovata* y en el subextracto etéreo de *Tagetes filifolia* Lag a concentraciones de 10.000 µg/mL. También presentó actividad parcial en el extracto etanólico y subextracto clorofórmico de *Tagetes filifolia* Lag a concentraciones de 10.000 µg/mL. Actividad parcial en extracto clorofórmico de *Senna macrophylla* a concentraciones de 10.000 µg/mL.

Los extractos etanólicos y subextractos etéreo y clorofórmico de la Escama de pescado (*Drymaria ovata*), Flor amarilla (*Senna macrophylla*) y Anisillo (*Tagetes filifolia* Lag) no presentaron actividad frente a *Escherichia coli* ATCC 9637, *Salmonella gallinarum* ATCC 9184, *Klebsiella Pneumoniae* ATCC 10031 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 a concentraciones de 10.000, 1.000 y 100 µg/mL. Cuadro N° 6, N°7.

CAPÍTULO V

5. RECOMENDACIONES

- 1.** Realizar otros estudios ya que se trata de plantas con muy poca información de estudios que se han realizado en el país, ya que pueden presentar otro tipo de actividad farmacológica.
- 2.** Realizar estudios para determinar qué principio activo otorga la propiedad de los efectos antimicrobianos encontrados, conocer qué principios activos se encuentra en mayor cantidad en las plantas.

CAPÍTULO VI

6. RESUMEN

Se determinó la actividad antimicrobiana del extracto etanólico y subextractos etéreo y clorofórmico de la Escama de pescado (*Drymaria ovata*), Flor amarilla (*Senna macrophylla*) y Anisillo (*Tagetes filifolia* Lag).

Se obtuvieron los extractos etanólicos por maceración y fueron concentrados en rotavapor. Los subextractos se extrajeron por inmiscibilidad utilizando embudos de separación y solventes como éter y cloroformo. Por reacciones de coloración y precipitación se comprobó la presencia de Quinonas, Fenoles, Taninos, Flavonoides, Lactonas, Saponinas, Triterpenos y Esteroides, Chalconas, Flavonas, Lípidos y aceites esenciales. Aplicando el método de Mitscher se determinó la actividad antimicrobiana de los extractos y subextractos frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella gallinarum* ATCC 9184, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 9637 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

El extracto etanólico y los subextractos etéreo y clorofórmico de *Drymaria ovata* es activo para *Candida albicans* ATCC 10231, a una concentración de 10.000 µg/mL. El Subextracto Clorofórmico de *Senna macrophylla* es parcialmente activo frente a *Candida albicans* ATCC 10231 a una concentración de 10.000 µg/mL. El Extracto etanólico de *Tagetes filifolia* Lag presenta actividad parcial frente a *Candida albicans* ATCC 10231 a concentración de 10.000 µg/mL. El subextracto Etéreo a una concentración de 10.000 µg/mL es activo sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Candida albicans* ATCC 10231. El subextracto clorofórmico presenta actividad parcial frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Candida albicans* ATCC 10231 a una concentración de 10.000 µg/mL.

Se comprobó que los extractos etanólicos y subextractos etéreos y clorofórmicos de los vegetales estudiados presentan actividad antimicrobiana, se recomienda continuar los estudios para determinar otra actividad farmacológica.

ABSTRACT

This study is about the Determination of the Antimicrobial activity of ethanol extract and chloroform, and chloroform, and ether sub-extracts of fish scale (*Drymaria ovata*), Yellow flower (*Senna macrophylla*), and Wild anise (*Tagetes filifolia* Lag).

