



UNIVERSIDAD TECNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ESCUELA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA

“Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos totales de cuatro especies vegetales de las Provincias de Loja y Zamora Chinchipe: *Piper ecuadorensis* (Matico), *Lepechinia mutica* Benth (Turuyante), *Fuschia ayavacensis* (Pena-Pena), *Niphogeton dissecta* (Culantrillo del cerro), empleando los métodos de Difusión en placa, Concentración Mínima Inhibitoria e Inhibición del Crecimiento Radial.”

*Tesis de grado previa la
Obtención del Título de
Bioquímico Farmacéutico*

AUTORA

Ximena Del Cisne Abad Albán

DIRECTOR

Bioq. Luis Emilio Cartuche Flores

LOJA – ECUADOR

2009

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Bioq. Luis Emilio Cartuche Flores
DOCENTE INVESTIGADOR DE LA UTPL
DIRECTOR DE TESIS:

Certifico:

Que el trabajo de Investigación titulado “**Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos totales de cuatro especies vegetales de las Provincias de Loja y Zamora Chinchipe: *Piper ecuadorensis* (Matico), *Lepechinia mutica* Benth (Turuyante), *Fuschia ayavacensis* (Pena-Pena), *Niphogeton dissecta* (Culantrillo del cerro), empleando los métodos de Difusión en placa, Concentración Mínima Inhibitoria e Inhibición del Crecimiento Radial” elaborado por la Srta. Ximena del Cisne Abad Albán ha sido revisado y se ajusta a los requisitos legales exigidos por la Escuela de Bioquímica y Farmacia, por lo que autorizo su presentación.**

Bioq. Luis Emilio Cartuche Flores
DIRECTOR DE TESIS

Loja, 13 de Noviembre del 2009

AUTORIA

Los conceptos, ideas, metodologías y los resultados obtenidos en la presente investigación, así como las discusiones, conclusiones y recomendaciones, son de responsabilidad absoluta de la autora.

Ximena del Cisne Abad Albán

DEDICATORIA

Con gran amor y cariño dedico este trabajo:

A Dios por darme la sabiduría, el entendimiento para culminar mi mayor reto y la fortaleza para enfrentar cada día.

A mis padres y hermanos quienes me han apoyado en todo lo que he querido hacer en la vida, me han impulsado en los momentos en que he querido dar marcha atrás, a su inmenso cariño y apoyo incondicional. Por haber sufrido y reído conmigo.

A mis amigos por los buenos consejos y enseñanzas.

Para ustedes todos los frutos de esta experiencia

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Técnica Particular de Loja y a la Escuela de Bioquímica y Farmacia por permitirme vivir una gran experiencia profesional y humana, brindándome sus enseñanzas para llevar a cabo mis objetivos personales y académicos.

Al Bioq. Luis Cartuche por su invaluable asesoría, por sus enseñanzas, dedicación, paciencia, y motivación para el desarrollo de este proyecto.

A quienes forman parte del Instituto de Química Aplicada por la colaboración desinteresada durante el desarrollo de la presente investigación, de manera especial al Bioq. Santiago Ojeda, Ing. Ximena Jaramillo, a mis compañeras Verónica Sarango, Diana Palacios por su apoyo incondicional.

A mis grandes amigos que me han acompañado durante este largo proceso, a quienes me apoyaron en los momentos más difíciles vividos en el inicio de este largo camino.

Finalmente agradezco a todas las personas que de distinta manera hicieron posible la realización de esta labor y han contribuido a que culminase con mi carrera profesional.

GRACIAS A TODOS!!!!

CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Ximena del Cisne Abad Albán “declaro ser autora del presente trabajo y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y de tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

.....
Ximena Abad

TESISTA

.....
Bioq. Luis E. Cartuche

DIRECTOR DE TESIS

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN.....	II
AUTORÍA.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTO.....	V
CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHOS.....	VI
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	VII
RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
I. INTRODUCCION.....	2
1.1 Objetivos.....	5
1.1.1 General.....	5
1.1.2 Específicos.....	5
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1 Enfermedades infecciosas.....	7
2.2 Tratamiento de las enfermedades infecciosas.....	7
2.3 Microorganismos de importancia en la salud pública.....	8
2.3.1 Bacterias.....	8
2.3.1.1 Gram positivas.....	9
2.3.1.2 Gram negativas.....	10
2.3.2 Hongos.....	12
2.3.2.1 Dermatofitos.....	13
2.3.2.2 Infecciones fúngicas oportunistas.....	14
2.4 Antimicrobianos.....	16
2.4.1 Principios antimicrobianos provenientes de plantas.....	17
1.5 Métodos para evaluar la actividad antimicrobiana.....	18

1.5.1 Actividad antibacteriana.....	19
1.5.1.1 Método de difusión en agar.....	19
1.5.1.2 Método de microdilución en caldo..	20
1.5.2 Actividad antifúngica.....	20
1.5.2.1 Método de inhibición del crecimiento micelar.....	21
1.6 Especies vegetales en estudio.....	22
1.6.1 <i>Piper ecuadoreense</i>	23
1.6.2 <i>Lepechinia mutica</i>	24
1.6.3 <i>Niphogeton dissecta</i>	25
1.6.4 <i>Fuschia ayavacensis</i>	26
II. MÉTODOLOGIA.....	28
2.1 Área de recolección.....	28
2.2 Obtención de extractos.....	29
2.3 Microorganismos de prueba.....	30
2.4 Pruebas Antimicrobianas.....	30
2.4.1 Método de difusión en agar.....	30
2.4.1.1 Preparación del extracto.....	30
2.4.1.2 Preparación del cultivo.....	30
2.4.1.3 Procedimiento.....	31
2.4.2 Método de microdilución en caldo.....	32
2.4.2.1 Preparación del extracto.....	32
2.4.2.2 Preparación de la suspensión bacteriana.....	32
2.4.2.3 Procedimiento.....	33
2.4.3 Inhibición del crecimiento micelar.....	35
2.4.3.1 Preparación del extracto.....	35
2.4.3.2 Preparación de los inoculos.....	35
2.4.3.3 Procedimiento.....	36
2.5 Análisis e interpretación de datos.....	37

III. RESULTADOS.....	40
3.1 Método de difusión en agar.....	40
3.2 Método de inhibición del crecimiento micelar.	42
3.2.1 <i>Aspergillus niger</i>	42
3.2.2 <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	46
4.2.3 <i>Trichophyton rubrum</i>	50
4.2.4 Porcentaje de inhibición del crecimiento micelar.....	54
3.3 Método de microdilución en caldo.....	59
IV. DISCUSIÓN.....	62
4.1 Actividad antibacteriana.....	62
4.2 Actividad antifúngica.....	63
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	67
5.1 Conclusiones.....	67
5.2 Recomendaciones.....	68
BIBLIOGRAFÍA.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Diferencias estructurales entre gram - y gram +.....	9
Fig. 2. Estructura morfológica de las bacterias gram +.....	10
Fig. 3. Estructura morfológica de la bacterias gram -	11
Fig. 4. Estructura de la membrana célula fúngica.....	12
Fig. 5. Estructura morfológica de los diferentes tipos de géneros dermatofitos.....	13
Fig. 6. Dermatofitos.....	14
Fig. 7. Hongos oportunistas.....	15
Fig. 8. Fotografía de <i>Piper ecuadorensis</i> Sodiroi.....	23
Fig. 9. Fotografía de <i>Lepechinia mutica</i>	24
Fig. 10. Fotografía de <i>Niphogeton dissecta</i> Benth.....	25
Fig. 11. Fotografía de <i>Fuschia ayavacensis</i>	26
Fig. 12. Mapa de los lugares de recolección de las cuatro especies vegetales.....	28
Fig. 13. Obtención de los extractos.....	29
Fig. 14. Esquema del procedimiento del método de difusión en agar.....	32
Fig. 15. Ilustración de la microplaca TC ₉₆	32
Fig. 16. Ilustración de la microplaca TC ₉₆ para hongos	32
Fig. 17. Esquema del procedimiento del método de inhibición de crecimiento micelar.....	37
Fig. 18. Valor promedio del crecimiento micelar del hongo <i>A. niger</i> frente al extracto <i>N. dissecta</i>	43
Fig. 20. Valor promedio del crecimiento micelar del hongo <i>A. niger</i> frente al extracto <i>P. ecuadorensis</i>	43
Fig. 18. Valor promedio del crecimiento micelar del hongo <i>A. niger</i> frente al extracto <i>L. mutica</i>	44
Fig. 21. Valor promedio del crecimiento micelar del hongo <i>A. niger</i> frente al extracto <i>F. ayavacensis</i>	44

Fig 22. Valor promedio del crecimiento micelar del hongo <i>T. mentagrophytes</i> frente al extracto <i>P. ecuadorensis</i>	47
Fig 23. Valor promedio del crecimiento micelar del hongo <i>T. mentagrophytes</i> frente al extracto <i>N. dissecta</i>	47
Fig 24. Valor promedio del crecimiento micelar del hongo <i>T. mentagrophytes</i> frente al extracto <i>L. mutica</i>	48
Fig 25. Valor promedio del crecimiento micelar del hongo <i>T. mentagrophytes</i> frente al extracto <i>F. ayavacensis</i>	48
Fig 26. Valor promedio del crecimiento micelar del hongo <i>T. rubrum</i> frente al extracto <i>P. ecuadorensis</i>	51
Fig 27. Valor promedio del crecimiento micelar del hongo <i>T. rubrum</i> frente al extracto <i>N. dissecta</i>	51
Fig 28. Valor promedio del crecimiento micelar del hongo <i>T. rubrum</i> frente al extracto <i>L. mutica</i>	52
Fig 29. Valor promedio del crecimiento micelar del hongo <i>T. rubrum</i> frente al extracto <i>F. ayavacensis</i>	52
Fig. 30. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelar de los 4 extractos frente <i>A. niger</i>	56
Fig. 31. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelar de los 4 extractos frente a <i>T. mentagrophytes</i>	57
Fig. 32. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelar de los 4 extractos frente a <i>T. rubrum</i> ...	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lugares de recolección de las cuatro especies vegetales.....	28
Tabla 2. Condiciones de cultivo de los microorganismos utilizados.....	30
Tabla 3. Condiciones de cultivo de los hongos levaduriformes.....	33
Tabla 4. Condiciones de cultivo de los hongos esporulados.....	36
Tabla 5. Tamaño del halo de inhibición de los microorganismos frente a los 4 extractos.....	41
Tabla 6. Valor promedio de las mediciones y error estándar del diámetro de crecimiento del hongo <i>A. niger</i> frente a los 4 extractos	45
Tabla 7. Análisis estadístico mediante la prueba de Dunnet con un alpha de 0,05 de los 4 extractos frente <i>A. niger</i>	45
Tabla 8. Valor promedio y error estándar del diámetro de crecimiento del hongo <i>T. mentagrophytes</i> frente a los 4 extractos	49
Tabla 9. Análisis estadístico mediante la prueba de Dunnet con un alpha de de los 4 extractos frente <i>T. mentagrophytes</i>	49
Tabla 10. Valor promedio y error estándar del diámetro de crecimiento del hongo <i>T. rubrum</i> frente a los 4 extractos.....	53
Tabla 11. Análisis estadístico mediante la prueba de Dunnet con un alpha de 0,05 de los 4 extractos frente <i>T. rubrum</i>	53
Tabla 12. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelar de los 4 extractos frente <i>A. niger</i> , <i>T. mentagrophytes</i> , <i>T. rubrum</i>	55
Tabla 13. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los 4 extractos frente a los microorganismos de prueba.....	60

RESUMEN:

En el presente trabajo, se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos de cuatro especies vegetales recolectadas de la Provincia de Loja y Zamora Chinchipe: *Piper ecuadorensis* (Matico), *Lepechinia mutica* Benth (Turuyante), *Fuschia ayavacensis* (Pena-Pena), *Niphogeton dissecta* (Culantrillo del cerro), utilizadas tradicionalmente en el tratamiento de muchas afecciones como enfermedades respiratorias, trastornos digestivos, antiinflamatorios, etc.

Para este estudio se empleo métodos que permiten medir la susceptibilidad *in vitro* de los microorganismos frente a sustancias de origen natural con potencial antimicrobiano como las técnicas de Difusión en agar, Inhibición del crecimiento micelar y Microdilución en caldo frente *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *C. albicans*, *S. typhimurium*, *S. cerevisiae*, *A. niger*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* utilizando diferentes concentraciones de los extractos metanólicos para determinar su inhibición.

En las pruebas de actividad antibacteriana los resultados muestran que la especie *L. mutica* resultó ser más activo frente a *S.aureus*, *P. vulgaris*, *E. faecalis*, mientras que los otros extractos no presentaron actividad contra los microorganismos ensayados en la dosis empleada. En las pruebas antifúngicas las especies con mayor potencial antifúngico contra los dermatofitos *T. mentagrophytes* y *T. rubrum* fueron: *P. ecuadorensis* y *N. dissecta* a una concentración de 1000 µg/ml con un porcentaje de Inhibición de 100-96,78 % respectivamente, seguido la especie *L. mutica* inhibiendo el 78-76 % respectivamente, mientras que la especie *F. ayavacensis* se mostró menos activo contra los dermatofitos inhibiendo el 50 % del crecimiento. Los resultados obtenidos nos permiten determinar que las especies vegetales tienen una aplicación potencial como antimicrobianos por lo que se sugiere medir sus propiedades para establecer su uso como agentes terapéuticos.

