



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“DETERMINACIÓN Y COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD  
ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE EXTRACTOS DE DOS  
ESPECIES DE ORTIGA SOBRE BACTERIAS DE IMPORTANCIA  
CLINICA”**

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

**BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**AUTOR:** FRANKLIN VINICIO GUAMÁN PILCO

**TUTOR:** DR. GERARDO EMILIO MEDINA RAMÍREZ

RIOBAMBA-ECUADOR

2015

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

El tribunal certifica que: El trabajo de titulación : **“DETERMINACIÓN Y COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE EXTRACTOS DE DOS ESPECIES DE ORTIGA SOBRE BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLINICA”** de responsabilidad del Sr. Franklin Vinicio Guamán Pilco ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dr. Gerardo Medina <b>DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN</b>	-----	-----
Dr. Félix Andueza <b>MIEMBRO DE TRIBUNAL</b>	-----	-----
BQF. Diego Vinueza <b>MIEMBRO DE TRIBUNAL</b>	-----	-----
<b>DOCUMENTALISTA SISBIB – ESPOCH</b>	-----	-----

Yo, Franklin Vinicio Guamán Pilco soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en el trabajo, y el patrimonio intelectual del trabajo de titulación, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

-----  
**FRANKLIN VINICIO GUAMÁN PILCO**

## **DEDICATORIA**

A DIOS por haber significado un impulso espiritual, fuente de motivación y sabiduría.

A mis seres más queridos mis padres Gustavo y Elvita, quienes han sabido ayudarme incondicionalmente, guiándome en los peores momentos y dándome siempre un motivo para seguir adelante cuando más lo necesitaba.

A grandes amigos que tuve el privilegio de compartir momentos felices y duros a lo largo de la investigación.

Franklin

## AGRADECIMIENTO

Doy Gracias a DIOS por haber formado parte de mi fortaleza y empuje para seguir aun en los malos momentos.

A mis padres, quienes son las principales fuentes de inspiración y trabajo, en especial a mi madre querida quien nunca faltó una palabra de aliento y confianza.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Al Dr. Gerardo Medina, asesor principal de mi trabajo de titulación, por su apoyo incondicional, paciencia, conocimientos y amistad brindada.

A BQF. Diego Vinuesa M. Sc, por su gran colaboración, asesoría incondicional, generosidad y amistad brindada a lo largo de la investigación realizada.

A BQF Víctor Guangasig, por su ayuda prestada, por su asesoría y factibilidad de colaboración.

A la Ing. Paola Arguello por su colaboración brindada.

Al Dr. Félix Andueza, colaborador de trabajo de titulación por sus consejos y sugerencias aportados para la presentación del trabajo.

A la Dra. Lolita responsable del Laboratorio Clínico de la Unidad Oncológica Solca Chimborazo por su donación gentil durante la realización del trabajo práctico.

Agradezco a la Dra. Paty, responsable del Laboratorio Clínico y Microbiológico de la Escuela de Bioquímica y Farmacia por su asesoría, colaboración incondicional y gentileza brindada a lo largo de la realización del trabajo práctico.

Finalmente doy mis sinceros agradecimientos a amigos de trabajo de titulación quienes me colaboraron de una forma u otra para plasmar mi trabajo.

Franklin

## ÍNDICE GENERAL

<b>CERTIFICACIÓN</b>	ii
<b>DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDADES</b>	iii
<b>DEDICATORIA</b>	iv
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	v
<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS</b>	x
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	xi
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	xiii
<b>ÍNDICE DE ANEXOS</b>	xiv
<b>REASUMEN</b>	xv
<b>SUMMARY</b>	xvi
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>4</b>
<b>1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1. Medicina Tradicional.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2. Plantas Medicinales.....</b>	<b>5</b>
<i>1.2.1. Extractos Vegetales.....</i>	<i>6</i>
<i>1.2.2. Métodos de Extracción.....</i>	<i>8</i>
<b>1.3. Tamizaje Fitoquímico.....</b>	<b>10</b>
<b>1.4. Métodos de Concentración de Extractos Fluidos.....</b>	<b>11</b>
<b>1.5. Actividad Antibacteriana de Plantas Naturales.....</b>	<b>13</b>
<b>1.6. Principales Grupos de Compuestos Antimicrobianos en Plantas</b>	<b>13</b>
<i>1.6.1. Fenoles y Polifenoles.....</i>	<i>14</i>
<i>1.6.2. Flavonoides.....</i>	<i>14</i>
<i>1.6.3. Quinonas.....</i>	<i>15</i>
<i>1.6.4. Taninos.....</i>	<i>16</i>
<b>1.7. Bacterias y Hongos Distribución en la naturaleza.....</b>	<b>16</b>
<i>1.7.1. Resistencia Bacteriana a Antibióticos.....</i>	<i>17</i>
<i>1.7.2. Inhibición Bacteriana.....</i>	<i>18</i>
<i>1.7.3. Cultivo y Factores de Crecimiento Bacteriano.....</i>	<i>19</i>
<b>1.8. Bacterias Monitores.....</b>	<b>20</b>
<i>1.8.1. Escherichia coli.....</i>	<i>20</i>

1.8.1.1.	<i>Clasificación Científica</i> .....	20
1.8.1.2.	<i>Patogenia</i> .....	20
<b>1.8.2.</b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	21
1.8.2.1.	<i>Clasificación Científica</i> .....	21
1.8.2.2.	<i>Patogenia</i> .....	21
<b>1.8.3.</b>	<b><i>Pseudomona aeruginosa</i></b> .....	22
1.8.3.1.	<i>Clasificación Científica</i> .....	22
1.8.3.2.	<i>Patogenia</i> .....	22
<b>1.8.4.</b>	<b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b> .....	23
1.8.4.1.	<i>Clasificación Científica</i> .....	23
1.8.4.2.	<i>Patogenia</i> .....	24
<b>1.8.5.</b>	<b><i>Proteus vulgaris</i></b> .....	24
1.8.5.1.	<i>Clasificación Científica</i> .....	25
1.8.5.2.	<i>Patogenia</i> .....	25
<b>1.8.6.</b>	<b><i>Candida albicans</i></b> .....	25
1.8.6.1.	<i>Clasificación Científica</i> .....	25
1.8.6.2.	<i>Patogenia</i> .....	26
<b>1.9.</b>	<b>Especies Vegetales</b> .....	26
<b>1.9.1.</b>	<b><i>Urera baccifera (L) Gaudich</i></b> .....	26
1.9.1.1.	<i>Antecedentes</i> .....	26
1.9.1.2.	<i>Descripción Botánica</i> .....	27
1.9.1.3.	<i>Nombre Vernáculo</i> .....	27
1.9.1.4.	<i>Clasificación Taxonómica</i> .....	27
1.9.1.5.	<i>Usos Medicinales</i> .....	27
1.9.1.6.	<i>Constituyentes Químicos</i> .....	28
<b>1.9.2.</b>	<b><i>Urtica urens</i></b> .....	28
1.9.2.1.	<i>Antecedentes</i> .....	28
1.9.2.2.	<i>Descripción Botánica</i> .....	28
1.9.2.3.	<i>Nombre Vernáculo</i> .....	29
1.9.2.4.	<i>Clasificación Taxonómica</i> .....	29
1.9.2.5.	<i>Usos Medicinales</i> .....	29
1.9.2.6.	<i>Constituyentes Químicos</i> .....	29
<b>1.10.</b>	<b>Actividad Hemoaglutinante</b> .....	30
<b>1.10.1.</b>	<b><i>Historia</i></b> .....	30
<b>1.10.2.</b>	<b><i>Lectinas Vegetales</i></b> .....	31
<b>1.10.3.</b>	<b><i>Aplicaciones Terapéuticas de Lectinas</i></b> .....	34

1.10.4.	<i>Efectos Adversos de Lectinas</i> .....	35
<b>CAPÍTULO II</b> .....		36
2.	<b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....	36
2.1.	<b>Lugar de Investigación</b> .....	36
2.2.	<b>Materiales, Equipos y Reactivos</b> .....	36
2.2.1.	<i>Material Vegetal</i> .....	36
2.2.2.	<i>Microorganismos Monitores</i> .....	36
2.2.3.	<i>Materiales de Laboratorio</i> .....	37
2.2.4.	<i>Equipos de Laboratorio</i> .....	37
2.2.5.	<i>Reactivos</i> .....	38
2.2.6.	<i>Medios de Cultivo</i> .....	39
2.2.7.	<i>Grupos Sanguíneos</i> .....	39
2.3.	<b>Técnicas Y Métodos</b> .....	39
2.3.1.	<i>Recolección y Tratamiento del Material Vegetal</i> .....	40
2.3.2.	<i>Preparación de Extractos Vegetales</i> .....	41
2.3.2.1.	<i>Preparación de Extractos Acuosa</i> .....	41
2.3.2.2.	<i>Obtención de Extractos Alcohólicos - Método de Maceración</i> ....	41
2.3.2.3.	<i>Obtención de Extractos Alcohólicos - Método de Ultrasonido</i> .....	41
2.3.3.	<i>Tamizaje Fitoquímico</i> .....	42
2.3.4.	<i>Cromatografía en Capa Fina</i> .....	48
2.3.5.	<b>Control de Extractos Vegetales</b> .....	50
2.3.5.1.	<i>Requisitos Organolépticos</i> .....	50
2.3.5.2.	<i>Determinación de Densidad Relativa</i> .....	51
2.3.5.3.	<i>Determinación de Índice de Refracción</i> .....	51
2.3.5.4.	<i>Determinación de pH</i> .....	52
2.3.5.5.	<i>Determinación de Sólidos Totales</i> .....	52
2.3.6.	<b>Concentración de Extractos</b> .....	53
2.3.6.1.	Concentración de Extractos Acuosa: <i>U. baccifera (L) Gaudich</i> y <i>U. urens</i> .....	53
2.3.6.2.	Concentración de Extractos Etanólicos: <i>U. baccifera (L) Gaudich</i> y <i>U. urens</i> .....	54
2.3.7.	<b>Ensayo de Actividad Aglutinante de Extractos Acuosa: <i>U. baccifera (L) Gaudich</i> - <i>U. urens</i></b> .....	55
2.3.8.	<b>Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos sobre bacterias de importancia clínica</b> .....	58

2.3.8.1.	<i>Preparación de Medios de Cultivo</i> .....	58
2.3.8.2.	<i>Preparación de Extractos</i> .....	59
2.3.8.3.	<i>Ensayo de Esterilidad de Extractos y Antibióticos</i> .....	59
2.3.9.	<i>Ensayo de Actividad antimicrobiana mediante el Método Microgotas</i> .....	60
2.3.10.	<i>Ensayo de Actividad antimicrobiana mediante el Método de Difusión en Discos</i> .....	63
<b>CAPÍTULO III</b> .....		67
3.	<b>MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	67
3.1.	<b>Resultado de proceso de extracción y concentración de Extractos de Ortiga brava y Ortiga Blanca</b> .....	67
3.2.	<b>Resultados de Tamizaje Fitoquímico</b> .....	68
3.3.	<b>Cromatografía en Capa Fina TLC</b> .....	71
3.4.	<b>Control de Extractos Vegetales</b> .....	74
3.4.1.	<i>Requisitos Organolépticos</i> .....	74
3.4.2.	<i>Determinación de Densidad Relativa</i> .....	75
3.4.3.	<i>Determinación de Índice de Refracción</i> .....	75
3.4.4.	<i>Determinación de pH</i> .....	76
3.4.5.	<i>Determinación de Sólidos Totales</i> .....	76
3.5.	<b>Resultados de Ensayo de Actividad Hemoaglutinante</b> .....	77
3.5.1.	<i>Determinación de Actividad Hemoaglutinante en extracto acuoso de Urtica baccifera (L) Gaudich</i> .....	77
3.5.2.	<b>Determinación de Actividad Hemoaglutinante en extracto acuoso de Urtica urens</b> .....	79
3.6.	<b>Resultados de Actividad antimicrobiana de Urtica urens y Urtica baccifera (L) Gaudich</b> .....	80
3.6.1.	<i>Determinación de Actividad Antimicrobiana mediante Método de Microgotas</i> .....	80
3.6.2.	<i>Determinación de Actividad Antimicrobiana mediante Método de Difusión en Discos</i> .....	83
<b>CONCLUSIONES</b> .....		86
<b>RECOMENDACIONES</b> .....		87
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		
<b>ANEXOS</b>		

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>ATCC:</b>	American Type Culture Collection
<b>CRO</b>	Ceftriaxona
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>E</b>	Eritromicina
<b>EAL</b>	Extracto acuoso Liofilizado
<b>EEM</b>	Estrado Etanólico por Maceración
<b>EEU</b>	Estrado Etanólico asistido por ultrasonido
<b>K</b>	Ketoconazol
<b>g:</b>	Gramo
<b>HCl conc.</b>	Ácido Clorhídrico concentrado
<b>mg:</b>	Miligramos
<b>min:</b>	Minutos
<b>mL:</b>	Mililitro
<b>mm:</b>	Milímetros
<b>pH:</b>	Potencial de Hidrogeno
<b>Q</b>	Quercetina
<b>Rf:</b>	Factor de Retención
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>TLC</b>	Thin layer chromatography
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colonias
<b>µg:</b>	Microgramos
<b>µL:</b>	Microlitro
<b>UV</b>	Luz Ultravioleta
<b>°C:</b>	Grados Celsius
<b>%</b>	Porcentaje

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1</b>	Principales Pruebas Cualitativas de Tamizaje Fitoquímico previo a la Determinación de Metabolitos Secundarios.....	10
<b>Tabla 2-1</b>	Clasificación Científica de <i>Escherichia coli</i> .....	20
<b>Tabla 3-1</b>	Clasificación Científica de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	21
<b>Tabla 4-1</b>	Clasificación Científica de <i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	22
<b>Tabla 5-1</b>	Clasificación Científica de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	24
<b>Tabla 6-1.</b>	Clasificación Científica de <i>Proteus vulgaris</i> .....	25
<b>Tabla 7-1</b>	Clasificación Científica de <i>Candida albicans</i> .....	26
<b>Tabla 8-1</b>	Clasificación Taxonómica de <i>Urera baccifera (L) Gaudich</i> .....	27
<b>Tabla 9-1</b>	Clasificación Taxonómica de <i>Urtica urens</i> .....	29
<b>Tabla 10-1</b>	Clasificación de Lectinas según su especificidad sobre monosacáridos	33
<b>Tabla 11-2</b>	Proporciones de Fases móviles en Cromatografía en capa fina.....	48
<b>Tabla 12-3</b>	Resultado de Pesos y volúmenes utilizados en la extracción de Compuestos en plantas.....	67
<b>Tabla 13-3</b>	Porcentajes de Rendimiento de Extractos.....	67
<b>Tabla 14-3</b>	Resultado de Concentración de extractos.....	68
<b>Tabla 15-3</b>	Resultados de Análisis Fitoquímico Cualitativo en extracto acuoso y etanólico de <i>Urera baccifera (L)</i> .....	68
<b>Tabla 16-3</b>	Resultados de Análisis Fitoquímico Cualitativo en extracto acuoso y etanólico de <i>Urtica urens</i> .....	70
<b>Tabla 17-3</b>	Relación de frentes de bandas de Flavonoides Presentes en Extracto Acuoso de <i>Urtica urens</i> y <i>Urera baccifera (L) Gaudich</i> .....	71
<b>Tabla 18-3</b>	Relación de frentes de bandas de Flavonoides Presentes en Extracto Etanólicos de <i>Urtica urens</i> y <i>Urera baccifera (L) Gaudich</i> .....	73
<b>Tabla 19-3</b>	Resultado de Características Organolépticas en Extractos de <i>Urtica urens</i> . Y <i>Urera baccifera (L) Gaudich</i> .....	74
<b>Tabla 20-3</b>	Resultado de Densidad Relativa en Extractos de <i>Urtica urens</i> y <i>Urera baccifera (L) Gaudich</i> .....	75
<b>Tabla 21-3</b>	Resultado de Índice de Refracción.....	75
<b>Tabla 22-3</b>	Resultado de determinación de pH.....	76
<b>Tabla 23-3</b>	Resultado de determinación de Sólidos Totales en Extractos.....	76
<b>Tabla 24-3</b>	Resultados de Ensayo de Actividad hemoaglutinante, sin centrifugar, en <i>Urera baccifera (L) Gaudich</i> . ....	77

<b>Tabla 25-3</b>	Resultado de ensayo de Actividad hemoaglutinante en diluciones seriadas de <i>Urera baccifera</i> (L) Gaudich. ....	78
<b>Tabla 26-3</b>	Resultado de ensayo de actividad hemoaglutinante, sin centrifugar en extracto Acuoso de <i>Urtica urens</i> .....	79
<b>Tabla 27-3</b>	Resultado de ensayo de Actividad hemoaglutinante en diluciones seriadas de <i>Urtica urens</i> .....	80
<b>Tabla 28-3</b>	Resultados de ensayo de Actividad antibacteriana de <i>U. urens</i> mediante el método de microgotas.....	81
<b>Tabla 29-3</b>	Resultados de Actividad Antibacteriana de <i>U. baccifera</i> mediante el método de microgotas.....	82
<b>Tabla 30-3</b>	Resultados de Actividad Antibacteriana de <i>Urtica urens</i> Mediante el Método de Difusión en discos.....	83
<b>Tabla 31-3</b>	Resultados de ensayo de Actividad Antibacteriana de <i>Urera baccifera</i> (L) Gaudich mediante el método de Difusión en discos.....	84

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-1</b>	Etapas de Proceso de Liofilización.....	11
<b>Figura 2-1</b>	Estructuras de Principales Grupos de Flavonoides.....	14
<b>Figura 3-1</b>	Estructura de Grupos de Flavonoides con actividad antibacteriana.....	15
<b>Figura 4-1</b>	Triada Interacción: bacteria – Germen Y Huésped.....	18
<b>Figura 5-1</b>	Representación esquemática de estructuras tridimensionales de lectinas vegetales.....	32
<b>Figura 6-2</b>	Esquema General de Técnicas y Métodos.....	40
<b>Figura 7-2</b>	Esquema de Extracción de principios activos asistido por Ultrasonido	42
<b>Figura 8-2</b>	Reacciones de Caracterización y Coloración de Extracto Etanólico. ....	43
<b>Figura 9-2</b>	Reacciones de Caracterización y Coloración de Extracto Acuoso.....	46
<b>Figura 10-2</b>	Procedimiento General de Actividad hemoaglutinante de Extractos.....	57
<b>Figura 11-3</b>	Cromatografía en Capa fina de Extractos Acuosos de <i>U. urens</i> y <i>U. baccifera (L) Gaudich</i> .....	72
<b>Figura 12-3</b>	Cromatografía en Capa fina de Extractos Etanólicos de <i>U. urens</i> y <i>U. baccifera (L) Gaudich</i> .....	73

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO A</b>	Recolección y Tratamiento de <i>Ureva baccifera</i> (L) Gaudich
<b>ANEXO B</b>	Preparación y Maceración de Extractos de <i>Ureva baccifera</i> (L) Gaudich
<b>ANEXO C</b>	Preparación y Maceración de Extractos de <i>Urtica Urens</i>
<b>ANEXO D</b>	Obtención de Extractos Etanólicos asistidos por ultrasonido
<b>ANEXO E</b>	Tamizaje Fitoquímico de Extracto acuoso y etanólico de <i>Urtica urens</i>
<b>ANEXO F</b>	Tamizaje Fitoquímico de Extracto acuoso y Etanólico de <i>Ureva baccifera</i>
<b>ANEXO G</b>	Cromatografía en Capa fina de Extracto acuoso y etanólico asistido por Ultrasonido
<b>ANEXO H</b>	Control de Extractos de <i>Urtica urens</i> y <i>U. baccifera</i>
<b>ANEXO I</b>	Concentración de Extractos: Rotaevaporación y Liofilización
<b>ANEXO J</b>	Lavado de Eritrocitos y Preparación de Diluciones de Extracto Acuoso
<b>ANEXO K</b>	Evaluación de Actividad hemoaglutinante sin centrifugar
<b>ANEXO L</b>	Evaluación de Actividad Hemoaglutinante después de centrifugar
<b>ANEXO M</b>	Evaluación antimicrobiana de controles positivos y Controles negativos
<b>ANEXO N</b>	Evaluación de Actividad antimicrobiana de <i>Ureva baccifera</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i> Mediante método de Microgotas
<b>ANEXO O</b>	Evaluación de Actividad antimicrobiana de <i>Urtica urens</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i> Mediante método de Microgotas
<b>ANEXO P</b>	Evaluación de Actividad antimicrobiana de <i>Ureva baccifera</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i> (1) y <i>Candida albicans</i> (2) Mediante método de Difusión en Discos
<b>ANEXO Q</b>	Evaluación de Actividad antimicrobiana de <i>Urtica urens</i> sobre <i>S. aureus</i> (1), <i>P. aeruginosa</i> (2) y <i>C. albicans</i> (3) Mediante método de Difusión en Discos

## RESUMEN

El propósito del presente trabajo fue evaluar la actividad antibacteriana, antifúngica y hemoaglutinante *in vitro* de la ortiga blanca (*Urtica urens*) y Ortiga brava (*Urtica baccifera* (L) *Gaudich*), para ello se prepararon extractos de cada una de las muestras, extractos etanólicos por maceración y ultrasonido y extractos acuosos. Cada uno de los extractos obtenidos fueron evaluados utilizando el método de microgotas y método de Difusión en discos sobre cinco bacterias *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Proteus vulgaris* (ATCC 13315) y el hongo *Candida albicans* (ATCC 10231). La actividad de los extractos fue comparada con sus controles positivos: Ceftriaxona (30µg), Eritromicina (15µg) y Ketoconazol (25µg), y controles negativos: Agua destilada, Etanol y Dimetilsulfóxido. Las placas inoculadas se incubaron a 35 °C por 12 a 16 horas. En el ensayo de hemoaglutinación se utilizaron extractos acuosos a diferentes diluciones sobre glóbulos rojos preparados al 5% de cuatro grupos sanguíneos: A<sup>+</sup>, B<sup>+</sup>, AB<sup>+</sup> y O<sup>+</sup>. La actividad antimicrobiana se determinó por la presencia o ausencia de halos de inhibición y la potencia del extracto se estimó midiendo diámetros de halos. *Urtica urens* mostró acción inhibitoria sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Candida albicans* en cambio *Urtica baccifera* presentó actividad sobre *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, por lo que se concluye que *Urtica urens* presenta mayor efecto tóxico sobre bacterias. Además se estableció que el método de extracción de compuestos afecta la actividad tóxica. Se concluye que en la actividad de aglutinación *Urtica baccifera* (L) *Gaudich* presentó la mayor actividad sobre todos los eritrocitos ensayados, demostrando que en la composición química de la planta existen lectinas o Fitohemaglutininas responsables de aglutinación, por lo que se recomienda realizar una caracterización bioquímica y especificidad de lectinas.

**Palabras clave:** < ORTIGA BLANCA [*Urtica urens*]> <ORTIGA BRAVA [*Urtica baccifera* (L) *Gaudich*]> <ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA> <LECTINAS> <HEMOAGLUTINACIÓN > <MICROGOTAS > <DIFUSIÓN EN DISCOS > <MÉTODOS DE EXTRACCIÓN> <MICROBIOLOGIA>

## SUMMARY

The purpose of the following research study was to evaluate the antimicrobial, antifungal and haemagglutinating in vitro from white dead - nestle (*Urtica urens*) and ortiga brava (*Urera baccifera* (L) Gaudich) then extracts of each one of the samples were prepared, besides ethanolic extracts through maceration and ultrasound and aqueous extracts. Each of the extracts obtained were evaluated by using the Droplets method and Dissemination method in discs applied in five bacteria such as: *Escherichia coli* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 7000603), *Proteus vulgaris* (ATCC 13315) and the fungus *Candida albicans* (ATCC 10231). The activity of extracts was compared with positive controls trough ceftriaxone (30µg) Erythromycin (15µg) and Ketoconazole (25 µg), and negative controls of distilled water, ethanol and dimethyl sulfoxide. The inoculated plates incubated at 35 °C around 12 to 16 hours. While the hemagglutination assay used aqueous extracts in different dilutions on red blood cells prepared at 5% of four blood groups A<sup>+</sup>, B<sup>+</sup>, AB<sup>+</sup>, O<sup>+</sup>. The antimicrobial activity was determined by the presence or lack of aura inhibitors and the potency of the extract were estimated by measuring diameters of halos. On the other hand *Urtica urens* showed inhibitory action on *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* and *Candida albicans*, however *Urera baccifera* showed activity on *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*, but *Urera baccifera* pretended activity on *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* so that, it concludes that *Urtica urens* has greater toxic effect on microorganism. Furthermore it was established that the compound extraction method affects the toxic activity concluding that agglutination activity of *Urera baccifera* (L) Gaudich showed the highest activity in relation to all tested erythrocytes, demonstrating that the chemical composition plants contains lectins or phytohaemagglutinin that are responsible of agglutination, This is why it is particularly recommended to develop a biochemical characterization and specificity of lectins.

**KEYWORDS:** <NESTLE [URTICA URENS]> <ORTIGA BRAVA [URERA BACCIFERA (L) GAUDICH]> <MICROBIAL ACTIVITY> <LECTINS> <HEMAGGLUTINATION> <DROPLETS> <DISC DIFFUSION> <EXTRACTION METHOD><MICROBIOLOGY>

## INTRODUCCIÓN

### Planteamiento del Problema

Desde épocas antiguas el hombre ha utilizado las plantas o parte de ellas en la sanación de heridas, dolencias, como fuente de alimento e inclusive en ritos espirituales, las plantas son consideradas por pueblos ancestrales como medio de curación gracias a su poder medicinal, a pesar de que hace muchos años el uso de plantas era considerado como supersticioso, infundado e ignorante. (SENPLADES, 2013, p.326).

La ortiga fue utilizada por los egipcios para tratar ciertas dolencias como artritis, el ejército romano y pueblo británico antiguamente empleaban la ortiga como fuente de calor, por su propiedad de picar, quemar y enrojecimiento, se convirtió en un remedio natural para combatir reumatismos, parálisis muscular siendo quizás el uso medicinal más antiguo de esta planta. En América Latina la ortiga se encuentra extendida ampliamente desde México hasta Argentina, antiguamente en México la civilización azteca practicaba la medicina ancestral utilizándola para sanar inflamaciones, infecciones, como agente diurético etc. (Upton, 2013, p.9)

En las últimas décadas el estudio y empleo de plantas con usos terapéuticos ha permitido encontrar principios activos responsables de alguna actividad biológica ante una determinada patológica. Como ejemplo podemos mencionar el empleo de medicina herbolaria ligada al área Farmacéutica, actuando en la inhibición bacteriana de microorganismos potencialmente peligrosos para el hombre. También está ligada al área médica gracias a la presencia de ciertas proteínas (Lectinas) de plantas, debido a que sus propiedades biológicas brindan la magnífica oportunidad de utilizarlas en enfermedades como cáncer, actuar como inmunomoduladores e inclusive en antifúngicos y antivirales. (Castillo & Abdullaev, 2005, p.55)

La familia *Urticaceae* es muy amplia cuenta con unas 2000 especies de ortiga ubicadas en América, Asia sur oriental, Europa y África. En el Ecuador existen más de 5 especies de ortiga distribuidas en las tres regiones territoriales Costa, Sierra y Oriente, las cuales son utilizadas con fines comestibles y medicinales, entre las especies más relevantes de la región Sierra y Costa tenemos *Urtica urens* (Ortiga menor) y *Urtica dioica* (Ortiga brava). (Sulca, 2010, p.11-22).

Se han desarrollado varios estudios sobre actividad antibacteriana de numerosas plantas, sin embargo en *Urtica urens* escasos son los estudios que se han desarrollado para determinar su capacidad terapéutica, por el contrario la especie *Urtica dioica*, perteneciente a la misma

familia, ha demostrado poseer actividad sobre microorganismos y hongos responsables de diferentes enfermedades nosocomiales, bucofaríngeas, infecciones urinarias, respiratorias e inclusive aportar al ámbito agrícola combatiendo bacterias y hongos destructores de plantaciones tropicales. (Upton, 2013, p.9). (Gülçin, 2003, p. 208). (Sulca, 2010, p.11-22). (Viveros & Castaño, 2006, p.37-50).

En *Urera baccifera* (L) Gaudich son mínimos los estudios que se han realizado, sin embargo Onofre & Herkert (2012 p. 139-143) realizaron un estudio con el propósito de evaluar la actividad antimicrobiana de extractos: acuoso, etanólico y metanólico de hojas, corteza y raíces a diferentes concentraciones utilizando el método de difusión en disco, frente a *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*., quienes reportaron que extracto metanólico de hojas y raíces presentaron actividad bactericida frente a las tres bacterias monitores. (Onofre & Herkert, 2012, p. 139-143).

La resistencia bacteriana en América Latina se ha convertido en una preocupación constante, los principales causantes del fenómeno de resistencia son bacterias Gram negativas, como por ejemplo *Pseudomona sp.*, *Escherichia sp.*, *Klebsiella sp.*, entre otros. El grado de resistencia varía de un país a otro, de territorio a territorio y de un hospital a otro, la situación es diferente en cada lugar, de ahí la importancia de regionalizar estudios, investigando efectos potenciales en antibióticos frente a bacterias aisladas localmente. La resistencia bacteriana desarrolló por el uso excesivo, indiscriminado e inapropiado de antibióticos comerciales frente alguna infección, este problema junto a la aparición de efectos negativos de algunos antibióticos, han sido razones más que suficientes para investigar y desarrollar nuevos compuestos a partir de las plantas consideradas en cada región como popularmente medicinales, científicos han comprobado hasta el momento que las plantas poseen compuestos activos ante bacterias. (Zampini, *et. al.*, 2007, p. 386)

La gran importancia de poseer los conocimientos ancestrales sobre el uso de medicina natural favorece el desarrollo sostenible de nuestro país, satisfaciendo las necesidades de pacientes que emplean la naturaleza como medio de curación, especialmente aquellas personas que no cuentan con una atención oportuna de salud por encontrarse ubicados en sectores alejados de las unidades de salud. (SENPLADES, 2013, p.326)

Este estudio biofarmacéutico está ligado a las políticas del plan del buen vivir planteadas por el organismo competente a través del potenciamiento del bioconocimiento, apuntado como un catalizador de la producción nacional aplicando conocimientos, impulsando la transformación de la matriz productiva, mejorando la conservación y sustentabilidad del uso de los bienes naturales. La iniciativa sobre la investigación basada en conocimientos ancestrales como el uso

de plantas, su catalogación, codificación y rescate de los saberes van encaminados a asegurar el bien público. (SENPLADES, 2013, p.326)

El tema abordado está encaminado hacia el tercer objetivo del plan del buen vivir, mejorar la calidad de vida de la población, ejerciendo los derechos del buen vivir y precisamente uno de ellos y que compete a nuestra área de trabajo es el uso de medicamentos y su incidencia sobre la salud logrando así fortalecer las capacidades y potencialidades individuales y sociales. (SENPLADES, 2013, p.326)

La ortiga en el Ecuador en la última década ha alcanzado un alto grado de popularidad medicinal, en infecciones intestinales, respiratorias, como agente antiinflamatorio, cicatrizante etc. (Sulca, 2010, p.11-22). Por lo que hace que surja la interrogante ¿Es posible determinar actividad antibacteriana y antifúngica en extractos de dos especies de ortiga nativas del Ecuador frente a bacterias de importancia clínica?