The ethanol extracts were obtained through maceration, and were concentrated with a rotary evaporator. The sub-extracts were extracted by immiscibility using separating funnels, solvents such as ether and chloroform. The presence of Quinones, Phenols, Tannins, Flavonoids, Lactones, Saponines, Triterpenes and Steroids, Chalcones, Flavones, Lipids and essential oils was determined by color and precipitation reactions. By applying the method of Mitscher antimicrobial activity was determined in extracts and sub-extracts against *Staphylococcus aureus* ATCC (American Type Culture collection) 6538, *Salmonella gallinarum* ATCC 9184, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 9637 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Ethanol extract and ethereal and chloroform sub-extracts of *Drymaria ovata* is active for *Candida albicans* ATCC 10231 at 10.000 µg/mL concentration. The chloroformic sub-extract of *Senna macrophylla* is partially active against *Candida albicans* ATCC 10231 at 10.000 µg/mL concentration. Ethanol extract of *Tagetes filifolia* Lag presents partial activity against *Candida albicans* ATCC 10231 at 10.000 µg/mL concentration. Ethereal sub-extract at 10.000 µg/mL concentration is active on *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Candida albicans* ATCC 10231. The chloroform sub-extract present partial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Candida albicans* ATCC 10231 at 10.000 µg/mL concentration.

It was proven, then that ethanol extracts and ethereal and chloroformic sub-extracts from the studied vegetables show an antimicrobial activity, it is recommended to continue doing different studies in order to determine other pharmacological activity.

CAPÍTULO VII

7. BIBLIOGRAFÍA

1. **ÁLVARES, V., y otros.**, Manual de Técnicas en Microbiología Clínica., Barcelona - España., 1990., Pp. 74 – 75, 76 -78.
2. **BAGUÉ, A., Y ALVAREZ, N.**, Tecnología Farmacéutica., Alicante - España., Editorial Club Universitario., 2012., Pp. 113 -114.
3. **BUENO, J.**, La Medicina Natural De Lezaeta Paso a Paso., México DF., Pax México., 2002., Pp. 3-4.
4. **CASTILLO, E., Y MARTINEZ, I.**, Manual de Fitoterapia., Barcelona – España., Elsevier Masson., 2007., Pp. 63
5. **CERON, E.**, Plantas Medicinales de los Andes Ecuatorianos., Quito – Ecuador., Herbario Alfredo Paredes (QAP)., 2006., P. 289.
6. **CERÓN, C.**, Etnobiología de los Cofanes de Dureno., Quito - Ecuador., Abya Yala., 1995., Pp. 91-93.
7. **CUEVA, K., Y GROTEN, U.**, Saberes y Practicas Andinas., Quito – Ecuador., Ecompar., 2010., P. 18.
8. **ESCOBAR, E.**, Presentación de Yotoco “Reserva Natural” Flora: Plantas Vasculares., Palmira - Colombia., Litotamara., 2001., P. 129.

9. **FERNÁNDEZ, G.**, 2006., Salud e Interculturalidad en América Latina., Quito - Ecuador., Abya Yala., Pp. 418 - 426.
10. **FONNEGRA, R., Y JIMENEZ, S.**, Plantas medicinales aprobadas en Colombia., 2ª. ed., Medellín., Universidad de Antioquia., 2007., P. 7.
11. **GARCIA, P., y otros.**, Microbiología clínica practica., 2a.ed., Cádiz – España., Universidad de Cádiz., 1994., P. 125.
12. **GRANADOS, R., Y VILLAVERDE, M.**, Microbiología., Madrid - España., Paraninfo S,A., 2003., Pp. 107
13. **LEZAETA, M.**, Medicina Natural., 2a.ed., México D.F - Mexico., Pax México., 1997., P. 28.
14. **MUJICA, X.**, Hiervas que curan., S.l., Ediciones LEA., 2006., Pp. 14- 34.
15. **OLAYA, J., Y MENDEZ, J.**, Guía de plantas y productos medicinales., Bogotá - Colombia., Upar - CAB., 2003., P. 11.
16. **ORTUÑO, M.**, Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes., Madrid - España., Aiyana., 2006., P. 223.
17. **PAHISSA, A.**, Enfermedades producidas por *Staphylococcus aureus.*, Barcelona - España., ICG Marge., 2009., Pp. 17- 18.
18. **PÉREZ, B., y otros.**, Lista de las plantas útiles del estado de Hidalgo., Pachuca – México ., UAEH., 2003., P. 60.
19. **PRATS, G.**, Microbiología Clínica., Buenos Aires - Argentina., Medica Panamericana., 2005., P. 24.