Palabras claves: *P. ecuadorensis*, *L. mutica*, *N. dissecta*, *F. ayavacensis*, actividad antimicrobiana, hongos.

Abstract:

In this study, we evaluated the antimicrobial activity of methanolic extracts of four plant species collected from the Province of Loja and Zamora Chinchipe: *Piper ecuadorensis* (Matico), *Lepechinia mutica* Benth (Turuyante), *Fuschia ayavacensis* (Pena-Pena) and *Niphogeton dissecta* (Culantrillo del cerro), traditionally used in the treatment of many conditions including digestive disorders, respiratory, anti-inflammatories, and so on.

To this study were used methods which permit to measure the *in vitro* susceptibility of microorganisms front to naturally substances with antimicrobial potential such as diffusion technique in agar-well, mycelial growing inhibition and broth microdilution front of *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *C. albicans*, *S. typhimurium*, *S. cerevisiae*, *A. niger*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* using different concentrations in the methanolic extracts to determine their inhibition.

In tests of antibacterial activity the results show the *L. mutica* species is more active against the *S. aureus*, *P. vulgaris*, *E. faecalis*, while the other extracts did not show any activity against the microorganisms tested in the spent dosage. In the antifungal test the species with more antifungal potential against the dermatophytes *T. mentagrophytes* and *T. rubrum* were: *P. ecuadorensis* and *N. dissecta* to a concentration of 1000 µg/ml with an inhibition percentage of 100-96.78 % respectively, following of a species *L. mutica* inhibiting 78-76 % respectively, while the *F. ayavacensis* species shows less active against the dermatophytes inhibiting the 50 % in growing. The obtained results allow us to determine the vegetable species home a potential application as antimicrobials due to we suggest to measure their properties in order to establish its usage as therapeutic agents.

Keywords: *P. ecuadorensis*, *L. mutica*, *N. dissecta*, *F. ayavacensis*, antimicrobial activity, fungi.

Capítulo I: Descripción General del Proyecto

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, tan solo en el año 2001 la Organización Mundial de la Salud estimó que las enfermedades infecciosas, causadas principalmente por bacterias, hongos y parásitos, fueron responsables de más de 5,7 millones de muertes, la mayor parte de ellas en países en desarrollo y actualmente son responsables de 14,9 millones de muertes al año. A esto sumado el hecho de que muchos de los microorganismos causantes de enfermedades comunes y que pueden ser tratados fácilmente, han adquirido gran resistencia; debido principalmente al uso indiscriminado de antibióticos, ha empeorado el panorama (Mesa *et al.* 2004, OMS 2001).

En varios países de América Latina las enfermedades infecciosas actualmente son causan de mortalidad, casi la mitad (47 %) de las muertes en niños menores de 5 años es atribuida a la neumonía, diarrea, tuberculosis. Debido a que, dichos microorganismos responsables han desarrollado resistencia a consecuencia de varios factores a más del uso indiscriminado de antibióticos, las dosis utilizadas, el tiempo de tratamiento, y la eliminación de la mitad de la droga que no se alcanza a metabolizar en su totalidad, otros elementos que influyen son las altas posibilidades de transmisión o contagio y el estadio inmunocomprometidos de los pacientes que los hace susceptibles a infecciones con patógenos oportunistas (Bergstrom *et al.* 2004, OMS 2007).

En nuestro país los datos no son muy alentadores, la resistencia bacteriana ha ido incrementándose gradualmente hasta convertirse en un grave problema de salud Pública; entre los principales agentes responsables de esta escalada se encuentran *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, principalmente de origen hospitalario y comunitario. Actualmente más del 90 % de las cepas de *S. aureus* de distintas zonas geográficas del país, son productoras de enzimas β -lactamasas (Zurita 2001).

A mediados de los años 90, se pensó que el descubrimiento de la genómica bacteriana sería el avance tecnológico que rápidamente proveería muchas nuevas clases de antibióticos para el siglo XXI; sin embargo hasta el 2004, ningún antibiótico de amplio espectro ha logrado posicionarse para uso clínico durante los últimos 20 años (Payne 2004). También lo es el hecho de que una buena parte de la población mundial no siempre tiene acceso a los mismos. Además, los requerimientos para validar y colocar en el mercado un nuevo antibiótico sintético son cada vez más complejos; por lo que, el proceso es cada vez más lento en tanto que, las enfermedades infecciosas proliferan a un ritmo mayor (Encarnación 1996).

Frente a esta importante problemática mundial, numerosas son las investigaciones enfocadas a la búsqueda de nuevos compuestos biológicos a partir de fuentes naturales, dentro de ellos un gran número de estudios han sido dirigidos para la evaluación de actividades antimicrobianas en extractos y aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas (Hernández & Rodríguez 2001). El reino vegetal representa una enorme fuente potencial de moléculas por ser descubiertas, ya que se estima que más del 90 % de las especies vegetales no han sido aún exhaustivamente estudiadas; y hablando exclusivamente del desarrollo de antibióticos, cerca del 25 % de las drogas prescritas alrededor del mundo provienen de las plantas: 121 compuestos bioactivos se han convertido en drogas de uso común. De las 252 drogas consideradas como básicas y esenciales para la OMS, el 11 % son exclusivamente de origen vegetal y un número significativo son drogas sintéticas obtenidas de precursores naturales, es por ello que la importancia de los productos naturales es enorme debido a que poseen, poco o nulo efecto tóxico y además de ser estructuralmente mucho más complejos que los sintéticos, actúan de manera combinada resultando más difícil para los gérmenes patógenos desarrollar resistencia frente a estas drogas (Cuellar & Rojas 1990, Gale & Kiser 2006).

Numerosos son los metabolitos antimicrobianos, entre ellos tenemos algunas sustancias simples como fenoles, derivados de los fenoles (flavonoides, epicatequina, tatinos, cumarinas) aceites esenciales, terpenoides (Capsaicina), alcaloides (piperina), lectinas, polipéptidos y poliacetilenos, entre muchos otros que han sido obtenidos de diversas especies vegetales pertenecientes a una amplia variedad de familias (Cowan 1999); algunas de las cuales Piperaceae, Onagraceae, Lamiaceae, Apiaceae son comunes a cuatro de las especies seleccionadas para el presente estudio: *Piper ecuadorensis*, *Lepechinia mutica*, *Niphogeton dissecta*, *Fuschia avayacensis*, las cuales han sido usadas tradicionalmente por los pobladores de la provincia de Loja para el tratamiento de muchas afecciones entre ellas, las enfermedades infecciosas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo General:

- ✓ Determinar la capacidad antibacteriana y antifúngica de cuatro extractos totales de especies vegetales nativas y endémicas de la Región sur del Ecuador, empleando métodos de susceptibilidad como el Método de Difusión en placa, Inhibición del Crecimiento Radial y Microdilución en Caldo.

1.1.2. Específicos:

- ✓ Evaluar la capacidad inhibitoria de los extractos metanólicos de *Piper ecuadorensis*, *Fuchsia avayacensis*, *Lepechinia mutica* y *Niphogeton dissecta* empleando los métodos clásicos de Difusión en Placa modificado para productos Naturales (“Agarwell Difussion”) y Microdilución en Caldo, frente a *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *S. typhimurium*.
- ✓ Identificar cual de las especies vegetales es promisoría por su actividad antibacteriana, en base a la medición de su capacidad antiproliferativa expresado como Concentración Mínima Inhibitoria, tomando como referencia valores de CMI ≤ 200 $\mu\text{g/mL}$.
- ✓ Evaluar la capacidad antifúngica de los extractos metanólicos de *Piper ecuadorensis*, *Fuchsia avayacensis*, *Lepechinia mutica* y *Niphogeton dissecta* empleando los métodos de Inhibición del Crecimiento Radial y Microdilución en Caldo frente a *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *A. niger*, *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*.
- ✓ Identificar cual de las especies vegetales es promisoría por su actividad antifúngica, en base a la medición de su capacidad inhibitoria expresado como CI50 en la prueba de Inhibición del Crecimiento Radial y un valor de referencia para CMI ≤ 200 $\mu\text{g/mL}$.

Capítulo II: Revisión Bibliográfica

II. REVISION BIBLIÓGRAFICA

2.1 Enfermedades Infecciosas

Las enfermedades infecciosas son causadas principalmente por microorganismos o patógenos, que pueden auto-reproducirse dentro del cuerpo y perjudicar al huésped si no son destruidos (Lacaz *et al.* 2002). Constituyendo estas afecciones una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, y siguen siendo una gran amenaza a pesar de los grandes avances científicos. A mediados del siglo XX se pensó que la batalla contra flagelos como el cólera, la tuberculosis, el dengue y la malaria, entre otros, estaba ganada. Evidentemente, esto no ha sucedido, lo que sí ha venido ocurriendo es la aparición de nuevos organismos patógenos, y brotes de nuevas enfermedades emergentes (VIH, el virus del ébola), así como brotes de las que se creían vencidas enfermedades reemergentes debido a la aparición e incremento de microorganismos resistentes a los antibióticos a causa de su amplio y mal uso (Mesa *et al.* 2004).

2.2 Tratamiento de las Enfermedades Infecciosas

En lo que respecta al tratamiento de las enfermedades infecciosas, el objetivo de una terapia antimicrobiana consiste en alcanzar la destrucción o impedir la multiplicación de microorganismos patógenos en pacientes con los síntomas y signos clínicos de infección; por lo que el tratamiento se basa en: la administración de agentes antimicrobianos (antibióticos o agentes quimioterapéuticos) o vacunas tomando en cuenta ciertos factores como: la etiología, plantearse si realmente hay necesidad de tratamiento específico, tomar las muestras adecuadas previas al tratamiento, pensar qué el antibiótico es activo contra los patógenos sospechados, asegurarse de que puede llegar en cantidades suficientes al lugar de la infección y que tenga un precio aceptable. Las dosis e intervalos, aún cuando existen guías terapéuticas, deben razonarse valiéndonos de nuestra experiencia y teniendo en cuenta los patrones de sensibilidad de nuestro entorno (Drobnic 2002, Gavilán *et al.* 2004).

Al momento existe un gran número de plantas de uso terapéutico para enfermedades provocadas por bacterias

Gram negativas, Gram positivas y algunas especies de hongos que son oportunistas en pacientes inmunosuprimidos; para evaluar su eficiencia y garantizar su inocuidad se necesitan tener programas de control de calidad donde exista identificación de especies con potencial, preparación de extractos, pruebas microbiológicas, además de la evaluación de la citotoxicidad de los mismos sobre líneas celulares de los órganos comúnmente afectados por los antibióticos conocidos, entre otras (García *et al.* 2006).

2.3 Microorganismos de Importancia en Salud Pública

2.3.1 Bacterias

Las bacterias son los más simples organismos encontrados en la mayoría de los ambientes naturales. Son células esféricas o en forma de bastones cortos con tamaños variados, alcanzando entre 0,2-10 μm de diámetro. La célula bacteriana presenta varias estructuras, algunas de las cuales están presentes sólo en determinadas especies, mientras otras son esenciales, y por lo tanto encontradas en todas las bacterias (Mims *et al.* 1999).

Una de las estructuras esenciales de la célula bacteriana es conocida como membrana citoplasmática de 8 nm de espesor y responsable de la separación del medio interno (citoplasma) y externo de la célula (Ryan 1994). El mantenimiento de la forma bacteriana (bacilo, coco, espirilos), se debe a la presencia de la pared celular bacteriana que desempeña una función importante en la división celular dando origen a la formación de un septo o tabique transversal que separa las dos nuevas células resultantes de la división celular. En la mayoría de las bacterias, la pared celular debe su rigidez a una capa compuesta por una sustancia que sólo se encuentra en procariotas y recibe diferentes denominaciones como mureína, peptidoglicano, mucopéptido (Tavares 1999).

De acuerdo con la constitución de la pared, las bacterias pueden ser divididas en dos grandes grupos: Gram negativas y Gram positivas. Las diferencias entre esos dos grupos residen principalmente en sus propiedades de permeabilidad y en los componentes de superficie. Las principales

diferencias reveladas por la coloración de Gram están relacionadas por la presencia de una membrana externa en las bacterias Gram negativas y de una espesa capa de peptidoglicano en las bacterias Gram-positivas (Ryan 1994).

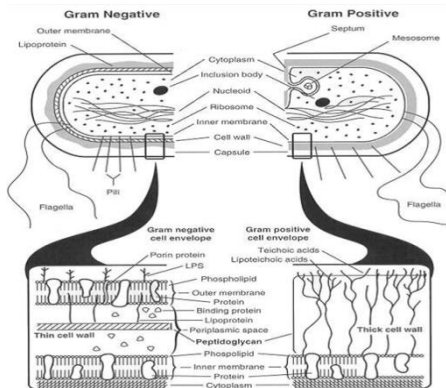


Figura.- 1 Diferencias estructurales entre Gram-negativas y Gram-positivas. Fuente: www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch002.htm.

Las bacterias de modo general son causadoras de diversas patologías. La gravedad de la infección depende de diversos factores, de entre ellos la inmunidad del hospedero, bacteria causadora, lugar de infección, resistencia de la bacteria al antibióticoterapia. Las bacterias implicadas en estas infecciones pueden ser verdaderamente patógenas o patógenas oportunistas.