Se decidió realizar la actividad antibacteriana y antifúngica *in vitro* de dos especies de Ortiga autóctonas de la región Sierra y Oriente frente a bacterias y hongos debido a que provocan una serie de patologías potencialmente peligrosas para el hombre, aportando información importante para investigaciones posteriores.

## **Objetivos de La Investigación**

### **Objetivo General:**

Determinar la actividad antibacteriana y antifúngica *in vitro* de extractos de dos especies de Ortiga de diferentes regiones climáticas, sobre bacterias de importancia clínica.

### **Objetivos Específicos**

1. Obtener los extractos de dos especies de ortiga empleando Agua destilada y Etanol.
2. Evaluar la actividad antibacteriana y anti fúngica *in vitro* de dos especies de ortiga frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 y *Proteus vulgaris* ATCC 13315, bacterias de Importancia Clínica y *Candida albicans* ATCC 10231.
3. Evaluar la Actividad Hemoaglutinante de extractos acuosos de *Urtica urens* y *Urera baccifera* (L) *Gaudich* frente a grupos Sanguíneos.

# CAPÍTULO I

## 1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

### 1.1. Medicina Tradicional

La medicina tradicional según la Organización Mundial de Salud (OMS) constituye el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como prevención, diagnóstico, mejora o tratamiento de enfermedades físicas o mentales. (OMS, 2014, p. 14-24)

A lo largo del tiempo la medicina tradicional se ha involucrado en diferentes regiones del mundo existiendo entre otras la medicina tradicional china, el ayurveda hindú, medicina árabe. Países asiáticos africanos, Latinoamericanos, oceánicos y otras culturas han desarrollado una gran variedad de sistemas de medicinas tradicionales indígenas. Estas culturas se encuentran influenciadas por ciertos factores de gran peso como su historia, filosofía, actitudes y creencias personales, sin embargo la forma de cómo lo practican varían de un país a otro y de una región a otra. (OMS, 2014, p. 14-24)

Las terapias de Medicina tradicional pueden clasificarse como terapias de medicación en el caso de que se utilicen medicinas con base de plantas (hierbas), partes de animales, minerales, pero también puede clasificarse como terapias sin medicación en el caso de no utilizar medicación y recurrir a actividades alternativas como acupuntura, terapias manuales, qigong, terapia termal entre otras. (OMS, 2014, p. 14-24)

La medicina tradicional es un sistema sanitario que crece rápidamente y que además se ha convertido en un aporte económico importante, así por ejemplo en Asia y Latinoamérica sus pobladores la utilizan como resultado de ciertos hechos históricos y creencias propias de cada cultura. El amplio uso de medicina tradicional se debe a ciertos aspectos como su accesibilidad, siendo importante en aquellos países donde su economía es limitada. (OMS, 2014, p. 14-24)

La medicina tradicional en países Latinoamericanos actualmente presenta un incremento e impacto social, representando un aporte importante en atención a la salud, llegando a ser reconocida por altas organizaciones mundiales como la Organización Mundial de la Salud y la

Organización panamericana de Salud, además se destacan ciertos rasgos como lo místico y religioso. La medicina ancestral o tradicional posee una alta presencia en zonas rurales de países latinos, donde los pobladores en su gran mayoría son indígenas, pese a esto en el último tiempo ha existido evidencia sobre una expansión de la medicina ancestral o tradicional en zonas urbanas. (Becerra, 2014, p.1-4)

En la última década ha existido cierta preocupación por los gobiernos competentes, debido a que miles de pobladores no gozan de un servicio de salud digno y de calidad por lo que han optado por practicar la medicina propia de cada país o territorio, aun con más razón cuando el factor económico es el principal limitante. (Becerra, 2014, p.1-4)

En el Ecuador la medicina tradicional cuenta con una historia que se remonta hacia unos 10 000 años atrás, su permanencia en el tiempo se ha dado en tres siglos de colonia española y dos siglos de vida republicana, la medicina ancestral ecuatoriana a cubierto necesidades de ciertas razas y pueblos como mestizos, indios, campesinos, montubios que han encontrado en este tipo de actividad una alternativa de salud más accesible y económica. (Becerra, 2014, p.1-4)

La medicina ancestral se ha mantenido en sectores rurales y sectores urbano - marginales, los pueblos indígenas ecuatorianos tienen una forma propia de concebir la salud y la enfermedad donde integran ciertos aspectos como el físico, espiritual, mental emocional hasta ambiental. Tanto la medicina ancestral andina como la medicina de pueblos amazónicos ecuatorianos se han convertido en una fuente extraordinaria de conocimientos y sapiencias sobre las buenas prácticas y empleos de plantas con actividad terapéutica. Sin embargo a pesar de ser un aporte a la salud en distintos pueblos, este tipo de práctica medicinal ha sido restringida y prohibida durante muchos años por carecer de respaldo científico a criterio de la cultura occidental, pueblos como los Yachacs que viven en sectores donde el acceso de salud gubernamental es difícil consideran a las plantas como una farmacia verde, que carece de costo y es de fácil acceso. (Becerra, 2014, p.1-4)

## **1.2. Plantas Medicinales**

Las plantas medicinales forman parte de un recurso valioso en los sistemas de salud de países de economía emergente. La OMS ha estimado que el 80% de la población mundial maneja empíricamente la medicina ancestral para cubrir necesidades de atención primaria de salud, y que además en la mayoría de los casos los tratamientos tradicionales involucran la utilización de extractos de plantas o sus principios activos. (Bermúdez, *et al.* 2005, pp. 543-459)

De acuerdo a la OMS una planta medicinal es definida como “Cualquier especie vegetal que contiene sustancias que puedan ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos”. (Bermúdez, *et al.* 2005, pp. 543-459).

El uso de plantas medicinales es el medio de terapia más conocida en la medicina tradicional y medicina complementaria a nivel global. Las plantas con alguna actividad terapéutica se consiguen mediante la recolección de variedades silvestres o a partir de cultivos de variedades domésticas. Numerosos pueblos, culturas y/o comunidades dependen de productos naturales recogidos de ecosistemas, los cuales son empleados para fines medicinales, alimentarios, culturales e incluso espirituales. (Bermúdez, *et al.* 2005, pp. 543-459).

Las plantas naturales presentan una gran importancia en la medicina moderna, ya que son fuente directa de agentes terapéuticos, utilizados como materia prima para la producción de medicamentos semisintéticos más complejos, así la estructura química de los principios activos presentes servirían de modelo para la producción de fármacos sintéticos, además los principios activos que pudiesen encontrarse se los emplearía como marcadores taxonómicos en investigaciones de nuevos medicamentos. (Bermúdez, *et al.* 2005, pp. 543-459).

### ***1.2.1. Extractos Vegetales***

Extracto vegetal es aquella preparación líquida, semisólida o sólida que resulta de la adición y acción de ciertos solventes (agua, etanol, acetato de etilo, etc.) sobre plantas, hojas, flores u otros constituyentes de la misma, convirtiéndose en un poderoso medicamento por las propiedades de principios activos presentes en las plantas. (Bagué & Álvarez, 200, p. 145).

Otra definición es que son soluciones extractivas de fitocomplejos de plantas medicinales, obtenidos por maceración o percolación de una droga en un solvente (agua, alcohol, glicerina, propilenglicol, acetato de etilo etc.) y su posterior concentración mediante evaporación parcial o total del solvente de extracción. Se distinguen 4 tipos de extractos de acuerdo al modo de concentración. (Bagué & Álvarez, 200, p. 145).

#### **a. Extractos Fluidos**

Un extracto Fluido es una preparación líquida donde 1 g de planta es equivalente a 1 g de extracto de la planta o tejido de origen animal en estado seco.

Para el proceso de extracción se emplea etanol, agua, sin embargo el alcohol se evapora durante el proceso de extracción por lo que resulta difícil emplearlo como conservante. Un extracto fluido puede ser filtrado, inclusive puede presentar un nivel de sedimento, este nivel sería permisible siempre y cuando la composición del extracto no se vea afectada significativamente. (Bagué & Álvarez, 200, p. 145).

Un extracto fluido es fácilmente alterable si toma contacto con la atmósfera y la luz, favoreciendo dicha alteración la alcalinidad del vidrio de los envases, por lo que deben ser almacenados en frascos totalmente llenos, cerrados y conservados a temperatura ambiente, en un lugar seco y sin contacto a la luz. (Bagué & Álvarez, 200, p. 145).

#### **b. Extractos semisólidos o Blandos**

Un extracto blando es una preparación semisólida que resulta de la evaporización parcial o completa del solvente de extracción, su contenido de agua está alrededor del 60 %, son de difícil conservación y aun de más difícil manipulación, debido a esto en la actualidad este tipo de extractos está en desuso. (Bagué & Álvarez, 200, p. 145).

#### **c. Extractos Secos**

Se obtienen por evaporación total del disolvente hasta conseguir la textura de polvo. Se trata de productos muy concentrados en relación a la droga de partida, con equivalencias variables pero que fluctúan entre 4:1 y 10:1, es decir presenta una concentración de entre 4 y 10 veces mayor al peso de la materia vegetal inicial, su limitante es su poder higroscópico que dificulta su manipulación y conservación. (Bagué & Álvarez, 200, p. 145).

#### **d. Extractos Glicólicos**

Un extracto Glicólico se obtienen a partir de materia vegetal seca sometida a la acción extractiva de un disolvente a base de proilenglicol y agua, consiguiendo una buena extracción de principios polares, se trata de un extracto que presenta una moderada concentración de metabolitos activos si se compara con otros tipo de extractos, por ejemplo extracto hidroalcohólico. (Bagué & Álvarez, 200, p. 145).

### **1.2.2. Métodos de Extracción**

Las condiciones óptimas de extracción varían dependiendo de los compuestos activos y del tipo de planta en que se trabaje. Una extracción convencional se realiza generalmente a temperatura de reflujo de 90 °C durante varias horas o maceración con disolvente durante varios días a temperatura ambiente, estos métodos han sido utilizados durante muchas décadas, sin embargo requieren cantidades relativamente grandes de disolventes, afortunadamente en los últimos años se han creado algunos nuevos métodos de extracción de metabolitos (flavonoides, compuestos fenólicos, taninos, etc.), entre otros tenemos extracción por ultrasonidos (Siglas en Inglés USE) y la extracción asistida por microondas (Siglas en Inglés MAE). (Biesaga, 2011, pp. 2505–2510)

#### **➤ Extracción Por Maceración**

Un proceso de maceración se verifica mediante la interacción entre el material vegetal fresco o seco y el solvente de extracción, llegando a formar un sistema homogéneo, el solvente que se emplee actúa sobre toda la superficie de la muestra disolviendo los principios activos presentes en la planta llegando a alcanzar una cierta concentración proporcionada con el contenido celular. (Guerra, 2005, pp. 14-18).

Durante la maceración se deben realizar agitaciones repetidas durante varios días, llegando a influenciar el gradiente de concentración. Al inicio de la extracción el gradiente está en su punto máximo sin embargo a lo largo de los días pese a la agitación constante que se le dé al sistema (muestra / solvente) el gradiente de concentración disminuye. Como norma general se macera la planta por siete días con agitación frecuente y protegida de la luz solar. Se prefiere la maceración debido a las siguientes razones: (Guerra, 2005, pp. 14-18).

- Principios activos termolábiles.
- Plantas ricas en taninos. Por medio de la maceración se extraen la mayor parte de los metabolitos, dejando los taninos en la planta (Guerra, 2005, pp. 14-18).

#### **➤ Extracción Por reflujo Climatizada**

La extracción por reflujo es una forma de separar fracciones o metabolitos específicos de la planta mediante la adición de un solvente y llevando la mezcla a ebullición sin perjudicar los demás componentes de la muestra a extraer. (Guerra, 2005, pp. 14-18).

Este método se puede efectuar desde tres estados de la materia, siendo los siguientes: (Guerra, 2005, pp. 14-18).

- 1) Extracción sólido – líquido.
- 2) extracción líquido – líquido
- 3) extracción gas – líquido.

#### ➤ **Extracción Por Ultrasonido**

La extracción de principios activos por sonicación o ultrasonido se fundamenta en la utilización de ondas de elevada frecuencia con el propósito de desprender ciertos compuestos del vegetal, el extracto vegetal presenta partículas sólidas y líquidas que al contacto con las vibraciones ultrasónicas se aceleran ocasionando un traspaso del compuesto de la fase sólida al solvente de extracción. (Biesaga, 2011, pp. 2505–2510)

La extracción de compuestos bioactivos bajo irradiación de ultrasonido (20-100 kHz) puede ofrecer una alta reproducibilidad en tiempos más cortos, manipulación simplificada, reducir el consumo de disolvente, temperatura y la entrada de energía es más bajo. Este es un método de extracción económico, además posee bajos requerimientos instrumentales a diferencias de otras técnicas de extracción desarrolladas en los últimos tiempos. (Biesaga, 2011, pp. 2505–2510).

#### ➤ **Extracción asistida por microondas**

El método de extracción por microondas se fundamenta en la utilización de radiaciones electromagnéticas en un límite que va desde 0,3 hasta 300 GHz, al emplear las radiaciones se crea calor al interior del material calentándose en periodos de tiempos cortos, optimizando el método y rendimiento de extracción, evitando cualquier tipo de descomposición de metabolitos de importancia. (Biesaga, 2011, pp. 2505–2510)

La base de extracción asistida por microondas es la mejora en la cinética de extracción proporcionadas por calentamiento. El uso de sistemas cerrados reduce el riesgo de pérdidas, y el hecho de que la irradiación de microondas disminuye ciertos problemas de sobrecalentamiento, además podría minimizar la degradación de analitos presentes en las muestras. La extracción por microondas es un método fácil y rápido, a partir del cual se pueden obtener diferentes compuestos utilizando baja cantidad de solvente, sin embargo no es adecuado utilizarlo en compuestos termolábiles y además requiere de cierto nivel de seguridad. (Biesaga, 2011, pp. 2505–2510)

### 1.3. Tamizaje Fitoquímico

El tamizaje Fitoquímico es una determinación cualitativa que permite identificar los compuestos o metabolitos presentes en la planta. Se han desarrollado una serie de técnicas o métodos para la determinación de diferentes constituyentes químicos de la planta con la ayuda de solventes adecuados y la aplicación de reacciones de coloración. Existen varios métodos de tamizaje o marcha Fitoquímica, algunos de ellos solamente evalúan pocos grupos de sustancias, otros métodos evalúan presencia o ausencia de compuestos de bajo interés: por ejemplo azúcares, polisacáridos, mucílagos etc. Para la realización de pruebas cualitativas en un tamizaje fitoquímico se requiere cierta cantidad de material vegetal, esta varía de 5 – 200 g. (Bagué & Álvarez, 200, p. 145).

**Tabla 1-1:** Principales Pruebas Cualitativas de Tamizaje Fitoquímico previo a la Determinación de Metabolitos Secundarios.

<b>N.</b>	<b>Prueba Cualitativa</b>	<b>Grupo Fitoquímico</b>
<b>1</b>	Dragendorff Mayer Wagner	Alcaloides
<b>2</b>	Baljet	Cumarinas
<b>3</b>	Borntrager	Quinonas
<b>4</b>	Liebermann – Burchard	Triterpenos y/o Esteroides
<b>5</b>	Catequinas	
<b>6</b>	Resinas	
<b>7</b>	Fehling	Presencia de azúcares Reductores
<b>8</b>	Espuma	Saponinas
<b>9</b>	Cloruro Ferrico FeCl <sub>3</sub>	Compuestos fenólicos y/o Taninos
<b>10</b>	Shinoda	Flavonoides
<b>11</b>	Antocianidinas	Flavonoides de estructura: C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>
<b>12</b>	Mucilagos	Polisacaridos
<b>13</b>	Principios Amargos Y Astringentes	

Fuente: MIRANDA, M. 2002.

Realizado por: GUAMÁN, F.2015

## 1.4. Métodos de Concentración de Extractos Fluidos

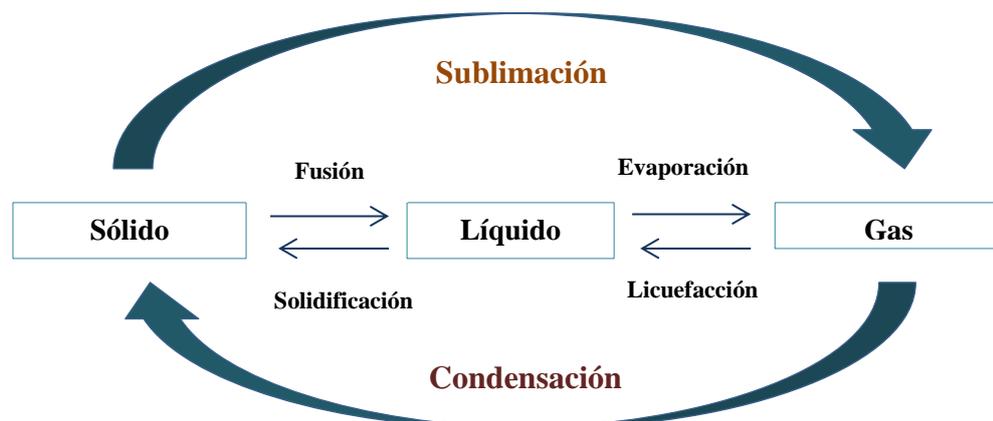
### A. Evaporación

La evaporación es un método empleado para la eliminación parcial o total del solvente de extracción y la concentración de extractos fluidos mediante ebullición de una parte del líquido contenido en una disolución. El calor necesario para ello puede proceder de cualquier medio de calefacción. (Bagué & Álvarez, 200, pp. 233-234).

En los laboratorios de análisis fitoquímico es frecuente trabajar con un Rotaevaporador para la concentración de extractos, por lo general el extracto a concentrar ingresa por la parte superior hacia el frasco acoplado en el equipo, este se encuentra sumergido en un baño de agua que permite incrementar o disminuir la temperatura de trabajo. Mediante la evaporación de solvente por Rotaevaporador permite llegar a obtener extractos blandos y secos que se pueden recuperar a través de disoluciones apropiadas. (Bagué & Álvarez, 200, pp. 233-234).

### B. Secado por Liofilización

La liofilización fue conocida antiguamente como criodesecación, es un método de desecación en donde se elimina un volumen de agua por congelación del producto húmedo y la posterior sublimación del hielo en condiciones de vacío. Se entiende por sublimación, al producto congelado que cambia de estado sólido a gaseoso sin pasar por un estado líquido. (Orrego, 2008, pp. 49-55)



**Figura 1-1.** Etapas de Proceso de Liofilización

Fuente: (ORREGO, 2008, pp. 49-55)

El extracto seco presenta una estructura abierta, porosa que se hidrata con mayor facilidad que un extracto secado al ambiente, por su estructura abierta una solución liofilizada expone una superficie interna muy grande a la oxidación. (Orrego, 2008, pp. 49-55)

La liofilización presenta dos etapas fundamentales:

1. Congelación del producto, alimento y/o Extracto.
2. El Producto es secado por sublimación directa del hielo bajo presión reducida. (Orrego, 2008, pp. 49-55)

**Etapas de Secado por Sublimación.** En el proceso de secado por congelación se distinguen tres etapas importantes a considerar:

- **Etapas Conductiva**

Al inicio debido al calentamiento de la muestra la velocidad de sublimación incrementa de forma instantánea hasta llegar a un punto máximo. Su tiempo de agotamiento es corto, por lo general está en 10 – 15% del tiempo total del proceso. (Orrego, 2008, pp. 49-55)

- **Primera Fase Difusiva**

Se da una disminución considerable de la velocidad de evaporación del sólido a consecuencia de la formación de una capa porosa de extracto seco que se resiste al flujo de calor y vapor a medida que avanza el proceso de secado.

Las dos fases Conductiva y Difusiva se denominan secado primario, durante estas dos fases se da la mayor eliminación de agua del producto a concentrar. (Orrego, 2008, pp. 49-55)

- **Segunda Etapa Difusiva**

La etapa difusiva se la conoce como secado secundario, la velocidad de evaporación del sólido sigue decreciendo de forma que se aproxima a cero debido a que el calor que se requiere para condensar el agua ligada es mayor que el calor de sublimación. (Orrego, 2008, pp. 49-55)

### **Ventajas del secado por Liofilización**

- › Humedad residual muy baja
- › Tiempo de conservación es extenso.
- › Alta Calidad del producto final Manteniendo de mejor manera todos los constituyentes del producto.

- › Debido a la sublimación del hielo quedan poros que facilita una disolución/reconstitución inmediata.
- › Es aplicable para productos termolábiles, impidiendo su descomposición o alteración debido a la baja temperatura.

**Desventajas:**

- › Alto costo en equipos y materiales.
- › Gran consumo de energía
- › Tiempos de secado largos. (Orrego, 2008, pp. 49-55)

**1.5. Actividad Antibacteriana de Plantas**

Las plantas desde épocas antiguas constituyen un recurso necesario para el ser humano, utilizadas como fuente de alimentación y curación de dolencias o enfermedades, un ejemplo de ello lo constituye las plantas que poseen capacidades de combatir agentes patógenos llegando a destruirlos o inhibirlos parcialmente en su desarrollo y crecimiento, por lo que un antibiótico natural posee la capacidad de ser bactericida o bacteriostático frente a un ente patógeno. (Araujo & Salas, 2008)

Existe un aproximado del 60 % de la población mundial que emplea plantas y derivados de ellas con alguna actividad antibacteriana. En miles de casos se puede emplear directamente la planta o algún extracto derivado sin tener que extraer y purificar metabolitos activos que pudiesen presentar actividad terapéutica. (Araujo & Salas, 2008)

**1.6. Principales Grupos de Compuestos Antimicrobianos de Plantas Naturales:**

**Compuestos Fenólicos**

Los compuestos fenólicos son un conjunto de compuestos que presentan en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos, por lo general se presentan como glicósidos, combinados con unidades de azúcar. Son bactericidas o bacteriostáticos, dependiendo de la concentración a la que se use, algunos compuestos fenólicos actúan como fungicidas, su actividad se reduce a un pH alcalino y por material orgánico. Entre los principales compuesto fenólicos con actividad bactericida tenemos: (Araujo & Salas, 2008)

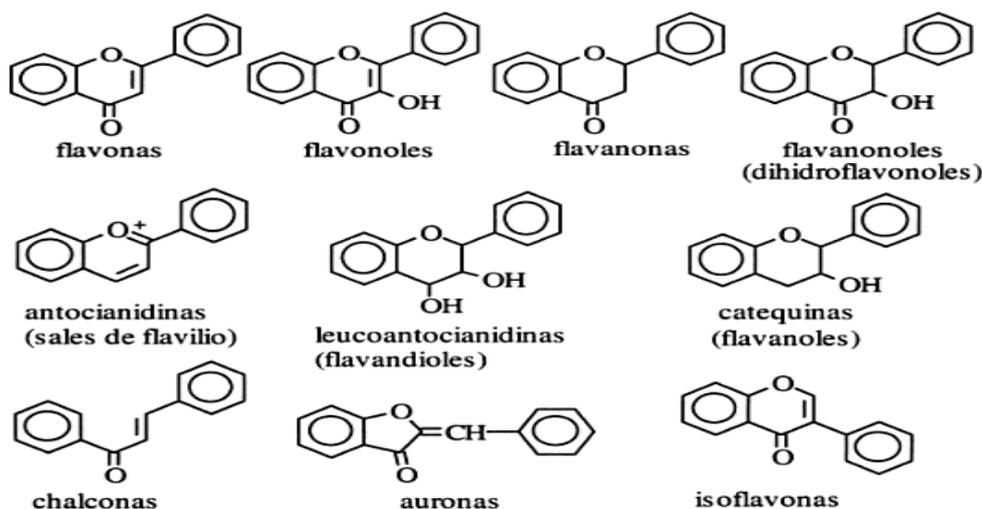
### 1.6.1. Fenoles y Polifenoles

Los Fenoles se hallan libres, depositados en semillas, frutos, tejidos muertos, generalmente se encuentran en estado sólido, su coloración se alterna desde incoloro a fenoles intensamente coloreados, son solubles en solventes polares lo que permite diferenciar los pigmentos liposolubles como carotenoides que al igual que los fenoles presentan coloraciones fuertes. (Araujo & Salas, 2008)

Debido a su acidez permiten ser solubles en bases ( $\text{NaOH} - \text{Na}_2\text{CO}_3$ ), además absorben en la región visible y ultravioleta. El ácido cafeico y cinámico representantes de este grupo presentan actividad antiviral, antibacteriana y antimicótica, demostrada científicamente. Los catecoles y Eugenoles presentan una actividad bacteriostática sobre bacterias es decir no provocan la muerte bacteriana pero tampoco permite su proliferación. (Araujo & Salas, 2008)

### 1.6.2. Flavonoides

Los flavonoides son compuestos derivados de los fenil propanos, se trata de uno de los grupos más abundantes, distribuidos de gran ampliamente en la naturaleza, a excepción de algas se encuentran generalmente concentrados en hojas y flores, son solubles en agua y etanol, son pigmentos vegetales que presentan una estructura carbonada:  $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$ , algunos ejemplos son: flavona , aurora , chalcona , flavona , flavonol , flavanol , flavandioli-3,4 (leucoantocianidina) , antocianidina , catequina , isoflavona y neoflavona (Lock de Ugaz, 1994, pp.114-117)

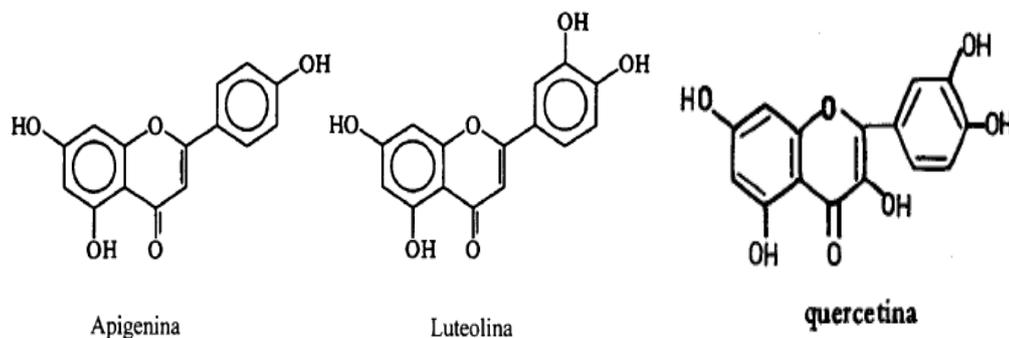


**Figura 2-1.** Estructuras de Principales Grupos de Flavonoides  
Fuente: (LOCK DE UGAZ, 1994)

Los flavonoides son sintetizados por numerosos grupos de plantas y con excepción de algunas flavonas localizadas en alas de mariposas, confieren ciertas actividades terapéuticas entre las que tenemos: Actividad antioxidante y secuestradores de radicales libres, actividad antimicrobiana, actividad Fotoprotectora contra luz UV. Existen aproximadamente 3000 flavonoides naturales distribuidos extensamente en plantas vegetales, de forma libre (agliconas) o como glicósidos (ligados a moléculas de carbohidratos). Es más frecuente el estudio de flavonoides en estado libre en extractos de plantas previamente hidrolizados, algunas clases de agliconas se encuentran en mayor proporción en unas plantas que en otras, siendo las más comunes flavonas y flavonoles y menos comunes de encontrar tenemos a isoflavonas, chalconas y auroras. (Lock de Ugaz, 1994, pp.114-117).

### Actividad Antibiótica de Flavonoides

Desde siglos pasados se ha estudiado la relación de flavonoides y su capacidad de acción frente a infecciones provocadas por hongos y virus. Varios flavonoides han demostrado presentar actividad fúngica y antiviral, como es el caso de glucósidos de apigenina, luteolina y Quercetina, los cuales son capaces de inhibir infecciones causadas en árboles frutal (*Pyrus comunnis*). Otros flavonoides como Dihidroquercetina y dihidrorobinetina presentan actividad antifúngica, tro ejemplo es el faseolinisoflavano (isoflovano) que inhibe el crecimiento de *Fusarium*. (Ferraro, 1983, p.98)



**Figura 3-1.** Estructura de Grupos de Flavonoides con actividad antibacteriana  
Fuente: (LOCK DE UGAZ, 1994)

### 1.6.3. Quinonas

Las quinonas en su forma natural son un conjunto de compuestos que presentan una coloración variable que va de amarillo hasta casi negro, por lo general se encuentran distribuidas en la corteza, madera e inclusive raíces de plantas, en ciertos casos se pueden encontrar en hojas, en algunas ocasiones pueden ser responsables de aportar coloración a la planta. (Lock de Ugaz, 1994, p. 182)

Las quinonas se subdividen en:

- Benzoquinonas.
- Naftoquinonas.
- Antraquinonas.
- Quinonas isoprenoide.