20. **QUINTERO, G., y otros.,** Infección en cirugía., Bogotá - Colombia., Medica Internacional., 2001., Pp. 107-109.
21. **ROMERO, R.,** Microbiología y Parasitología Humana., 3a.ed., México D.F – México., Medica Panamericana., 2007., Pp. 805- 806, 876-877.
22. **ROMERO, R., Y HERRERA, I.,** Síndrome Diarreico Infeccioso., Medica panamericana., Madrid - España., 2002., P. 95.
23. **SALCEDO, A., Y GARCIA, M.,** Fibrosis Quística., Madrid - España., Díaz de Santos., 1998., P. 71.
24. **SERRANO, V.,** Ciencia Andina., 2a.ed., Quito - Ecuador., Abya Yala., s/a., Pp. 225-226.
25. **SHARAPIN, N., y otros.,** Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos., Bogotá - Ecuador., Quebecor – Impreandes., 2000., Pp. 41- 42, 198 – 199.
26. **TORTORA, G., y otros.,** Introducción a la microbiología., 9a.ed., Buenos Aires - Argentina., Medica Panamericana., 2007., Pp. 159 - 168.
27. **VANACLOCHA, B., Y CAÑIGUERAL, S.,** Fitoterapia Vademécum de prescripción., 4a.ed., Barcelona - España., Elsevier Masson., 2003., Pp. 29 - 53.
28. **VARGAS, W.,** Guía Ilustrada de las Plantas de las Montañas del Quindío y los Andes Centrales., Manizales - Colombia., Universidad de Caldas., 2002., Pp. 363 - 364.

29. **VILLAVICENCIO, M., PÉREZ, B.,** Guía de la Flora útil de la Huasteca y la Zona Otomí-Tepehua, Hidalgo I., Mexico D.F - México., UAEH., 2005., P. 44
30. **WATERS, W., Y HAMERLY, M.,** Estudios Ecuatorianos: un aporte a la discusión – Tomo II., Quito - Ecuador., Abya Yala., 2007., P. 148.
31. **SERRATO, M., Y BARAJAS, J.,** POBLACIONES SILVESTRES DE TAGETES FILIFOLIA LAG, EN EL CENTRO – SUR DE MEXICO., Revista Fitotecnia Mexicana., México D.F – México., N° 2., Vol 29., 2006., Pp. 7-12.
32. **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, *Pseudomona aeruginosa* ATCC N° 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC N°6538., Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Facultad de Ciencias., Escuela Bioquímica y Farmacia., Riobamba – Ecuador., **TESIS.**, 2011., Pp. 60-61.
33. **PEDRAZA, P., Y CASTELLANOS, H.,** Estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de antibióticos de administración intravenosa a través de métodos in vitro., Pontificia Universidad Javeriana., Facultad de Ciencias., Escuela de Microbiología Industrial y Bacteriología., Bogotá – Colombia., **TESIS.**, 2009., Pp. 9-10.

BIBLIOGRAFÍA DE INTERNET

34. AGENTES ANTIMICROBIANOS.

http://www.lablinsan.cl/index_files/Page886.htm
2012/09/22

35. ANTIMICROBIANOS.

<http://www.bvs.hn/RFCM/pdf/2008/pdf/RFCMVol5-2-2008-11.pdf>

2008/07/01

36. CANDIDA ALBICANS

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

2012/09/21

37. CANDIDA ALBICANS COMO SAPROFITO DE LA MUCOSA LINGUAL.

<http://svdcd.org.ve/revista/1974/Vol%201/DV-1-1974-candida.pdf>

2012/09/22

38. CANDIDA ALBICANS UN HONGO OPORTUNISTA.

<http://www.miherbolario.com/articulos/salud/6/candida-albicans-un-hongo-opportunista>

2012/09/23

39. CARACTERÍSTICAS DE TAGETES FILIFOLIA LAG

<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=727>

2012/09/21

40. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE ESCHERICHIA COLI.