2.3.1.1 Bacterias Gram positivas

Las bacterias pertenecientes al género *Staphylococcus* son los agentes patógenos de los humanos y otros mamíferos. *Staphylococcus aureus* es una bacteria bastante común y causadora de diversos tipos de infecciones. La gravedad de la infección va desde una intoxicación alimentaria o infección cutánea de poca importancia, hasta infecciones potencialmente mortales. Cuando las infecciones están localizadas en la piel, pueden causar forúnculos, conjuntivitis, heridas infecciosas, pústulas o abscesos profundos, osteomielitis, artritis y meningitis (Richardson *et al.* 2008).

Poseen resistencia más del 90 % de *S. aureus* a la penicilina debido a que éstas producen una enzima penicilinasas (un tipo β -lactamasa) que hidroliza el anillo beta-lactámico de la penicilina (Silva 1999).

Las especies de *Enterococcus* especialmente *E. faecalis* y *E. faecium*, son causa importante de hospitalizaciones, estas bacterias son patógenos que habitan en el tracto gastrointestinal de humanos y animales, desde donde puede pasar vía alimento al humano, estos patógenos suelen tener una multiresistencia a los antibióticos, y que posiblemente, el uso de antibióticos como promotores de crecimiento haya contribuido a esto (Debnam *et al.* 2005).

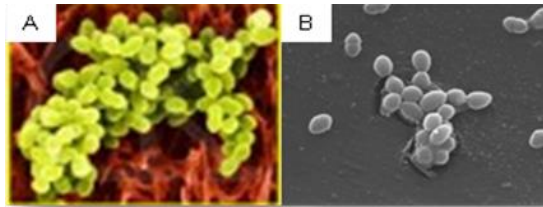


Figura 2.- Estructura morfológica de las bacterias gram-positivas a) *S.aureus* b) *E. Faecalis*. Fuente: www.depaginas.com.ar/fotosde_bacteria_gram_positiva.htm

2.3.1.2 Bacterias Gram negativas

Las manifestaciones clínicas de las infecciones causadas por *Escherichia coli* dependen de la localización de la infección, del tipo de cepa y sitio de acción. La causa más común de infecciones del tracto urinario, siendo responsables por cerca del 90 % de primeras infecciones de vías urinarias en mujeres jóvenes (Peñaranda 2003).

Algunas cepas patógenas de *E. Coli* pueden provocar diarrea. Estas cepas se clasifican por sus propiedades de virulencia, y cada grupo provoca diarrea a través de un mecanismo diferente. Cuando las defensas normales del hospedero no están adecuadas, la *E. coli* puede alcanzar el torrente sanguíneo y causar sepsis.

El género *Proteus* es encontrado regularmente en el intestino del hombre. Las infecciones causadas por esas bacterias ocurren principalmente en el trato urinario. Es

importante destacar que una característica común de las bacterias del género *Proteus*, es la resistencia natural a las polimixinas, un grupo de antibióticos bastante activo contra las demás enterobacterias y otros microorganismos Gram-negativos (Trabulsi *et al.* 1999).

Salmonelosis es una gastroenteritis comúnmente encontrada en el hombre, que comienza en la mucosa intestinal. La patogenicidad de las *Salmonellas* varía de acuerdo con el tipo serológico de la bacteria, edad y condiciones de salud del hospedero (Schaechter *et al.* 2002).

Pseudomona aeruginosa es un típico patógeno oportunista que puede causar todo tipo de enfermedades. Como ejemplo podemos citar infecciones urinarias asociadas con el uso de catéteres, neumonías asociadas con el uso de respiradores, entre otras. Se puede encontrar en hospitales, y su elevada frecuencia en este ambiente se explica por una elevada resistencia a los antibióticos y antisépticos leves (Silva 1999).

Klebsiella pneumoniae es el microorganismo causal de infecciones del tracto urinario, neumonías, sepsis, infecciones de tejidos blandos, e infecciones de herida quirúrgica. El tratamiento de elección consiste en la asociación de antibióticos de amplio espectro (Lacaz *et al.* 2002).

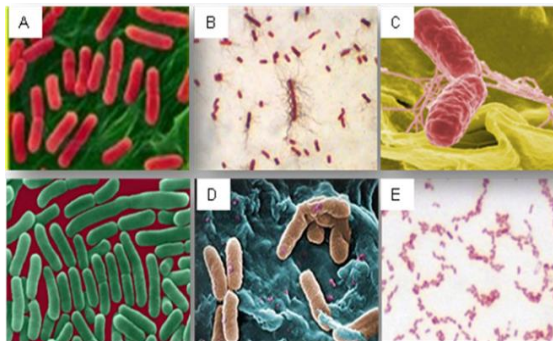


Figura 3.- Estructura morfológica de las Bacterias Gram negativas: a) *E. coli* b) *P. vulgaris* c) *Salmonella* d) *P. aeruginosa* e) *K. Pneumoniae*. Fuente: www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Bacterias+Gramnegativas&lang=2.

2.3.2 Hongos

Los hongos son células eucarióticas, con núcleo bien definido rodeado por una membrana nuclear, una membrana celular que contiene lípidos, glicoproteínas y esteroides. Se encuentran constituidos por tubos filamentosos llamados hifas que presentan una pared celular con gran plasticidad y responsable de la protección de la célula. La pared celular se compone básicamente de polisacáridos (quitina, glucano) y proteínas. Todos estos componentes están asociados entre sí dando lugar a una estructura rígida (Figura 4).

La pared celular es una estructura esencial para los hongos y su eliminación o los defectos en su formación tienen efectos profundos en el crecimiento y la morfología de la célula fúngica, pudiendo causar la muerte celular por lisis. Dado el papel vital que la pared celular juega en la fisiología de la célula fúngica, puede considerarse el talón de Aquiles de los hongos y por tanto, una diana muy importante para la acción de los fármacos antifúngicos (Fisher & Cook 2001).

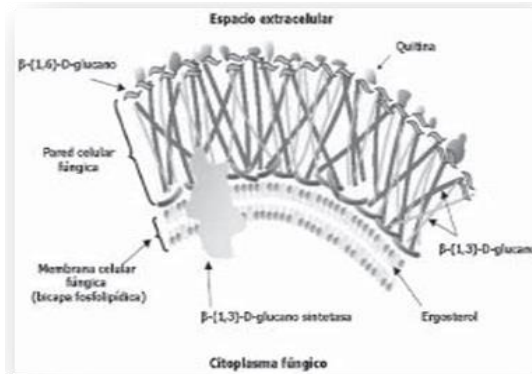


Figura 4.- Estructura de la membrana celular fúngica.
Fuente: (Nielsen J., et al., 2003).

Los hongos patógenos pueden ser divididos en base a la forma de crecimiento o conforme el tipo de infección producida. De acuerdo con la micosis causada pueden ser divididos en micosis superficial o profunda provocada por dermatofitos y de acuerdo con la forma de crecimiento se clasifican en filamentosos o levaduriformes.

2.3.2.1 Dermatofitos

La expresión dermatofito es utilizada para designar grupo de hongos de vida parasitaria que viven a cuenta de la queratina de la piel, uñas y pelo. Los dermatofitos taxonómicamente se encuentran en los géneros *Microsporium*, *Trichophyton* y *Epydermophyton* (Figura.-5).

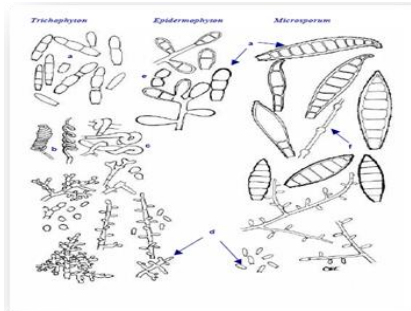


Figura 5.- Estructura morfológica de los diferentes tipos de géneros dermatofitos. Fuente: (Emmons 1934)

Las infecciones producidas por estos hongos se denominan dermatofitosis, aunque comúnmente también son llamadas tiñas, término que procede del latín *tinea* y que significa gusano o polilla. Esta palabra se usa de forma descriptiva dado el aspecto de serpentina o anular que presentan las lesiones cutáneas con una apariencia de gusano enterrado en la piel (Kane *et al.* 1997).

Las diferentes especies de dermatofitos poseen diferentes nichos ecológicos. Los hongos del género *Microsporium* son de distribución geográfica mundial, y son los patógenos zoofílicos y geofílicos más común en infecciones humanas (Graser *et al.* 2000).

Trichophyton rubrum es el agente etiológico de la tinea corporis (dermatofitosis en el cuerpo), barbae (dermatofitosis en la barba), cruris (dermatofitosis en las ingles), manuum (dermatofitosis en las manos) y onicomicosis de de las manos y pies. Especie antropofílica de distribución mundial, alcanza cerca de un 80% de los casos de tinea. Procesos inflamatorios causados por estos agentes son generalmente

crónicos, algunas veces con lesiones profundas llamadas granulomas tricofíticos (Fisher & Cook 2001, Tavares 1999).

El *Trichophyton mentagrophytes* es un dermatofito cosmopolita, es la especie más aislada del hombre y animales. Es un agente contagioso, pudiendo ser transmitido entre animales, de animales a personas y de persona a persona provocando tinea pedis y tinea corporis, algunas veces invade la lámina ungueal, presentando puntos blancos en la uña (Nimrichter *et al.* 2005).

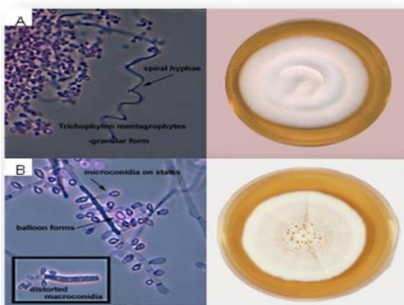


Figura 6.-Dermatofitos a) *T. rubrum*; b) *T. mentagrophytes*.

Fuente: www.telmeds.org/AVIM/Amico/Dermatofitos/dermatofitos.htm

2.3.2.2 Infecciones Fúngicas Oportunistas

Diversos hongos, presentes en el medio ambiente o integrantes de la flora normal, pueden en determinadas situaciones pasar de saprófitos a patógenos, provocando cuadros clínicos variables, desde procesos febriles benignos, a septicemias algunas veces fatales (Nimrichter 2005).

De entre las principales patologías fúngicas oportunistas podemos citar la candidiasis, aspergilosis, criptococosis y fusarium. Candidiasis son infecciones provocadas por levaduras del género *Candida*, principalmente *Candida albicans*. La mayor parte de esas infecciones son de origen endógeno, es decir, son causadas por microorganismos que forman parte de la microbiota normal del ser humano. La transmisión exógena ocurre principalmente en pacientes debilitados por el tratamiento con antibióticos y drogas inmunosupresoras, y en el curso de enfermedades crónicas (Pazos *et al.* 2006).

La aspergilosis es una micosis provocada por una especie perteneciente al género *Aspergillus*. El *Aspergillus* tienen amplia distribución geográfica, encontrándose en el aire, en las plantas y la materia orgánica en general, siendo contaminantes comunes en laboratorios y hospitales (Schaechter *et al.* 2002).

La aspergilosis se produce rara vez como enfermedad primaria en los individuos normales. La infección se localiza en los pulmones (frecuentemente el hongo es inhalado), el oído, el sistema nervioso central, u otros órganos. Varias especies de *Aspergillus* pueden provocar “colonización” en cavidades pre-existentes, infecciones propiamente conocidas, procesos alérgicos e intoxicaciones (micotoxicosis). Las formas clínicas más comúnmente observadas son la pulmonar y cutánea (Trabulsi 1999, Yamada *et al.* 2000).

Saccharomyces cerevisiae es un tipo de levadura utilizado en la fabricación del pan, la cerveza y vino. *S. cerevisiae*, se encuentra ocasionalmente como parte de la flora normal endógena de la garganta. Esta levadura se ha aislado en casos de fungemia, infección diseminada y las válvulas del corazón. También fue aislado de los catéteres en pacientes con SIDA, neumonía, cáncer y otras enfermedades (Fisher & Cook 2001).

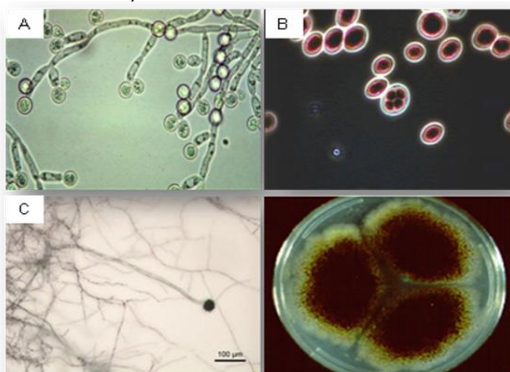


Figura 7.- Hongos Oportunistas a) *C. albicans*; b) *A. niger* c) *S. cerevisiae*.
Fuente: www.telmeds.org/AVIM/Amico/Levaduras/levadura.

2.4 Antimicrobianos

Desde el siglo XVIII se ha empleado sustancias químicas para el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Posteriormente se descubrieron las sulfonamidas y se acrecentó el interés en sustancias antibacterianas de origen microbiano, llamadas antibióticos, de ahí surgió la penicilina, estreptomina, gentamicina, itraconazol, etc. Las cuales también han sido obtenidas sintéticamente, a través de modificación química, total o parcial de las moléculas por biosíntesis (Cordiés *et al.* 1998, Croteau *et al.* 2000).

El ataque a los microorganismos, por parte de los antimicrobianos, se puede dar de diferentes maneras: por inhibición de la síntesis de la pared celular, de las funciones de la membrana celular, de la traducción de material genético y de la síntesis de ácidos nucleicos (Manrique & Mosquera 1997).