Se Presume que las Quinonas actúan sobre adhesinas presentes en la superficie de bacterias, sobre polipéptidos y enzimas ligadas a membranas. Desde épocas antiguas las quinonas han sido utilizadas por sus propiedades de teñir compuestos, algunos derivado como la shikonina actúa como antimicótico, la plumbagina es activa frente a leishmaniasis, el lapachol presenta actividad citostática, bacteriostática y fungistática. (Lock de Ugaz, 1994, p. 182)

#### **1.6.4. Taninos**

Los taninos representan una clase de polímeros fenólicos vegetales utilizados como defensa frente a microorganismos, ejemplo de ello, especies de árboles contienen elevadas concentraciones de taninos que ayudan a prevenir la descomposición causada por bacterias y hongos. (Araujo & Salas, 2008)

Los taninos se clasifican en dos grupos: Taninos hidrolizables y Taninos condensables, en el primer grupo el principal representante es el ácido gálico, mientras que en el segundo los compuestos más representativos provienen de monómeros de flavonoides. La capacidad de inhibir el crecimiento microbiano se presume que se debe a la unión e interacción de su estructura sobre adhesinas y polisacáridos. (Araujo & Salas, 2008)

#### **1.7. Bacterias y hongos :Distribución en la Naturaleza**

Las bacterias son organismos procariotas unicelulares, comúnmente se dividen por fisión binaria. Se encuentran distribuidas en todas partes, son transportados por corrientes de aire desde la superficie de la tierra a las partes más altas de la atmosfera. Se encuentran en sedimentos de mares ubicados a grandes profundidades, abundan en suelo fértil, ríos, lagos, etc. (Pelczar, *et al.*, 1987, p. 11-425)

Las bacterias abundan cuando encuentran fuentes de alimentos, lugares húmedos y temperaturas idóneas para su supervivencia, crecimiento y multiplicación. Numerosas son las bacterias que sobreviven y se desarrollan en condiciones que normalmente lo hace el hombre,

por lo que resulta inevitable que vivamos rodeados de bacterias. Sin embargo muchos de ellos son inofensivos e inocuos para el hombre. (Pelczar, *et al.*, 1987, p. 11-425)

Los hongos son organismos multicelulares, desprovistos de ciertos pigmentos como clorofila, no contienen tallos, hojas y raíces. Su tamaño varía desde una levadura (Única célula) hasta un champiñón (seta multinucleada grande). Los hongos verdaderos disponen de filamentos y masas de células que componen el cuerpo del organismo, conocidos como micelios (Pelczar, *et al.*, 1987, p. 11-425)

Los Hongos son organismos heterótrofos, de cuerpos alargados o filamentosos, en su mayoría inmóviles, en estado saprófito se alimentan de la materia orgánica muerta, en forma de parásitos se alimentan de huéspedes vivos. Son seres eucariotas quimioorganotróficos, distribuidos ampliamente en la naturaleza, ubicados en suelo, plantas, alimentos, la mayoría se reproducen de forma natural a través de esporas. (Pelczar, *et al.*, 1987, p. 11-425)

### **1.7.1. Resistencia Bacteriana a Antibióticos**

La resistencia bacteriana a un medicamento antimicrobiano se ha convertido en un proceso natural en donde las bacterias adquieren cierta tolerancia hacia nuevas condiciones ambientales, esto podría ser a causa de un factor preexistente en el microorganismo o a algunos factores adquiridos. Por ejemplo la resistencia a la penicilina suele ser el resultado de la producción de penicilinasas, una enzima que convierte a la penicilina en ácido peniciloico inactivo. (Pelczar, *et al.*, 1987, p. 11-425)

Entre otros mecanismos internos de resistencia tenemos:

- › Inhibición competitiva entre un principio activo esencial y un agente bacteriano
- › Alteración de la estructura proteínica ribosomal de la bacteria.
- › Alteración de la membrana o pared celular imposibilitando el paso del antibiótico al organismo. (Pelczar, *et al.*, 1987, p. 11-425)

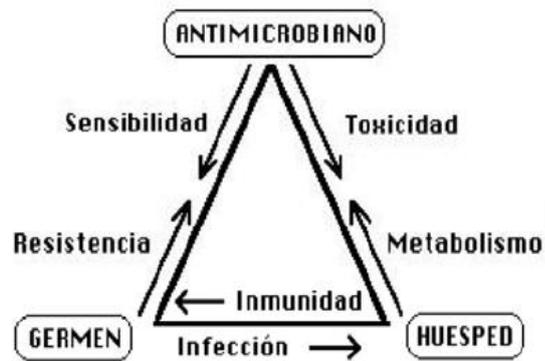
Entre los factores externos que favorecen al origen y difusión de resistencia bacteriana tenemos:

- › Escasa utilización de instrumentos de diagnóstico, prevención y tratamiento.
- › Prácticas ineficientes para prevenir y controlar infecciones.
- › Uso Irracional de antimicrobianos, incluido en la cría de animales,

- › Sistema Inadecuado Para Asegurar la Calidad y el Suministro ininterrumpido de medicamentos.
- › Falta de sistemas eficientes y adecuados para la vigilancia y seguimiento de resistencia de antibacterianos.
- › Falla de una respuesta integral y coordinada. (OMS, 2015)

### 1.7.2. Inhibición Bacteriana

El empleo de antibióticos es la principal herramienta médica en el tratamiento de patologías infecciosas, en los últimos años la resistencia bacteriana se ha convertido en el más grande problema de morbilidad y mortalidad en personas. A continuación se muestra una triada, donde se relacionan: Antibiótico, Germen y Huésped. (Sulca, 2010, p. 38)



**Figura 4-1.** Triada Interacción: bacteria – Germen Y Huésped.  
Fuente: (SULCA, 2010)

La clasificación de un antibiótico está basada en la estructura química y su correspondiente mecanismo de acción, a continuación se indican los principales mecanismos de acción de antibióticos.

1. Compuestos que inhiben la síntesis de la pared bacteriana.
2. Compuestos que actúan de modo indirecto en la membrana celular del microorganismo y que afectan su permeabilidad y permiten la fuga de compuestos intracelulares.
3. Medicamentos que afectan la función de las subunidades ribosomales 30 S o 50 S y causan inhibición reversible de la síntesis proteínica.
4. Fármacos que afectan el metabolismo del ácido nucleico.
5. Antimetabolitos (Trimetoprim y las sulfonamidas) que bloquean fases metabólicas específicas que son esenciales para los microorganismos.
6. Análogos de ácidos nucleicos, que bloquean a las enzimas virales que son esenciales para la síntesis de DNA y así impiden la réplica viral. (Goodman & Gilman, 2000, p. 1093)

### **1.7.3. Cultivo y Factores de Crecimiento Bacteriano**

Para realizar un estudio de morfología, características, susceptibilidad bacteriana, etc., en microorganismos/hongos se necesita como requisito sembrarlos en medio de cultivo, se entiende como medio de cultivo como aquellas mezclas de sustancias que proporciona en forma asimilable el mayor porcentaje de elementos o sustancias necesarios para su crecimiento y propagación.

El desarrollo de una bacteria en un medio de cultivo depende de varios factores entre los que resaltan:

#### **a. Composición**

Un medio de cultivo debe incluir varios elementos para garantizar un crecimiento bacteriano, entre los elementos tenemos: Nitrógeno, carbono, Elementos minerales (P-S-Ca-Mg-Fe) factores estimulantes como hidratos de Carbono, sangre.

#### **b. pH del medio.**

Comúnmente una bacteria crece en un pH cercano a la neutralidad de 6,8 a 7,6.

#### **c. Presión Osmótica.**

Un medio de cultivo debe prepararse en condiciones de isotonía.

#### **d. Potencial Redox**

Un requerimiento indispensable para el crecimiento y desarrollo bacteriano es la presencia de agua por lo q deberá estar en cantidades suficientes en un medio.

#### **e. Temperatura.**

Para análisis y estudios de bacterias de importancia clínica los cultivos deben incubarse de 35 – 37 °C.

#### **f. Atmosfera**

Varias bacterias aerobias y bacterias facultativas requieren para un excelente desarrollo la presencia de ambientes gaseosos.

Sin embargo hasta la actualidad no su cuenta con un medio de cultivo universal que cubra las necesidades de bacterias/hongos, por lo que la elección de un medio se realiza a partir de las necesidades nutritivas que requieran y del hábitat natural. (Álvarez & Boquet, 1995. p 224).

## 1.8. Microorganismos Monitores

### 1.8.1. *Escherichia coli*

*E. coli* es un bacilo Gram negativo, heterótrofo, anaerobio facultativo, móvil por flagelos periféricos, incapaz de formar esporas pero capaz de fermentar glucosa y lactosa. Mide 0,5 $\mu$  de ancho y 3 $\mu$  de longitud, presentan actividad positiva para catalasa y actividad negativa para Oxidasa, además tiene la capacidad de reducir nitratos en nitritos. (Tapia, 2012, p 29-30)

Se adapta y desarrolla con gran facilidad en medios de cultivo como agar Eosina y Azul de metileno presentando colonias oscuras que en ciertos casos tienden a ser negras, una de sus características distintivas es el color verde metálico cuando es observada hacia la luz, generalmente las colonias tienen un diámetro de 2- 4 mm. (Contero, 2012, p 29-30)

Se clasifican de acuerdo a su poder de morbi-mortalidad en el hombre:

- *E. coli* Entero patógena.
- *E. coli* enterotoxigénica.
- *E. coli* Entero invasiva
- *E. coli* Entero hemorrágica. (Rodríguez – Ángeles, 2002, p 465-466)

#### 1.8.1.1. Clasificación Taxonómica

**Tabla 2-1.** Clasificación Taxonómica de *Escherichia coli*

Reino	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacterales
Familia	Enterobacteriaceae
Genero	<i>Escherichia</i>
Especie	<i>E. coli</i> ( <i>E. freundii</i> )

Fuente: (UVIDIA, 2012)

#### 1.8.1.2. Patogenia

*E. coli* presenta un alto poder virulento, puede provocar disenterías hemorrágicas debido a su agresividad, intensidad y a la capacidad de desplegar sustancias tóxicas, ocasiona cólico en el

hombre y varios animales. Se propaga con los alimentos, agua contaminada, excreciones de animales llegando a ocasionar enfermedades muy graves como infecciones, meningitis, septicemia, neumonía etc. (Rodríguez & Ángeles, 2002, p 465-466)

### 1.8.2. *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* es un coco Gram- positivo, aerobio o anaerobio, de forma esférica, inmóvil, no esporulante, presenta actividad positiva para catalasa y coagulasa, se ubican como racimos irregulares parecidos a un racimo de uvas, mide 1µm de diámetro, además de *S. aureus*, otras especies como *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus sprophyticus* están conectados directamente con enfermedades humanas, productoras de enterotoxinas, por lo habitual se encuentra en mucosa nasal, piel, cabello. (Pelczar, et al., 1987. p 11-425)

*S. aureus* se adapta y desarrolla con gran facilidad en medios de cultivo como agar sangre y agar chocolate, puede producir hemólisis, desarrolla colonias medianas, de color blanco ligeramente cremoso que al dejarlos incubarlos por 24 o más horas se tornan de color amarillo. Son identificados por presentar pruebas positivas en: catalasa, coagulasa y manitol. (Pelczar, et al., 1987. p 11-425)

#### 1.8.2.1. Clasificación Taxonómica

**Tabla 3-1.** Clasificación Taxonómica de *Staphylococcus aureus*

<b>Reino</b>	<b>Bacteria</b>
<b>Filo</b>	<b>Firmicutes</b>
<b>Clase</b>	<b>Bacilli</b>
<b>Orden</b>	<b>Bacillales</b>
<b>Familia</b>	<b>Micrococcaceae</b>
<b>Genero</b>	<b><i>Staphylococcus</i></b>
<b>Especie</b>	<b><i>aureus</i></b>

Fuente: (UVIDIA, 2012)

#### 1.8.2.2. Patogenia

El *S. aureus* figura entre las bacterias patógenas más importantes para el hombre, es un habitante normal de vías respiratorias superiores, piel, intestino y vagina, provocan diversas enfermedades supurativas o generadoras de pus. En conjunto con especies *Neumococos* y *Streptococos* forman un grupo de bacterias Gram -positivas invasoras conocidas como cocos pirógenos. (Productoras de pus), estas bacterias Gram- positivas pueden provocar enfermedades

mediante dos mecanismos distintos. El primero se basa en la capacidad de bacterias para proliferar y propagarse ampliamente por los tejidos, el segundo, en la capacidad de bacterias para producir toxinas y enzimas extracelulares. (Pelczar, et al., 1987. p 11-425)

El *S. aureus* provoca intoxicación alimentaria (ETA) debido a la producción de una enterotoxina termoestable estafilocócica, ocasionando en las personas vómitos explosivos, diarrea, fiebre, cólicos, desequilibrio hidroelectrolítico y deshidratación. (Pelczar, et al., 1987. p 11-425)

### 1.8.3. *Pseudomona aeruginosa*

*P. aeruginosa* es un bacilo Gram -Negativo, anaerobio, móvil debido a la presencia de 1-3 flagelos polares, incapaz de formar esporas. Mide de 0,5µm -1µm de diámetro y de 1.5µm - 5µm de longitud, presenta actividad positiva para catalasa y oxidasa. Se adapta y desarrolla con gran facilidad en agar MacConkey, no fermentan lactosa, tiene la capacidad de reducir nitratos en nitritos. (Ruiz, 2007, p 3-9)

Generalmente crecen en temperaturas óptimas de 30<sup>0</sup>C a 37<sup>0</sup>C, no obstante pueden crecer y multiplicarse en cualquier condición ambiental llegando a crecer en temperaturas de 20 a 42<sup>0</sup>C. *P. aeruginosa* presenta como características de cultivo la presencia de color amarillo- verdoso debido a la pioverdina, pigmento fluorescente propio del bacilo. (Ruiz, 2007, p 3-9)

#### 1.8.3.1. Clasificación Científica

**Tabla 4-1.** Clasificación Taxonómica de *Pseudomona aeruginosa*

Reino	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Pseudomonadales
Familia	Pseudomonadaceae
Genero	<i>Pseudomona</i>
Especie	<i>aeruginosa</i>

Fuente: (RUIZ, 2007)

### 1.8.3.2. Patogenia

*P. aeruginosa* es la bacteria más representativa del género *Pseudomonas*, genera una gran cantidad de infecciones en el hombre, convirtiéndose en un patógeno altamente peligroso, siendo participe de altos índices de morbi-mortalidad. Reconocida como fuente de infecciones nosocomiales, provoca foliculitis, bacteriemia, infecciones en piel, tracto urinario y respiratorio. (Ruiz, 2007, p 3-9)

*P. aeruginosa* es el pseudomonadal que se aísla con más frecuencia en muestras clínicas, la infección prevalece especialmente en pacientes con quemaduras, fibrosis quística, leucemia aguda, trasplante de órganos y adicción a drogas intravenosas. Además ocasiona queratitis, infección de úlceras corneanas y la endoftalmitis, esta última puede convertirse en una enfermedad permanente para el hombre. (Ruiz, 2007, p 3-9)

### 1.8.4. *Klebsiella pneumoniae*

*K. pneumoniae* es la especie de mayor relevancia clínica dentro del género bacteriano *Klebsiella*, compuesto por bacterias Gram -Negativas de la familia Enterobacteriaceae, de bacilos rectos, de 0,3µm - 1,0µm de diámetro y 0,6 - 6,0µm de longitud. Su disposición celular es individual, en pareja o formando cadenas cortas, carecen de movilidad, se encuentran encapsuladas, forma parte de la flora natural en el ser humano, sin embargo pueden volverse patógenas cuando se ubican fuera del intestino, especialmente en el canal alimentario. (Chaves, 2013, p 4-8)

La denominación de *K. pneumoniae* se debe en honor del patólogo alemán Edwin Klebs, importante investigador de su época, quien mantuvo investigaciones en el área de enfermedades infecciosas. Presenta dos tipos de metabolismos: fermentativo y respiratorio por lo que se las considera como bacterias anaerobias facultativas, se desarrollan en la mayoría de los medios de cultivo, sin embargo el citrato y glucosa se los puede emplear como su única fuente de carbono, las especies de género *Klebsiella* crecen de 30 °C – 37 °C, sin embargo pueden crecer hasta 44.5 °C. (Chaves, 2013, p 4-8)

#### 1.8.4.1. Clasificación Taxonómica

**Tabla 5-1.** Clasificación Taxonómica de *Klebsiella pneumoniae*

Reino	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Genero	<i>Klebsiella</i>
Especie	<i>pneumoniae</i>

Fuente: (UVIDIA, 2012)

#### 1.8.4.2. Patogenia

Por muchos años *K. pneumoniae* fue descartada como un agente potencialmente peligroso para la salud del ser humano, a pesar de esto y por el uso excesivo de antibióticos, la automedicación y utilización de procedimientos de diagnósticos médicos más estrictos hoy en día es considerado como un agente etiológico potencialmente peligroso, representa un alto porcentaje de infecciones a nivel de vías urinarias, aparato respiratorio, septicemias (presencia de bacterias en sangre) e infecciones de tejidos blandos. (Chaves, 2013, p 4-8)

Es causante de diversas enfermedades a nivel hospitalario, en un gran porcentaje contribuyen al desarrollo de neumonías, espondilitis anquilosante, su principal lugar de desarrollo se da a nivel de tracto gastrointestinal, siendo las manos del personal hospitalario de salud el principal vehículo de transmisión de este agente. Es considerada como la segunda bacteria más virulenta después de *Escherichia coli* en causar infecciones a nivel del tracto urinario (ITU) (Chaves, 2013, p 4-8)

#### 1.8.5. *Proteus vulgaris*

*P. vulgaris* es un bacilo Gram Negativo, anaerobio facultativo, móvil debido a la presencia flagelos peritricos, no esporulado ni encapsulados, presenta actividad positiva para catalasa, ureasa y oxidasa, incapaces de fermentar lactosa. *P. vulgaris* desamina triptófano (Indol) lo que la diferencia en pruebas bioquímicas de *Proteus mirabilis*. Las especies de *Proteus* muestran el rasgo característico de la motilidad ascendente, que se observa en agar no inhibidor (ej. Agar Sangre) como una propagación ondulante del microorganismo a través de la totalidad de la

superficie del medio de cultivo. Crece y multiplica con mayor facilidad en agar MacConkey, formando colonias blandas o incoloras. (García & Rodríguez, 2010, p 3430-3431)

#### 1.8.5.1. Clasificación Taxonómica

**Tabla 6-1.** Clasificación Taxonómica de *Proteus vulgaris*

<b>Filo</b>	<b>Proteobacteria</b>
<b>Clase</b>	<b>Gammaproteobacteria</b>
<b>Orden</b>	<b>Enterobacteriales</b>
<b>Familia</b>	<b>Enterobacteriaceae</b>
<b>Genero</b>	<i>Proteus</i>
<b>Especie</b>	<i>P. vulgaris</i>

Fuente: (GARCÍA & RODRÍGUEZ, 2010)

#### 1.8.5.2. Patogenia

La especie *P. vulgaris* se obtiene con mayor frecuencia en huéspedes inmunodeprimidos, sobre todo los que reciben una terapia extensa de antibióticos. Es causante de diversas enfermedades como prostatitis, pielonefritis, por lo general se ubica a nivel de vías urinarias ocasionando infecciones urinarias, además septicemia, neumonía entre otras. (García & Rodríguez, 2010, p 3430-3431)

#### 1.8.6. *Candida albicans*

Conocida en algunas ocasiones como *Oidium albicans*, se desarrolla de manera distinta de acuerdo a la temperatura de crecimiento, en forma de levadura en el huésped a 37 °C y a manera de hongo filamentoso a 25 °C, se reproducen de forma asexual mediante gemación. En su forma de levadura presenta forma redondeada, de tamaño próximo a 3-8µm a 2-7µm, colocada en pequeños grupos. Cuando se observa a modo de hongo filamentoso las células presentan forma alargada, formando desde pseudohifas a hifas formales. (Aguilera, 2010, p 1-4)

Su dimorfismo le ayuda a eludir diversos mecanismos de defensa del sistema inmunitario del ser humano. Al presentarse como levadura esta se comporta como saprofita el huésped, y a manera de hongo filamentoso actúa como un parásito patógeno. (Aguilera, 2010, p 1-4)

### 1.8.6.1. Clasificación Taxonómica

**Tabla 7-1.** Clasificación Taxonómica de *Candida albicans*

Reino	Fungi
<b>Filo</b>	Deuteriomycota
<b>Clase</b>	Saccharomycotina
<b>Orden</b>	Saccharomycetales
<b>Familia</b>	Saccharomycetaceae
<b>Genero</b>	<i>Candida</i>
<b>Especie</b>	<i>albicans</i>

Fuente: (UVIDIA, 2012)

### 1.8.6.2. Patogenia

*C. albicans* es un patógeno oportunista que ocasiona infecciones denominadas Candidiasis. A diferencia de otros hongos patógenos, *C. albicans* es un miembro de la microbiota normal del tracto digestivo, aparato respiratorio, área vaginal y boca, en individuos sanos no produce ninguna sintomatología, sin embargo, si existe una alteración de la microbiota se puede multiplicar rápidamente y producir candidiasis. En los últimos años se ha consolidado como un patógeno nosocomial a tener muy en cuenta. Entre otras enfermedades ocasiona candidiasis bucal o muguet común en recién nacido. Además *C. albicans* produce Paroniquia (tejidos subcutáneos) y Onicomicosis (uñas), Candidiasis intertriginosa que afecta a superficies cutáneas como axilas, ingles. (Aguilera, 2010, p 1-4)

## 1.9. Especies Vegetales.

### 1.9.1. *Urtica baccifera* (L) Gaudich

#### 1.9.1.1. Antecedentes

*U. baccifera* (L) Gaudich es una especie de ortiga que se encuentra distribuida en Centroamérica y Sudamérica, desde la antigüedad los aztecas empleaban la ortiga para elaborar papel, en la medicina tradicional se empleaba la ortiga como medio de curación en artritis, cuadros reumáticos, alérgicos, además como un medio antiinflamatorio y diurético. En forma etimológica *Urtica* proviene de latín *urere* que significa quemar o arder y *baccifera* describe la forma de frutos. (Onofre & Herkert, 2012, p. 139-143).

### 1.9.1.2. Descripción Botánica

*U. baccifera* (L) Gaudich es una planta perenne, de arbusto erecto, que varía en altura de 1,5m a 2,5m, con hojas alternas, simples, contiene pelos urticantes que causan quemaduras en la piel, presenta flores pequeñas, unisexuales, crecen en inflorescencias axilares. Los frutos son pequeños, o en forma de drupa achene, es una planta esponjosa, hidratada y rica en hidratos de carbono y proteínas. Esta especie es conocida popularmente como ortiga y se puede encontrar a lo largo de los bordes del bosque en América Tropical, donde hay un ambiente húmedo, sombrío. (Onofre & Herkert, 2012, p. 139-143).

### 1.9.1.3. Nombre Vernáculo

Se la conoce como Ortiga brava y Ortiga Menor. (Onofre & Herkert, 2012, p. 139-143).

### 1.9.1.4. Clasificación Taxonómica

**Tabla 8-1.** Clasificación Taxonómica de *Urera baccifera* (L) Gaudich

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Phylum</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Urticales
<b>Familia</b>	Urticaceae
<b>Género</b>	Urera
<b>Nombre Científico</b>	<i>Urera baccifera</i> (L) Gaudich

Fuente: (PINO, 2005)

### 1.9.1.5. Usos Medicinales

*U. baccifera* (L) Gaudich es una especie nativa popularmente utilizada en el tratamiento de hemorroides, hemorragias, reumatismo, pérdida de cabello, enfermedades de la piel, no debe ser utilizada de manera indiscriminada, debido a que puede causar daños o toxicidad para el organismo. Además, otras especies de la flora *Urticaceae* muestran actividad hipoglucémica, hipotensora, antibacteriana y antiviral. (Onofre & Herkert, 2012, p. 139-143).

#### 1.9.1.6. Constituyentes Químicos.

Entre otros componentes químicos, las hojas de *U. baccifera* contienen proteínas, calcio, potasio, magnesio, fósforo, azufre, hierro, sodio, manganeso, boro, zinc y cobre. (Onofre & Herkert, 2012, p. 139-143).

#### 1.9.2. *Urtica urens*

##### 1.9.2.1. Historia

EL efecto punzante de la ortiga es ampliamente conocido por muchos que han sido sorprendidos por su picadura. Esta planta pertenece al género *Urtica* se deriva de *uro*, para quemar, o *urere*, que significa picadura. Desde la antigüedad, las personas se han aprovechado del efecto de esta picadura para emplearla en enfermedades artríticas o paralíticas; estimulan la circulación y dan calor a las articulaciones y extremidades en un tratamiento conocido como urticaria

(Upton, 2013, p.9-15)

Como ejemplo tenemos a los antiguos egipcios que utilizaban la infusión de ortiga para el alivio de artritis y el lumbago. Las tropas romanas empleaban en sí mismos la ortiga para mantener el calor, llevaban semillas de una especie similar, la ortiga romana (*U. pilulifera*) a Inglaterra con el propósito de mantener el calor corporal. Esta práctica de frotarse la ortiga se convirtió en un estándar en la medicina popular como un remedio para la artritis, el reumatismo y la parálisis muscular y es quizás el uso medicinal más antiguo de ortiga. (Upton, 2013, p.9-15)

##### 1.9.2.2. Descripción Botánica

*Urtica urens* se presenta en forma de arbusto, perenne y urticante, de tallo grueso y surcado, a partir del tallo surgen sus hojas, las más antiguas presentan formas aovadas, mientras sus hojas jóvenes toman forma puntiaguda, generalmente presentan un diámetro de 70 mm. Su fruto es un aquenio de 1 mm de grosor. *U. urens* es de tamaño pequeño y de color verde oscuro, tienen una base opaca bulbosa o cilíndrica y el ápice translúcido rígido. Sus tallos y hojas llevan pelos urticantes erectos y erizados por naturaleza, los pelos urticantes poseen la misma estructura y longitud que las que se encuentran en la hoja de *U. dioica*, (Upton, 2013, p.9-15)

### 1.9.2.3. Nombre Vernáculo

En el Ecuador a la Ortiga blanca se lo conoce también como Kari chini, yana chini (kichwa), ortiga, ortiga blanca, ortiga de 24 horas, pica manos, picasarna, ronchona, ortiga silvestre. (Ministerio del Ambiente, 2014)

### 1.9.2.4. Clasificación Taxonómica

**Tabla 9-1.** Clasificación Taxonómica de *Urtica urens*

<b>Dominio</b>	<b>Eukaryota</b>
<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>Phylum</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Clase</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Orden</b>	<i>Rosales</i>
<b>Familia</b>	<i>Urticaceae</i>
<b>Genero</b>	<i>Urtica</i>
<b>Especie</b>	<i>U. urens</i>

**Fuente:** (SULCA, 2010)

### 1.9.2.5. Usos Medicinales

El zumo de la raíz macerada se usa como purgante y para tratar la artritis. La inflorescencia y la raíz pueden ser utilizadas para tratar dolencias como inflamaciones y extremidades amortiguadas. La raíz machacada se usa para tratar el dolor de hígado y de riñones. Las hojas e inflorescencias machacadas y en emplasto se aplican para tratar golpes. *U. urens* es útil para calmar los dolores de espalda, artritis, afecciones de la sangre y de los nervios, también se usa para tratar el nublamiento de la vista, las “palpitaciones” (sic) y el dolor de cabeza. Las hojas, en infusión junto con eucalipto, pinpinilla y sal, sirven para tratar el reumatismo. (Ministerio del Ambiente, 2014)

### 1.9.2.6. Constituyentes Químicos

Las hojas de *U. urens* contienen una variedad amplia de componentes químicos, aunque sólo unos pocos compuestos han sido identificados. Los compuestos responsables de la acción de ardor de los pelos en hojas de *Urtica dioica* son: acetilcolina, histamina, 5-hidroxitriptamina (serotonina), y pequeñas cantidades de leucotrienos, proteínas. Según bibliografía se ha confirmado la presencia de flavonoides, ácidos grasos, terpenos, vitaminas y minerales. Se ha

comprobado la existencia del ácido shikímico, ácido cafeico, y diversos ésteres de este ácido tales como el ácido clorogénico, gálico, fórmico y acético, también existe la presencia de derivados cumarínicos como escopoletina.

Los flavonoides presentes en la hierba fresca (inflorescencias y follaje) son principalmente kaempferol, isorhamnetina, patuletina y sus derivados glicosídicos, quercetina y sus 3-rutinósidos y 3-glucósidos. (Upton, 2013, p 9-15)

El carotenoide principal de la Ortiga es  $\beta$  – caroteno, la cantidad de carotenoides totales en hojas de ortiga fresca han sido reportados como:  $\beta$  – caroteno (61 %), hidroxy –  $\alpha$  caroteno (0.9%) luteoxantina (10.3%) epóxido de luteína (13.1%) y violaxantina (14.7%). (Upton, 2013, p 9-15)

## **1.10. Actividad Hemoaglutinante**

### ***1.10.1. Historia***

Hacia el siglo XIX, se realizaron estudios sobre la presencia de ciertas proteínas en extractos de plantas que poseían la capacidad de aglutinar glóbulos rojos. En aquella época dichas proteínas se dieron a conocer como hemaglutininas o fitohemaglutininas. En 1888 *Stillmark* describió un proceso de hemoaglutinación en extractos de *Ricinus communis*, la proteína implicada en este fenómeno se denominó Ricina. En 1919 James Summer obtuvo la primera lectina (término aún desconocido) en forma cristalina obtenida del frijol a la que denominó como *Canavalia ensiformis* (Reyes & Gallegos, 2011, p. 179-180)

Más tarde en el año de 1954 William Boyd, fue el primero en asignar a estas proteínas al nombre lectinas, que provienen del latín *legere* = elegir. Boyd observó que varias aglutininas encontradas en semillas de especies vegetales reconocían y aglutinaban a un grupo sanguíneo específico. Hacia el año de 1960 Peter Nowel descubrió que una lectina de frijol rojo llamada Fitohemaglutinina tenía una capacidad asombrosa de estimular la propagación de linfocitos. (Reyes & Gallegos, 2011, p. 179-180)

En el año de 1963 se describe las propiedades que presentan las lectinas vegetales, indicando que tienen la capacidad de distinguir células normales de células malignas, se presume que las lectinas alteran la superficie de una célula cancerígena. (Reyes & Gallegos, 2011, p. 179-180)

En la actualidad el uso de Lectinas ha significado un medio de herramientas en los análisis bioquímicos, genética y biomedicina, biología celular y ciencias afines.