<http://cbtis253escherichiacoli.blogspot.com/p/caracteristicas-generales.html>

2012/09/19

41. CONDICIONES GENERALES PARA EL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS.

<http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioMedios.htm>

2012/09/21

42. CLASIFICACIÓN BOTÁNICA DRYMARIA OVATA.

[http://www.minam.gob.pe/pdf/familias/D_Magnoliophyta_C_Magnoliopsida
_O_Caryophyllales_F_CARYOPHYLLACEAE.pdf](http://www.minam.gob.pe/pdf/familias/D_Magnoliophyta_C_Magnoliopsida_O_Caryophyllales_F_CARYOPHYLLACEAE.pdf)

2012/09/20

43. CRECIMIENTO BACTERIANO.

<http://www.biologia.edu.ar/microind/crecimiento%20bacteriano.htm#temao>

2012/09/22

44. CRECIMIENTO MICROBIANO.

<http://facultad.bayamon.inter.edu/yserrano/crecimiento%20microbiano.>

2012/09/22

45. CRUZ ROJA ECUATORIANA. SALUD INDÍGENA EN ECUADOR

[http://www.saludancestralcruzroja.org.ec/web/index.php/saludancestral/salud
-indigena.html](http://www.saludancestralcruzroja.org.ec/web/index.php/saludancestral/salud-indigena.html)

2012/09/20

46. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE DRYMARIA OVATA.

http://zipcodezoo.com/Plants/D/Drymaria_ovata/#Taxonomy

2012/09/20

47. DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE DRYMARIA

<http://es.wikipedia.org/wiki/Drymaria>

2012/09/21

48. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE TAGETES FILIFOLIA LAG.

<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php>

2012/09/21

49. DRYMARIA OVATA

http://www.plantes-botanique.org/espece_Drymaria_ovata

2012/09/19

50. ESCHERICHIA COLI.

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

2012/09/19

51. ETIOPATOGENIA MICROBIOLÓGICA.

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

2012/09/19

52. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA EXTRACCIÓN.

<http://plantas-medicinales.servidor-alicante.com/documentos/metodos-extraccion-preparados-fitoterapia>.

2012/09/20

53. FITOTERAPIA.

http://www.fitoterapia.net/portada/mas_info.php

2012/09/20

54. FITOTERAPIA DEFINICIÓN.

<http://www.naturamedic.com/fitoterapia.htm>

2012/09/20

55. GÉNERO STAPHYLOCOCCUS.

http://www.micromadrid.org/pdf/tomo1_tema15.pdf

2012/09/21

56. KLEBSIELLA PNEUMONIAE

<http://www.monografias.com/trabajos92/klebsiella-pneumoniaea-patogeno-causante-neumonia-y-otras-enfermedades-infecciosas>

2012/09/22

57. MALEZAS DE MÉXICO.

<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/tagetesfilifolia/fichas/ficha.htm#1. Nombres>

20012/09/14

58. MEDICINA NATURAL

<http://www.innatia.com/s/c-medicina-natural/a-que-es-medicinanatural.html>

2012/09/19

59. MEDICINA NATURAL CONCEPTOS

<http://geosalud.com/medicinatural/Medicina%20Natural.htm>

2012/09/19

60. MEDICINA NATURAL ORÍGENES

<http://www.driridologo.com/medicinatural.html>

2012/09/19

61. MEDIOS DE CULTIVO

<http://es.scribd.com/doc/13693968/Tipos-de-Medios-de-Cultivo>

2012/09/21

62. MODOS DE ACCIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS.

<http://es.scribd.com/doc/29370218/Modos-de-Accion-de-antimicrobianos>

2012/09/22

63. OMS. MEDICINA TRADICIONAL

http://www.who.int/topics/traditional_medicine/es/

2012/09/19

64. OMS. RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/index.html>

2012/09/22

65. PSEUDOMONAS AERUGINOSA

http://www.bvsde.paho.org/cdgdwq/docs_microbiologicos/Bacterias20PDF/Pseudomonas.pdf

2012/09/22

66. PSEUDOMONAS AERUGINOSA TAXONOMÍA.

<http://www.uniprot.org/taxonomy/208964>

2012/09/22

67. REQUERIMIENTOS PARA EL CRECIMIENTO MICROBIANO.

<http://kaatubi.blogspot.com/2007/12/requerimientos-para-el-crecimiento.html>

2012/09/22

68. SIEMBRA DE MICROORGANISMOS.

http://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_ano/biotecnologia/practicoIII.pdf