Los antibióticos son productos metabólicos naturales de hongos, bacterias o actinomicetos, capaces de impedir el crecimiento o destruir microorganismos, estas sustancias pueden actuar de dos maneras:

- a. Como microbicidas, es decir, que matan las formas vegetativas de los gérmenes, especialmente se denominan bactericidas, refiriéndose a bacterias y refiriéndose a hongos.
- b. Como microbiostático, es decir que inhibe el crecimiento de microorganismos y se denominará, bacteriostático o fungistático, según se refiere a bacterias o a hongos respectivamente (Barreto 1997).

Muchos de los antibióticos tienen considerables inconvenientes, bien sea por poseer un limitado espectro antimicrobiano, serios efectos colaterales, o por la resistencia de muchas bacterias y hongos a los agentes quimioterapéuticos actualmente utilizados. Estos factores estimulan a la búsqueda de nuevos principios activos, que sean efectivos frente a infecciones clínicas causadas por microorganismos Gram negativos, Gram positivos, hongos, virus y micobacterias (Tavares 1999).

2.4.1 Principios Antimicrobianos Provenientes de Plantas

Los mecanismos por los cuales las plantas pueden conseguir la destrucción o inhibición de los microorganismos pueden ser atribuidos a los metabolitos antimicrobianos que pueden actuar en alguno de los siguientes puntos: impidiendo la síntesis de ácidos nucleicos, de proteínas o de la pared celular o bien alterando la membrana celular bacteriana sobre la que actúan (Carrillo *et al.* 2001).

Por ejemplo, los taninos precipitan las proteínas, fenómeno que, al ocurrir en la membrana citoplasmática bacteriana, altera la permeabilidad de la misma y, por lo tanto, el intercambio de sustancias nutritivas y de desecho conllevando esto a la muerte celular (Mongeli & Pomilio 2002).

Los compuestos esteroidales pueden interferir en determinados procesos de síntesis vitales en la célula bacteriana y los triterpenos, por su parte, pueden actuar siguiendo diversos mecanismos en dependencia de su naturaleza química: los de naturaleza hidrocarbúrica, por ejemplo, tienen generalmente acción depresora sobre la tensión superficial lo cual, cuando tiene lugar en el entorno de la célula bacteriana, altera la selectividad de la membrana citoplasmática para el intercambio de sustancias. Los triterpenos de naturaleza alcohólica pueden alterar la naturaleza coloidal del protoplasma de la célula provocando su muerte (Sáenz 2003).

Los flavonoides y cumarinas pueden también actuar por numerosos mecanismos por cuanto los grupos sustituyentes que aparecen unidos al núcleo estructural de los mismos suelen ser de los más disímiles (Williams & Grayer 2004)

2.5 Métodos de Evaluación Antimicrobiana

Los métodos empleados para evaluar la actividad antimicrobiana permite medir la susceptibilidad *in vitro* de los microorganismos frente a sustancias con potencial antimicrobiano determinando la potencia de la sustancia, la susceptibilidad de un microorganismo a concentraciones conocidas de una droga de origen vegetal, el espectro de microorganismos inhibidos y la concentración de la droga en el organismo humano. Es indispensable en la evaluación de la actividad antimicrobiana conocer y controlar las condiciones de laboratorio del modelo microbiano, tanto en procedimientos *in vivo* como *in vitro* (Cáceres *et al.* 1996).

Factores como la composición y el pH del medio, el método de extracción, la solubilidad de la muestra en el medio de cultivo y los microorganismos utilizados en la prueba pueden hacer variar los resultados, por lo que es difícil establecer un método estandarizado para el estudio de la actividad antimicrobiana de las plantas medicinales (Ríos *et al.* 1988).

La determinación de la actividad antimicrobiana puede dividirse en dos fases: tamizaje y concentración mínima inhibitoria. Este último procedimiento se realiza únicamente con los microorganismos cuyo procedimiento fue inhibido por el extracto en la primera fase. Se evalúa si hubo crecimiento, una completa supresión del crecimiento es requerida para declarar que el extracto es activo. Los extractos que son activos deben ser probados nuevamente para confirmar los resultados, para evitar confusiones en la interpretación de resultados provocadas por probable contaminación durante la preparación del medio de cultivo deben colocarse dos cajas de control positivo por lote de pruebas (Yarseny 2005). Adicionalmente, para los casos en los que hubo crecimiento es posible evaluar de nuevo la actividad a distintas concentraciones.

Generalmente, la medición de la actividad antimicrobiana se realiza por medio del método de difusión o el método de dilución. La selección del método depende de las necesidades del investigador, las cuales han hecho que los métodos sufran

modificaciones con el fin de optimizar las técnicas empleadas y por consiguiente obtener resultados confiables.

2.5.1 Actividad Antibacteriana

2.5.1.1 Método de Difusión en Agar

Este se basa en el procedimiento descrito por Bauer - Kirby y permite estimar el grado de inhibición del crecimiento de los microorganismos (Bauer *et al.* 1966). Se utiliza un disco, agujero o cilindro como reservorio en el agar, el cual contiene la muestra a ensayar, luego del período de incubación se mide el diámetro de la zona de inhibición alrededor del reservorio.

El método de difusión se usa como un procedimiento cualitativo, semi-cuantitativo y a veces cuantitativo, generalmente los microorganismos son categorizados como resistentes, intermedios o susceptibles para cada agente antimicrobiano. Este método es frecuentemente utilizado en investigación, pero tiene la desventaja de ser poco creíble en casos en los cuales la muestra se difunde con dificultad en el medio debido a la inexistente relación entre el poder de difusión y la actividad antimicrobiana lo cual fue demostrado por Pellecuer *et al* (Pellecuer *et al.* 2002, Kalemba & Kunicka 2003).

Este método no requiere dispersión homogénea en agua del extracto a evaluar, la cantidad de muestra utilizada en el tamizaje es pequeña y permite probar cinco a seis compuestos contra varios organismos, además es el más conveniente para el tamizaje preliminar de sustancias puras (alcaloides, terpenoides, flavonoides, etc.). Los resultados se evalúan de la siguiente manera:

- Ausencia del halo alrededor del pocillo o reservorio: actividad negativa.
- Presencia del halo de inhibición alrededor del pocillo o reservorio: actividad positiva.
- Luego, el resultado obtenido, se compara con los resultados en los métodos de dilución (Kalemba & Kunicka 2003).

2.6.1.2 Método de Microdilución en Caldo

Mediante éste método se puede determinar la inhibición del crecimiento del microorganismo de prueba, en presencia de concentraciones decrecientes de los extractos, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo). Estos se han venido usando para la determinación de las concentraciones de extractos de plantas, aceites esenciales o sustancias puras, así como para el tamizaje preliminar de la actividad antimicrobiana.

Es un técnica en la que se prueba una suspensión normalizada de bacterias frente a varias concentraciones del extracto a ensayar (normalmente mediante diluciones seriadas que reducen la concentración a la mitad) en un medio líquido estandarizado. El método se puede realizar en placas de microtitulación (Microdilución). Una placa puede contener de 7 a 8 o de 12 a 6 diluciones seriadas del extracto incluyendo en la microplaca los controles: de esterilidad (caldo + extracto), el control negativo (caldo + DMSO) y finalmente el control positivo (caldo + antibiótico). Después del período de incubación se examinan los cultivos visualmente o turbidimétricamente y se interpreta como resultado positivo, la ausencia del crecimiento del microorganismo (NCCLS 2006).

El método de dilución se emplea para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) que se requiere del agente antimicrobiano para inhibir o matar al microorganismo, es decir, la CIM es la concentración más baja en la que no hay crecimiento visible (Cos *et al.* 2006). Las ventajas de este método son su simplicidad, sensibilidad, reproducibilidad, rapidez, facilidad de estandarizar y de procesar una gran cantidad de muestras; además ofrece la posibilidad de usarlo en el estudio de antimicrobianos solubles en agua o muestras insolubles como aceites esenciales (Kalemba 2003).

2.6.2 Actividad Antifúngica

Los procedimientos son similares a los antibacterianos. Las pruebas se complican por ciertas características de los hongos, como dimorfismo, requerimiento de crecimiento por tiempo prolongado, temperatura, concentración del inóculo, el punto de lectura y el medio de cultivo, etc. El crecimiento de

hongos filamentosos inoculados en medios de cultivo adecuados es inhibido por las moléculas bioactivas diluidas en el medio de agar.

Hay varios métodos para pruebas de susceptibilidad con antifúngicos, dilución en caldo, difusión en agar los cuales se basan en los mismos principios de los utilizados para agentes antibacterianos. También se emplea el método de inhibición de crecimiento radial.

2.6.2.1 Inhibición del Crecimiento Micelar

Este método emplea el procedimiento de Macrodilución en Agar como una medida de acercamiento al valor de CMI. Donde se expone la sustancia a evaluar frente a los hongos de ensayo y se mide el crecimiento micelar en mm de diámetro en un intervalo de 24 horas por un periodo de 5 días determinando con estos valores el Porcentaje de Inhibición del crecimiento micelar de acuerdo a la siguiente fórmula: $\% IN = [(C-i)-(E-i) / (C-i)] \times 100$ [Fisher & Cook 2001, Márquez *et al.* 2007).

2.7 Especies Vegetales en Estudio

Las plantas medicinales han sido utilizadas durante siglos como remedios para enfermedades humanas porque contienen componentes de valor terapéutico. Recientemente, la aceptación de la medicina tradicional como una forma alternativa de la atención de la salud y el desarrollo de la resistencia microbiana a los antibióticos disponibles ha llevado a autores a investigar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. Por otra parte, el aumento de la utilización de extractos vegetales en la alimentación, la industria cosmética y farmacéutica sugiere que, a fin de encontrar compuestos activos, un estudio sistemático de plantas medicinales es muy importante (Nostro *et al.* 2000).

El Ecuador es considerado un país megadiverso, cuyas especies vegetales son especialmente adecuadas para estudios de bioprospección, debido a que se encuentra en una zona en donde predomina el clima tropical y subtropical; y es conocido que las plantas de éstas zonas han desarrollado a través de la evolución mecanismos de producción y acumulación de metabolitos secundarios, para protegerse de las condiciones hostiles de este ambiente como los fuertes rayos ultravioleta que soporta la zona tropical y una gran variedad de microbios patógenos, incluyendo varias especies de bacterias, hongos y virus (Vogel *et al.* 2004). Se ha postulado que los medicamentos naturales de origen vegetal, además de ser estructuralmente mucho más complejos que los sintéticos, actúan de manera combinada resultando más difícil para los gérmenes patógenos desarrollar resistencia frente a estas drogas (Cuellar & Rojas 1990)

Para desarrollar la presente investigación se han considerado cuatro especies vegetales que fueron recolectadas en las Provincias de Loja y Zamora, las cuales han sido usadas tradicionalmente por los pobladores de dicha región para el tratamiento de muchas afecciones.

2.7.1 *Piper ecuadorensis* Sodiroi (Matico)



Fig. 8 Fotografía de *Piper ecuadorensis*, tomada en el cantón Numbani Provincia de Zamora (izquierda), y tomada en el Herbario de la UTPL- IQA (derecha).

FAMILIA: PIPERACEAE

DISTRIBUCIÓN: Estatus nativo de los andes y la Amazonía encontrado desde 0 a 2500 m s.n.m.

PROVINCIAS: Carchi, Pichincha, Zamora-Chinchipec.

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA: Arbusto delgado de 4 m de alto. Tallos verdes, glabros, los nudos hinchados. Hojas con corto peciolo, la superficie escabrosa, ovada, de 15x9 cm oblicuamente redondeada en la base, largamente atenuada en el ápice, nervadura secundaria mayor. Flores aclamídeas, inflorescencia en espiga apretados o amentos, erecta, hasta 4 mm de grosor y 18 cm de largo, curvada, blancal (López 1995).

USOS: Se emplea los tallos, hojas, raíces para afecciones respiratorias, luxaciones, trastornos digestivos, malaria, antiinflamatorio, diarreas sanguinolentas, expectorante, antitusígeno.

MODO DE USO: Tintura, Infusión, decocción y maceración (López 1995).

2.7.2 *Lepechinia mutica* Benth (Turuyante)



Fig. 9 Fotografía de *Lepechinia mutica*, tomada en el Cantón Quilanga de la Provincia de Loja (Izquierda) y tomada del Herbario de la UTPL- IQA (derecha).

FAMILIA: LAMIACEAE

DISTRIBUCIÓN: Estatus endémico de los andes y encontrado desde 2000-3000 m s.n.m.

PROVINCIAS: Loja

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA: Arbusto anual o perenne, aromático. Hojas opuestas, rara vez verticiladas o alternas, simples, sin estípulas. Flores bisexuales. Fruta seca. Semillas con o sin endosperma

USOS: Se la emplea las hojas y tallo para el tratamiento de infecciones vaginales, como antiinflamatorio, diarrea, afecciones respiratorias.