(Reyes & Gallegos, 2011, p. 179-180)

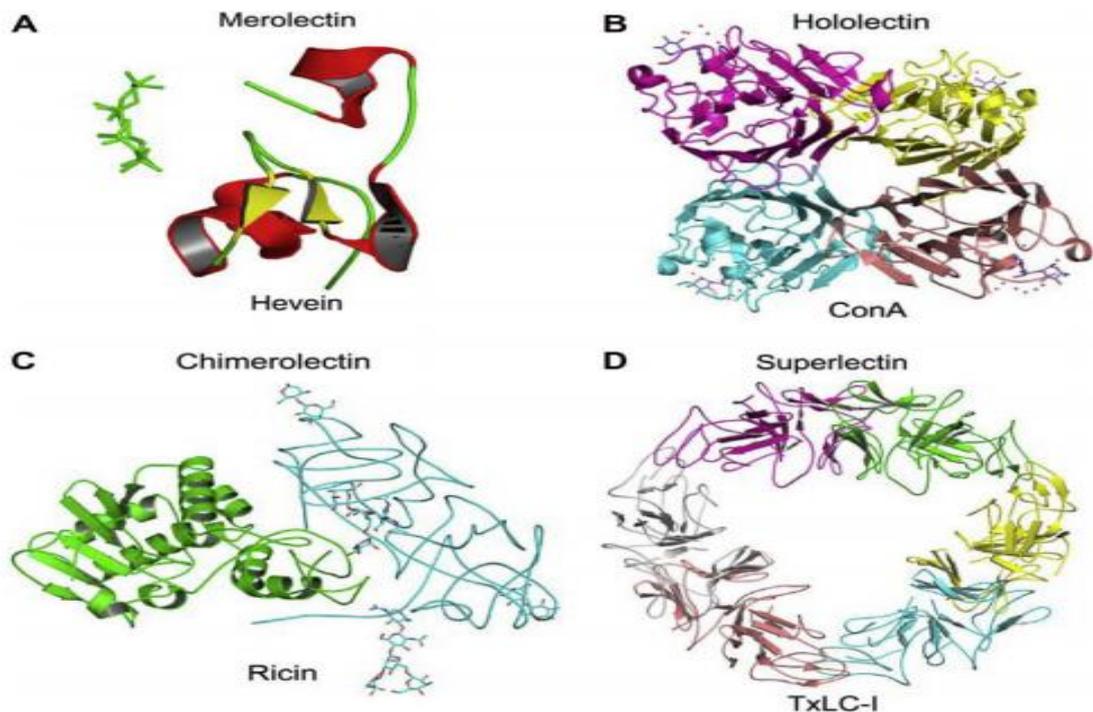
### ***1.10.2. Lectinas Vegetales***

Las lectinas son un grupo diverso de proteínas de origen no inmune, distribuidos en plantas, animales, algunos microorganismos y hongos, se unen de forma reversible y específica a azúcares o carbohidratos específicos en estado libre o formando parte de estructuras complejas, desencadenando varios procesos celulares importantes, por ejemplo tienden a aglutinar a células a las cuales están ligadas. (Liu *et al.*, 2010, p 1-3)

Por lo habitual las lectinas presentan al menos dos puntos de unión por molécula, es decir se unen a través de un azúcar específico a una molécula glicosilada. La característica más importante de estas proteínas es la aglutinación o unión a células. La importancia de lectinas en plantas está fundamentada en sus propiedades biológicas, por ejemplo el reconocimiento e interacción de grupos sanguíneos, aglutinación de glóbulos blancos, eritrocitos, bacterias, células cancerígenas entre otras. (Castillo & Abdullaev, 2005, p 55 - 61)

En plantas las lectinas desempeñan varias funciones importantes como regulación fisiológica, agentes antimicrobianos, estimulan procesos de división y proliferación celular. En los últimos años, cientos de lectinas vegetales se han purificado y caracterizado en detalle con respecto a sus propiedades bioquímicas, especificidades de unión a carbohidratos y funciones biológicas. (Castillo & Abdullaev, 2005, p 55)

De acuerdo con las estructuras generales las lectinas de plantas maduras se pueden dividir en: “Merolectinas”, “Hololectinas”, “Chimerolectinas” y “Superlectinas”. (Liu. *et al.*, 2010, p 2)



**Figura 5-1.** Representación esquemática de estructuras tridimensionales de lectinas vegetales  
Fuente: (LIU. et al., 2010)

**Merolectinas.-** presentan un único dominio de unión a carbohidratos (Hevein), este tipo de proteínas no poseen actividad hemoaglutinante. (Liu et al., 2010, p2)

**Hololectinas.-** presentan dos o más dominios del mismo tipo estructural y funcional de unión a carbohidratos. Este tipo de proteínas presentan la capacidad de aglutinar células y/o precipitar glicoconjugados. Un alto porcentaje de fitohemaglutininas extraídas se incluyen en esta categoría de proteínas. (Liu et al., 2010, p2)

**Quimerolectinas.-** son proteínas de fusión, contienen un dominio que se une a carbohidratos, sin embargo también presentan uno o más dominios con actividad biológica diferente al reconocimiento de carbohidratos, así tenemos por ejemplo actividad enzimática, inactivación en ribosomas, entre otros. Este tipo de proteínas puede o no presentar actividad hemoaglutinante. (Liu et al., 2010, p2)

**Superlectinas.-** formadas exclusivamente por al menos dos dominios de unión a carbohidratos (TXCL-1) (Liu et al., 2010, p2)

Las lectinas en plantas se dividen en 12 familias, de acuerdo con sus diferentes especificidades de unión a carbohidratos, tenemos:

**Tabla 10-1.** Principales Lectinas Vegetales y su clasificación según su especificidad hacia monosacáridos

	Lectina Representante	Abreviatura	Monosacáridos
1	Lectina de <i>Agaricus bisporus</i>	ABA	Galactosa
2	<i>Amaranthus leucocarpus</i>	ALL	N-acetil- $\alpha$ -D-galactosamina
3	<i>Ricinus communis</i>	CRA	N-acetil- $\alpha$ -D-galactosamina
4	<i>Cyanovirin-N</i>	CV-N	Manosa
5	<i>Agglutinina Euonymus europaeus</i>	EEA	Manosa y/o galactosa
6	<i>Polygonatum cyrtonema</i>	PCL	Manosa y ac. Siálico
7	<i>Triticum vulgare</i> (agglutinina <i>Germen de trigo</i> )	WGA	N-acetilglucosamina y ac. Siálico
8	<i>Agglutinina Jacalina</i>	JAC	Manosa
9	<i>Concanavalina A</i>	ConA	$\alpha$ -D-glucosa y $\alpha$ -D-manosa
10	<i>Lotus tetragonobulos</i>	LTA	$\alpha$ -D-Fructosa
11	Lectina de Soja	SBA	N-acetil-D-galactosamina
12	Lectina de Muérdago europeo	ML-1	$\beta$ -galactosa
13	<i>Arachis hypogaea</i>	PNA	$\beta$ -galactosa
14	<i>Ulex europaeus</i>	UEA	antígeno fucosilado H

Fuente: (FU et al., 2011)

Realizado Por: GUAMÁN, F. 2015

En las dos últimas décadas, las lectinas vegetales se han utilizado como herramientas clínicas para el reconocimiento de diferentes tumores malignos de benignos. Recientemente, muchos estudios han presentado aún mayores evidencias sobre actividades anti-tumorales de lectinas de plantas en una variedad de células malignas. Varias lectinas como la Ricina y WGA se ha informado que poseen actividades anti-tumorales notables mediante la inducción de apoptosis en las células cancerosas. (Liu et al., 2010, p 1-3).

### ***1.10.3. Aplicaciones Terapéuticas de Lectinas***

Se han considerado a las lectinas como medios importantes en áreas como genética, inmunología y Biomedicina, entre otras, por sus propiedades de interacción con los diferentes grupos sanguíneos, aglutinación de linfocitos, eritrocitos, espermatozoides, bacterias, células tumorales etc. (Castillo & Abdullaev, 2005, p 55 - 61)

#### **Posibles implicaciones terapéuticas de lectinas en el cáncer**

Debido a investigaciones previas de acción farmacológica de lectinas en enfermedades cancerígenas, se ha propuesto utilizarlos en ensayos *in vitro* como candidatos a fármacos antitumorales, algunas lectinas se han utilizado en terapias pre-clínicas y clínicas frente a diferentes cánceres en el hombre. Se han realizado una gran cantidad de estudios de lectinas *in vivo* e *in vitro*, donde se ha demostrado satisfactoriamente actividad antitumoral debido al efecto inhibitorio en el crecimiento del tumor. Su mecanismo de acción es variado, influyen ciertos aspectos como clase de células tumorales, origen y concentración de Lectina. (Fu, L. et al. 2011, p 1443)

Algunas lectinas pueden activar a la caspasa-8, una proteína esencial en los procesos de apoptosis, e inducir una muerte celular programada en las células cancerígenas. La inducción de apoptosis se debe a que la lectina inhibe la síntesis de ADN, ARN y proteínas en células malignas, este tipo de respuesta no se observa en células normales, lo cual sugiere un resultado diferencial en el reconocimiento de una lectina frente a células malignas. (Reyes & Gallegos, 2011, p 179-180)

#### **Posible Mecanismo de Acción de Lectinas como agente Antitumoral.**

La acción de las proteínas varía de acuerdo a la unión a azúcares y su mecanismo de acción a nivel celular

- ✓ Lectinas se ligan a linfocitos.
- ✓ Adheridas a linfocitos liberan ciertas toxinas en la linfa.
- ✓ Linfocitos presentes en el bazo se liberan y activan en la linfa.
- ✓ Se da un proceso de activación de células Natural Killer y macrófagos.
- ✓ Existe una combinación de hiperplasia intestinal y efecto antiangiogénico reduciendo la disponibilidad de nutrientes para el tumor.
- ✓ Actividad y efecto citotóxico de Lectinas sobre células malignas (Castillo & Abdullaev , 2005, p 55-61)

## **Las lectinas como Inmunotoxinas**

Desde los años 90 se vienen desarrollando una nueva clase de agentes terapéuticos como citotoxinas específicos del receptor mediante la conjugación de toxinas con agentes de direccionamiento. Uno de estos métodos incluye la conjugación de las lectinas citotóxica de la planta a anticuerpos monoclonales antitumorales. (Castillo & Abdullaev, 2005, p 55- 61)

### ***1.10.4. Efectos Adversos de Lectinas***

Varias lectinas presentan un cierto grado de toxicidad, se caracterizan por inactivar ribosomas. La ingesta de la proteína puede provocar afecciones patológicas como parenquimatositis, edema en tejidos. Algunas Lectinas pueden adherirse a grupos glicosilados de células epiteliales del tracto digestivo, obstaculizando la absorción de nutrientes. Puede darse el caso de aparición de hemorragia locales en el punto de aplicación de la proteína. (Castillo & Abdullaev, 2005, p 55- 61)

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1. Lugar de Investigación

La investigación se realizó en:

- ✓ Laboratorios de Productos Naturales – Escuela Bioquímica Y Farmacia-ESPOCH.
- ✓ Laboratorio de Análisis Clínicos y Bacteriológico - Escuela de Bioquímica Y Farmacia - ESPOCH.
- ✓ Laboratorio de Bromatología- Escuela Bioquímica Y Farmacia-ESPOCH.
- ✓ Laboratorio de Análisis Instrumental –Facultad de Ciencias - ESPOCH

#### 2.2. Materiales, Equipos y Reactivos

##### 2.2.1. *Material Vegetal*

- **Ortiga brava** (*Urera baccifera (L) Gaudich*).- la materia prima se obtuvo en el mes de Mayo de 2015 en la Ciudad de Macas que pertenece a la Provincia de Morona Santiago, para el análisis se emplearon hojas y Tallos.
- **Ortiga Blanca** (*Urtica urens*).- el material vegetal fue comprada el mes de Mayo de 2015 en el Centro Comercial la Condamine ubicada en la calles Carabobo y Esmeraldas del cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo. Se emplearon hojas y tallos.

##### 2.2.2. *Microorganismos (Bacterias y Hongos) Monitores*

- » *Escherichia coli* ATCC 25922
- » *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
- » *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- » *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603
- » *Proteus vulgaris* ATCC 13315
- » *Candida albicans* ATCC 10231

### 2.2.3. *Materiales de Laboratorio*

- › Vaso de Precipitación 400 mL.
- › Vaso de Precipitación 250 mL.
- › Vaso de Precipitación 120 mL.
- › Embudo.
- › Tubos de ensayo
- › Gradilla
- › Balón esmerilado 500 mL.
- › Balón esmerilado 250 mL.
- › Pipeta graduada 10 mL.
- › Pera de succión.
- › Kitasato
- › Cuba Cromatográfica
- › Probeta 250 mL
- › Embudo buchner
- › Mangueras
- › Piseta
- › Papel Filtro
- › Frascos de vidrio ámbar 250 mL
- › Frascos de vidrio ámbar 120 mL.
- › Matraz Erlenmeyer 500 mL.
- › Balón de aforo 1000 mL
- › Reverbero eléctrico
- › Termómetro
- › Papel Filtro cualitativo 101:  
Marca: Xinxing.  
Tipo: Cualitativo  
Material: Algodón pulp.  
Número de Modelo: 101
- › Lámpara de alcohol
- › Parafilm
- › Guantes quirúrgicos
- › Mascarilla
- › Pipeta automática de 2 µL
- › Puntas blancas de pipeta automática
- › Pipeta automática de 10 – 100 µL
- › Puntas Amarillas para pipeta Automática.
- › Puntas azules para pipeta automática.
- › Papel Aluminio
- › Trípode
- › Placa sílica gel
- › Picnómetro
- › Desecador
- › Licuadora Ozter.
- › Pinzas para cápsula de porcelana
- › Capsula de Porcelana
- › Capilares sin heparina.
- › Asa de Platino
- › Pinzas de disección
- › Cajas Petri
- › Jeringas.
- › Filtros Millipore

### 2.2.4. *Equipos de Laboratorio*

- › Balanza analítica BOECO
- › Cámara de Reflujo Laminar ESCO
- › Refractómetro
- › Autoclave TUTTNAVER
- › Liofilizador ThermoFisher
- › Cámara Fotográfica SONY
- › Unidad de Lectura para Aglutinación
- › Sonicador/ultrasonido BRANSONIC 220

- › Rotavapor BUCHI
- › Refrigerador DUREX
- › Estufa MEMMERT
- › Computadora HP Intel CORE i5
- › pH metro
- › Congelador
- › Bomba de vacío
- › Centrifuga AIC 4217
- › Cámara UV
- › Agitador Vórtex.

#### 2.2.5. *Reactivos*

- › Etanol 96 %
- › Agua Destilada
- › Agua
- › Dimetilsulfóxido 98 %
- › Solución Salina 0,9%
- › Cloroformo
- › Quercetina 98% pureza
- › Acetato de Etilo
- › Ácido Fórmico
- › Ácido Acético Glacial
- › Metil Isobutil Cetona
- › Reactivo de Dragendorff
- › Reactivo de Mayer
- › Reactivo de Wagner
- › Reactivo de Baljet
- › Reactivo de Borntrager
- › Reactivo de Liebermann-Burchard
- › Solución de Fehling A – B
- › Cloruro Férrico 5%
- › Solución de ninhidrina 2%
- › Reactivo de Shinoda
- › Alcohol Amílico
- › Ácido Sulfúrico 1%
- › Cloruro de Bario dihidrato.
- › Cloruro de Sodio dihidratado.

### **2.2.6. Medios de Cultivo**

- › Agar Mueller Hinton
- › Agar Sabouraud
- › Caldo Trypticase de soya
- › Caldo Cerebro Corazón

### **2.2.7. Grupos Sanguíneos:**

- › A Tipo Rh<sup>+</sup>
- › B Tipo Rh<sup>+</sup>
- › AB Tipo Rh<sup>+</sup>
- › Tipo Rh<sup>+</sup>

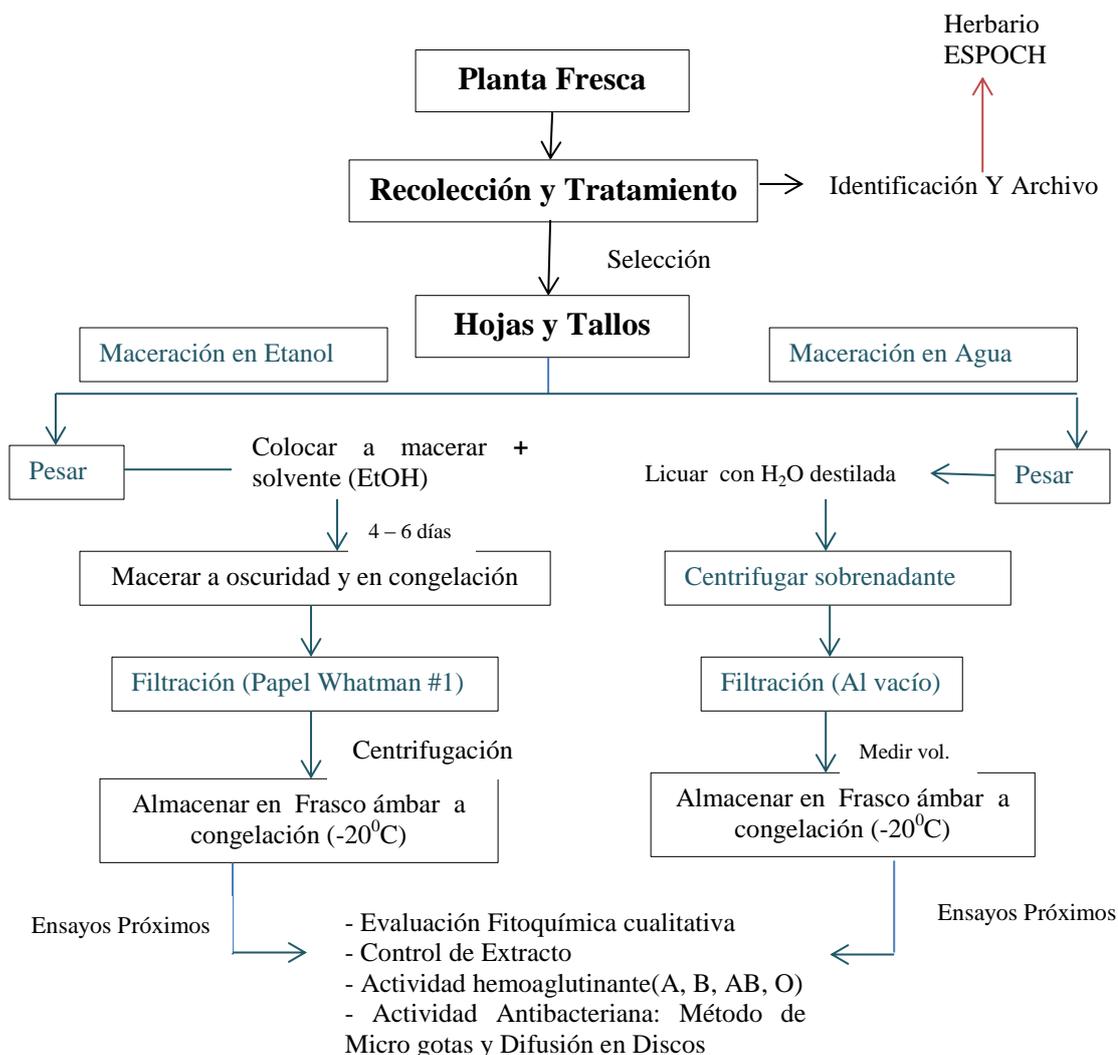
## **2.3. Técnicas Y Métodos**

La investigación se desarrolló en tres ámbitos importantes, el primero fue la preparación de extractos y su respectivo análisis fitoquímico, donde se incluyeron estudios cromatográficos de extractos acuoso y etanólicos de *U. baccifera* (L) Gaudich y *U. urens*.

El segundo punto fue la determinación de la actividad hemoaglutinante de los extractos acuoso de ambas ortigas en 4 grupos sanguíneos (A Rh +, B Rh +, AB y O Rh +), tomando como criterio la formación de tapiz o presencia de botón en el fondo del tubo de análisis y la capacidad de formación de grumos (aglutinación) de los extractos en los diferentes tipos de sangre.

El Tercer punto fue la determinación de la Actividad antibacteriana y anti fúngica en microorganismos monitores ATCC mediante dos métodos: test de sensibilidad bacteriana a partir del método de microgotas y mediante difusión de extractos en discos. A todo esto le sumamos el control de extractos previo a su utilización en los diferentes ámbitos antes mencionados

A continuación se indica el proceso que se efectuó.



**Figura 6-2.** Esquema General de Técnicas y Métodos  
Realizado por: GUAMÁN, F. 2105

### 2.3.1. *Recolección y Tratamiento del Material Vegetal*

Ortiga brava (*Urtica baccifera* (L) Gaudich) fue recolectada en las siguientes coordenadas:

- › Lugar: Morona Santiago - Macas
- › Dirección: Calles 9 de Octubre y Calle Quito
- › Coordenadas: X=0820781; Y=9745603
- › Altitud: 1047 m s n m

La Ortiga blanca (*Urtica urens*) no fue recolectada, fue adquirida en el Centro Comercial la Contamine.

El tratamiento de la muestra se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales. Se seleccionaron hojas y tallos en buen estado. En ciertos casos el material vegetal necesitó que

ser lavada con agua para eliminar impurezas. Se pesó, se dividió en pesos iguales para su posterior extracción (Agua y etanol) y se almacenó en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **2.3.2. Preparación de Extractos Vegetales**

#### *2.3.2.1. Preparación de Extractos Acuosa*

Se retiró el material vegetal del congelador y se licuó por 10 minutos en una Licuadora ozter de capacidad de volumen 1000 mL, se realizó paulatinamente hasta licuar por completo el material, alcanzando durante el proceso cierto grado de homogeneidad de mezclado (solvente - muestra).

Finalizado el proceso inmediatamente se retiró el sobrenadante del vaso, se centrifugó (centrifuga AIC 4217) a 3800 rpm por 10 minutos, se filtró a través de un Kitasato y embudo buchner con la ayuda de una bomba al vacío, se midió el volumen filtrado y se almacenó en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  para ensayos posteriores.

#### *2.3.2.2. Obtención de Extractos Alcohólicos - Método de Maceración*

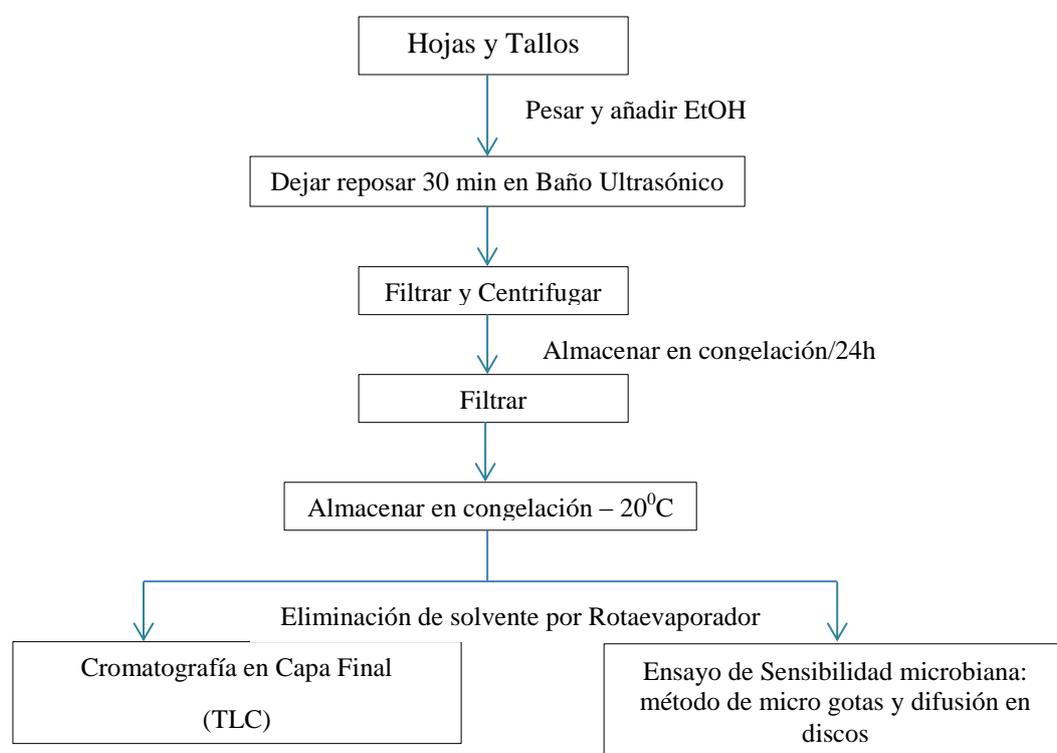
Se retiró el material vegetal del congelador, se troceó y trituró utilizando una pinza limpia, la maceración se realizó en un frasco de vidrio envuelto en papel aluminio para evitar cualquier degradación u oxidación de compuestos, el frasco fue almacenado a  $-0^{\circ}\text{C}$  por 4 días, a continuación se filtró el sobrenadante a través de Papel Whatman #1. El volumen extraído fue centrifugado (centrifuga AIC 4217) a 3800 rpm por 10 minutos, para una mayor eliminación de clorofilas, el volumen final se vertió en un frasco de vidrio ámbar y se almacenó en congelación  $-20^{\circ}\text{C}$  para análisis y ensayos posteriores.

#### *2.3.2.3. Obtención de Extractos Alcohólicos - Método de Ultrasonido*

La extracción en alcohol por ultrasonido es un método innovador con ciertas ventajas frente a la maceración tradicional, se emplea menor cantidad de materia prima, solvente de extracción y su tiempo de extracción es menor. (Biesaga, 2011, p 2507)

- Se pesó cierta cantidad de hojas y tallos de planta fresca previamente desinfectada y troceada, se colocó en un frasco de vidrio envuelto con papel aluminio y se añadió etanol hasta que sobrepase ligeramente el material.

- Se colocó la mezcla de material (planta - solvente) en Baño María de ultrasonido BRANSONIC B-220, dejándolo reposar por 30 minutos. (Biesaga, 2011, p 2507)
- Finalizado el tiempo, se filtró la muestra, posterior a ello se centrifugó el extracto a 3800 rpm / 10 minutos y se almacenó en congelación por 24 horas.
- Transcurrido el tiempo se realizó un segundo filtrado (papel filtro Whatman #1), obteniendo un extracto transparente, de menor contenido de grumos espesos y clorofilas.
- Se almacenó en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ , se evaporó el solvente y se almacenó el residuo previo a ensayos y controles posteriores, a continuación se muestra esquemáticamente el proceso de extracción mediante ultrasonido.



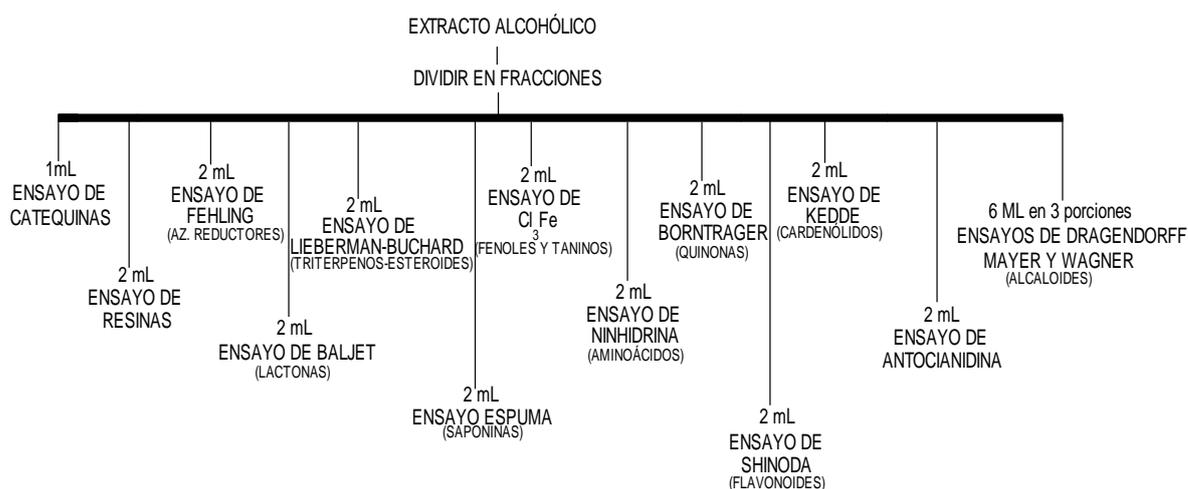
**Figura 7-2.** Esquema de Extracción de principios activos asistido por Ultrasonido  
 Realizado por: GUAMÁN, F. 2105

### 2.3.3. Tamizaje Fitoquímico

El tamizaje fitoquímico permite estimar cualitativamente compuestos activos a partir del empleo de solventes apropiados y reacciones de caracterización y coloración, se trata de un análisis rápido, reproducible, de bajo costo donde únicamente establece una idea de posibles compuestos libres o en forma de glicósidos de un vegetal.

Para la determinación cualitativa de compuestos presentes en un extracto vegetal se tomó una alícuota (30 mL) de extracto acuoso y extracto Etanólico (Método de Maceración) del extracto inicial.

A continuación se muestra de forma esquemática y detallada la metodología utilizada en tamizaje fitoquímico de Extracto etanólico.



**Figura 8-2.** Reacciones de Caracterización y Coloración de Extracto Etanólico.

**Fuente:** (Miranda, M. 2002)

### Determinación de Alcaloides

#### » Ensayo de Dragendorff

A partir de una alícuota de extracto, se eliminó el alcohol en baño maría, el restante se resuspendió en 1 mL de HCl 1%, posteriormente se añadió 3 gotas de reactivo de Dragendorff. Los resultados se reportaron de acuerdo a la aparición de opalescencia marcando (+), turbidez (++) y formación de precipitado (+++) (Miranda, 2002, p18-22)

#### » Ensayo de Mayer

A partir de una alícuota de extracto, se eliminó el alcohol en baño maría, el restante se resuspendió en 1 mL de HCl 1%, se adicionó una pizca de sal yodada después se añadió 3 gotas de Reactivo de Mayer. Los resultados se reportan de la misma forma que el Ensayo de Dragendorff (Miranda, 2002, p18-22)

#### » **Ensayo de Wagner**

A partir de una alícuota de extracto, se eliminó el alcohol en baño maría, el restante se re suspendió en 1 mL de HCl 1% y se añadió reactivo 3 gotas de Dragendorff. Los resultados se reportaron de acuerdo a la aparición de opalescencia marcando (+), turbidez (++) y formación de precipitado (+++) (Miranda, 2002, p18-22)

#### **Determinacion de Cumarinas**

##### » **Ensayo de Baljet**

A partir de una alícuota de extracto, se eliminó el alcohol en baño maría hasta el menor volumen posible, posterior a esto se adicionó 1 mL de Reactivo. El ensayo se estableció de forma positiva de acuerdo al cambio de tonalidad de la muestra o formación de un precipitado rojo. (Miranda, 2002, p18-22)

#### **Determinación de Quinonas**

##### » **Ensayo de Borntrager**

A partir de una alícuota de extracto, se eliminó el alcohol en baño maría, el restante se re suspendió en 1 mL de cloroformo, posteriormente se añadió 1 mL de reactivo de Borntrager, se mezclaron las fases y se mantuvo en reposo por 10 minutos. Los resultados se reportaron de acuerdo a la aparición de tonalidades: Rosado (++) y Naranja (++) (Miranda, 2002, p18-22)

#### **Determinación de Triterpenos y/o Esteroides**

##### » **Ensayo de Lieberman-Burchard**

A partir de una alícuota de extracto, se eliminó el alcohol en baño maría, el restante se re suspendió en 1 mL de cloroformo posteriormente se añadió 1mL de reactivo de Lieberman-Burchard, se adicionó con cuidado hasta 3 gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y se dejó reposar. Los resultados se reportaron de acuerdo a cambios de tonalidades. (Miranda, 2002, p18-22)

#### **Determinación de Catequinas**

A partir de una alícuota de extracto se colocó la muestra sobre papel filtro Whatman N.1 con la ayuda de un capilar azul, y se observó en la Cámara UV. El resultado se considera positivo si sobre el punto de aplicación existió una tonalidad verde fosforescente. (Miranda, 2002, p 18-22)

## **Determinación de Resinas**

A partir de una alícuota de extracto, se adicionó Agua destilada, se agitó y mantuvo en reposo por 5-10 minutos. El resultado se considera positivo por la presencia de un precipitado. (Miranda, 2002. p 18-22)

## **Determinación de Azúcares Reductores**

### **» Ensayo de Fehling**

A partir de una alícuota de extracto se adicionó reactivo de Fehling y se llevó a baño maría por 10 minutos, el resultado se reporta de forma positiva si la mezcla presenta una coloración roja o a su vez existe la formación de un precipitado. (Miranda, 2002. p 18-22)

## **Determinación de Saponinas**

### **» Ensayo de Espuma**

Una alícuota de extracto se agitó constante hasta 10 minutos. El resultado se reporta de forma positiva de acuerdo a la persistencia y altura de espuma formada por más de 2 minutos de reposo. (Miranda, 2002, p18-22)

## **Determinación de Compuestos Fenólicos y Taninos**

### **» Ensayo de $FeCl_3$**

A partir de una alícuota de extracto se adicionó tres gota de Cloruro Férrico 5% ( $FeCl_3$ ). Los resultados se reportan de acuerdo a cambios de coloración:

Aparición de tonalidad rojo/vino = Fenoles en general

Aparición de tonalidad verde intensa = taninos pirocatecólicos

Aparición de tonalidad azul = Taninos pirogalotánicos. (Miranda, 2002, p18-22)

## Determinación de Flavonoides

### » Ensayo de Shinoda

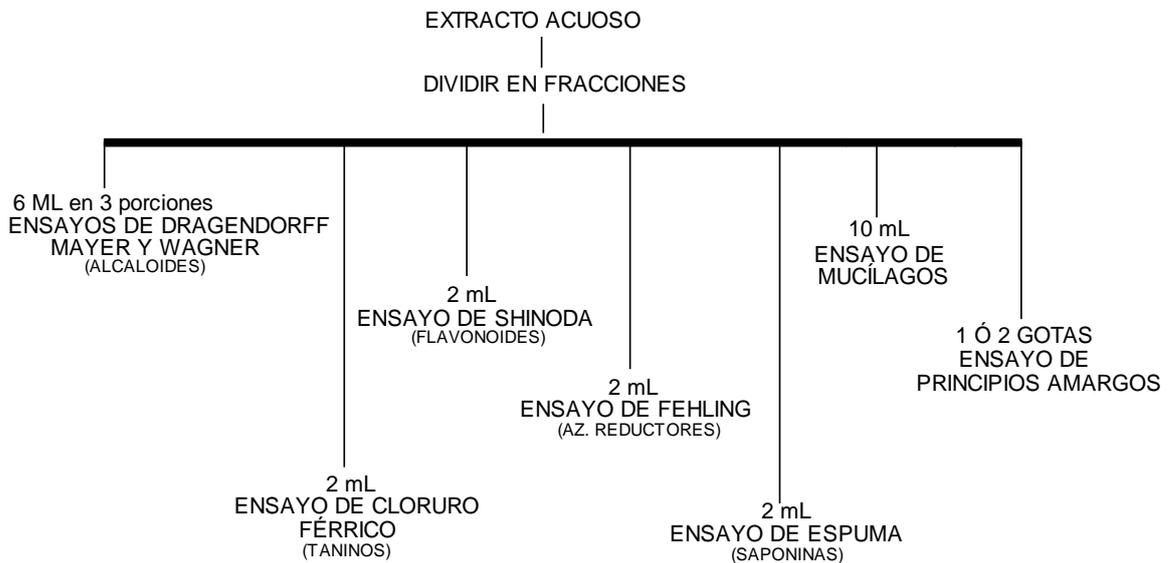
A partir de una alícuota de extracto se añadió 1 mL de HCL concentrado, después se adicionó una pizca de cinta de magnesio, se dejó reposar por 5 minutos y se agregó 1 mL de Alcohol Amílico, se mezcló y se dejó reposar hasta una separación de fases. Los resultados se reportan de forma positiva de acuerdo a cambios de coloración del alcohol amílico a rojo, naranja o amarillo.