2012/09/19

69. SALMONELLA

<http://es.wikipedia.org/wiki/Salmonella>

2012/09/21

70. SALMONELLA SPP.

<http://www.food-info.net/es/bact/salm.htm>

2012/09/19

71. SALMONELOSIS

<http://158.109.105.11/granja/salmonelosis.pdf>

2012/09/19

72. TAGETES FILIFOLIA LAG

http://darnis.inbio.ac.cr/ubisen/FMPro?-DB=UBIPUB.fp3&-lay=WebAll&-error=norec.html&-Format=detail_print.html&-

2012/09/21

73. TAXONOMÍA DE TAGETES FILIFOLIA LAG

<http://herbario.medellin.unal.edu.co/MEDEL/?controlador=ShowObject&accion=show&id=21338>

2012/09/21

74. TAXONOMÍA DE SENNA MACROPHYLLA

<http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/?controlador=ShowObject&accion=show&id=262928>.

2012/09/22.

75. TAXONOMÍA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

<http://kimi-foro.latin-foro.es/t4-genero-staphylococcus>

2012/09/19

76. TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS.

<http://www.emagister.com/curso-analisis-clinicos/tecnicas-microbiologicas>

2012/09/19

77. TRATAMIENTO PARA KLEBSIELLA PNEUMONIAE

<http://www.todopapas.com/diccionario/pediatrica/klebsiella-pneumoniae-820>

2012/09/22

78. USOS DRYMARIA

http://bibdigital.rjb.csic.es/Imagenes/O_HUM_Nov_Gen_Spec_6/HUM_Nov_Gen_Spec_6_032.pdf.