MODO DE USO: Coccción

(Fuente:http://www.zipcodezoo.com/Plants/L/Lepechinia_mutica/html)

2.7.3 *Niphogeton dissecta* Benth (Culantrillo del cerro)

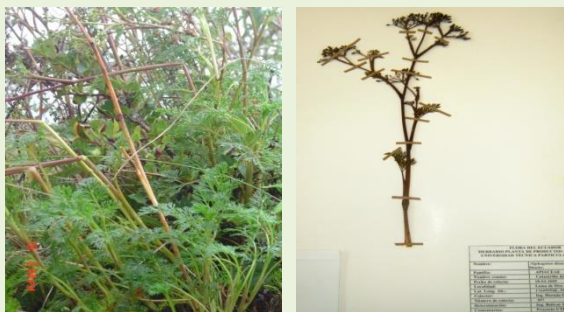


Fig. 10 Fotografía de *Niphogeton dissecta* tomada en el Cantón Saraguro Provincia de Loja (izquierda), y tomada del Herbario de la UTPL- IQA (derecha).

FAMILIA: APIACEAE

DISTRIBUCIÓN: Hierba nativa de los andes encontrado desde 2500-4500 m s.n.m.

PROVINCIAS: Loja, Azuay, Cañar, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Morona Santiago, Napo, Pichincha, Azuay, Zamora-Chinchipe.

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA: Hierba arrossetada, 5-10 cm de altura, glabra. Hojas compuestas; pecíolos 5-10 cm de largo; lanceolada; con el ápice mucronado, nervadura hifódroma. Pétalos 0.8 mm de largo, obovados, blancos a verde claro. Ovario 0.8 mm de largo. Fruto 3 mm de largo; mericarpos tricostados.

USOS: Se emplea las hojas toda la planta para el tratamiento de disentería, colitis, reumatismo, afecciones al hígado y riñón.

MODO DE USO: Cocción.

(Fuente: http://www.zipcodezoo.com/Plants/N/Niphogeton_dissectus/html).

2.7.4. *Fuschia ayavacensis* (Pena-Pena)



Fig. 11 Fotografía de *Fuschia ayavacensis*, tomada del cantón Cariamanga de la provincia de Loja (izquierda) y tomada del Herbario de la UTPL- IQA (derecha).

FAMILIA: ONAGRACEAE

DISTRIBUCIÓN: Estatus nativo de los andes y la amazonia encontrado desde 1500-300 m s.n.m.

PROVINCIAS: Loja

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA: Arbusto muy ramificado, las hojas lanceoladas, pecioladas. Los bordes dentados, alcanzan una longitud de 2,5-8 cm de largo. Las flores son colgantes, generalmente se hallan solitarias, presenta 4 pétalos purpúreos o morados, de 1-1,5 cm de largo y 4 sépalos rojos de 2-2,5 cm de largo. El fruto es rojo violáceo o negro, carnosos, de forma oblonga aproximadamente de 1 cm de largo (Zin 1958).

USOS: Se emplea las hojas y flor para los nervios, como diurético, emenagogo, quemaduras, purgante, febrífugo, tónico.

MODO DE USO: Infusión (Zin 1958).

Capítulo III: Metodología

III. METODOLOGIA

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Área de recolección

Tabla 1.- Lugares de recolección de las especies vegetales.

Especie	Nombre común	Lugar de recolección
<i>Piper ecuadorense</i>	Matico	Numbani (Zamora)
<i>Lepechinia mutica</i>	Turuyante	Ungüanche vía a Quilanga (Loja)
<i>Niphogeton dissecta</i>	Culantrillo	Loma de Oro Saraguro (Loja)
<i>Fuschia ayavacensis</i>	Pena-Pena	Cantón Cariamanga (Loja)

Fuente: autora

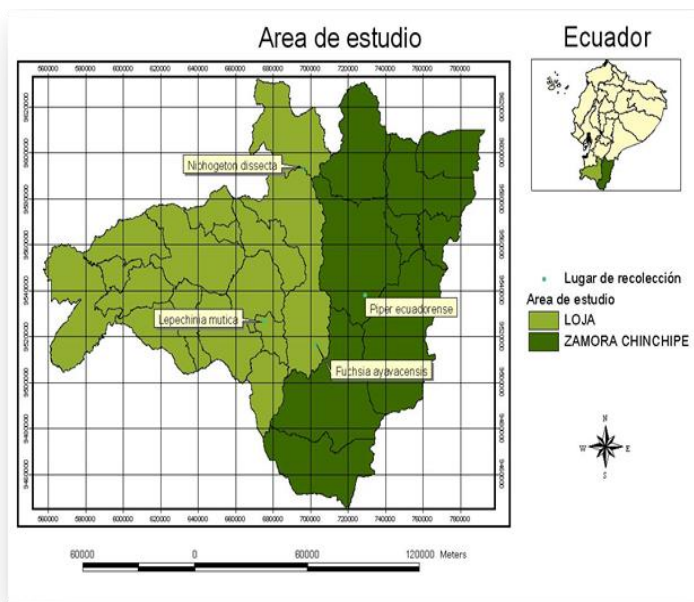


Figura 12.- Mapa de los lugares de recolección de las cuatro especies vegetales de las Provincia de Loja y Zamora Chinchipe.

3.2. Obtención de los extractos

Las características vegetales de las especies fueron identificadas en el herbario de UTPL. Se realizó la selección de las partes útiles, eliminando las partes dañadas y se seco a 37 °C por 8 días. Pasado este tiempo se trituraron las plantas (1 cm). La obtención de los extractos se realizó por maceración dinámica a temperatura ambiente por 5 horas, con una relación metanol: planta de 10:1, luego se separó el residuo vegetal y el líquido extractivo empleando una filtración al vacío con la ayuda de una bomba de succión sobre papel filtro, se procedió a la concentración de cada uno de los extractos, empleando un equipo rota- evaporador a presión reducida y a temperatura moderada de 30-35 °C, hasta obtener un extracto seco, para así evitar la degradación de los componentes activos. Finalmente los extractos obtenidos perfectamente secos son almacenados a -20 °C hasta su posterior empleo.

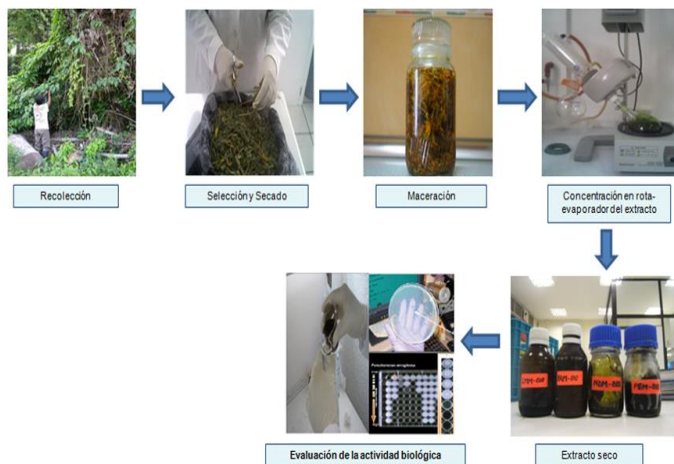


Figura 13.- Obtención de los extractos evaluados.

3.3 Microorganismos de Prueba

Se emplearon 5 cepas Gram negativas: *Pseudomona aeruginosa* ATCC® 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 9997, *Proteus vulgaris* ATCC® 8427, *Escherichia coli* ATCC® 25922 y *Salmonella Typhimurium* LT2; 2 cepas Gram positivas: *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212 y *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, para la evaluación de la susceptibilidad bacteriana. Así mismo, se empleo 5 organismos fúngicos entre levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* ATCC® 2601, *Candida albicans* ATCC® 24433 y hongos esporulados como *Aspergillus niger* ATCC® 9642-U, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC® 28185 y *Trichophyton rubrum* ATCC® 28188.

3.4 Pruebas Antimicrobianas

3.4.1 Método de Difusión en agar

3.4.1.1 Preparación del extracto

Cabe recalcar que la sustancia a ensayar (extracto) que se prepara, se usa tanto para Difusión como para CMI (se usa directamente sin realizar diluciones). Se preparó a partir del extracto seco, una disolución de 20 mg/mL de extracto en 1 mL de Dimetil sulfóxido (DMSO).

3.4.1.2 Preparación del cultivo microbiano (Cultivo Overnight)

Se preparó el cultivo a partir de las cepas que están en reserva criogénica mantenidas a -80 °C y luego se procedió a la siembra e incubación de los microorganismos en las condiciones específicas para cada género en la Tabla.- 2.

Tabla 2.- Condiciones de cultivo de los microorganismos utilizados.

Microorganismo	Medio de Cultivo	Condiciones de Incubación
Bacterias		
<i>P. aeruginosa</i>	Caldo Tryptisoya	37 °C por 14-16 h
<i>K. pneumoniae</i>	Caldo Tryptisoya	37 °C por 14-16 h
<i>P. vulgaris</i>	Caldo Muller Hinton	37 °C por 14-16 h
<i>E. coli</i>	Caldo Tryptisoya	37 °C por 14-16 h

<i>S. tiphymurium</i>	Caldo Nutritivo Oxoid	37 °C por 14-16 h
	Caldo Infusión	
<i>E. faecalis</i>	Cerebro-Corazón	37 °C por 14-16 h
<i>Staphylococcus aureus</i>	Caldo Triptisoya	37 °C por 14-16 h
Levaduras		
<i>S. cerevisiae</i>	Caldo Sabouraud	28 °C por 14-16 h
<i>C. albicans</i>	Caldo Sabouraud	37 °C por 14-16 h

* American Type Culture Collection (ATCC)

3.4.1.3 Procedimiento

Se procede a la siembra a partir de los cultivos overnight 100 µL en el centro de la placa y se hace un vertido de 25 mL de agar Muller Hinton o Sabouraud según corresponda sobre ella. Se homogeniza y se deja solidificar bajo corriente de flujo. La concentración final de la población bacteriana esta alrededor de 1×10^7 ufc/mL y 1×10^6 ufc/mL para levaduras. Luego se realizó 6 pocillos de 5mm con un tubo estéril en la placa y se extraen los discos con las micro-espátulas para que de esta manera quede el pocillo con un diámetro de 5 mm y listo para colocar el extracto.

Posteriormente se coloca 25 µL de cada una de las soluciones de extracto preparadas. Para lograr una mayor difusión de las muestras se dejo reposar por unos minutos a temperatura ambiente, se las sella con parafilm y se incuba invertidas las placas a 37- 28 °C según corresponda, por un periodo de 24h. Después de retirar las placas de la incubadora, se procede a medir los halos de inhibición tanto del control como de los extractos. La prueba se realizó por triplicado.

Controles positivos: se utiliza discos de sensibilidad específicos para cada microorganismo como Gentamicina 10 µg, Ampicilina 10 µg (bacterias), Nistatina 100 u (levaduras) colocado en el pocillo central de la placa respectiva. Se emplea una caja de control por microorganismo.

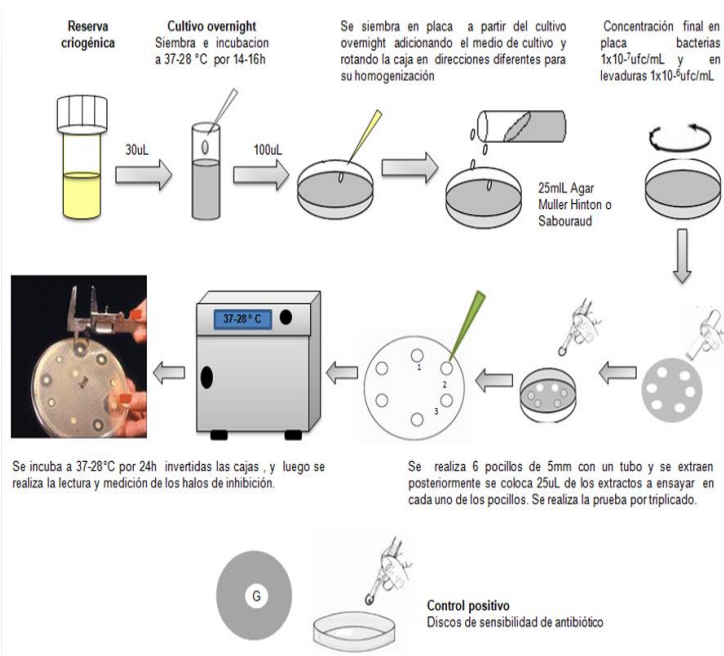


Figura 14.- Esquema del procedimiento del Método de difusión en agar.

3.4.2 Método de Microdilución en Caldo

3.4.2.1 Preparación del extracto

Para este ensayo se empleó la solución de partida utilizada en la prueba de difusión de 20 mg/mL.

3.4.2.2 Preparación de la suspensión de los inoculos

Bacterianos

Se prepara a partir de un cultivo nocturno (overnight) sembrado el día anterior a las condiciones específicas mostradas en la Tabla 2. De este cultivo se toma 150-300 μ L en 7 mL de suero fisiológico estéril, ajustando el inóculo a una concentración equivalente a 0,5 en la escala de MacFarland, de esta suspensión tomamos 140 μ L e inoculamos en 6,86 mL de Caldo Muller Hinton ajustando a una población

bacteriana de 2×10^6 ufc/mL. 100 μ L de esta suspensión se usan para completar a 200 μ L el volumen final de la placa de cultivo, de esta manera se ajusta la población bacteriana a 5×10^5 ufc/mL.

Fúngicos

- Levaduriformes

Se prepara a partir de un cultivo nocturno (overnight) sembrado el día anterior a las condiciones específicas en la Tabla 3. De este cultivo se toma 150-300 μ L en 7 mL de suero fisiológico estéril, ajustando el inóculo a una concentración equivalente a 0,5 en la escala de MacFarland, de esta suspensión tomamos 140 μ L e inoculamos en 6,86 mL de Caldo Sabouraud ajustada a una población de 1×10^4 ufc/m. 100 μ L de esta suspensión se usan para completar a 200 μ L el volumen final de la placa de cultivo, de esta manera se ajusta la población fúngica a 2.5×10^3 ufc/mL.