El ensayo de Shinoda es igual para extractos en etanol y agua. (Miranda, 2002, p18-22)

## Determinación de Antocianidinas

En una alícuota de extracto se adicionó 1 mL de HCL concentrado, luego fue llevada a baño María por 10 minutos, se dejó enfriar y se adicionó 1 mL de agua destilada y alcohol amílico inmediatamente se agitó y se dejó reposar por 5 minutos. El resultado se reporta de forma positiva por aparición de una tonalidad roja. (Miranda, 2002, p18-22)

A continuación se muestra las Reacciones de Caracterización Fitoquímica en Extracto acuoso



**Figura 9-2.** Reacciones de Caracterización y Coloración de Extracto Acuoso  
Realizado por: GUAMÁN, F. 2105

## **Determinación de Alcaloides**

### **» Ensayo de Dragendorff**

A partir de una alícuota de extracto se agregó una gota de HCl conc., se calentó y enfrió, posteriormente se añadió 3 gotas reactivo de Dragendorff. Los resultados se reportan de acuerdo a la aparición de opalescencia marcando (+), turbidez (++) y formación de precipitado (+++) (Miranda, 2002, p18-22)

### **» Ensayo de Mayer**

A partir de una alícuota de extracto se agregó una gota de HCl conc., se calentó y enfrió, se colocó una pizca de sal yodada y se añadió 3 gotas de Reactivo de Mayer. Los resultados se reportan de la misma manera que el Ensayo de Dragendorff (Miranda, 2002, p18-22)

### **» Ensayo de Wagner**

A partir de una alícuota de extracto se agregó una gota de HCl concentrado. Posteriormente se añadió 3 gotas de Reactivo de Wagner. Los resultados se reportan de la misma manera que el Ensayo de Dragendorff (Miranda, 2002, p18-22)

## **Determinación de Taninos**

### **» Ensayo de FeCl<sub>3</sub>**

En extracto acuoso se determina la presencia de taninos, el protocolo de identificación es el mismo que se utiliza en extracto etanólico. (Miranda, 2002, p18-22)

## **Determinación de Polisacáridos**

### **» Ensayo de Mucilagos**

A partir de una alícuota de extracto se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$ , el resultado se considera positivo si se evidencia un aspecto gelatinoso. (Miranda, 2002, p18-22)

## Determinación de Principios Amargos

A partir de gotas de extracto, se procedió a tomar contacto, paladeando y reconociendo el sabor característico de la muestra. (Miranda, 2002. p 18-22)

### 2.3.4. Cromatografía en Capa Fina

La cromatografía en capa fina forma parte de una gran familia de técnicas cromatográficas, facilita la separación, aislamiento e identificación de compuestos que pertenecen a una solución o mezcla. (Silva et al., 2006, p 244)

En esta técnica, la mezcla compleja viaja o transporta por una fase estacionaria, se transporta gracias a la acción de una fase móvil, la cual fluye sobre la fase estacionaria, facilitando el despliegue de compuestos. (Silva et al., 2006, p 244)

La fase estacionaria es una sustancia que cuenta con una gran extensión superficial (gel), de estructura generalmente esponjosa, inerte e insoluble en los solventes utilizados como fase móvil, los compuestos disueltos en esta fase se insertan siendo adsorbidos por el gel. La Fase móvil es aquella sustancia líquida que se desplaza o difunde por la fase estacionaria. (Silva et al., 2006, p 244)

#### Fase Móvil:

Acetato de Etilo: 7

Ácido Fórmico: 0,5

Ácido Acético Glacial: 0,5

Metil Isobutil cetona: 3

Agua Destilada: 1

**Tabla 11-2.** Proporciones de Fases móviles en Cromatografía en capa fina (TLC)

Fase Móvil	TLC EN E. Acuoso	TLC EN E. Etanólico Ultrasonido
Acetato de Etilo	7	7
Ácido Fórmico	0,7	0,5
Ácido Acético Glacial	0,3	0,5
Metil Isobutil cetona	2,5	3
Agua Destilada	1	1

Realizado por: GUAMÁN, F. 2105

## Cálculo de Constantes dieléctricas de Fase Móvil

### TLC en Extracto Acuoso.

$$\text{Constante dieléctrica} = c \text{ del sistema} = \frac{c Ax \% A + c Bx \% B + c Cx \% C + c Dx \% D + c Ex \% E}{100}$$

$$c \text{ del sistema} = \frac{(7 \times 6,02) + (0,7 \times 58) + (0,3 \times 6,15) + (2,5 \times 13,1) + (1 \times 78,3)}{100}$$

$$c \text{ del sistema} = 1,96$$

### TLC en Extracto Etanólico

$$\text{Constante dieléctrica} = c \text{ del sistema} = \frac{c Ax \% A + c Bx \% B + c Cx \% C + c Dx \% D + c Ex \% E}{100}$$

$$c \text{ del sistema} = \frac{(7 \times 6,02) + (0,5 \times 58) + (0,5 \times 6,15) + (3 \times 13,1) + (1 \times 78,3)}{100}$$

$$c \text{ del sistema} = 1,92$$

### Fase Estacionaria

Sílica Gel en Aluminio 60 F 254.

### Preparación de Extractos para el Análisis Cromatográfico

- › Para la realización de cromatografía en capa fina se recurrió al extracto etanólico asistido por ultrasonido.
- › La muestra se filtró en papel Whatman #1, se colocó 100 mL de extracto filtrado en un balón de 250 mL, se preparó el rotavapor y la bomba de vacío para la concentración y eliminación del solvente en el extracto.
- › Se introdujo el balón cuidadosamente en el baño calefactor e inmediatamente se programó la velocidad (90 rpm)
- › Se ajustó la temperatura de baño María con la ayuda de un termómetro a 45 -55 °C. Una vez evaporado todo el solvente del extracto quedó cierto residuo acuoso.
- › La porción acuosa que se mantuvo en el balón fue retirada en un frasco para aplicaciones cromatográficas. El residuo adherido a las paredes del balón se disolvió en etanol (96%). Para una mejor disolución se colocó el balón por 10 minutos en el baño maría del ultrasonido.
- › Finalmente el residuo re suspendido fue recolectado, filtrado y almacenado bajo congelación (-20°C) para aplicaciones cromatográficas.

### **Método de aplicación en placa Cromatográfica:**

- › En una lámina de sílica gel de 3 x10 cm se colocaron tres muestras, de derecha a izquierda: solución estándar de Quercetina (0,2%), extracto etanólico re suspendido y extracto acuoso, de acuerdo a la siguiente metodología.
- › Con la ayuda de capilares el extracto fue impregnado en la capa acercando y alejando la punta del capilar por fracciones de segundos, se colocaron aproximadamente 15 puntadas de cada muestra en la placa, se colocó de forma paulatina, secándolas constantemente.
- › Se observó en una lámpara UV para estimar el tamaño y color de las muestras.
- › Se retiró la placa y se colocó cuidadosamente en la cuba Cromatográfica, donde se encontraba la fase móvil.
- › Se esperó la migración de la fase móvil, hasta que cubra las  $\frac{3}{4}$  partes de su superficie la lámina.
- › Una vez cubierta las  $\frac{3}{4}$  partes de la fase estacionaria, se retiró la placa e inmediatamente se secó al ambiente por 5 minutos y se reveló con vapores de amoníaco.
- › Revelada la placa, fue llevada a un reverbero, flameándola por pocos minutos para intensificar el color de sus manchas.
- › Inmediatamente la placa fue observada nuevamente en una lámpara UV para observar la presencia de diferentes manchas.
- › Se marcó el frente de solvente y la migración de cada mancha con la ayuda de lápiz y regla, y a continuación se calculó el Rf en cada caso.

### **2.3.5. Control de Extractos Vegetales**

#### **2.3.5.1. Requisitos Organolépticos** (Miranda, 2002, p.51 -55)

#### **A. Determinación de Olor**

Se utilizó una tira de papel secante y se introdujo en una alícuota de todos los extractos, se huele y se reporta el resultado.

#### **B. Determinación de Color**

Se colocó 2 a 5 mL de extractos en tubos de ensayo limpios y secos, posteriormente se registran su color, presencia o ausencia de partículas/ grumos y transparencia.

### 2.3.5.2. Determinación de Densidad Relativa (Miranda, 2002, p.51 -55)

La densidad relativa se refiere a la relación entre la masa de un volumen de la sustancia a 25 °C y la masa de un volumen igual de agua a la misma temperatura, esta relación se determina según la siguiente fórmula:

$$D_{25} = \frac{M_1 - M}{M_2 - M}$$

M1: Peso picnómetro con muestra

M2: Peso picnómetro con agua destilada

M: Peso de Picnómetro vacío.

### 2.3.5.3. Determinación de Índice de Refracción. (Miranda, 2002, p.51 -55)

El Índice de refracción es una propiedad óptica propia, característica de cada sustancia. Es el cociente entre la velocidad de la luz en el vacío y en otro medio, el numerador del cociente siempre será mayor de cualquier denominador

$$n_2 = n_1 \frac{\text{Sen}\theta_1}{\text{Sen}\theta_2}$$

### Procedimiento

Se colocó sobre el prisma del refractómetro una gota de agua destilada, se calibró ajustando el equipo seleccionando la zona del espectro visible, en el caso del agua es 1,33 con la ayuda del compensador cromático se llegó a colocar la línea límite entre dos campos.

Después se lavó el prisma con agua destilada y se colocó una gota de extracto, se cerró el termoprisma y con la ayuda del compensador cromático se llegó a colocar la línea límite entre dos campos. Se efectuó la lectura en la parte inferior del campo visual del equipo. La expresión de resultados viene dado por la siguiente fórmula:

$$N_{d25} = N_{dt} + 0.00044 (t-25)$$

$N_d^{25}$  = Índice de refracción a 25 °C

$N_d^t$  = valor leído en la escala del aparato a la temperatura t.

t = Temperatura a que se realiza la medición (°C)

0.00044 =factor de corrección por grado Celcior. (Miranda, 2002, p.51 -55)

#### 2.3.5.4. *Determinación de pH* (Miranda, 2002, p.51 -55)

El pH es un índice numérico adimensional utilizado para expresar el grado de acidez o basicidad de ciertas sustancias diluidas de acuerdo a los iones hidrogeno.

El rango de pH se encuentra entre 0 a 14, la línea ácida presenta valores de pH menor 7, la línea básica presenta valores de pH mayor a 7, en el caso de presentar un valor de 7, significa que la solución es neutra. La expresión de resultado viene dado por la siguiente formula:

$$pH = -\log a[H^+]$$

#### **Método de Medición en pH-metro**

Se debe calibrar el equipo con una solución reguladora de pH de acuerdo a las necesidades de medición de muestras. Se lavó el electrodo con agua destilada estéril, y se puso en contacto el electrodo en un vaso de vidrio con el extracto a analizar. Se agitó el extracto y se volvió hacer una segunda medición para corroborar si la medición es correcta o existe algún cambio.

#### 2.3.5.5. *Determinación de Sólidos Totales* (Miranda, 2002, p.51 -55)

Este método valora cuantitativamente la variación de masa de una solución, se fundamenta en la pérdida de compuestos volátiles por evaporación y el secado del restante en una estufa hasta llegar a peso constante. La expresión de sólidos totales en porcentaje viene dado por la siguiente formula:

$$St = \frac{Pr - P}{V} \times 100$$

$P_r$  = masa de la cápsula más el residuo (g)

$P$  = masa de la cápsula vacía (g)

$V$  = volumen de la porción de ensayo.

100 = factor matemático para el cálculo

#### **Método**

El ensayo se realizó por duplicado para lo cual se midió 5 mL de extracto en una cápsula tarada (peso constante), la muestra fue evaporada sobre un baño María hasta obtener un residuo seco.

La cápsula fue colocada en una estufa y se dejó reposar hasta obtener peso constante, para conseguir pesos iguales se tuvo que pesar cada 60 minutos.

Finalmente se retiraron de la estufa y se colocaron en un desecador por 60 minutos con el propósito de obtener masas constantes entre varias pesadas de muestra y además que logre llegar a temperatura ambiente. (Miranda, 2002, p.51 -55)

### **2.3.6. Concentración de Extractos**

#### **2.3.6.1. Concentración de Extractos Acuosa: *U. baccifera* (L) Gaudich y *U. urens***

Descripción del Equipo:

El equipo se suministra con una bomba de vacío serie RV EDWARDS – bomba rotativa, con temperatura final del condensador de  $-50^{\circ}\text{C}$ , el equipo liofilizador cuenta con 8 vasos, cada uno de volumen de capacidad de 300 mL, a continuación se indica las características de fábrica del equipo:

**Dispositivo:** Liofilizador

**Modelo:** Micromodulyo – 115

**Serie:** X16U-426249-XU

### **Metodología**

#### **A. Preparación de la Muestra**

1. Se partió de un volumen de 200 mL de extracto acuosa, estos se mantuvieron siempre en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
2. Se descongelaron los extractos en Baño María a  $37^{\circ}\text{C}$ , se colocaron 25 mL de cada extracto en vasos de liofilización previamente pesados.
3. Posteriormente se pesaron los frascos con muestras para obtener un estimado de valor en peso y volumen.
4. Se envolvió la boca de los vasos con papel aluminio y se congelaron por 45 -60 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
5. Transcurrido el tiempo se tomaron los frascos del congelador, se retiraron los tapones de papel aluminio y se los ubicaron en válvulas de vacío del equipo.

## **B. Procedimiento Para Liofilizar**

6. Se procedió a encender el equipo, el liofilizador cuenta con un condensador que trabaja a temperaturas menores a 50 °C, una bomba al vacío que se encarga del proceso de eliminación del agua a bajas temperaturas, proceso conocido como sublimación.
7. Se encendió el condensador marca THERMO ELECTRON CORPORATION, se esperó por 15 a 20 minutos hasta que se encienda completamente e inmediatamente se encendió la bomba (modelo RV5 A65313906).
8. Los vasos que contenían las muestras congeladas fueron tomadas del congelador, se quitaron los tapones de papel aluminio y se acoplaron a adaptadores (rosca de plástico) acorde a los vasos, posterior a ello se ubicó en las válvulas de vacío del equipo, girando la llave de la válvula e inmediatamente se encendió la bomba de vacío.
9. El proceso de concentración y eliminación de agua fue extenso de 12 – 16 horas, siempre y cuando se trabaje con el mismo volumen de muestra.
10. Una vez transcurrido el tiempo de proceso se suprime el vacío girando nuevamente la llave que regula la presión y se retiraron los frascos, los residuos secos se rasparon cuidadosamente, se pesaron y se almacenaron en frascos ámbar pequeños en congelación para ensayos próximos.
11. Después se Gira la perilla negra del condensador para eliminar el agua almacenada y apagar el equipo.
12. El proceso fue continuo hasta alcanzar un peso considerable de trabajo.

### *2.3.6.2. Concentración de Extractos Etanólicos: U. baccifera (L) Gaudich y U. urens*

Dispositivo: Rotavapor Buchi R110

Se eliminó el solvente asistido por Rotaevaporador en baño maría del extracto etanólico obtenido mediante ultrasonido. Ver apartado 2.3.2.3.

#### **Método:**

1. Se agregó agua en el Baño María hasta una marca señalada.
2. Se debe encender el equipo y conectar las mangueras adecuadamente.
3. Se colocó 150 mL de extractos etanólicos en balones de fondo plano.
4. Se sujetó el balón en el adaptador y se colocó en el baño María para el traspaso de vapor.
5. Se abrió la llave de agua que conecta la manguera con el refrigerante y con el botón de rotación del equipo se reguló la velocidad de evaporación a 7 (90 -110 rpm), se procuró evitar el exceso de velocidad y la formación de una película espesa alrededor del balón.

6. Se controló la temperatura de trabajo, misma que fue entre 45 – 50 °C.
7. Se encendió la bomba regulando la presión.
8. Una vez evaporado el mayor volumen de solvente, se cerró la llave de entrada de agua al refrigerante y se retiró el balón del baño calefactor.
9. El balón fue llevado a baño maría para eliminar cierto residuo líquido que aún permanecía en el balón.
10. Se pesó el balón y se calculó el porcentaje de rendimiento.
11. Se almacenó el balón, tapando con papel aluminio, se etiquetó y se almacenó bajo congelación para análisis microbiológicos.

### **2.3.7. Ensayo de Actividad Aglutinante en Extractos Acuosa de *U. baccifera* (L) Gaudich y *U. urens***

El ensayo de actividad hemoaglutinante se realizó utilizando tubos de vidrio de 7 x 1 cm, de fondo redondo, enfrentando extractos y eritrocitos, preparados al 5% con Solución fisiológica estéril 0.9%, de diferentes grupos sanguíneos: A<sup>+</sup>, B<sup>+</sup>, AB Y O<sup>+</sup>.

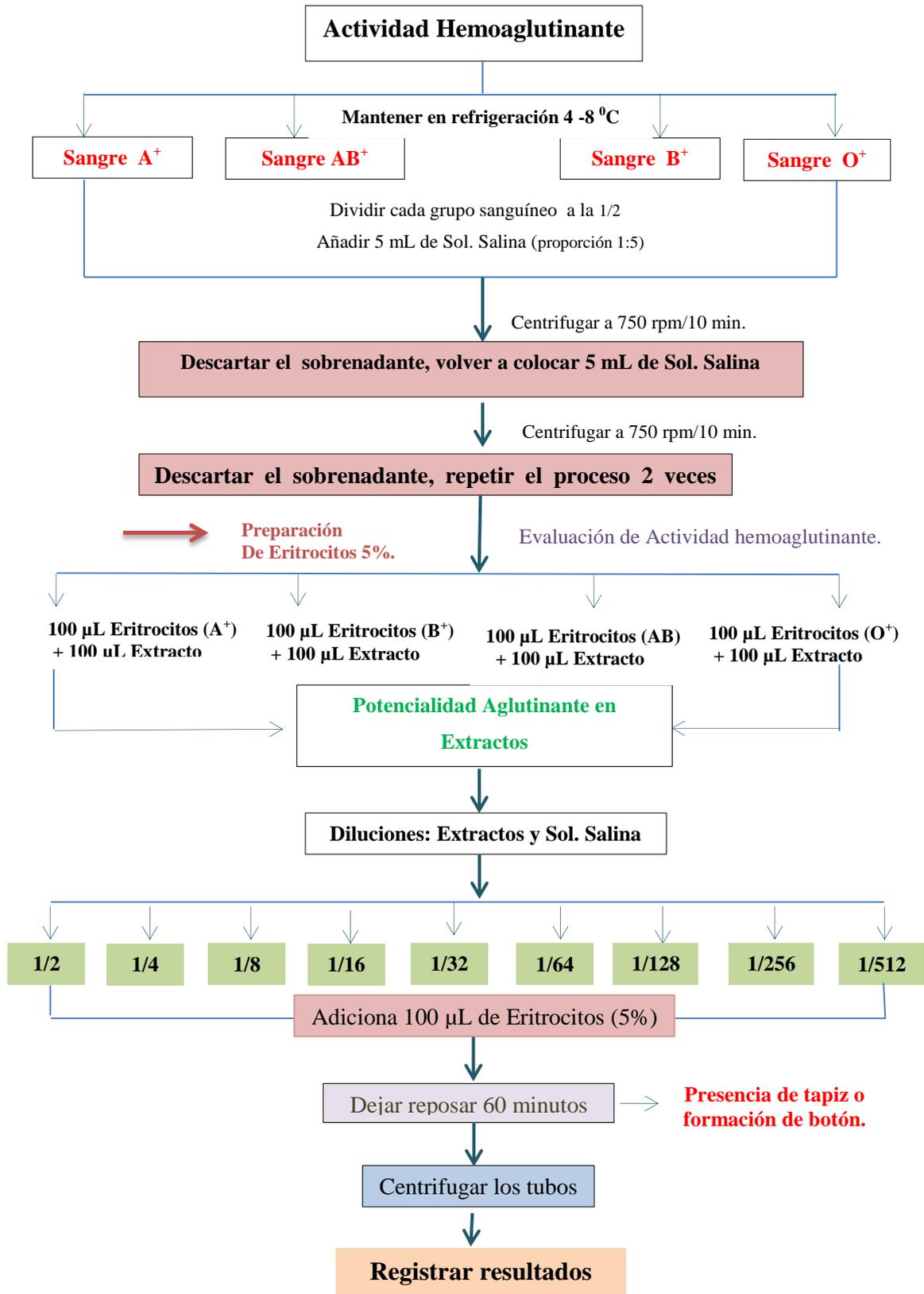
El ensayo se realizó a temperatura ambiente, en una cámara de flujo laminar para garantizar inocuidad, evitando cualquier contaminación posible. (Corrales, 2004, p 32-34)

#### **a. Preparación de Suspensión de Glóbulos Rojos**

1. Se extrajo los grupos sanguíneos en tubos tapa lila con anticoagulante
2. Las muestras se mantuvieron bajo refrigeración, cada tipo de sangre fue dividido a la mitad en tubos de vidrio limpios y secos.
3. A cada tubo se añadió cerca de 15 mL de sol. salina al 0.9%.
4. Se centrifugó a 750 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se volvió a colocar el mismo volumen de sol. salina, se mezclaron las muestras empleando parafilm, volteando los tubos cuidadosamente y ligeramente.
5. Esta operación se repitió 3 veces para separar de mejor manera el plasma, es decir hasta obtener un sobrenadante o fase acuosa translúcida, los glóbulos rojos precipitan en los tubos, se separaron, se midió el volumen de cada uno y se almacenaron en frascos de vidrio.
6. Se prepararon eritrocitos al 5%, es decir por cada mL de eritrocitos se colocó 19 mL de sol. salina estéril (0,9%).
7. Los frascos se mantuvieron bajo refrigeración, previo a ensayos de hemoaglutinación. (Corrales, 2004, p 32-34)

## **b. Estimación de la Potencialidad de Extractos**

1. Se etiquetaron tubos de vidrio en el siguiente orden de dilución: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256 y 1/512. Utilizando como volumen de dilución 100  $\mu$ L de sol. Salina estéril (0,9%).
2. Al primer tubo (1/2) se adicionó 100  $\mu$ L de extracto acuoso, se agitó suavemente y se tomó nuevamente 100  $\mu$ L y se trasvasó al segundo tubo (1/4) el proceso siguió la misma secuencia hasta llegar a la última dilución (1/512).
3. Se agitaron ligeramente los frascos que contenían los eritrocitos previamente preparados, y en cada dilución de extractos se adicionó 100  $\mu$ L de eritrocitos, excepto en la última dilución (1/512) donde el volumen empleado fue el doble de suspensión de eritrocitos.
4. Se dejó reposar los tubos en la gradilla por 60 minutos, posteriormente se observó la presencia de tapiz o botón en el fondo de cada tubo, para facilitar el análisis se observó en una cámara de luz blanca de aglutinación.
5. Se Agitó suavemente los tubos y se observó la presencia o ausencia de grumos.
6. Para Mejorar la sensibilidad del método de aglutinación se centrifugaron los tubos con la mezcla a 3000 rpm por 3 minutos.
7. Se agitaron los tubos cuidadosamente, observando en un fondo blanco o a la luz solar, Los resultado se registraron a partir del siguiente criterio:
  - 3+: Abundante hemaglutinación
  - 2+: Mediana Aglutinación
  - 1+: Leve Aglutinación
  - 0: Ausencia de hemoaglutinación o formación de botón
8. La comparación se realizó frente a blancos (controles negativos) de cada grupo sanguíneo de sangre: 100  $\mu$ L de sol. Salina (0,9%) y 100  $\mu$ L de glóbulos rojos.
9. El Ensayo fue igual para todos los tipos de sangre, el ensayo de hemoaglutinación se efectuó por triplicado comparando los resultados en cada repetición.



**Figura 10-2.** Procedimiento General de Actividad hemoaglutinante de Extractos  
 Realizado por: GUAMÁN, F. 2105

### ***2.3.8. Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos sobre bacterias de importancia clínica***

#### ***2.3.8.1. Preparación de Medios de Cultivo.***

Previo al test de actividad antibacteriana se prepararon medios de cultivo indispensables para el crecimiento de los microorganismos monitores.

#### **Agar Mueller – Hinton y Agar Sabouraud en Placa**

1. El Agar fue preparado a partir del reactivo comercial deshidratado y de acuerdo a las especificaciones del frasco. La preparación se realizó en un Erlenmeyer.
2. Se procedió al autoclavado del medio por 30 minutos a 15 psi de presión. (Bernal & Guzmán , 1984, p 115)
3. Inmediatamente después de esterilizar el medio nutritivo se dejó enfriar al ambiente por 10 – 15 minutos hasta que el Erlenmeyer se lo pueda soportar en la palma de la mano, para evitar cualquier contaminación del medio nutritivo se realizó en una cámara de flujo laminar.
4. Se vertió el preparado ligeramente tibio en una placa Petri de plástico de fondo plano para alcanzar una uniformidad de volumen cercano a los 4 mm (25-30 mL/caja) (Bernal & Guzmán , 1984, p 115)
5. Una vez vertida en la placa Petri se dejó enfriar al interior de la cámara, esto tomó un tiempo de 15 -20 minutos, después las cajas fueron envueltas y almacenadas en refrigeración a 2-8 °C para análisis microbiológicas posteriores. (Bernal & Guzmán , 1984, p 115)

#### **Preparación de Agar en Pico de Flauta**

1. Se prepararon agares en picos de flauta utilizando medio de cultivo deshidratado (Mueller Hinton).
2. Se preparó en un matraz, mezclando y disolviendo adecuadamente el polvo con el solvente, homogeneizando con agitación permanente, evitando la sedimentación del agar, completado el proceso de disolución se esterilizó por 30 minutos a 121 °C (15 psi de presión).
3. El matraz fue retirado del autoclave y llevado a la cámara de flujo, se dejó reposar por 10 – 15 minutos con la intención de disminuir la temperatura del medio, posteriormente se vertió hasta la mitad de cada tubo estéril, cubriéndolos ligeramente.

4. Los tubos se inclinaron a un ángulo aproximado de  $10^0$  dejándolos solidificar por 10 a 20 minutos.
5. Una vez solidificados los medios en los tubos, se almacenaron en refrigeración 2-8  $^0\text{C}$  hasta su utilización.

**Preparación de tubos con Caldo Nutritivo:** Caldo Cerebro Corazón y Soya Tripticasa.

1. Los medios nutritivos se pesaron de acuerdo a las especificaciones del fabricante.
2. Con una agitación permanente evitando la sedimentación del caldo se colocó de 4-5 mL en cada tubo, inmediatamente se cerraron ligeramente los tubos con tapas rojas y se auto clavaron por 30 minutos a 121  $^0\text{C}$  de temperatura y 15 psi de presión.
3. Los tubos se retiraron de autoclave, se dejaron reposar al ambiente por unos minutos para luego ser almacenados en refrigeración para empleos posteriores.

*2.3.8.2. Preparación de Extractos para determinar actividad antimicrobiana*

Se pesaron de cada planta 300 mg de extracto acuoso liofilizado y extracto etanólico asistido por Ultrasonido, los extractos fueron disueltos inicialmente con 1200  $\mu\text{L}$  de DMSO (98%) y posteriormente se adicionó, obteniendo una concentración de 300 mg/3 mL, que también equivale a 100 mg/mL o 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

Los extracto etanólicos de *U. urens* y *U. baccifera* (L) Gaudich obtenidos por maceración no fueron concentrados (ver aparatado 2.3.2.2.), a partir del extracto inicial se tomó 3 mL y se dividieron en tres tubos eppendorf estériles para determinar actividad.

Para establecer la concentración de los extractos 3 mL de cada uno se colocaron en tubos estériles y se llevó a sequedad en estufa a 105  $^0\text{C}$  por 4 a 6 horas, donde por diferencia de pesos iniciales y finales se obtiene la cantidad de muestra seca, misma que se mantuvieron en congelación hasta su utilización.