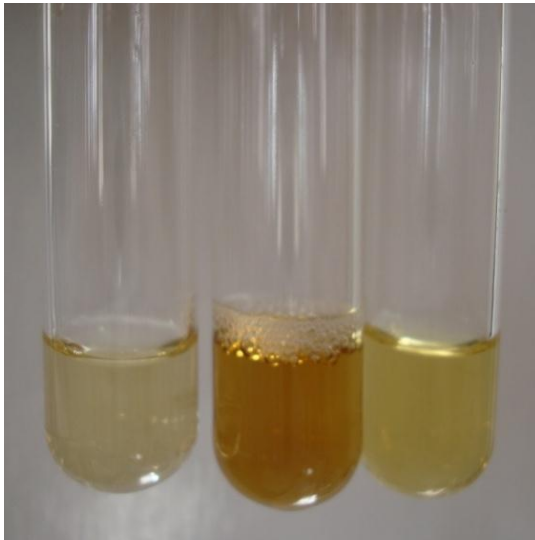
2012/09/19

CAPÍTULO VIII

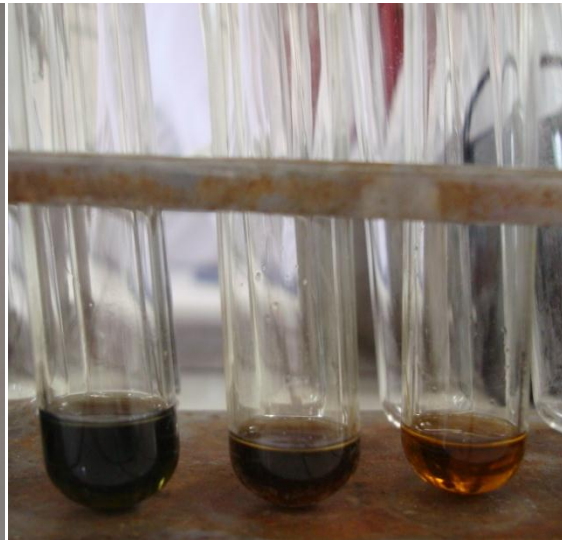
8. ANEXOS

Anexo N° 1 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

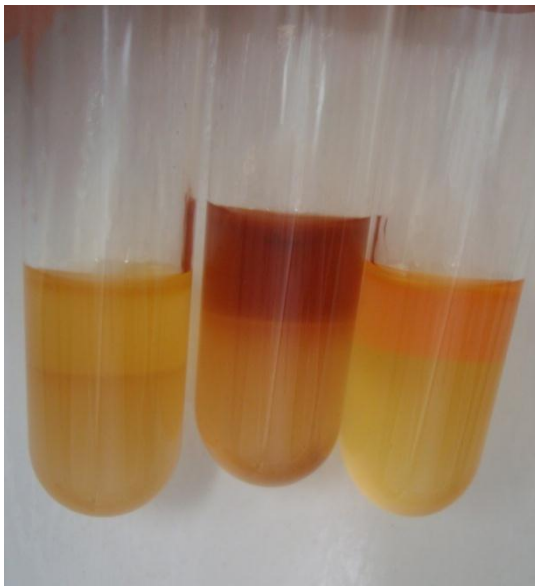
SAPONINAS



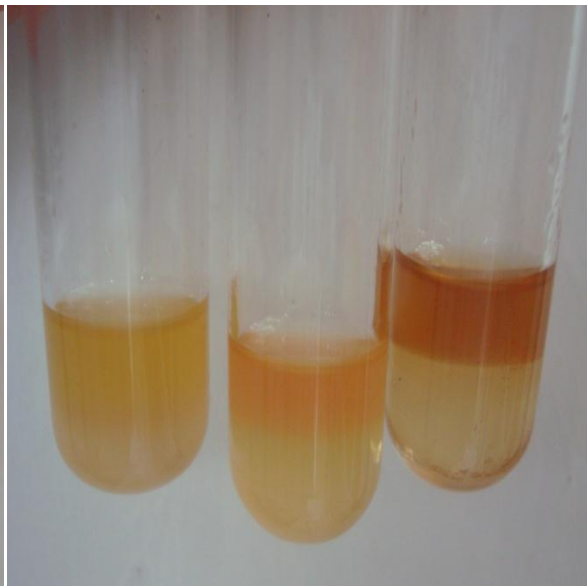
A. SULFÚRICO



BORNRAGER



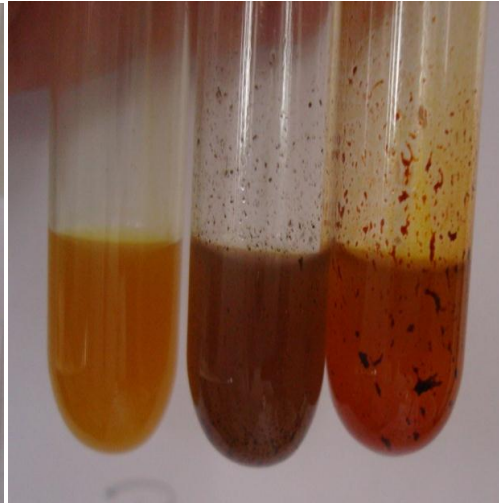
SHINODA



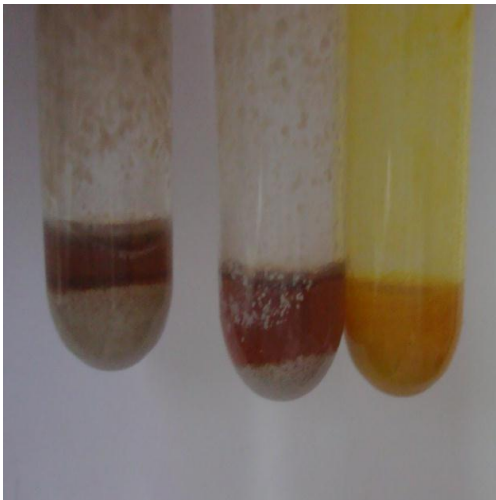
ROSENTALER



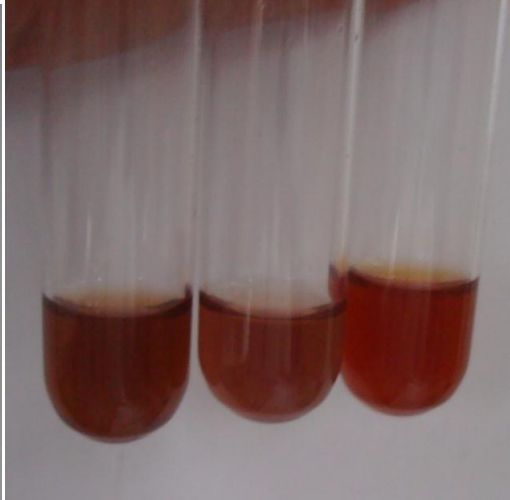
BALJET



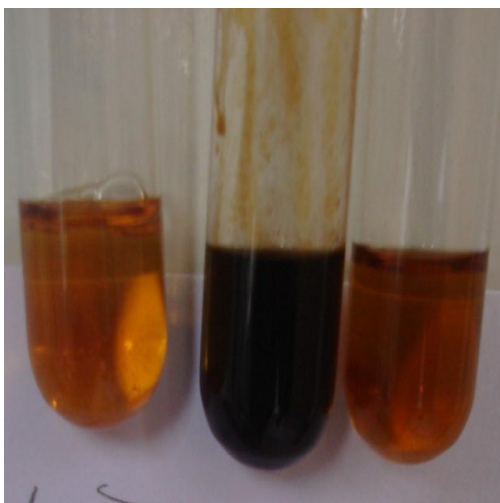
MANINI BETOLO



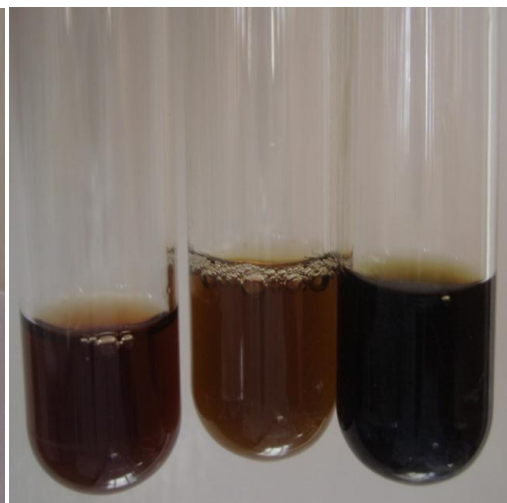
SUDAN



LIEBERMAN – BUCHARD



CLORURO FÉRRICO