Tabla 3.- Condiciones del medio de cultivo de los hongos levaduriformes.

Hongos Levaduriformes	Medio de Cultivo	Condiciones de Incubación
<i>S. cerevisiae</i>	Caldo Sabouraud	28°C por 14-16 h
<i>C. albicans</i>	Caldo Sabouraud	37°C por 14-16 h

* American Type Culture Collection (ATCC)

- Esporulados

Se prepara la suspensión a partir de las cepas en reserva criogénica mantenidas a -80 °C tomando de esta 14 μ L en 7 ml de Caldo Sabouraud. 100 μ L de esta suspensión se usan para completar a 200 μ L el volumen final de la placa de cultivo, de esta manera se ajusta la población fúngica a 5×10^4 esporas/mL.

2.4.2.3 Procedimiento

Para Bacterias:

El ensayo se realizó sobre microplacas de 96 pocillos utilizando el procedimiento de dilución doble seriada del

siguiente modo: colocamos 180 μL de caldo Muller Hinton al primer pocillo y 100 μL a todos los demás pocillos restantes, luego se adiciona 20 μL del extracto (20 mg/mL) a probar, en el primer pocillo y mezclamos. Se realiza diluciones seriadas tomando 100 μL del primer pocillo y diluyendo con 100 μL del pocillo siguiente y se continúa este procedimiento hasta obtener 8 diluciones consecutivas. Se sigue el mismo procedimiento para el control de esterilidad (180 μL caldo + 20 μL extracto) control negativo (180 μL caldo + 20 μL DMSO) como para el control positivo (180 μL caldo + 20 μL Gentamicina® a 1000 ppm).

Una vez preparada la placa se inocularon con 100 μL de la suspensión del inóculo, para todas las columnas a excepción de los controles de esterilidad, completando a un volumen final de 200 μL en la placa de cultivo, de esta manera se ajusta tanto la población bacteriana a 5×10^5 ufc/mL, así como la concentración final del extracto de 1000 a 8 $\mu\text{g/mL}$. Se sella las placas e incubamos a 37 °C por un período de 18-24 h.

	EXTRACTO 1				EXTRACTO 2				CONTROLES DMSO (C11), ANTIBIOTICO (C12)			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1000											
B	500											
C	250											
D	125											
E	62.5											
F	31.25											
G	15.625											
H	7.8125											

Figura 15.- Ilustración de la microplaca TC₉₆ hecha con 12 columnas y 8 filas (A –H).

Una vez preparada la placa se inocularon con 100 μL de la suspensión del inóculo, para todas las columnas a excepción de los controles de esterilidad, completando a un volumen final de 200 μL en la placa de cultivo, de esta manera se ajusta tanto la población bacteriana a 5×10^5 ufc/mL, así como la concentración final del extracto de 1000 a 8 $\mu\text{g/mL}$. Se sella las placas e incubamos a 37 °C por un período de 18-24 horas.

Para Hongos:

Se sigue el mismo procedimiento de dilución seriada aplicada variando únicamente ciertos parámetros: en hongos levaduriformes la concentración final del inóculo 2.5×10^3 ufc/mL y el control positivo que se emplea la Nistatina®. Y en hongos esporulados la concentración final del inóculo 5×10^4 esporas/ml, concentración final de extracto de 1000 a $0,5 \mu\text{g/ml}$ en la que se realiza diluciones seriadas hasta obtener 12 diluciones consecutivas (fig.16) y el control positivo que se emplea una solución de 1 mg/mL de Itraconazol. Se incuban las placas a 28°C y se monitorea el crecimiento hasta las 96 horas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95	0.97	0.48
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Figura 16.- Ilustración de la microplaca TC₉₆ hecha con 12 columnas y 8 filas (A–H).

3.4.3 Inhibición del Crecimiento Radial

3.4.3.1 Preparación del extracto

Se preparo una disolución de 100 mg de extracto seco en 500 μL de DMSO, posteriormente se realizo dos diluciones 1:10 y 1:100.

3.4.3.2 Preparación de los inoculos

Para la preparación de los inoculos fúngicos se partió de cepas en reserva criogénica mantenidas a -80°C se extraen 50 μL y se siembra en el centro de placas petri de vidrio de 50 a 60 mm de diámetro, adicionando 10mL de Agar Sabouraud

o Emmon's según corresponda a la cepa, dejamos solidificar e incubamos hasta que crezcan totalmente sin esporular, en las condiciones específicas para cada género, descritas en la tabla.-4

Tabla 4.- Condiciones del medio de cultivo de los hongos esporulados.

Hongos esporulados	Medio de Cultivo	Condiciones de Incubación
<i>A. niger</i>	Agar Sabouraud	28 °C por 24-48 h
<i>T.mentagrophytes</i>	Agar Emmon's	28 °C por 24-72 h
<i>T. rubrum</i>	Agar Emmon's	28 °C por 24-96 h

* American Type Culture Collection (ATCC)

3.4.3.3 Procedimiento

De cada una de las tres soluciones de extracto preparadas se extraen 50 µL y se diluyen con 10 mL de agar Sabouraud o Emmon's en placas petri de vidrio de 50 a 60 mm de diámetro. Se homogeniza y se deja solidificar bajo corriente de flujo, posteriormente se realiza un pocillo de 10 mm de diámetro con un tubo estéril en el centro de la placa y se extrae el disco con las micro-espátulas para que de esta manera quede el pocillo con un diámetro de 10 mm y listo para colocar el inóculo. Posteriormente se realizan varios pocillos de 10 mm de diámetro en las placas donde el hongo ha crecido correctamente, se extraen con una pinza y se los coloca en las placas donde se encuentra la sustancia de prueba a la cual previamente se le ha extraído un disco del mismo diámetro. Se sellan las placas e incubamos invertidas a 28 °C y se monitorea el crecimiento cada 24 horas por un período máximo de 5 días. La prueba se realiza por triplicado.

Controles: Como testigo negativo empleamos una solución de 50 µL de DMSO en 10 mL de Agar y como testigo positivo una solución de 50 µL de Itraconazol (1 mg/mL) en 10 mL de agar.

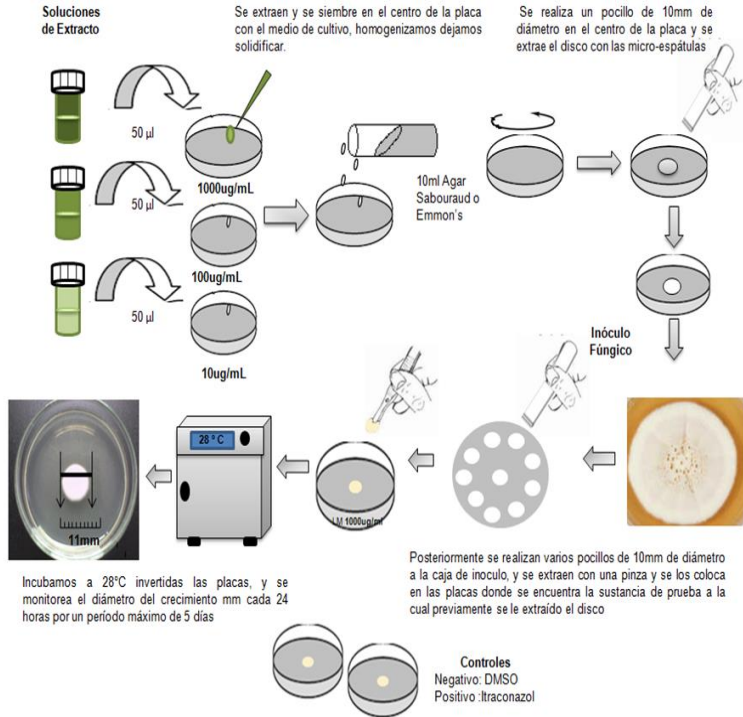


Figura 17.- Esquema del procedimiento del Método de Inhibición de Crecimiento Radial.

3.5 Análisis e Interpretación de Datos

Para la realización de la presente investigación se utilizó estadística descriptiva (como medias, desviación estándar, etc.) e inferencial teniendo en cuenta los diferentes criterios para cada una de las pruebas realizadas como: Difusión en Placa, se basa en la medida de los diámetros de la zona de inhibición. Se demostrará la actividad con la existencia del mismo y la NO actividad con la ausencia. Las zonas de inhibición se medirán en milímetros y se reportará si es un halo de sensibilidad o resistencia (NCCLS 2006). Los valores de CMI se reportarán en µg/ml y se reportará actividad relevante y selectiva cuando el valor de CMI esté por debajo

de 200 µg/ml para extractos y 25 µM para compuestos puros (Cos *et al.* 2006). En la prueba de Inhibición del Crecimiento Radial se medirá el diámetro (mm) de la zona de crecimiento miceliar a intervalos de 24 horas por un período máximo de 5 días y estos valores serán convertidos a su equivalente en Porcentaje de Inhibición de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% IN = \frac{(C - i) - (E - i)}{(C - i)} \times 100$$

Donde:

C: Diámetro de crecimiento en placa control

E: Diámetro de crecimiento en la placa extracto

i: Diámetro de crecimiento del inóculo inicial

Capítulo IV: Resultados

IV.RESULTADOS

4.1 Método de Difusión en Agar

Mediante el método de difusión en agar se determinó la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos obtenidos contra las bacterias gram (+): *S. aureus*, *E. faecalis*, las bacterias gram (-): *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *S. typhimurium* y los hongos levaduriformes: *C. albicans* y *S. cerevisiae*. Según puede observarse en la tabla 5, el extracto metanólico de la especie *L. mutica* es el que presenta mayor actividad inhibitoria con un halo de inhibición de 14mm frente a *S. aureus* y un halo de inhibición de 12mm para *P. vulgaris* respectivamente, mientras que con el extracto metanólico de *F. ayavacensis* se observa una actividad inhibitoria inferior contra *S. aureus* con un halo de inhibición de 10mm. *P. ecuadorensis* y *N. dissecta* resultaron ser las especies que presentaron una actividad débil o ninguna frente a los microorganismos ensayados.

Tabla 5.- Tamaño del halo de Inhibición de los microorganismos frente a los cuatro extractos ensayados

	Tamaño del Halo de Inhibición (mm)								
Dosis extractos (20mg/ml)	Ec	Kp	Pa	Pv	St (LT2)	Sa	Ef	Ca	Sc
<i>Niphogeton dissecta</i>	-	-	-	-	-	-	7	6	6
<i>Piper ecuadorese</i>	-	9	-	-	-	8	6	8	9
<i>Lepechinia mutica</i>	-	8	-	12	-	14	15i	-	7
<i>Fuchsia ayavacensis</i>	18r	17r	18r	14r	15r	10	9r	15r	14r
CONTROLES									
Gentamicina 10 ug*	20	27	21	25		25			
Ampicilina 10 ug*					30		30		
Nistatina 100 units*								20	23

Microorganismos ensayados: Bacterias gram (-) *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona areuginosa*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella tiphymurium*, gram (+) *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*; Hongos levaduriformes *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*. **Referencias** (-) no activo, (r) resistencia, (i) intermedio.

* Los diámetros de los halos de inhibición reportados para los controles empleados en esta prueba, están dentro de los márgenes de referencia publicados por la Clínica and Laboratory Standards Institute (CLSI).

4.2 Método de Inhibición del Crecimiento Micelar

4.2.1 *Aspergillus niger*

En las figuras 18, 19, 20, 21 y Tabla 6 se muestra el diámetro del crecimiento micelar del hongo expresado en milímetros (mm), los datos son el resultado del promedio de tres repeticiones con sus tres réplicas más el error estándar, de los cuatro extractos metanólicos a las tres concentraciones ensayadas de 1000, 100 y 10 ug/mL. Se realizaron mediciones cada 24 horas en un periodo máximo de 3 días dependiendo de su crecimiento. De acuerdo a los resultados obtenidos se observa que los extractos de las especies *P. ecuadorensis* y *N. dissecta* presentaron mayor actividad inhibitoria para la concentración de 1000 ug/mL y frente a las otras concentraciones de 100-10 ug/mL su crecimiento se dio de forma normal sin producir ningún efecto inhibitorio contra este hongo durante los tres días de ensayo en comparación con el control de DMSO. Mientras que los extractos de las especies *L. mutica* y *F. ayavacensis* no mostraron actividad para ninguna de las concentraciones ensayadas frente a este hongo.

Una vez realizado el Análisis de varianza del conjunto de datos, no se encontró una diferencia significativa ($p < 0,005$) para los datos de crecimiento micelar de la especie, una vez determinado esto, se realizó también un Análisis de Dunnett con el que las cuatro especies no arrojaron ninguna diferencia significativa ($p > 0,05$) (ver tabla 7).

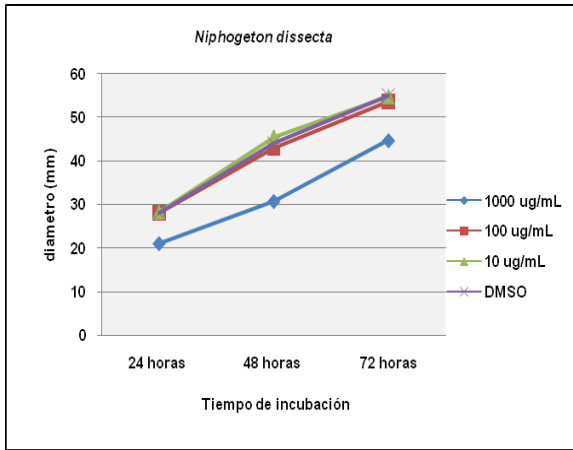


Figura 18.- Valor promedio del crecimiento micelar en mm del hongo *A. niger* frente al extracto *N. dissecta*.