*2.3.8.3. Ensayo de Esterilidad de Extractos y Antibióticos*

- ✓ Para evaluar la esterilidad de los extractos se utilizó una placa Petri con medio agarizado de Mueller Hinton sobre la cual se adicionaron 2  $\mu\text{L}$  de cada uno de ellos, 2 $\mu\text{L}$  de DMSO y 2  $\mu\text{L}$  de Agua destilada estéril como controles negativos (blancos).
- ✓ La placa se incubó en una estufa a 35  $^0\text{C}$  por 18 – 24 horas.

- ✓ Al día siguiente se debe observar algún tipo de crecimiento bacteriano en los puntos de aplicación de extractos.
- ✓ En caso de existir contaminación en los puntos de aplicación del extracto acuoso y extracto etanólico asistido por ultrasonido se debe filtrar los extractos, a través de membranas de celulosa, utilizando una jeringa y filtros Millipore. Para ello, con la ayuda de la jeringa se absorbe de 1 a 2 mL de muestra y se sujeta al filtro, se aplica un ligero empuje a la jeringa para que por el otro extremo del filtro pudiera salir la muestra, el líquido filtrado debe ser recogido en tubos eppendorf estériles y conservados en congelación para ensayos microbiológicos próximos.

### **Esterilidad de Antibióticos**

- ✓ Se prepararon dos antibióticos, Eritromicina 15 µg (antibiótico en bacterias Gram positivas) y Ceftriaxona 30 µg (Antibiótico de amplio espectro), y un anti fúngico, Ketoconazol preparado a una concentración de 30 µg.
- ✓ El ensayo fue similar al ensayo de esterilidad de extractos, es decir se tomó 2 µL de las soluciones de antibióticos y se colocó sobre Mueller Hinton, para antibióticos y 2 µL de la solución Ketoconazol sobre Agar Sabouraud. Las placas se incubaron a 35 °C por 12 a 16 horas.
- ✓ Al día siguiente se debe observar si los antibióticos presentan contaminación.

### **2.3.9. Ensayo de Actividad antimicrobiana mediante el Método Micro gotas**

#### **Extractos**

Extractor Acuoso concentrado por Liofilización = **EAL**

Extracto Etanólico Asistido por Ultrasonido = **EEU**

Extracto Etanólico obtenido por Maceración = **EEM**

#### **Controles**

Agua Destilada = H<sub>2</sub>O des.

Solución de Dimetilsulfóxido = DMSO

Etanol

Etanol Diluido (1 parte de extracto y 3 partes de solvente) = Etanol ¼

Solución de Quercetina = Q

Ceftriaxona = CRO

Eritromicina= E

Ketoconazol = K

### **a) Reactivación de Microorganismos Monitores**

Para el test de sensibilidad, se utilizaron cepas de American Type Culture Collection (ATCC) que pertenecen al Laboratorio de Microbiología de La Escuela de Bioquímica y Farmacia – ESPOCH. Se inició con la reactivación de microorganismos Monitores (Bacterias y hongos), a partir de cultivos en Pico de Flauta con Mueller Hinton agarizado, de igual forma el hongo en Pico de Flauta con Sabouraud agarizado.

Se seleccionaron las colonias tocándolas por arriba con un hisopo estéril específico por microorganismo, con ligeros movimientos circulares en el pico de flauta se transfirió la muestra bacteriana a un tubo con 5 mL de caldo cerebro corazón, el hongo se transfirió a 5 mL de Caldo soya Trypticase mezclando el hisopo en el medio ligeramente.

Se conservaron cuñas de bacterias en pico de flauta para garantizar un respaldo de muestras y evitar posibles contaminaciones.

### **b) Preparación y Siembra del Inóculo**

De las cuñas de microorganismos reactivadas, se tocó la cepa por arriba con un hisopo y se sembró en caldo nutritivo Cerebro corazón por cada bacteria y en Caldo soya Trypticase para *C. albicans*.

El caldo nutritivo fue incubado a 35 °C por 12 a 16 horas, hasta que alcance o exceda la turbidez del estándar de 0,5 McFarland. La turbidez del caldo se ajustó con solución salina estéril (0,9%) hasta alcanzar una suspensión bacteriana equivalente a una turbidez estándar de  $1,5 \times 10^8$  UFC en la escala de McFarland.

Para realizar la estandarización del inóculo se realizó de forma visual, se comparó el inóculo suspendido en Sol. Salina con el estándar McFarland previamente preparado contra un fondo blanco con líneas blancas y negras contrastantes.

Después de ajustar la turbidez del inóculo, se introdujo un hisopo estéril en ella, el palillo del hisopo fue retirado eliminando el exceso de líquido presionando y girando contra la pared interna del tubo sobre el nivel del líquido. Se inoculó en la superficie de una Placa con Mueller Hinton para bacterias y placa con agar Sabouraud para Candida, rayando sobre toda la superficie, el procedimiento fue repetido dos veces más rotando la placa 60 °C, garantizando

una distribución homogénea del inóculo, como etapa final del rayado se pasó el hisopo sobre el borde circular del agar.

### c) Ensayo de Sensibilidad

#### Actividad Bactericida

Los ensayos de actividad antibacteriana se llevaron a cabo por triplicado para cada microorganismo monitor. Para bacterias se utilizó agar Mueller Hinton, y para *C. Albicans* se utilizó agar Sabouraud y cloranfenicol.

- Se procedió a colocar sobre la placa Petri previamente sembrada 2µL de extracto (Ríos, *et al.*, 2009. p 97) con micropipeta automática icona.
- Por cada ortiga se contó con tres tipos de extractos: EAL, EEM y EEU (Ver Denominación y Abreviaturas), con la ayuda de una cuadrícula colocada por debajo de la placa Petri se fue colocando los extractos re suspendidos.
- Así de acuerdo a la numeración de la plantilla o cuadrícula en la primera fila se colocó tres veces EAL, a continuación EEU, después EEM, el extracto etanólico diluido (EEM ¼) y por ultimo sol. De Quercetina (Control Positivo).
- Se dejó secar la placa no más de 10 minutos y se incubó a 35 °C por 18 -24 horas.
- La actividad antibacteriana se midió por la presencia o ausencia de un halo de inhibición en los puntos de aplicación. La forma de expresión de se indican a continuación:

3 = Halo de inhibición translúcido (altamente tóxico)

2 = Halo de inhibición pequeño y turbio (Moderadamente tóxico)

1 = Halo de inhibición muy opaco y muy pequeño (Bacteriostático, levemente tóxico)

0 = Ausencia de Halo de Inhibición (No Tóxico)

#### Actividad Antifúngica

- Se procedió a colocar sobre la placa Petri previamente estriada con *C. albicans* 2µL de extracto (Ríos, *et al.*, 2009. p 97) con micropipeta automática icona.
- Similar al efecto bactericida se colocó inicialmente EAL, luego EEU, EEM, EEM ¼ y sol estándar de Quercetina, de la misma manera se utilizó una plantilla como medio de referencia colocada por debajo de la placa Petri.
- Se dejó secar la placa no más de 10 min. y se incubó a 35 °C por 24 horas.

- La actividad antifúngica se midió por la presencia o ausencia de un halo de inhibición comparado con halos producidos por sus respectivos controles.

#### **d) Preparación y siembra de Controles**

Se utilizaron como controles positivos Eritromicina (15 µg), Ceftriaxona (30 µg) y Ketoconazol (25 µg), los controles negativos fueron los solventes que se emplearon para disolver los extractos previamente concentrados de las dos especies de ortiga, y estos son: Agua destilada estéril, solución de Dimetilsulfóxido, solución de Quercetina, Etanol, y etanol diluido ¼, el ensayo de los controles se realizó por duplicado.

- Se procedió a colocar sobre la placa Petri previamente estriada con el microorganismo monitor 2µL de cada control con micropipeta automática icona.
- Se dejó reposar y secar la placa hasta 10 minutos e inmediatamente se incubó a 35 °C por 18 a 24 horas.
- El efecto antimicrobiano de los controles positivos fue evidenciado por la aparición y medición de halos de inhibición en los puntos de aplicación.
- El efecto antimicrobiano de los controles negativos fue evidenciado por la aparición de halos de inhibición en los puntos de aplicación.

Las comparaciones de actividad antibacteriana y antifúngica se realizaron de forma individual, cotejando con sus respectivos controles.

#### **2.3.10. Ensayo de Actividad antimicrobiana mediante el Método de Difusión en Discos**

El método de difusión en medio de cultivo agarizado se encuentra apoyado por datos clínicos y de laboratorio, presentando entre otras ventajas resultados altamente reproducibles. El protocolo está basada en estudios anteriores descritos metodología de Kirby-Bauer, actualmente es recomendado por el Subcomité de ensayos de Suceptibilidad de National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). (Ramírez & Marín, 2009, p 264)

La técnica se fundamenta en la relación entre la concentración de una sustancia necesaria para inhibir o destruir una bacteria y el halo de inhibición que provoca dicha sustancia en una medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a investigar y sobre la cual se ha depositado un disco de papel filtro impregnado con cierto volumen de sustancia probablemente activa. (Ramírez & Marín, 2009, p 264)

#### **a) Preparación y siembra del Inóculo**

- ✓ De las cuñas preparadas (VER Reactivación de Microorganismos Monitores) se seleccionaron las cepas tocándolas por arriba con un hisopo estéril con ligeros movimientos circulares, se transfirió la muestra a un tubo con 5 mL de caldo cerebro corazón en el caso de bacterias y caldo Soya Tripticasa en el caso de *C. albicans*. (Bernal & Guzmán , 1984, p 116-117)
- ✓ El caldo nutritivo fue incubado a 35 °C por 12 - 16 horas, hasta que alcance o exceda la turbidez del estándar de 0,5 McFarland. La turbidez del caldo se ajustó con solución salina estéril (0,9%) hasta alcanzar una suspensión bacteriana equivalente a una turbidez estándar de  $1,5 \times 10^8$  UFC en la escala de McFarland. (Bernal & Guzmán , 1984, p 116-117)
- ✓ Para la estandarización del inóculo se lo realizó de forma visual, se comparó el inóculo suspendido en Sol. Salina con el estándar McFarland previamente preparado contra un fondo blanco con líneas blancas y negras contrastantes. (Bernal & Guzmán , 1984, p 116-117)
- ✓ Después de ajustar la turbidez de la suspensión del inóculo, se introdujo un hisopo estéril en la misma, el palillo fue retirado eliminando el exceso del líquido presionando y rotando el hisopo contra la pared interna del tubo sobre el nivel del líquido. (Bernal & Guzmán , 1984, p 116-118)
- ✓ Se sembró en la superficie de una Placa de Mueller Hinton para bacterias y Agar Sabouraud en Candida, rayando sobre toda la superficie, el procedimiento fue repetido dos veces más rotando la placa 60 °C garantizando una distribución homogénea y constante del inóculo, como etapa final del rayado se pasó el hisopo sobre el borde circular del agar. (Bernal & Guzmán, 1984, p 116-118)

#### **b) Ensayo de sensibilidad: Difusión en Agar**

##### **➤ Actividad Bactericida**

Las características del papel filtro se muestran en el apartado 2.2.3 (Materiales de Laboratorio), los extractos son los mismos que se utilizaron en el ensayo de actividad antimicrobiana mediante método de micro gotas. (Ver apartado 2.3.8.2)

- Una vez preparado y sembrado el inóculo microbiano, con la ayuda de una pinza estéril se colocaron sobre la superficie del agar discos de papel filtros estériles de 5 mm diámetro y sobre ellos se impregnados con 15 µL de extractos diluidos. (Onofre & Herkert, 2012, p 140)
- Presionando con una pinza estéril suavemente sobre el disco, asegurando de esta manera un contacto completo con la superficie del medio de cultivo.
- De manera similar al ensayo de susceptibilidad antibacteriana por microgotas, se utilizó una plantilla donde se colocó discos impregnados y humedecidos con EAL, EEU, EEM y extracto etanólico diluido ¼ (EEM¼).
- Los discos se dejaron secar en el agar por 5 a 10 minutos en una cámara de flujo laminar.
- Transcurridos los 10 minutos, se incubaron las placas en posición invertida a 35 °C durante 18 a 24 horas. (Onofre & Herkert, 2012, p 140)
- Posterior al tiempo de incubación se examinó cada placa y con la ayuda de una regla se midieron los diámetros de halos de inhibición de cada disco.
- La expresión de resultados estará en función del diámetro alcanzado lo que permitirá establecer si la bacteria monitor es Resistente – Intermedio o Sensible al extracto diluido. (Bernal & Guzmán , 1984, p 116-118)

➤ **Actividad antifúngica**

- Una vez preparado y sembrado el inóculo con *Candida albicans*, con la ayuda de una pinza estéril se colocaron sobre la superficie del agar tres discos de papel filtros estériles impregnados con 15 µL de cada extracto diluido en cada papel. (Onofre & Herkert, 2012, p 140)
- Presionando suavemente sobre cada disco asegurando de esta manera un contacto completo con la superficie del medio de cultivo.
- Con la ayuda de una plantilla se colocaron: EAL, EEU, EEM y EEM ¼.
- Los discos se dejaron secar en el agar por 5 -10 minutos en una cámara de flujo y se incubaron de forma invertida a 35 °C/ 24 horas. (Onofre & Herkert, 2012, p 140)
- Posterior al tiempo de incubación se examinó la placa y con la ayuda de una regla se midieron los diámetros de halos de inhibición de cada disco.
- La expresión de resultados estará en función del diámetro conseguido lo que permitirá establecer si el microorganismo monitor es Activo o Resistente al extracto diluido. (Bernal & Guzmán , 1984, p 116-118)

### ➤ **Preparación y siembra de Controles**

Los controles positivos y negativos fueron los mismos que se utilizaron en la determinación de actividad de extractos por microgotas.

- En una placa Petri con medio de cultivo previamente estriada con el microorganismo, con la ayuda de una pinza estéril se colocaron sobre la superficie de la misma un disco de papel filtro estéril impregnado con 15  $\mu\text{L}$  de cada solvente. En otra placa se colocaron los discos con antibióticos de referencia.
- Se dejó reposar y secar la placa hasta 10 minutos e inmediatamente se incubó a 35  $^{\circ}\text{C}$  por 18 a 24 horas.
- El efecto antimicrobiano de los controles fue evidenciado por la aparición y medición de halos de inhibición en los puntos de aplicación.

## CAPITULO III

### 3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### 3.1. Resultado de proceso de extracción y concentración de Extractos de Ortiga brava y Ortiga Blanca

**Tabla 12-3.** Resultado de Pesos y volúmenes utilizados en extracción de Compuestos en plantas

<b>Especie de Ortiga</b>	<b>Extracción en agua (p/v)</b>	<b>Extracción en Etanol (Maceración)</b>	<b>Extracción en Etanol (Ultrasonido)</b>
<i>Urera baccifera (L)</i> <i>Gaudich</i>	334,248 g – 1000 mL	334,415 g – 600 mL	50 g – 160 mL
<i>Urtica urens</i>	441 g – 1100 mL	441 – 800 mL	50 g – 160 mL

Realizado Por: GUAMÁN, F.2015.

La tabla 12-3 muestra los pesos y volúmenes utilizados en la obtención de metabolitos secundarios mediante diferentes métodos de extracción: en agua destilada, en etanol mediante maceración (4-5 días), es un método muy utilizado aunque presenta como desventajas el tiempo de extracción, el volumen de solvente entre otros y la extracción en etanol utilizando un baño ultrasónico el cual es un método nuevo e innovador, presenta ciertas ventajas entre ellas utiliza menor cantidad de material vegetal, el proceso es de menor tiempo (15 a 30 minutos).

**Tabla 13 – 3.** Porcentajes de Rendimiento de Extractos

	<b>Extracción en Etanol (Maceración)</b>	<b>Extracción en Etanol (Ultrasonido)</b>
<i>Urera baccifera (L)</i> <i>Gaudich</i>	<b>1,49</b>	<b>1,06</b>
<i>Urtica urens</i>	<b>0,90</b>	<b>0,69</b>

Realizado Por: GUAMÁN, F.2015.

La tabla 13-3 muestra los resultados de rendimiento de extractos etanólicos realizados en diferente proceso de extracción, los mayores porcentajes de materia seca se registraron en *U. baccifera*, presentando valores mayores que *U. urens*.

**Tabla 14-3.** Resultado de Concentración de extractos

Especie de Ortiga	Extracto Acuoso	Extracto Etanólico (Ultrasonido)	Extracto etanólico (Maceración)
<i>Urera baccifera (L) Gaudich</i>	100 µg/µL	100 µg/µL	8,9 µg/µL
<i>Urtica urens</i>	100 µg/µL	100 µg/µL	9,2µg/µL

Realizado Por: GUAMÁN, F.2015.

La concentración de extractos utilizados en los ensayos de actividad antimicrobiana se indica en la tabla 14-3. La concentración de trabajo en extracto acuoso y Etanólico en baño ultrasónico se determinó a partir de 300 mg de extracto seco, las muestras se diluyeron inicialmente en solución de Dimetilsulfóxido (razón por lo que se utiliza como control negativo) y después se completó la disolución con agua destilada, las concentraciones se muestran a continuación:

$$\frac{300 \text{ mg de extracto}}{1200 \text{ µL DMSO} + 1800 \text{ µL H}_2\text{O Destilada}}$$

$$\frac{300 \text{ mg de extracto}}{3000 \text{ µL disolvente}} = \frac{\cancel{300000} \text{ µg de extracto}}{\cancel{3000} \text{ µL disolvente}}$$

$$\text{Concentracion final} = \frac{100 \text{ µg}}{\text{µL}}$$

La concentración del extracto etanólico por maceración se determinó llevando a sequedad 3 mL de solvente (Ver aparatado 2.3.8.2), los resultados que muestran la tabla 14 -3 no difieren en gran cantidad, en *Urtica urens* presenta un mayor valor, esto puede deberse a que el solvente de extracción contiene mayor cantidad de solidos disueltos que *U. baccifera*.

### 3.2. Resultados de Tamizaje Fitoquímico

**Tabla 15-3.** Resultados de Análisis Fitoquímico Cualitativo en *Urera baccifera (L) Gaudich*

Determinación	Tipo de Extracto	
	Extracto Etanólico	Extracto Acuoso
<b>DRAGENDORFF</b> Alcaloides	+	+
<b>MAYER</b> Alcaloides	+	+
<b>Wagner</b> Alcaloides	+	+
<b>BALJET</b> Cumarinas	+	NE
<b>BORNTRAGER</b>	-	NE

Quinonas		
<b>LIEBERMANN BURCHARD</b> Triterpenos y/o Esteroides	-	+
<b>CATEQUINAS</b>		+
<b>RESINAS</b>		-
<b>FEHLING</b> Azucares Reductores		+
<b>ESPUMA</b> Saponinas		-
<b>CLORURO FERRICO</b> Compuestos fenólicos y/o Taninos		+
<b>SHINODA</b> Flavonoides		+
<b>ANTOCIANIDINAS</b> C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> (Flavonoides)		+
<b>MUCILAGOS</b> Polisacaridos		NE
<b>PRINCIPIOS AMARGOS Y ASTRINGENTES</b>		NE

**Indicador:** (-) Negativo, (+) Escasa evidencia (++) Evidencia Moderada (+++) Alta Evidencia (NE) No evaluado  
**Realizado Por:** GUAMÁN, F.2015.

En la tabla 15-3 se muestran los resultados del Análisis Fitoquímico cualitativo del extracto etanólico de *U. baccifera (L) Gaudich*, los ensayos fitoquímicos determinaron la presencia de: Cumarinas, Triterpenos, Compuestos Fenólicos, Flavonoides.

Así también en la tabla 15-3 se muestran los resultados de tamizaje fitoquímico del extracto acuoso, El número de compuestos obtenidos fue menor al extracto etanólico, se determinó la presencia de metabolitos como: Saponinas, Compuestos Fenólicos y Flavonoides.

Los datos que presenta la matriz concuerdan con el estudio realizado por Quiroz (2013), quien determinó el sobre extracto etanólico y acuoso de *U. dioica* la presencia de Terpenos, Flavonoides. Así también con el trabajo realizado por Coleman et al., (2013) quienes realizaron un aislamiento e identificación de compuesto fitoquímicos de *Cecropia schreberiana Miq* que pertenece a la familia Urticaceae, quienes encontraron cuatro tipos de Triterpenos, tres tipos de flavonas tipo glicosiladas, dos tipos de flavonoles y flavonolignanos. De esta manera se determina que especies de familia Urticaceae como *U. baccifera* podrían presentar compuestos fenólicos, flavonoides, Terpenos.

**Tabla 16-3.** Resultados de Análisis Fitoquímico cualitativo en *Urtica urens*

Determinación	Tipo de Extracto	
	Extracto Etanólico	Extracto Acuoso
<b>DRAGENDORFF</b> Alcaloides	+	+
<b>MAYER</b> Alcaloides	+	+
<b>Wagner</b> Alcaloides	+	+
<b>BALJET</b> Cumarinas	+	
<b>BORNTRAGER</b> Quinonas	-	NE
<b>LIEBERMANN</b> - <b>BURCHARD</b> Triterpenos y/o Esteroides	+	NE
<b>CATEQUINAS</b>	+	NE
<b>RESINAS</b>	-	NE
<b>FEHLING</b> Azúcares Reductores	+	+
<b>ESPUMA</b> Saponinas	-	+
<b>CLORURO FERRICO</b> Compuestos fenólicos y/o Taninos	+	+
<b>SHINODA</b> Flavonoides	+	++
<b>ANTOCIANIDINAS</b> C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> (Flavonoides)	+	NE
<b>MUCILAGOS</b> Polisacaridos	NE	-
<b>PRINCIPIOS AMARGOS Y ASTRINGENTES</b>	NE	<b>Amargo</b>

**Indicador:** (-) Negativo (+) Escasa evidencia (++) Evidencia Moderada (+++) Alta Evidencia (NE) No Evaluado.

**Realizado Por:** GUAMÁN, F.2015.

En la tabla 16-3 se muestran los resultados de Análisis Fitoquímico cualitativo del extracto etanólico de *Urtica urens*, los ensayos fitoquímicos determinaron la presencia de Cumarinas, Triterpenos, azúcares reductores, compuestos fenólicos, Flavonoides. En la evaluación Fitoquímica para alcaloides, los resultados mostraron una escasa evidencia, esto puede atribuirse a la presencia en el extracto de proteínas, las cuales pueden participar en la precipitación y cambio de color en el ensayo, lo que hace suponer que el resultado es positivo.

En la tabla 16-3 se muestran los resultados del extracto acuoso, en este se determinó la presencia de Alcaloides, Compuestos Fenólicos y Flavonoides, los resultados se asemejan al estudio realizado por Puelles, et al (2010), quienes determinaron sobre diferentes extractos de

*U. urens* la presencia de Compuestos fenólicos, flavonoides, Aminoácidos, alcaloides. De igual forma un estudio realizado por Quiroz (2013), quien evaluó el extracto etanólico y acuoso de *U. dioica* el cual mostró la presencia de Terpenos, Flavonoides.

En el extracto acuosos y etanólico de *U. baccifera* y *U. urens* se determinó la presencia de flavonoides debido a su cambio de tonalidad, alcanzando una coloración naranja, común para compuestos flavónicos, los compuestos obtenidos en el tamizaje son similares a trabajos realizados por Ferraro (1983), Bonkanka y Tim & Lamb, (2005) quienes determinaron que ciertos compuestos flavónicos atribuyen a un extracto actividad tóxica sobre bacterias, virus y hongos.

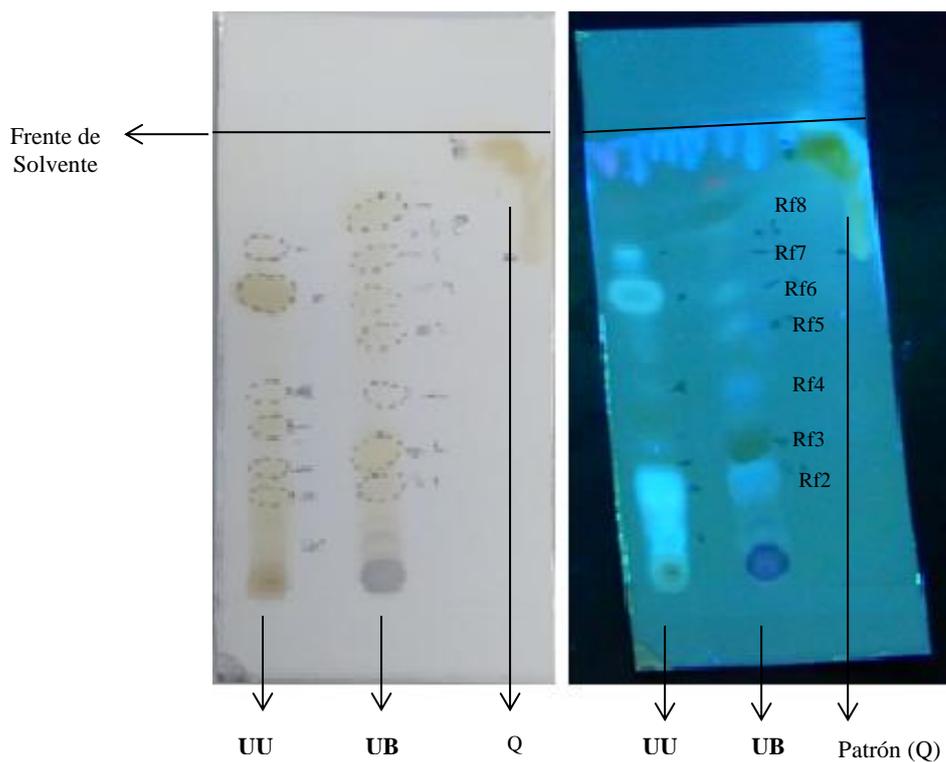
### 3.3. Cromatografía en Capa Fina TLC

**Tabla 17-3.** Relación de frentes (Rf) de bandas de Flavonoides Presentes en Extractos Acuoso de *Urtica urens* Y *Urtica baccifera* (L) Gaudich

Rf Teórico (cm)	Rf/Bandas	<i>U. urens</i> (cm)	<i>U. baccifera</i> (cm)	Quercetina (cm)
	<b>Rf 1</b>	0,13		
	<b>Rf 2</b>	0,21	0,19	
0,27 – 0,37 (Luteolina)	<b>Rf 3</b>		0,27	
0,39 – 0,46 (Mirecitina)	<b>Rf 4</b>		0,40	
0,54 – 0,57 (Rutina)	<b>Rf 5</b>		0,56	
0,60 – 0,62 (Ac.Clorogenico)	<b>Rf 6</b>	0,65	0,65	
0,71– 0,83 (Isoquercitrina)	<b>Rf 7</b>	0,73	0,72	
0,84– 0,93 (Quercetina)	<b>Rf 8</b>	0,85	0,85	0,92

Fuente: Boderó, 2010.

Realizado Por: GUAMÁN, F.2015.



UU= *U. urens*; UB= *U. baccifera*; Q= Sol. Quercetina

**Figura 11-3.** Cromatografía en Capa fina vista sin revelar y con UV de Onda larga de Extractos Acuosa de *U. urens* y *U. baccifera* (L) Gaudich. Realizado Por: GUAMÁN, F.2015.

En la tabla 17-3 se muestran los resultados del perfil Cromatográfico en TLC de extractos acuosa de *U. urens* y *U. baccifera*, se puede identificar 8 manchas entre ambas muestras, donde además los Rf: 2, 6, 7 y 8 presentan los mismos valores de relación de frentes. La figura 11-3 muestra dos placas, la del lado izquierdo corresponde a la placa sin revelar y hacia el lado derecho se muestra una placa revelada, estas placas cromatográficas presenta eficacia debido a que las manchas no se encuentran muy dispersas y extendidas, Eficiencia debido al número de manchas obtenidas y Resolución a causa de una cierta homogeneidad en cuanto al grado de separación entre manchas.

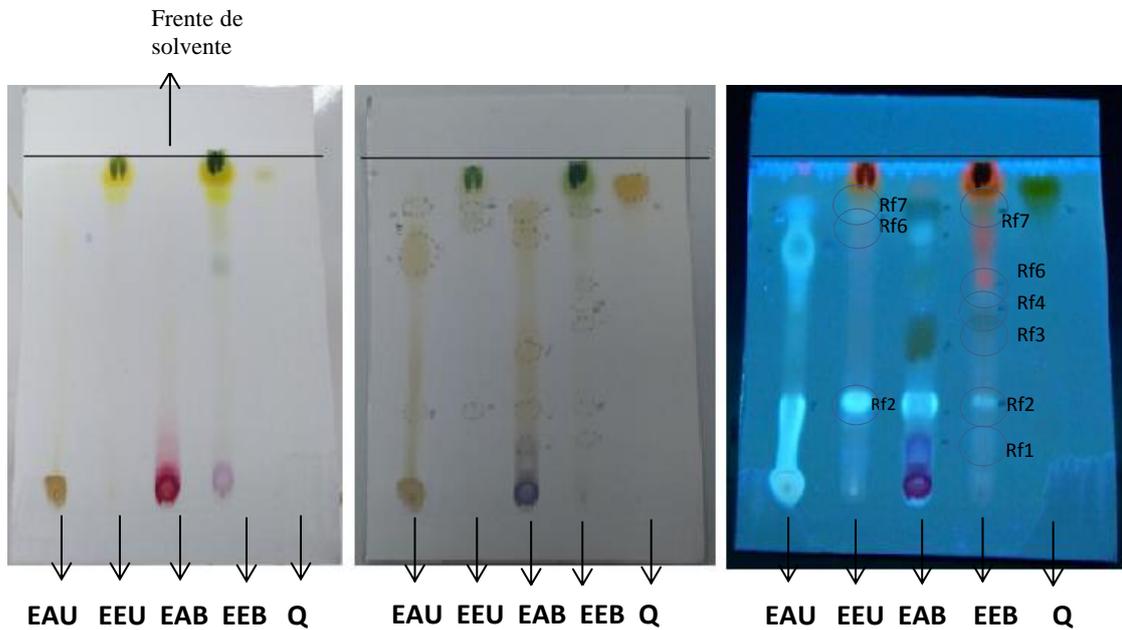
En la figura 11-3 para el extracto acuosa de *U. baccifera* presentan varias bandas, la banda con el Rf 3 presenta un color verde que según trabajos realizados por Boderó (2010) y Look de Ugaz (1994) corresponde a flavonas como la Luteolina, la banda con el Rf 5 presentó una coloración amarilla característica de flavonoles como la rutina, la banda con Rf6 al Ácido clorogénico, Rf 7 a Isoquercitrina y Rf 8 mostró un color amarillo verdoso que correspondería a un flavonol, como la Quercetina.

Se utilizó un patrón de solución de Quercetina, misma que tiene un Rf de 0,92, este dato práctico se encuentra en los valores de referencia bibliográficos mostrados en la tabla 17-3.