Anexo N° 2 RESULTADOS DE LAS SIEMBRAS DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS Y SUBEXTRACTOS ETÉREO Y CLOROFÓRMICO DE *Drymaria ovata*, *Senna macrophylla*, *Tagetes filifolia* Lag A DIFERENTES CONCENTRACIONES.

***Drymaria ovata* Extracto Etanólico 10.000 µg/mL**



***Drymaria ovata* Subextracto Etéreo 10.000 µg /mL**



***Drymaria ovata* Subextracto Clorofórmico 10.000 µg/mL**



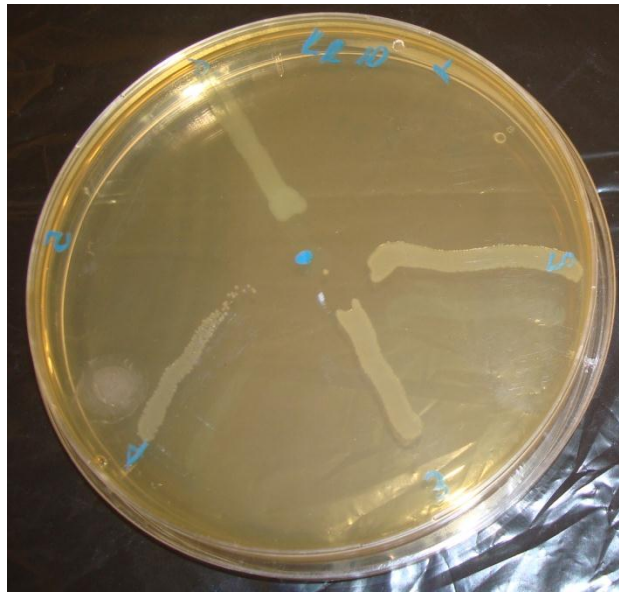
***Senna macrophylla* Extracto Etanólico 10.000 µg/mL**



***Senna macrophylla* Subextracto Clorofórmico 10.000 µg/mL**



Tagetes filifolia Lag Subextracto Etéreo 10.000 µg/mL



Tagetes filifolia Lag Subextracto Clorofórmico 10.000 µg/mL