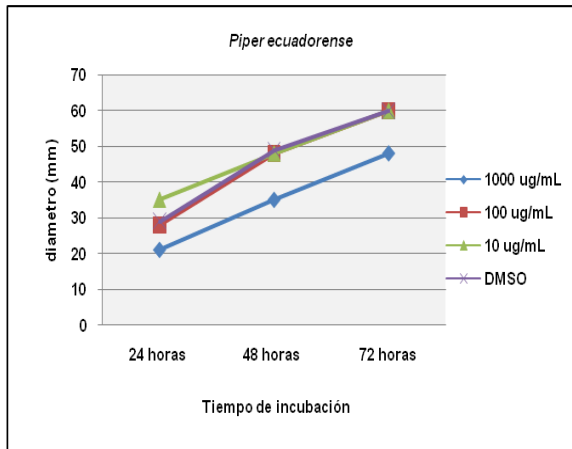


Figura 19.- Valor promedio del crecimiento micelar en mm del hongo *Aspergillus niger* frente al extracto *P. ecuadorensis*.

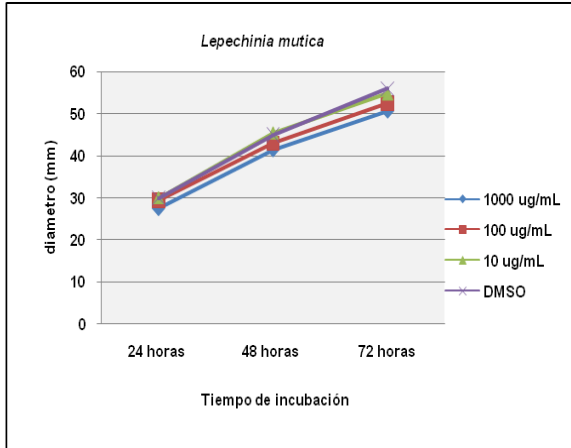


Figura 20.- Valor promedio del crecimiento micelar en mm del hongo *Aspergillus niger* frente al extracto *L. mutica*.

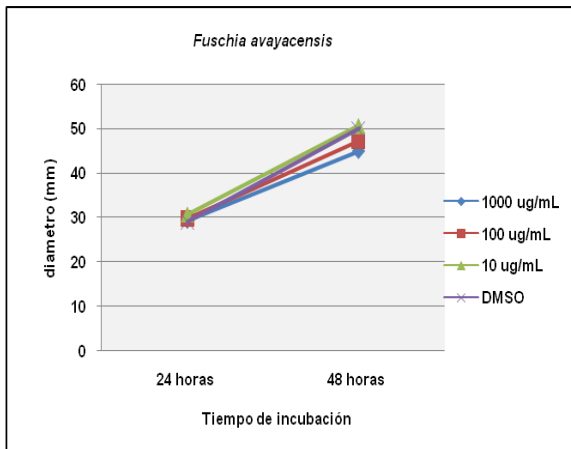


Figura 21.- Valor promedio del crecimiento micelar en mm del hongo *Aspergillus niger* frente al extracto *F. avayacensis*.

Tabla 6.- Valor promedio y error estándar del diámetro de crecimiento micelar en mm del hongo *A. niger* frente a los cuatro extractos metanólicos.

<i>Aspergillus niger</i> (diámetro de crecimiento micelar (mm))									
Tiempo de incubación	24 horas			48 horas			72 horas		
DOSIS (ug/mL)	1000	100	10	1000	100	10	1000	100	10
<i>Niphogeton dissecta</i>	21 ± 0,57	28 ± 0	28,3 ± 0,33	30,7 ± 0,66	43 ± 0	44,3 ± 0,33	44,7 ± 0,66	53,7 ± 1,33	54,7 ± 0,99
<i>Piper ecuadoreense</i>	21 ± 0	28 ± 0	29,3 ± 0,58	35 ± 0	48 ± 0,58	48 ± 0,99	48 ± 0,99	60 ± 0	60 ± 0
<i>Lepechinia mutica</i>	27,5 ± 0,22	29,5 ± 0,22	30 ± 0	41,5 ± 0,22	43 ± 0,25	45,2 ± 0,30	50,7 ± 0,33	52,5 ± 0,22	54,8 ± 0,47
<i>Fuschia avayacenses</i>	29,3 ± 0,66	29,7 ± 0,88	30,7 ± 0,66	47,66 ± 0,33	47,33 ± 1,2	50,7 ± 0,66			
CONTROLES									
DMSO	28,5 ± 0,29			48 ± 1,32			56,8 ± 1,59		
ITZ	19 ± 0,75			23,25 ± 0,83			24,8 ± 0,16		

Controles: positivo Dimetil Sulfoxido (DMSO); negativo Itraconazol 1mg/mL (ITZ).

Tabla 7.- Análisis estadístico mediante la prueba de Dunnett con un alfa de 0.05 de los 4 extractos.

Especies evaluadas	Prueba de Dunnett (p <0,05)		
	0-1000*	0-100*	0-10*
<i>Niphogeton dissecta</i>	0,074	0,694	0,742
<i>Piper ecuadoreense</i>	0,094	0,710	0,737
<i>Lepechinia mutica</i>	0,273	0,497	0,806
<i>Fuschia avayacenses</i>	0,459	0,687	0,687

*=Las categorías 0 -1000, 0-100,0-10 se refería al control positivo en comparación con las dosis ensayadas de los extractos.

4.2.2 Trichophyton mentagrophytes

Las datos observados en las figuras 22, 23, 24, 25 y la Tabla 9 son expresados de la misma forma que se realizó para *A. niger* promedio más el error estándar, variando únicamente el tiempo de incubación ya que sus mediciones del diámetro en mm del crecimiento micelar se tomaron en un periodo máximo de 4 días. De acuerdo a los resultados obtenidos se observa que los extractos con mayor actividad inhibitoria son las especies *P. ecuadorensis* y *N. dissecta* siendo estos más activos contra este hongo para la concentración de 1000 ug/mL, estos presentan un menor crecimiento micelar (11 ± 0 a $11,8 \pm 0,17$) en comparación con el control del solvente o DMSO ($13,38 \pm 0,38$ a $29,87 \pm 0,43$), mostrando los extractos un efecto inhibitorio significativo debido a que su crecimiento micelar permaneció estático en la placa extracto con el mismo diámetro del inóculo inicial 11mm durante los cuatro días de ensayo (ver figuras 22, 23 y Tabla 8). En cambio los extractos *L. mutica* y *F. ayavacensis* se mostraron menos activos contra este hongo para la concentración de 1000 ug/mL debido a que no se logra una inhibición total del microorganismo de manera significativa con respecto al control.

Una vez realizado el Análisis de varianza del conjunto de datos, se encontró una diferencia altamente significativa con un valor de $p < 0,0001$ para los datos de crecimiento micelar de las cuatro especies, una vez determinado esto, se realizó el Análisis de Dunnett con el que se logró determinar una alta diferencia significativa, entre los tratamientos de 0-1000 ug/mL con respecto al control positivo (ver tabla 9).

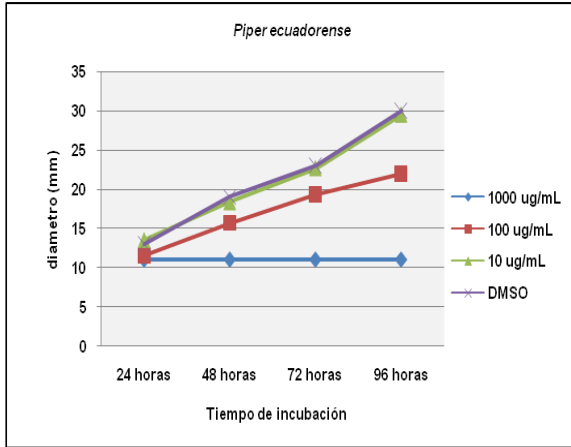


Figura 22.- Valor promedio del crecimiento micelar en mm del hongo *Trichophyton mentagrophytes* frente al extracto *P. ecuadorensis*.

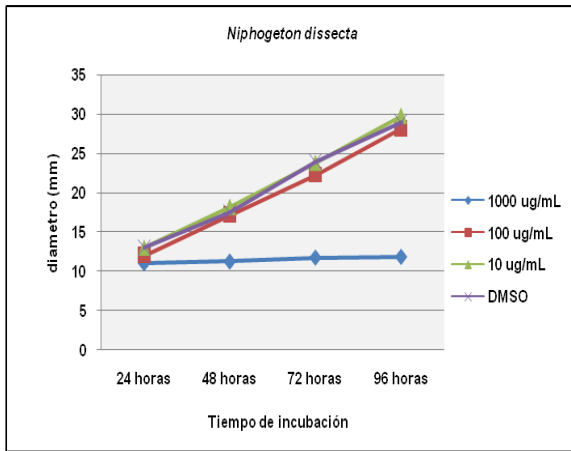


Figura 23.- Valor promedio del crecimiento micelar en mm del hongo *Trichophyton mentagrophytes* frente al extracto *N. dissecta*.

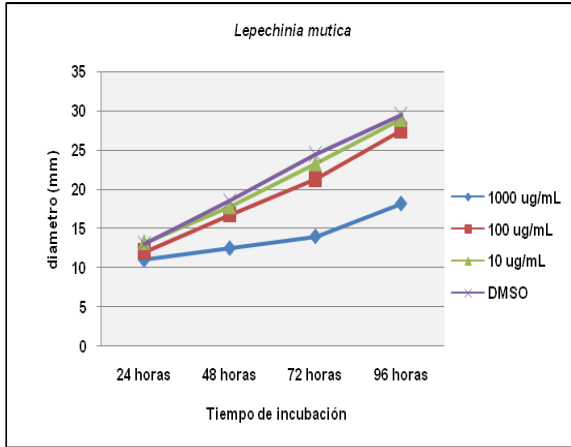


Figura 24.- Valor promedio del crecimiento micelar en mm del hongo *Trichophyton mentagrophytes* frente al extracto *L. mutica*.

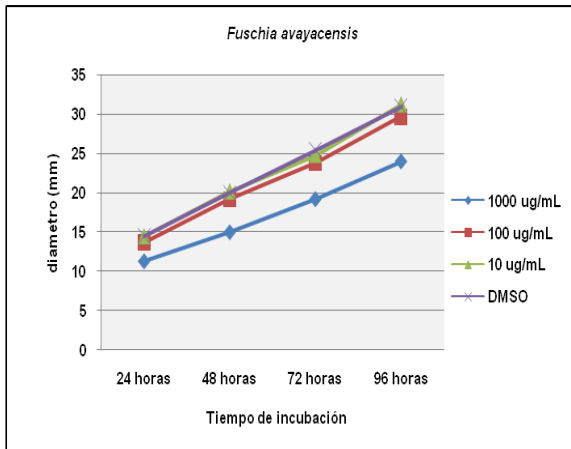


Figura 25.- Valor promedio del crecimiento micelar en mm del hongo *Trichophyton mentagrophytes* frente al extracto *F. avayacensis*.

Tabla 8.- Valor promedio y error estándar de la zona de crecimiento micelar en mm del *T. mentagrophytes* frente a los cuatro extractos metanólicos.

<i>Trichophyton mentagrophytes</i> (diámetro de crecimiento micelar (mm))												
Tiempo de incubación	24 horas			48 horas			72 horas			96 horas		
Dosis mg/ml	1000	100	10	1000	100	10	1000	100	10	1000	100	10
<i>Piper ecuadorensis</i>	11±0	11,5±0,22	13,5±0,22	11±0	15,67±0,7	18,33±0,7	11±0	19,33±1	22,67±0,9	11±0	22±0,45	29,5±0,6
<i>Niphogeton dissecta</i>	11±0	12±0,45	13±0,45	11,2±0,17	17,2±0,83	18,2±0,83	11,7±0,33	22,3±0,61	23,8±0,47	11,8±0,17	28,2±0,54	29,8±0,6
<i>Lepechinia mutica</i>	11±0	12±0	13,2±0,17	12,5±0,22	16,7±0,75	17,8±0,83	14±0,63	21,3±0,75	21,3±0,75	18,2±0,4	27,5±0,84	27,5±0,8
<i>Fuschia avayacensis</i>	11,3±0,2	13,7±0,33	14,5±0,22	15±0,25	19,2±0,17	20,2±0,17	19,2±0,40	23,8±0,31	24,8±0,31	24±0,4	29,7±0,21	31,2±0,1
CONTROLES												
DMSO	13,38±0,38			18,75±0,52			24,25±0,44			29,87±0,43		
ITZ	11±0			11±0			11,13±0,13			11,25±0,15		

Controles: positivo Dimetil Sulfoxido (DMSO); negativo Itraconazol 1mg/mL (ITZ).

Tabla 9.- Análisis estadístico mediante la prueba de Dunnett con un alpha de 0.05 de los 4 extractos metanólicos.