**Tabla 18-3.** Relación de Frentes (Rf) de bandas de Flavonoides Presentes en Extractos Etanólicos de *Urtica urens* Y *Urera baccifera* (L) Gaudich

Rf Teórico (cm)	Rf/Bandas	<i>U. urens</i> (cm)	<i>U. baccifera</i> (cm)	Quercetina (cm)
	<b>Rf 1</b>		0,20	
0,27 – 0,37 (Luteolina)	<b>Rf 2</b>	0,29	0,31	
0,54 – 0,57 (Rutina)	<b>Rf 3</b>		0,55	
0,60 – 0,62 (Ac.Clorogenico)	<b>Rf 4</b>		0,61	
	<b>Rf 5</b>		0,67	
0,71– 0,83 (Isoquercitrina)	<b>Rf 6</b>	0,84		
0,84– 0,93 (Quercetina)	<b>Rf 7</b>	0,88	0,90	0,94

Realizado Por: GUAMÁN, F.2015.



EAU= Extracto Acuoso de *U. urens*; EEU= Extracto Etanólico de *U. urens*; EAB= Extracto Acuoso de *U. baccifera*; EEB= Extracto Etanólico de *U. baccifera* Q= Quercetina.

**Figura 12-3.** Cromatografía en Capa fina de Extractos Etanólicos de *U. urens* y *U. baccifera* (L) Gaudich.

Realizado Por: GUAMÁN, F.2015.

En la tabla 18-3 se muestran los resultados del perfil Cromatográfico en TLC de extractos etanólicos de *U. urens* y *U. baccifera*, se puede identificar 7 manchas entre ambas muestras,

donde además los Rf: 2, 6 y 7 presentan los mismos valores de relación de frentes en las dos muestras. La presencia de flavonoides en los extractos también fue determinado por Coleman et al., (2013) en extracto con acetona de *Cecropia schreberiana* Miq., llevado a sequedad y re suspendido con acetato de etilo, hexano y acetato de etilo utilizando una cromatografía en columna determinaron la presencia de flavonoles y flavonolignanos.

La figura 12-3 muestra tres placas, hacia el lado izquierdo corresponde a las dos placas sin revelar y hacia el lado derecho una placa revelada, estas placas cromatográficas presenta eficacia debido a que las manchas no se encuentran muy dispersas y extendidas y Resolución a causa de una cierta homogeneidad en cuanto al grado de separación entre manchas.

En la figura 12-3 en la placa revelada y vista a la luz Ultravioleta, el Rf 2 presenta un color verde que por investigaciones cromatográficas realizadas por Boder (2010) y Look de Ugaz (1994) probablemente corresponde a una flavonas como Luteolina, el Rf3 correspondería a Rutina, el Rf 4 se presume que corresponde al Ácido clorogénico, Rf 6 a Isoquercitrina y Rf7 a Quercetina, donde además en la figura muestra un color fluorescente. Se utilizó un patrón de solución de Quercetina, misma que tiene un Rf de 0,94 cm este dato práctico se encuentra en los valores de referencia bibliográficos mostrados en la tabla 18-3.

### 3.4. Control de Extractos Vegetales

#### 3.4.1. Requisitos Organolépticos

**Tabla 19-3.** Resultado de Características Organolépticas en Extractos de *Urtica urens*. Y *Urera baccifera* (L) Gaudich

<i>Urtica urens</i>		
Tipo de Extracto	Olor	Color
E.A.	Floral	Café claro
E. E.	Picante	Verde claro
<i>Urera baccifera</i> (L) Gaudich		
E.A.	Floral	Naranja/Amarillento
E. E.	Característico al alcohol/picante	Verde claro

E.A. = Extracto Acuoso; E.E.M = Extracto etanólico (Maceración).

Realizado Por: GUAMÁN, F.2015.

La tabla 19-3 muestra las características físicas y organolépticas de diferentes de las diferentes muestras utilizadas, la tonalidad de extractos acuosos fue diferente, así en *U. urens* presentó una coloración café claro mientras que en *U. baccifera* su tonalidad presentó una coloración anaranjada. Por lo general los extractos obtenidos de *U. urens* presentaron mayor grado de

turbidez. Los resultados expuestos no presentan valores de referencia, por lo que el análisis fue realizado de acuerdo a una perspectiva visual.

### 3.4.2. Determinación de Densidad Relativa

**Tabla 20-3.** Resultado de Densidad Relativa en Extractos de *Urtica urens* y *Urera baccifera* (L) Gaudich

<i>Urtica urens</i>	
Tipo de Extracto	
E.A.	E.E.M
1,0058	0,8900
<i>Urera baccifera</i> (L) Gaudich	
E.A	E.E.M
1,0074	0,8095

E.A. = Extracto Acuoso; E.E.M = Extracto etanólico (Maceración).

Realizado Por: GUAMÁN, F.2015.

La tabla 20-3 muestra los resultados obtenidos de densidad relativa o peso específico, así en E.A de *U. urens* presentó un valor de 1,005 y el EEM presentó un valor de 0,89, este último dato según trabajo realizado por Quiroz, 2013 se aproxima al valor obtenido en extracto etanólico de *U. dioica*, que alcanzó un valor de 0,92.

En *Urera baccifera* el E.A presentó un valor de 1,007 similar al obtenido en extracto acuoso de *U. urens*, en extracto etanólico presentó un valor de 0,809 lo que indica que este extracto es menos denso que *U. urens*.

### 3.4.3. Determinación de Índice de Refracción

**Tabla 21-3.** Resultado de Índice de Refracción

<i>Urtica urens</i>	
EA	EEM
1,335	1,364
<i>Urera baccifera</i> (L) Gaudich	
EE	EEM
1,333	1,365

E.A. = Extracto Acuoso; E.E.M = Extracto etanólico (Maceración).

Realizado Por: GUAMÁN, F.2015.

La tabla 21-3 muestra los resultados de índice de refracción obtenidos en extractos de *U. urens* y *U. baccifera*, este parámetro físico bajo condiciones controladas de medición ayuda a

determinar el grado de pureza de una sustancia, extracto, alimento etc., además es utilizado como un parámetro de control de calidad y además establece un criterio indirecto de la concentración de un extracto en investigación.

En *U. urens*, el Extracto acuoso mostró un valor de 1,335 y en Extracto etanólico presentó un valor de 1,364; este último dato se acerca al obtenido por Quiroz, 2013, quien determinó el índice de refracción en extracto etanólico de *U. dioica*, obteniendo un valor de 1,35. En *Urera baccifera*, el Extracto acuosos mostró un valor de 1,33 y en E. Etanólico por maceración se obtuvo un valor de 1,365 similar al dato conseguido en *U. urens*.

#### 3.4.4. Determinación de pH

**Tabla 22-3.** Resultado de determinación de pH

Extractos	Extracto en Reposo
<b><i>U. urens</i></b>	
E.A	8,09
E.E.M	8,24
<b><i>U. baccifera</i></b>	
E.A	8,40
E.E.M	8,35

E.A. = Extracto Acuoso; E.E.M = Extracto etanólico (Maceración)

Realizado Por: GUAMÁN, F.2015.

En la tabla 22-3 se muestran los resultados de pH, en extracto acuoso de *U. urens* se obtuvo un valor de 8,09 y E. etanólico fue de 8,24 de extracto.

Según Quiroz, 2013 realizó una determinación de pH en extracto etanólico de planta seca de *U. dioica*, determinando un valor de 6,5. En la misma tabla se muestran los resultados de extractos de *U. baccifera*, el extracto etanólico y acuoso corresponden a valores alcalinos, se debe considerar que aunque las especies de ortiga proviene de diferentes hábitats los datos alcanzados son similares, la alcalinidad se puede deber al pH de suelo en el que crecen, temperatura entre otros.

### 3.4.5. Determinación de Sólidos Totales

**Tabla 23-3.** Resultado de determinación de Sólidos Totales En Extractos

<i>Urtica urens</i>	
E. A	E.E.M
0,95 %	1,01%
<i>Urera bacciefera (L) Gaudich</i>	
E.A	E.E.M
1,10 %	1,05%

E.A.L = Extracto Acuoso; E.E.M = Extracto etanólico obtenido por Maceración

Realizado Por: GUAMÁN, F.2015.

En la tabla 21-3 se muestran los resultados de Determinación de sólidos totales, la importancia de determinar sólidos totales en plantas se debe a que permite estimar la cantidad de materia disuelta y en suspensión que lleva un volumen de solvente. De acuerdo a la tabla el porcentajes de extracto acuoso y etanólico de *U. baccifera* son mayores a los obtenidos en *U. urens*, lo que determina una mayor cantidad de residuos sólidos o materia seca en un volumen definido de solvente.

### 3.5. Resultados de Ensayo de Actividad Hemoaglutinante.

#### 3.5.1. Determinación de Actividad Hemoaglutinante en extracto acuoso de *Urera baccifera (L) Gaudich*.

**Tabla 24-3.** Resultados de Ensayo de Actividad hemoaglutinante, sin centrifugar, en *Urera baccifera (L) Gaudich*.

Grupo Sanguíneo	DILUCIONES								
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
A Rh+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	0
B Rh+	1+	1+	1+	1+	1+	0	0	0	0
AB Rh+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	0	0	0
O Rh+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	0	0

1+: Formación de Tapiz. 0: presencia de botón

Realizado Por: GUAMÁN, F.2015.

La aglutinación se define como un agrupamiento en pequeños cúmulos de cuerpos formes (hematíes, Leucocitos, Bacterias) portadores de un antígeno y en suspensión en un líquido,

originando una reacción cuando se introduce el anticuerpo correspondiente en el líquido. Dicho de otra manera, los antígenos situados en la membrana por ejemplo de hematíes reaccionan con los anticuerpos y el resultado de la reacción es la formación de grumos de hematíes o aglutinados. (Castillo & Abdullaev, 2005, p 55- 61)

En la tabla 24-3 se muestran los resultados registrados de la actividad aglutinante para el extracto crudo de *Urera baccifera (L) Gaudich* antes de centrifugar, en todos los grupos existió actividad hemoaglutinante sin embargo la mayor actividad se registró en el grupo sanguíneo A<sup>+</sup>, alcanzando hasta una titulación de 1/256, en el grupo sanguíneo B<sup>+</sup> se registró una menor actividad en comparación a los demás grupos sanguíneos, alcanzando hasta una titulación de 1/64, este resultado indica una menor potencialidad del extracto para generar aglutinación.

Según Corrales, 2004, determinó que ciertas semillas de leguminosas presentan actividad hemoaglutinante en los cuatro grupos sanguíneos: A<sup>+</sup>, B<sup>+</sup>, AB<sup>+</sup>, O<sup>+</sup>. Así también Sangvanich et al., (2007) desarrollaron un estudio de actividad aglutinante en eritrocitos de conejo en conjunto con diferentes especies medicinales de cúrcuma, obteniendo aglutinación en todos los grupos de hematíes ensayados.

**Tabla 25-3** Resultado de ensayo de Actividad hemoaglutinante en diluciones seriadas de *Urera baccifera (L) Gaudich*.

Grupo Sanguíneo	DILUCIONES								
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
A Rh+	3+	3+	3+	2+	2+	1+	1+	1+	0
B Rh+	3+	3+	3+	2+	1+	1+	0	0	0
AB Rh+	3+	3+	3+	2+	2+	1+	1+	0	0
O Rh+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	1+	0	0

3+: Abundante hemaglutinación 2+: Mediana Aglutinación 1+: Leve Aglutinación 0: Ausencia de hemoaglutinación/formación de botón

**Realizado Por:** GUAMÁN, F.2015.

La tabla 25-3 muestran actividad hemoaglutinante del extracto sobre todos los grupos sanguíneos, lo que hace suponer la posible presencia de hemaglutininas o Lectinas responsables de la actividad, así el grupo A<sup>+</sup> presentó la mayor actividad aglutinante, alcanzando hasta una titulación de 1/256 similar a los encontrados en de actividad de extractos sin centrifugar (Ver tabla 24-3). El grupo B<sup>+</sup> presentó una menor potencialidad de aglutinación respecto a los demás grupos sanguíneos, alcanzando hasta una titulación de 1/64.

El extracto acuoso mostró aglutinación sobre los grupos AB<sup>+</sup> y O<sup>+</sup>, alcanzando hasta una titulación de 1/128. En todos los grupos sanguíneos a medida que aumentaba la dilución de la concentración del extracto la potencialidad de aglutinación disminuía.

Según Corrales, 2004, determinó que ciertas semillas de leguminosas presentan actividad hemoaglutinante en cuatro grupos sanguíneos: A<sup>+</sup>, B<sup>+</sup>, AB<sup>+</sup>, O<sup>+</sup>. Así también Sangvanich et al., (2007) desarrollaron un estudio de actividad aglutinante en eritrocitos de conejo en conjunto con diferentes especies medicinales de cúrcuma, obteniendo aglutinación en todos los grupos de hematíes ensayados.

Las lectinas por referencias bibliográfica (ver apartado 1.10.1) presentan una extensa utilidad clínica, así por ejemplo Kavalali et al., (2003) determinaron la presencia de lectinas en semillas de *Urtica pilulifera* (Familia Urticaceae) y además fueron utilizados en una actividad hipoglucemiante inducida en ratas.

### 3.5.2. Determinación de Actividad Hemoaglutinante en extracto acuoso de *Urtica urens*

**Tabla 26-3.** Resultado de ensayo de actividad hemoaglutinante, sin centrifugar en extracto Acuoso de *Urtica urens*.

Grupo Sanguíneo	DILUCIONES								
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
A Rh+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	0	0	0
B Rh+	1+	1+	1+	1+	1+	0	0	0	0
AB Rh+	1+	1+	1+	1+	1+	0	0	0	0
O Rh+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	0	0	0

1+: Presencia de Tapiz 0: Formación de botón

Realizado Por: GUAMÁN, F.2015.

En la tabla 26-3 se muestran los resultados registrados de la actividad aglutinante para el extracto crudo de *Urtica urens* antes de centrifugar, en todos los grupos se registra una baja actividad hemoaglutinante, sin embargo la mejor actividad se presentó en el grupo sanguíneo A<sup>+</sup> y O<sup>+</sup>, alcanzando hasta una titulación de 1/64, en el grupo sanguíneo B<sup>+</sup> y AB<sup>+</sup> se registra una menor actividad alcanzando hasta una titulación de 1/32, el resultado indica una menor potencialidad del extracto para generar aglutinación.

Las lectinas por referencias bibliográfica (ver apartado 1.10.1) presentan una extensa utilidad clínica, así por ejemplo Kavalali et al, (2003) determinaron y asilaron lectinas en semillas de *Urtica pilulifera* (Familia Urticaceae). Las lectinas aisladas demostraron actividad hipoglucemiante en ratas y además regeneración de Células b.

**Tabla 27-3.** Resultado de ensayo de Actividad hemoaglutinante en diluciones seriadas de *Urtica urens*

Grupo Sanguíneo	DILUCIONES								
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
A Rh+	2+	2+	2+	1+	0	0	0	0	0
B Rh+	1+	1+	1+	1+	1+	0	0	0	0
AB Rh+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	0	0	0
O Rh+	2+	2+	2+	2+	1+	1+	0	0	0

3+: Abundante hemaglutinación 2+: Mediana Aglutinación 1+: Leve Aglutinación 0: Ausencia de hemoaglutinación/formación de botón

**Realizado Por:** GUAMÁN, F.2015.

En La tabla 27-3 se muestra los resultados de actividad hemoaglutinante del extracto sobre todos los grupos sanguíneos, lo que hace suponer la posible presencia de Lectinas responsables de actividad, sin embargo el extracto mostró mayor actividad aglutinante sobre el grupo O<sup>+</sup> y AB<sup>+</sup>, alcanzando hasta una titulación de 1/64. Sobre el grupo A<sup>+</sup> el extracto presentó una menor potencialidad de aglutinación respecto a los demás grupos sanguíneos, demostrando aglutinación hasta una titulación de 1/16.

Además el extracto acuoso mostró la menor actividad aglutinante sobre el grupo B<sup>+</sup>, alcanzando hasta una titulación de 1/32. En todos los grupos sanguíneos a medida que aumentaba la dilución de concentración del extracto, la potencialidad de aglutinación disminuía.

La potencialidad de aglutinación de Extracto de *U. baccifera* es mayor al extracto de *U. urens*, aun en mayes diluciones de la muestra presenta hemoaglutinación sobre todos los grupos sanguíneos ensayados.

### 3.6. Resultados de Actividad Antimicrobiana de *Urtica urens* y *Urera baccifera* (L) *Gaudich*

#### 3.6.1. Determinación de Actividad Antimicrobiana mediante Método de Microgotas

**Tabla 28-3.** Resultados de ensayo de Actividad antibacteriana de *U. urens* mediante el método de microgotas.

Bacterias y Hongos Monitores	Extractos (mm)				Controles Negativos (mm)				Controles Positivos (mm)			
	EAL	EEU	EEM	EEM ¼	H <sub>2</sub> O DEST.	DMSO	Etanol	Etanol ¼	Q	E	CRO	K
<i>E. coli</i>	0	0	3	0	0	0	3	0	1	1	3	NE
<i>S. aureus</i>	0	1	3	2	0	0	3	0	1	3	3	NE
<i>K. pneumoniae</i>	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0	3	NE
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0	3	NE
<i>P. vulgaris</i>	0	0	2	0	0	0	2	0	1	1	3	NE
<i>C. albicans</i>	0	1	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0

H<sub>2</sub>O DEST. = Agua destilada estéril; DMSO = sol. Dimetilsulfóxido (98%); Etanol ¼ = Etanol diluido, Q = Sol. Quercetina; E= Eritromicina (7.5µg/2µL), CRO= Ceftriaxona (15µg/2µL), K= Ketoconazol (12.5µg/2µL), (NE) = No evaluado. mm= milímetros.

**Realizado Por:** GUAMÁN, F.2015.

La tabla 28-3 muestra los resultados de la determinación antibacteriana y anti fúngica de extracto acuoso (EAL), extracto etanólico por baño ultrasónico (EEU) y extracto etanólico por maceración (EEM) de *Urtica urens*, mediante método de microgotas, el ensayo se realizó de forma cualitativa, observándose diferencias importantes entre cada uno de ellos, la actividad tóxica se evaluó en base a la aparición de halos de inhibición translucidos, turbios y muy opacos.

El extracto etanólico por maceración (EEM) mostró actividad sobre todas las cepas evaluadas, presentando una gran toxicidad sobre *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. El extracto acuoso mostró actividad tóxica leve únicamente sobre *C. albicans*. El extracto etanólico obtenido por ultrasonido mostró actividad sobre *S. aureus* y *C. albicans*, sus controles negativos no presentaron actividad alguna. El extracto Etanólico por maceración diluido ¼ demostró actividad tóxica sobre *S. aureus*, su control negativo no mostró actividad alguna, por lo que se presume que la actividad se debe a los componentes presentes en el extracto.

Los resultados encontrados en *E. coli* y *S. aureus* coinciden con el trabajo realizado por Alvarado & Rodas (2010) quienes demostraron mediante el método de Concentración mínima Inhibitoria, que *U. urens* extraída de diferentes altitudes de la región sierra del Ecuador presentó actividad bactericida sobre *S. aureus*, pero la respuesta fue diferente en *E. coli*, donde no toxicidad alguna.

Según Weli et al., (2015) quienes realizaron una evaluación de actividad antimicrobiana en extractos con hexano, Cloroformo acetato de etilo e hidroalcohólico de las hojas de *Ficus carica* (Mismo ORDEN en taxonomía que ortiga) a diferentes concentraciones determinando que todos los extractos presentaron actividad moderadamente tóxica sobre *E. coli*, *S. aureus*, *P aeruginosa* y *Candida albicans*

Por los resultados mostrados en la tabla 28-3 se puede indicar que el método de extracción utilizado influye en la obtención de sustancias activas, además la actividad antimicrobiana mostrada en cada extracto se puede atribuir a los componentes presentes en este, según Tim & Lamb (2005) indican que compuestos fenólicos, flavonoides, serían responsables de atribuir actividad antimicrobiana en plantas

**Tabla 29-3.** Resultados de Actividad Antibacteriana de *U. baccifera* mediante el método de microgotas.

Bacterias y Hongos Monitores	Extractos (Medición en mm)				Controles Negativos (Medición en mm)					Controles Positivos (mm)		
	EAL	EEU	EEM	EEM ¼	H <sub>2</sub> O DEST.	DMSO	Etanol	Etanol ¼	Q	E	CRO	K
<i>E. coli</i>	0	0	3	0	0	0	3	0	0	1	3	NE
<i>S. aureus</i>	0	2	3	3	0	0	3	0	1	3	3	NE
<i>K. pneumoniae</i>	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0	3	NE
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	2	0	0	0	3	0	0	0	3	NE
<i>P. vulgaris</i>	0	0	2	0	0	0	2	0	1	1	3	NE
<i>C. albicans</i>	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0

H<sub>2</sub>O DEST. = Agua destilada estéril; DMSO = sol. Dimetilsulfóxido (98%); Etanol ¼ = Etanol diluido, Q = Sol. Quercetina; E= Eritromicina (7.5µg/2µL), CRO= Ceftriaxona (15µg/2µL), K= Ketoconazol (12.5µg/2µL), (NE) = No evaluado. mm= milímetros  
**Realizado Por:** GUAMÁN, F.2015.

La tabla 29-3 muestra los resultados de la determinación antibacteriana y anti fúngica de extracto acuoso (EAL), extracto etanólico por baño ultrasónico (EEU) y extracto etanólico por maceración (EEM) de *Urera baccifera* la actividad se evaluó en base a la aparición de halos de inhibición translucidos, turbios y muy opacos.

El extracto etanólico por maceración (EEM) mostró actividad sobre todas las cepas evaluadas, presentando una gran toxicidad sobre *E. coli*, *S. aureus* y *K. pneumoniae*. El extracto acuoso mostró actividad tóxica leve únicamente sobre *C. albicans*. El extracto etanólico obtenido por ultrasonido (EEU) mostró actividad sobre *S. aureus* y *C. albicans*, sus controles negativos no presentaron actividad alguna. El extracto Etanólico por maceración diluido ¼ demostró una gran actividad tóxica (halos de inhibición translucidos), únicamente sobre *S. aureus*, su control negativo no mostró actividad, por lo que se presume que la actividad del extracto se debe a su composición Fitoquímica.

Los resultado de la tabla 29-3 coincide parcialmente con los obtenidos por Gülçin *et al.*, 2004, y Dulger & Gronuz, 2004, quienes demostraron que extractos de ortiga negra (*Urtica dioica*) tienen un efecto bactericida débil sobre *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*.

### 3.6.2. Determinación de Actividad Antimicrobiana mediante Método Difusión en Discos.

**Tabla 30-3.** Resultados de Actividad Antibacteriana de *Urtica urens* Mediante el Método de Difusión en discos.

Bacterias y Hongos Monitores	Extractos (Medición en mm)				Controles Negativos (Medición en mm)					Controles Positivos (mm)		
	EAL	EEU	EEM	EEM ¼	H <sub>2</sub> O DEST.	DMSO	Etanol	Etanol ¼	Q	E	CRO	K
<i>E. coli</i>	R	R	10	R	R	R	8	R	R	11	27	NE
<i>S. aureus</i>	12	11	10	R	R	R	13	R	13	27	20	NE
<i>K. pneumoniae</i>	R	R	11	R	R	R	12	R	R	10	19	NE
<i>P. aeruginosa</i>	R	14	13	11	R	R	11	R	R	R	17	NE
<i>P. vulgaris</i>	R	R	8	R	R	R	10	R	R	R	35	NE
<i>C. albicans</i>	11	9	11	R	R	R	11	R	R	NE	NE	0

H<sub>2</sub>O DEST. = Agua destilada estéril; DMSO = sol. Dimetilsulfóxido (98%); Etanol ¼ = Etanol diluido, Q = Sol. Quercetina; E= Eritromicina (7.5µg/2µL), CRO= Ceftriaxona (15µg/2µL), K= Ketoconazol (12.5µg/2µL), (NE) = No evaluado. mm= milímetros  
**Realizado Por:** GUAMÁN, F.2015.

La concentración de los extractos fue mayor al utilizado en el método de microgotas, el extracto acuoso y etanólico por ultrasonido utilizó una concentración de 1 500 µg/disco (1,5 mg/disco) y el extracto etanólico por maceración utilizó una concentración de 113,5 µg/µL (0,11 mg/disco), las mediciones de los halos de inhibición se muestran en milímetros (mm)

La tabla 30-3 muestra los resultados de actividad toxica de extractos sobre microorganismos. El extracto etanólico por maceración mostró actividad sobre todos las cepas evaluadas, pero presentó una mayor diámetro de inhibición sobre *P. aeruginosa*, a la vez que el extracto etanólico diluido mostró halo de inhibición (11 mm) únicamente sobre *P. aeruginosa*. El extracto acuoso mostró actividad tóxica sobre *S. aureus* y *C. albicans* y el extracto etanólico por ultrasonido presentó halos de inhibición sobre *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*, sin embargo el mayor diámetro de inhibición presentó sobre *P. aeruginosa* (14 mm).

Los resultados mostrados sobre *E. Coli* y *S. aureus* mediante el método de difusión en discos (Kirby- Bauer) coinciden con los estudios realizados por Alvarado & Rodas (2010), quienes demostraron mediante el método de Concentración mínima Inhibitoria, que *U. urens* extraída de diferentes altitudes de la región sierra del Ecuador presentaban actividad bactericida sobre *S. aureus*, pero no sobre *E. coli*.

**Tabla 31-3.** Resultados de ensayo de Actividad Antibacteriana de *Urera baccifera* (L) Gaudic mediante el método de Difusión en discos.

Bacterias y Hongos Monitores	Extractos				Controles Negativos					Controles Positivos		
	EAL	EEU	EEM	EEM ¼	H <sub>2</sub> O DEST.	DMSO	Etanol	EtOH ¼	Q	E	CRO	K
<i>E. coli</i>	R	R	11	R	R	R	8	R	R	11	27	NE
<i>S. aureus</i>	11	12	13	12	R	R	13	R	13	27	20	NE
<i>K. pneumoniae</i>	R	R	11	R	R	R	12	R	R	10	19	NE
<i>P. aeruginosa</i>	R	R	10	R	R	R	11	R	R	R	17	NE
<i>P. vulgaris</i>	R	R	8	R	R	R	10	R	R	R	35	NE
<i>C. albicans</i>	9	8	10	R	R	R	11	R	R	NE	NE	0

H<sub>2</sub>O DEST. = Agua destilada estéril; DMSO = sol. Dimetilsulfóxido (98%); Etanol ¼ = Etanol diluido, Q = Sol. Quercetina; E= Eritromicina (7.5µg/2µL), CRO= Ceftriaxona (15µg/2µL), K= Ketoconazol (12.5µg/2µL), (NE) = No evaluado. mm= milímetros

Realizado Por: GUAMÁN, F.2015.

La concentración del extracto etanólico por maceración fue de 138 µg/disco (0,14 mg/disco), la tabla 31-3 muestra los resultados de actividad tóxica de extractos de *U. baccifera* sobre microorganismos. El extracto etanólico por maceración mostró actividad sobre todos las cepas evaluadas, pero presentó una mayor diámetro de inhibición sobre *S. aureus*, a la vez que el extracto etanólico diluido demostró halo de inhibición (11 mm) únicamente sobre *S. aureus*, su control negativo no presentó zona de inhibición, por lo que se presume que la actividad se debe a la composición Fitoquímica de la planta. El extracto acuoso mostró actividad tóxica sobre *S. aureus* y *C. albicans* y el extracto etanólico por ultrasonido presentó halos de inhibición sobre *S. aureus* y *C. albicans*, sin embargo el mayor diámetro de inhibición (12 mm) se presentó sobre *S. aureus*.

Los resultados de la tabla 31-3 muestran que todos los extractos de *U. baccifera* presentan halos de inhibición sobre *S. aureus* (Bacteria Gram positiva), se puede deber a la estructura externa de la bacteria lo que la hace más vulnerable a agentes antimicrobianos

Los controles negativos a excepción del etanol, no mostraron toxicidad, por lo que se presume que la actividad que demuestran los extractos se debe a la composición Fitoquímica de la planta.

Los resultados conseguidos sobre *E. Coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* coinciden con los estudios realizados por Onofre &, Herkert (2012) quienes demostraron mediante el método de Dilución en caldo (Concentración mínima Inhibitoria), que el extracto metanólico de hojas y raíz de *U. baccifera*, presentó actividad bactericida moderada sobre *E. Coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

Según Weli et al., (2015) realizaron una evaluación de actividad antimicrobiana mediante difusión en discos en extractos con hexano, Cloroformo acetato de etilo e hidroalcohólico de hoja de *Ficus carica* (Mismo ORDEN en taxonomía que ortiga) a diferentes concentraciones determinando que todos los extractos presentaron actividad moderadamente tóxica sobre *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*. Demostrando que plantas del mismo orden taxonómico pueden presentar actividad antimicrobiana probablemente a los similares compuestos activos presentes en las plantas.

## CONCLUSIONES

Se obtuvieron 3 extractos por cada especie de ortiga, extracto acuoso, extracto etanólico obtenido mediante método de Maceración y extracto etanólico mediante baño ultrasónico. En el extracto acuoso y etanólico por maceración de *Urtica urens* y *Urtica baccifera*, se realizaron la respectiva caracterización Fitoquímica encontrando metabolitos en común como Compuestos fenólicos, Flavonoides, Antocianidinas. En cromatografía en capa fina en extracto acuoso se concluye la presencia de cuatro bandas similares en ambas especies de ortiga, la banda que corresponde a Rf 6 se presume sería Acido Clorogénico, la banda que corresponde a Rf 7 a Isoquercitrina y la banda 8 que corresponde al Rf 8 sería a Quercetina.

Basados en los resultados alcanzados de actividad antimicrobiana mediante los métodos de microgotas y difusión en discos, se concluye que en *Urtica urens* y *Urtica baccifera* el extracto etanólico por maceración, presentó actividad antimicrobiana en todos las cepas ensayadas: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* y *Candida albicans*.

El extracto Acuoso y etanólico por baño ultrasónico de *Urtica urens* mostró actividad sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*, en cambio el extracto Acuoso y etanólico por baño ultrasónico de *Urtica baccifera*, mostró actividad frente a *S. aureus* y *C. albicans*.

En general *Urtica urens* demostró ser más eficaz que *Urtica baccifera*, debido al número de cepas bacterias inhibidas, sin embargo de acuerdo a los resultados obtenidos en la actividad bactericida mediante difusión en discos, se concluye que los extractos obtenidos de *Urtica baccifera* (*L*) *Gaudich* son más activos sobre *Staphylococcus aureus*.

El extracto acuoso obtenido de hojas y tallos de *Urtica baccifera* (*L*) *Gaudich* presentó el mayor efecto aglutinante sobre los cuatro grupos sanguíneos ensayados, su potencialidad en aglutinar eritrocitos alcanzó titulaciones hasta 1/256.

El extracto acuoso obtenido de hojas y tallos de *Urtica urens* presentó el menor efecto aglutinante sobre los cuatro grupos sanguíneos, su potencialidad fue muy baja en las primeras titulaciones ensayadas, el extracto alcanzó titulaciones hasta 1/64.

## RECOMENDACIONES

Realizar una cuantificación y Purificación de compuestos activos y aplicarlos en diferentes tipos de microorganismos monitores, sabiendo que los compuestos fenólicos serían los responsables de ejercer una acción inhibitoria sobre agentes bacterianos, se determinaría cual metabolito es el principal o único responsable de otorgar actividad.

Realizar una identificación, caracterización bioquímica y especificidad de las lectinas presentes en *Urera baccifera (L) Gaudich*, debido a que presentaron la mayor actividad hemoaglutinante, además establecer la posible utilidad clínica.

## BIBLIOGRAFIA

**AGUILERA, L.** Estudio de PGA 26, una proteína implicada en la arquitectura de la pared celular de *Candida albicans*. (Tesis) (Doctoral). Universidad de Valencia. Farmacia. Departamento de Microbiología y Ecología. Valencia - España. 2010 pp. 1-4. [Consulta: 2015-02-09]. Disponible en:  
< <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/31891/laforet.pdf?sequence=1> >

**ÁLVAREZ, Victoria & BOQUET, Ernesto.** *Manual de Técnicas en Microbiología Clínica*. España. 1995. p 224.

**ARAUJO, Jorge & SALAS, Ramsés.** Actividad Antimicrobiana de Plantas. 2008. Universidad Científica del Sur. Lima. Perú. [Consulta: 2015-06-09]. Disponible en:  
<<http://www.apicoladelalba.cl/actividad-antimicrobiana-de-plantas-sci/>>

**BAGUÉ, Ana. & ALVAREZ, Néstor.** *Tecnología Farmacéutica*. [En línea]. Sancti Spíritus. Cuba. Editorial Club Universitario, 2012. [Consulta: 2015-06-09]. Disponible en:  
<[https://books.google.com.ec/books/about/Tecnolog%C3%ADa\\_Farmac%C3%A9utica.html?id=w19eIC1H0IC&redir\\_esc=y](https://books.google.com.ec/books/about/Tecnolog%C3%ADa_Farmac%C3%A9utica.html?id=w19eIC1H0IC&redir_esc=y) >

**BECERRA, Martha.** Costumbres y prácticas que utilizan los agentes de la medicina ancestral y su relación en la salud de los moradores, en la parroquia Chinga Recinto Chigüe de la provincia de Esmeraldas del año 2014. [En línea] (Tesis de Pregrado). Pontificia Universidad Católica. Esmeraldas. Ecuador. 2014. pp. 1-4. [Consulta: 2015-09-04]. Disponible en:  
<<http://repositorio.pucese.edu.ec/bitstream/123456789/304/1/BECERRA%20PALMA%20MARTHA%20ELIZABETH.pdf>>

**BERMÚDEZ., et al.** La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *INCI*. Vol. 30. No. 8. 2005. Caracas. pp. 453-459. [Consulta: 2015-09-04]. Disponible en:  
<[http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0378-18442005000800005&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0378-18442005000800005&script=sci_arttext)>

**BERNAL, Maye & GUZMÁN, Miguel.** El antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby - Bauer. [En línea]. *Biomedica*. 1984. Vol 4. No 3. Bogotá -Colombia. pp. 115-117. [Consulta: 2015-09-04]. Disponible en:

<<http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/download/1891/1917%3A%3Apdf>>

**BIESAGA, Magdalena.** Influence of extraction methods on stability of flavonoids. .[En línea]. *ELSEVIER*. 2011. Polonia. Vol. 1218. pp. 2505–2512. [Consulta: 2015-09-04]. Disponible en: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002196731100286X>>

**BODERO, María.** Estudio farmacognóstico y actividad antimicrobiana (in vitro) de los extractos fluidos de Arrayán y Pumín y su aplicación en una pasta dentífrica. (Tesis Pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba – Ecuador. 2010. [Consulta: 2015-09-04]. Disponible en: <<http://dspace.esoch.edu.ec/handle/123456789/721>>

**CASTILLO, Adriana & ABDULLAEV, Fikrat.** Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer. *Investigación Clínica*. [En línea]. 2005. México DF- México Vol.57. No. 1. 2005. pp. 55, 59. [Consulta: 2015-09-06]. Disponible en: <[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0034-83762005000100007&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0034-83762005000100007&script=sci_arttext)>

**CHAVES, José.** Caracterización molecular del gen de la  $\beta$ -lactamasa shv-1 en *Klebsiella pneumoniae*. (Tesis Pregrado). [En línea]. Universidad de Barcelona. Biología. Barcelona-España. 2013 pp. 4-8. [Consulta: 2015-09-06]. Disponible en: <<http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/42377>>

**CORRALES, Istar,** Evaluación De La Presencia De Agentes Hemoaglutinantes Y De Otras Moléculas Biológicamente Activas En Extractos Acuosa Preparados A Partir De Semillas De Leguminosas. (Tesis Pregrado). Universidad de los Andes. Farmacia y Bionálisis. Farmacia. Merida-Venezuela. 2004 pp. 32-34. [Consulta: 2015-09-06].

**FERRARO, Graciela.** Flavonoides: Actualización de su uso en terapéutica. *Acta Farm. Bonaerense*. [En línea]. 1983. Buenos Aires. Argentina. Vol.2. No 2. p. 98. [Consulta: 2015-09-06]. Disponible en: <<http://www.acuedi.org/ddata/6753.pdf> >

**FU, Lei et al.** Plant lectins: Targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. *Biochemistry & Cell Biology*. [En línea].2014.China.Vol.43.pp.1443-1444. [Consulta: 2015-09-06]. Disponible en: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272511001968>>

**GARCÍA, A. & RODRÍGUEZ, F.** Enterobacterias. [En línea]. 2010. México Vol. 10. No 51. pp. 3430-3431. [Consulta: 2015-09-06]. Disponible en:  
<[http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Enterobacterias\\_Medicine2010.pdf](http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Enterobacterias_Medicine2010.pdf)>

**GOODMAN, L. & GILMAN, A.** *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Estados Unidos. 1995. pp. 1093

**GUERRA, Álvaro.** Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades físicoquímicas de los extractos fluidos, blandos y secos así como de las tinturas del rizoma y de la fronda de calahuala. (Tesis Pregrado). [En línea]. Universidad de San Carlos. Facultad de Ingeniería. Guatemala. 2005. pp. 14-18. [Consulta: 2015-09-07]. Disponible en:  
<[http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08\\_0951\\_Q.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08_0951_Q.pdf)>

**KAVALALI, G et al.** Hypoglycemic activity of *Urtica pilulifera* in streptozotocin diabetic rats. *Elsevier*. [En línea]. 2014. Turquía Vol.84. pp. 241-245 [Consulta: 2015-09-08]. Disponible en:  
<<http://www.sciencedirect.com/sci-hub.org/science/article/pii/S037887410200315X>>

**LIU B., et al.** Plant lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic. [En línea]. 2010. Universidad de Sichuan –China. Vol. 287. pp. 1-3 [Consulta: 2015-09-08]. Disponible en:  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S03043835090034502014/12/15>>

**LOCK DE UGAZ, Olga.** *Investigación Fitoquímica*. 2<sup>a</sup> ed. Lima. Perú. Fondo Editorial de La Pontificia Universidad Católica. 1994. pp. 114 - 182.

**MINISTERIO DEL AMBIENTE.** Base de datos de flora comercializada en el Ecuador. 2014. [Consulta: 2015-09-08] Disponible en: <[http://www.biocomercioecuador.ec/recursos/base-de-datos-flora/?pageNum\\_rsFlora=14&totalRows\\_rsFlora=299](http://www.biocomercioecuador.ec/recursos/base-de-datos-flora/?pageNum_rsFlora=14&totalRows_rsFlora=299)>

**MIRANDA, Migdalia.** *Métodos de análisis de drogas y extractos*. [En línea]. Universidad de la Habana. Instituto de Farmacia y Alimentos. Cuba. Editorial Club Universitario, 2002. p. 18-22. [Consulta: 2015-09-08] Disponible en:  
<<file:///C:/Users/Personal/Downloads/METODOS%20DE%20AN%C3%81LISIS%20DE%20ROGAS%20Y%20EXTRACTOS%20de%20Dra%20Migdalia%20Miranda%20Martinez.pdf>>

**ONOFRE, Sideney. & HERKERT, Patricia.** Antimicrobial activity of extracts obtained from *Urera baccifera* (L.) Gaudich. *Scientific & Academic Publishing*. [En línea]. 2012. UNIPAR.

Unit of Francisco Beltrão. Paraná. Brazil. Vol 12. No. 5. pp. 139-143 [Consulta: 2015-09-05]  
Disponibile en: <<http://article.sapub.org/10.5923.j.als.20120205.03.html#Sec2.4>>

**ORGANIZACIÓN MUNDIA DE SALUD (OMS)**, *Estrategias de la OMS sobre medicina tradicional*. [En línea]. 2014. Ginebra. Suiza. pp. 14-24. [Consulta: 2015-09-05] Disponible en: <<http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21201es/s21201es.pdf>>

**OMS**, *Resistencia a los antimicrobianos*. [En línea]. 2015 Ginebra. Suiza. [Consulta: 2015-03-05] Disponible en: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>>

**ORREGO, Carlos**. *Congelación y liofilización de alimentos*. [En línea] 2008. Manizales. Caldas. Colombia. [Consulta: 2015-03-05] Disponible en: <<http://www.bdigital.unal.edu.co/7837/1/9789584444363.pdf>>

**PELCZAR, et al**. Microbiología. 2<sup>a</sup>. ed. México. McGraw -Hill. 1982. pp. 11- 425.

**PRESCOTT, et al**. Microbiología. 4<sup>a</sup>. ed. Mac Graw – Hill. pp. 936,100-102.

**RAMÍREZ, Luz & MARÍN, Darwin**. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*. [En línea] 2009. Pereira. pp. 264. [Consulta: 2015-09-24] Disponible en: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84916714049>>

**REYES, Blanca & GALLEGOS, Madgalena**. Lectinas Vegetales: Una alternativa Terapeutica para el Cancer. *Desarrollo científico de enfermería*. [En línea]. 2011. Universidad Autonoma de Queretaro-México. Vol 19. No 5. pp. 119-180. [Consulta: 2015-09-06] Disponible en: <[www.index-f.com/dce/19pdf/19-179.pdf](http://www.index-f.com/dce/19pdf/19-179.pdf) >

**Rodríguez- Ángeles, Guadalupe**. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. *Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos*. [En línea]. 2002. Mexico DF. Mexico. Vol 44. No.5. pp. 465-466. [Consulta: 2015-09-06] Disponible en: <[http://www.avideter.com/ftp\\_public/E.coli.pdf](http://www.avideter.com/ftp_public/E.coli.pdf)>

**RUIZ, Lidia**. *Pseudomona aeruginosa*: Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. (Tesis doctoral). [En línea]. Universidad de Barcelona. Medicina. Unidad de microbiologia. Barcelona - España. 2007. pp. 3-9.[Consulta: 2015-09-06] Disponible en: <[http://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/2521/LRM\\_TESIS.pdf?sequence=1](http://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/2521/LRM_TESIS.pdf?sequence=1)>

**RUIZ, Nurby. Et al.** Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de algas marinas venezolanas. *Revista Peruana de Biología*. [En línea]. 2009. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú Vol. 16 No 1. Perú. pp. 98. [Consulta: 2015-09-30] Disponible en: <<http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/rpb/article/view/182>>

**SECRETARIA NACIONAL DE PLANIFICACIÓN Y DESARROLLO**, *Plan Nacional del Buen Vivir*. [En línea]. 2013. Quito. Ecuador. p 326. [Consulta: 2015-09-08] Disponible en: <<http://www.buenvivir.gob.ec/>>

**SILVA, María del Carmen; et al.** *Técnicos especialistas de laboratorio de servicio vasco de salud – Osakidetza*. [En línea]. 2<sup>ed.</sup> España. EDITORIAL MAD, S.L, 2006. [Consulta: 2015-09-08] Disponible en: <<https://books.google.com.ec/books?isbn=8466563156>>

**SULCA, Tania.** Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos de *Acmella repens* (Botoncillo), *Urtica dioica* (Ortiga negra) Y *Sonchus oleraceus* (Kana yuyo), plantas registradas en la parroquia La Esperanza – Imbabura, Sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* Y *Candida albicans*, Causante de enfermedades bucofaríngeas. (Tesis Pregrado). [En línea]. Escuela Politécnica del Ejército. Ingeniería en Biotecnología. Sangolquí. Ecuador. 2010. pp. 11-38. [Consulta: 2015-09-08] Disponible en: <<http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2648/1/T-ESPE-030037.pdf>>

**TAPIA, Jesica.** Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico y subextractos clorofórmico y etéreo de *Senna multijuga*, *Tagetes zipaquirensis*, y *Coursetia dubia*. (Tesis Pregrado). [En línea]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Ciencias. Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador. 2012. pp. 29-30. [Consulta: 2015-09-08] Disponible en: <<http://dspace.espech.edu.ec/handle/123456789/2449>>

**UPTON, Roy.** Stinging nettles leaf (*Urtica dioica* L.): Extraordinary vegetable medicine. *Elsevier*. [En línea]. 2013. Estados Unidos. Vol 3. American Herbal Pharmacopoeia. pp. 9-15. [Consulta: 2015-03-08] Disponible en: <<http://www.sciencedirect.com/sci-hub.org/science/article/pii/S2210803312000978>>

**UVIDIA, Rosa.** “Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico y subextractos etéreo y clorofórmico de *Duranta triacantha* Juss, *Callistemon speciosus*, y *Tagetes minuta* L.”.(Tesis Pregrado).Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Ciencias. Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador. 2012. pp. 27-38. [Consulta: 2015-03-08]

**ZAMPINI,Iris & CUDMANI,Norma.** Actividad antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico-resistentes. *Acta bioquím. clín. latinoam.* [En línea]. 2007. La Plata,Argentina. Vol 41. No 3. pp.386. [Consulta: 2015-03-08]. Disponible en: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_isoref&pid=S032529572007000300013&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_isoref&pid=S032529572007000300013&lng=es&tlng=es)

## ANEXOS

### ANEXO A: Recolección y Tratamiento de *Urera baccifera* (L) Gaudich



Realizado Por: GUAMÁN, F.2015.

### ANEXO B: Preparación y Maceración de Extractos de *Urera baccifera* (L) Gaudich



Realizado Por: GUAMÁN, F.2015.

### ANEXO C: Preparación y Maceración de Extractos de *Urtica Urens*

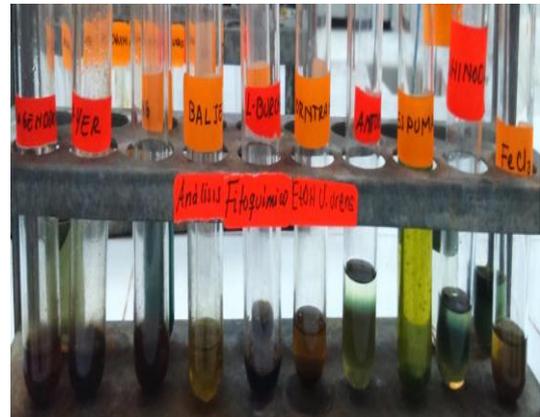


**ANEXO D:** Obtención de Extractos Etanólicos asistidos por ultrasonido.



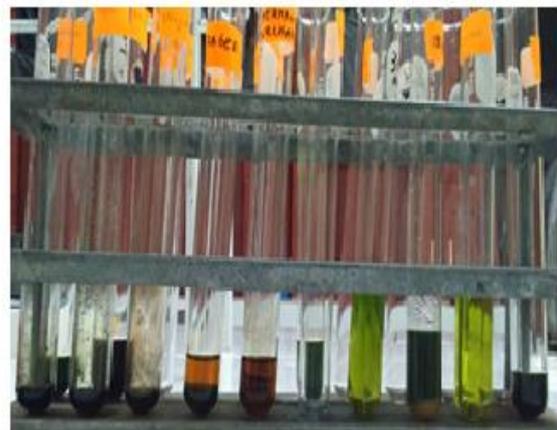
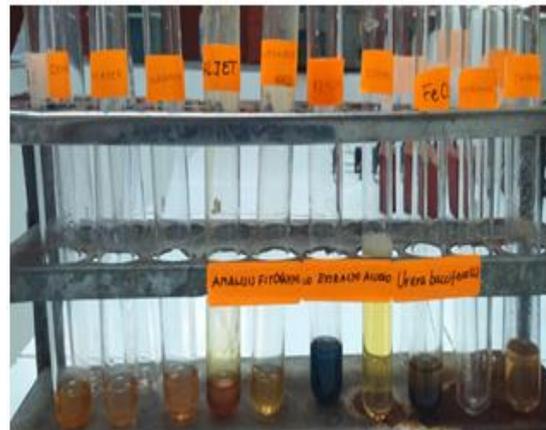
Realizado Por: GUAMÁN, F.2015.

**ANEXO E:** Tamizaje Fitoquímico de Extracto acuoso y etanólico de *Urtica urens*



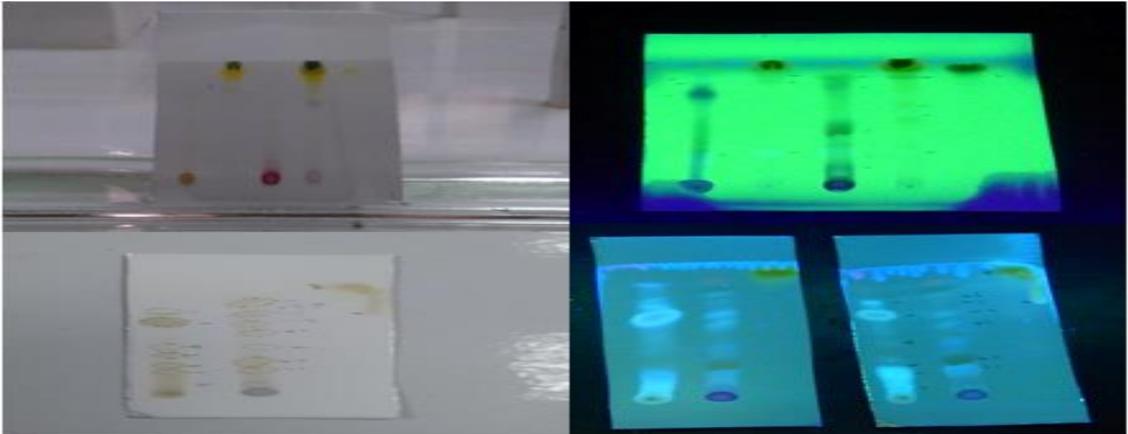
Realizado Por: GUAMÁN, F.2015

**ANEXO F:** Tamizaje Fitoquímico de Extracto acuoso y Etanólico de *Urera baccifera*



Realizado Por: GUAMÁN, F.2015

**ANEXO G:** Cromatografía en Capa fina de Extracto acuoso y etanólico asistido por Ultrasonido



Realizado Por: GUAMÁN, F.2015.

**ANEXO H:** Control de Extractos *Urtica urens* y *Urera baccifera*



Realizado Por: GUAMÁN, F.2015.

**ANEXO I:** Concentración de Extractos: Rotaevaporación y Liofilización



Realizado por: GUAMÁN, F.2015

**ANEXO J: Lavado de Eritrocitos y Preparación de Diluciones de Extracto Acuoso.**



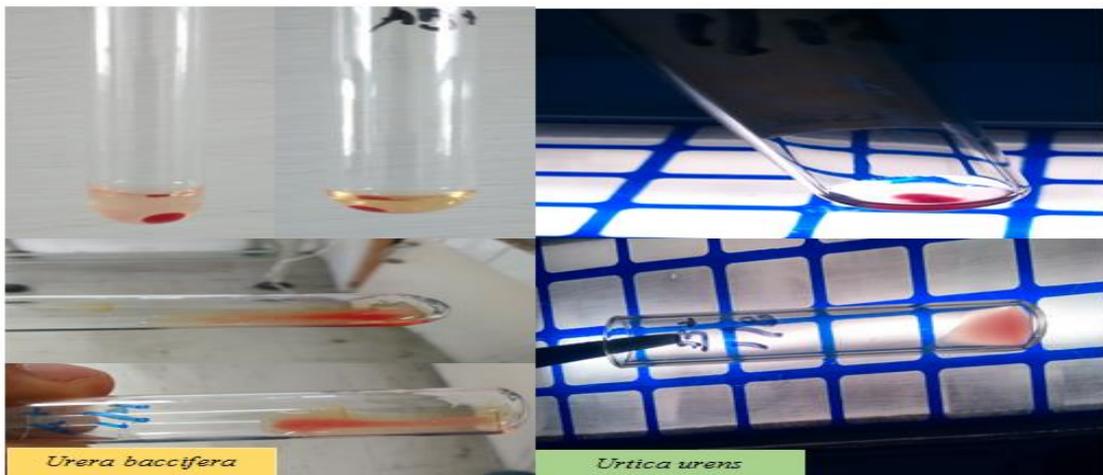
Realizado Por: GUAMÁN, F.2015.

**ANEXO K: Evaluación de Actividad hemoaglutinante sin centrifugar**



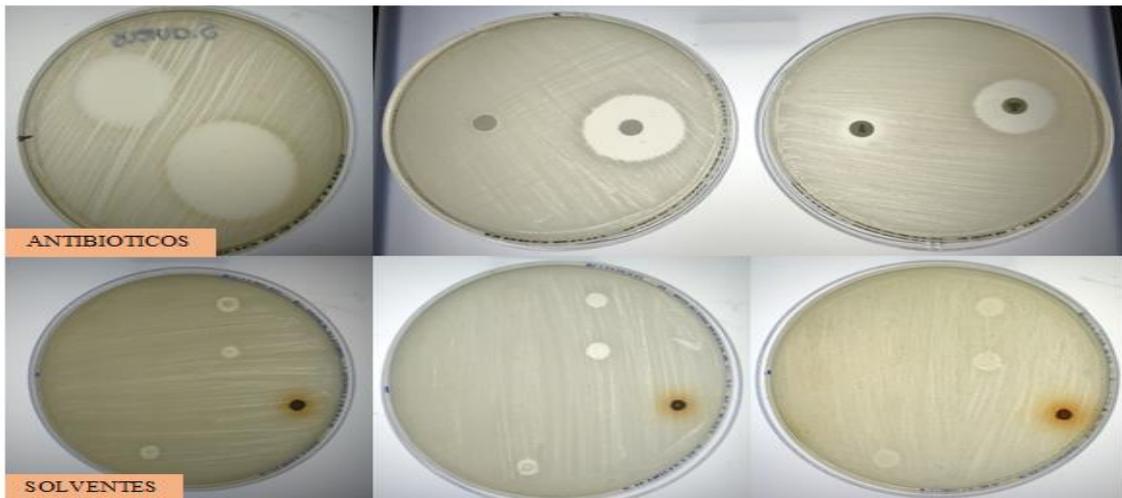
Realizado Por: GUAMÁN, F.2015.

**ANEXO L: Evaluación de Actividad Hemoaglutinante después de centrifugar**



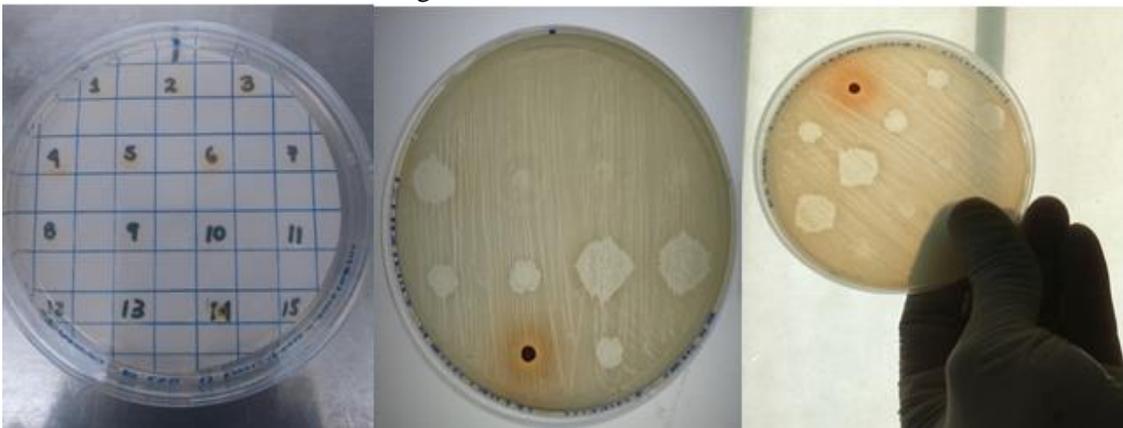
Realizado Por: GUAMÁN, F.2015.

**ANEXO M:** Evaluación antimicrobiana de controles positivos y Controles negativos.



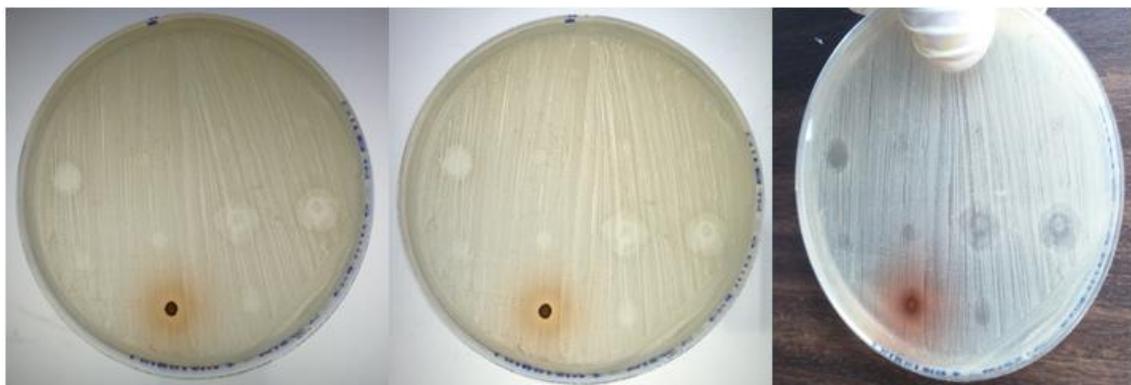
Realizado Por: GUAMÁN, F.2015

**ANEXO N:** Evaluación de Actividad antimicrobiana de *Urera baccifera* sobre *Staphylococcus aureus* Mediante método de Microgotas.



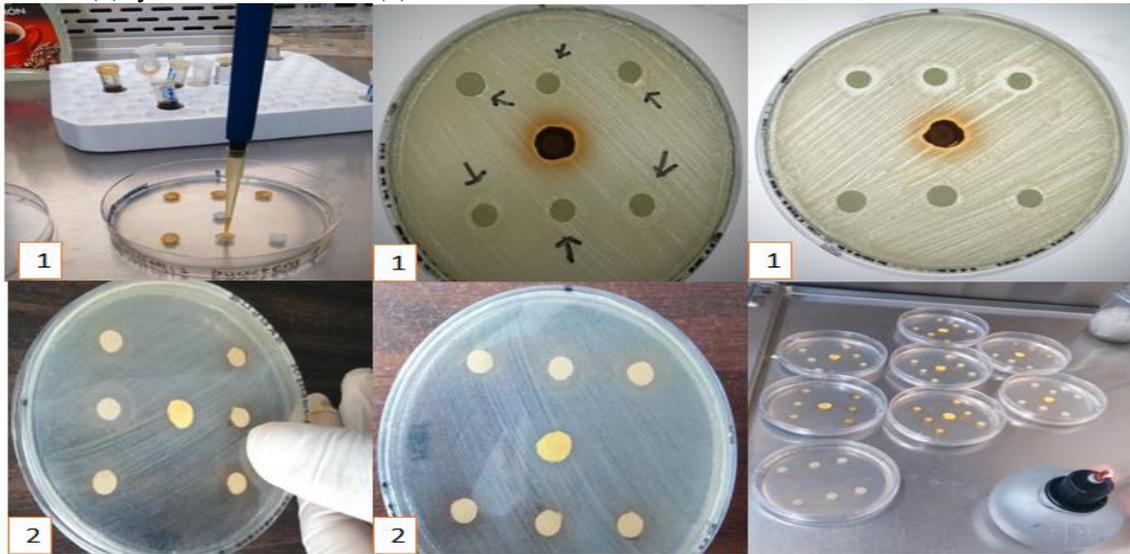
Realizado Por: GUAMÁN, F.2015

**ANEXO O:** Evaluación de Actividad antimicrobiana de *Urtica urens* sobre *Staphylococcus aureus* Mediante método de Microgotas.



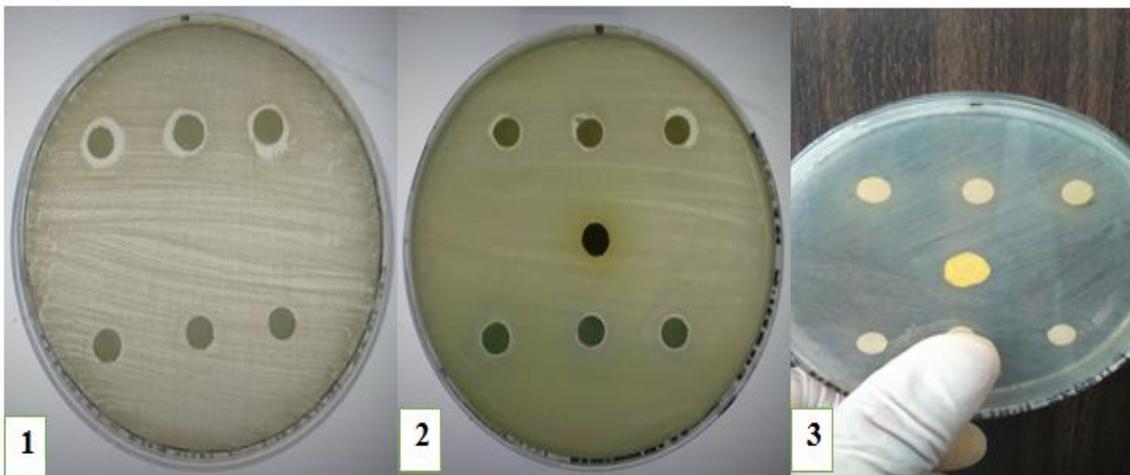
Realizado Por: GUAMÁN, F.2015

**ANEXO P:** Evaluación de Actividad antimicrobiana de *Urera baccifera* sobre *Staphylococcus aureus* (1) y *Candida albicans* (2) Mediante método de Difusión en Discos.



Realizado Por: GUAMÁN, F.2015

**ANEXO Q:** Evaluación de Actividad antimicrobiana de *Urtica urens* sobre *S. aureus* (1), *P. aeruginosa* (2) y *C. albicans* (3) Mediante método de Difusión en Discos



Realizado Por: GUAMÁN, F.2015