	Prueba de Dunnett (p <0,05)		
Especies evaluadas	0-1000*	0-100*	0-10*
<i>Piper ecuadorensis</i>	0,000	0,007	0,683
<i>Niphogeton dissecta</i>	0,000	0,464	0,795
<i>Lepechinia mutica</i>	0,000	0,235	0,615
<i>Fuschia avayacensis</i>	0,004	0,717	0,704

*=Las categorías 0 -1000, 0-100,0-10 se refería al control positivo en comparación con las dosis ensayadas de los extractos.

4.2.3 Trichophyton rubrum

De acuerdo a los resultados obtenidos se observa que los extractos con mayor actividad inhibitoria son las especies *P. ecuadorensis* y *N. dissecta* siendo activos contra este hongo para las tres concentraciones ensayadas, pero con un menor crecimiento micelar se da para la concentración de 1000 ug/mL (11 ± 0 a $15,5 \pm 0,43$) en comparación con el control de DMSO ($12,5 \pm 0$ a $22,88 \pm 0,13$) observándose con estos extractos un efecto inhibitorio significativo debido a que su crecimiento micelar permaneció estático sobre todo con la especie *N. dissecta* en la placa extracto con el mismo diámetro del inoculo inicial 11mm durante los cuatro días de ensayo, mientras que con la otra especie solo durante las 48 horas (ver figura 26,27 y tabla 10). Mientras que con los extractos de las especies *L. mutica* y *F. ayavacensis* su crecimiento se da de forma normal como en el control encontrándose una actividad inhibitoria menor contra este hongo (ver figuras 28,29).

Una vez realizado el Análisis de varianza del conjunto de datos, se encontró una diferencia altamente significativa con un valor de $p < 0,0001$ para los datos de crecimiento micelar de la especies *Piper ecuadorensis*, *Niphogeton dissecta*, *Lepechinia mutica* una vez determinado esto, se realizó el Análisis de Dunnett con el que se logró determinar una alta diferencia significativa, entre los tratamientos de 0-1000 y 0-100 ug/mL con respecto al control positivo (ver tabla 11).

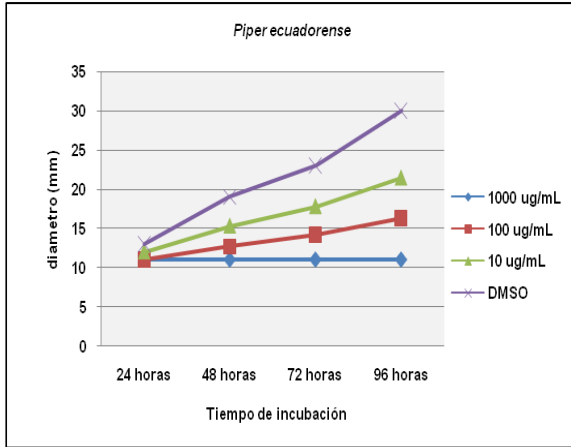


Figura 26.- Valor promedio del crecimiento micelar en mm del hongo *Trichophyton rubrum* frente al extracto *P. ecuadorensis*.

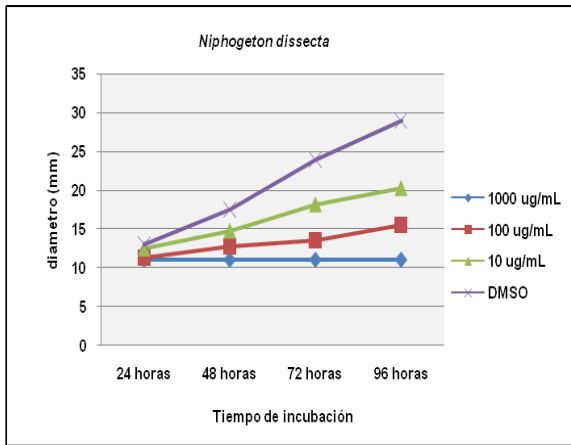


Figura 27.- Valor promedio del crecimiento micelar en mm del hongo *Trichophyton rubrum* frente al extracto *N. dissecta*

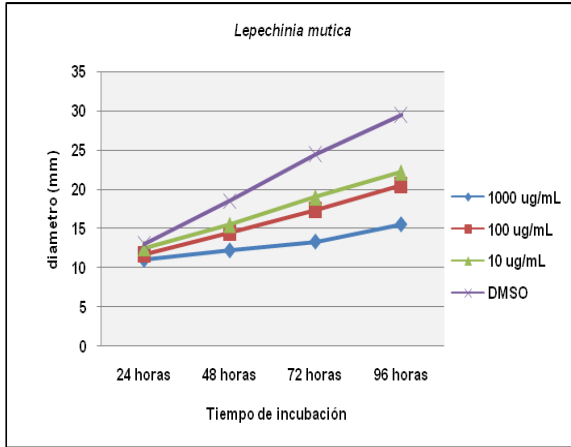


Figura 28.- Valor promedio del crecimiento micelar en mm del hongo *Trichophyton rubrum* frente al extracto *L. mutica*.

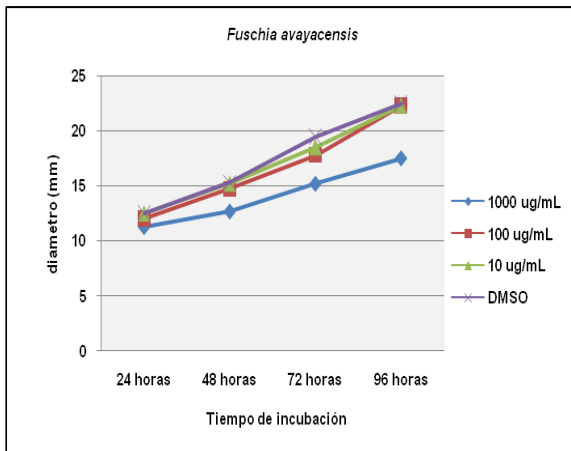


Figura 29.- Valor promedio del crecimiento micelar en mm del hongo *Trichophyton rubrum* frente al extracto *F. avayacensis*.

Tabla 10.- Valor promedio y error estándar de la zona de crecimiento micelar en mm del *T. rubrum* frente a los cuatro extractos metanólicos.

<i>Trichophyton rubrum</i> (diámetro de crecimiento micelar (mm))												
Tiempo de incubación	24 horas			48 horas			72 horas			96 horas		
Dosis ug/mL	1000	100	10	1000	100	10	1000	100	10	1000	100	10
<i>Niphogeton dissecta</i>	11±0	11,3±0,21	12,5±0,22	11±0	12,7±0,21	14,8±0,40	11±0	13,5±0,22	18,2±0,54	11±0	15,5±0,22	20,3±0,33
<i>Piper ecuadorese</i>	11±0	11±0	12±0	11±0	12,67±0,21	12,67±0,21	15,33±0,21	14,17±0,40	17,83±0,40	15,5±0,43	16,33±0,33	21,5±0,22
<i>Lepechinia mutica</i>	11±0	11,7±0,21	12,5±0,22	12,2±0,4	14,5±0,22	15,5±0,22	13,3±0,49	17,3±0,33	19±0,44	18,2±0,47	20,5±0,22	22,2±0,54
<i>Fuschia avayacenses</i>	11,3±0,21	12±0	12,5±0,22	12,7±0,33	14,7±0,21	15,2±0,17	15,2±0,31	17,8±0,40	18,5±0,43	17,5±0,50	22,3±0,49	22,3±0,33
CONTROLES												
DMSO	12,5±0			15,7±0,18			19,5±0			22,88±0,13		
ITZ	10,88±0,13			10,95±0,05			11±0			11±0		

Controles: negativo Dimetil Sulfóxido (DMSO); positivo Itraconazol 1mg/mL (ITZ).

Tabla 11.- Análisis estadístico mediante la prueba de Dunnett con un alpha de $p < 0.05$ de los 4 extractos metanólicos.

	Prueba de Dunnett ($p < 0,05$)		
Especies evaluadas	0-1000	0-100	0-10
<i>Piper ecuadorese</i>	0,000	0,000	0,219
<i>Niphogeton dissecta</i>	0,000	0,000	0,165
<i>Lepechinia mutica</i>	0,000	0,037	0,463
<i>Fuschia avayacenses</i>	0,005	0,388	0,577

*-Las categorías 0 -1000, 0-100,0-10 se refería al control DMSO en comparación con las dosis ensayadas de los extractos.

4.2.4 Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Micelar

Mediante este método se determino el Porcentaje de Inhibición del crecimiento micelar de los hongos ensayados: *A. niger*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* frente a los extractos evaluados. Los valores de porcentaje reportados fueron obtenidos a partir de la media de los valores del diámetro en mm del crecimiento micelar de los hongos tomados cada 24 horas en un periodo máximo de 5 días, siendo convertidos estos valores a su equivalente de Porcentaje de Inhibición de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% IN = \frac{(C - i) - (E - i)}{(C - i)} \times 100$$

Donde,

C: Diámetro de crecimiento en placa control

E: Diámetro de crecimiento en la placa extracto

i: Diámetro del inóculo inicial (11mm).

De acuerdo a los resultados obtenidos mediante esta fórmula aplicada se observa que los extractos con mayor actividad inhibitoria son las especies *P. ecuadorensis*, *N. dissecta*, contra las tres cepas fúngicas ensayadas, siendo más activos contra *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* para la concentración de 1000 ug/mL con un porcentaje de inhibición de 100-96,53 % respectivamente. Contra la cepa *A. niger* estas especies se mostraron menos activas inhibiendo el 30 % del crecimiento micelar (ver tabla 12). Seguido la especie *L. mutica* con un porcentaje de inhibición del 78 % para *T. mentagrophytes* y el 76 % para *T. rubrum* y finalmente la especie *Fuschia avayacenses* que se mostró menos activa contra estos hongos inhibiendo el 50 % del crecimiento micelar (ver tabla 12, graficas 30, 31, 32).

Tabla 12.- Porcentaje de Inhibición del Crecimiento micelar de los cuatro extractos metanólicos contra los tres hongos evaluados.

Porcentaje de Inhibición del Crecimiento micelar de los hongos									
Microorganismo	<i>Aspergillus niger</i>			<i>Trichophyton mentagrophytes</i>			<i>Trichophyton rubrum</i>		
Dosis ug/mL	1000	100	10	1000	100	10	1000	100	10
<i>Piper ecuadorensis</i>	34,23 ± 3,91*	0,00	0,00	100 ,00	44,78 ± 0,88*	3,94 ±1,27*	100 ,00	69,43 ±0,43*	18,17 ±0,73*
<i>Niphogeton dissecta</i>	33,93 ± 3,45*	0,00	0,00	96,78 ± 0,12*	15,49 ± 1,29*	0 ,00	100 ,00	68,18 ±0,33*	17,28 ±0,65*
<i>Lepechinia mutica</i>	0,00	0,00	0,00	78,57 ± 0,59*	23,59 ± 1,24*	5,92 ±1,27*	76,79 ±0,39*	30,67 ±0,69*	7,42 ±0,98*
<i>Fuschia avayacensis</i>	0,00	0,00	0,00	52,65 ± 0,98*	11,4 ± 1,23*	0,00	56,9 ±0,52*	10,68 ±0,82*	3,92 ±0,78*
CONTROLES									
ITZ	75			100			100		

*= Los valores de % se obtuvieron a partir de la media geométrica de los datos del diametro del crecimiento micelar (mm) de cada uno de los hongos evaluados frente a los cuatro extractos metanolicos de cada concentración por un periodo maximo de crecimiento que presentaron cada uno de los hongos , aplicando asi la siguiente formula para obtener el Porcentaje de Inhibicion del Crecimiento micelar $\%IN= [(C-J) - (E-J)/ (C-J)] \times 100$.

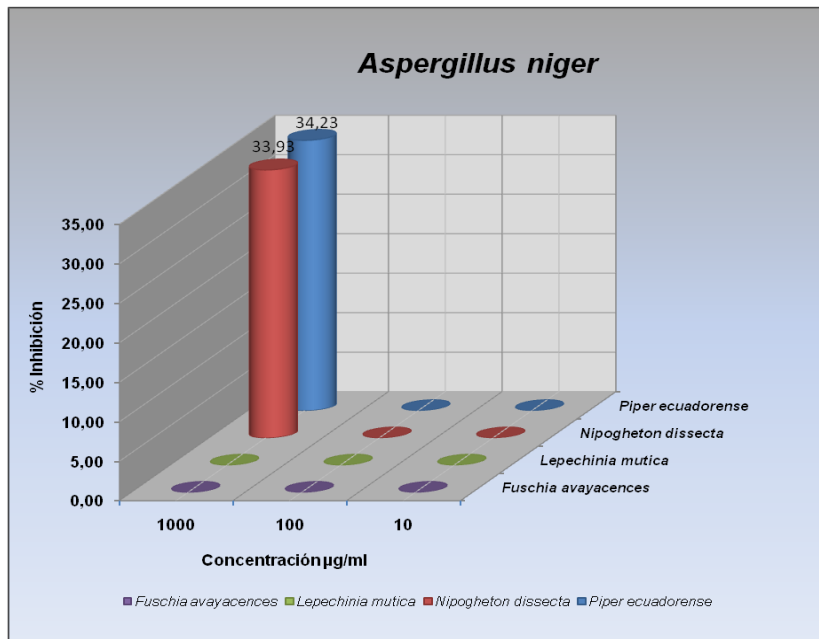


Figura 30.- Porcentaje de Inhibición del Crecimiento micelar de los cuatro extractos metanólicos frente a *Aspergillus niger*.

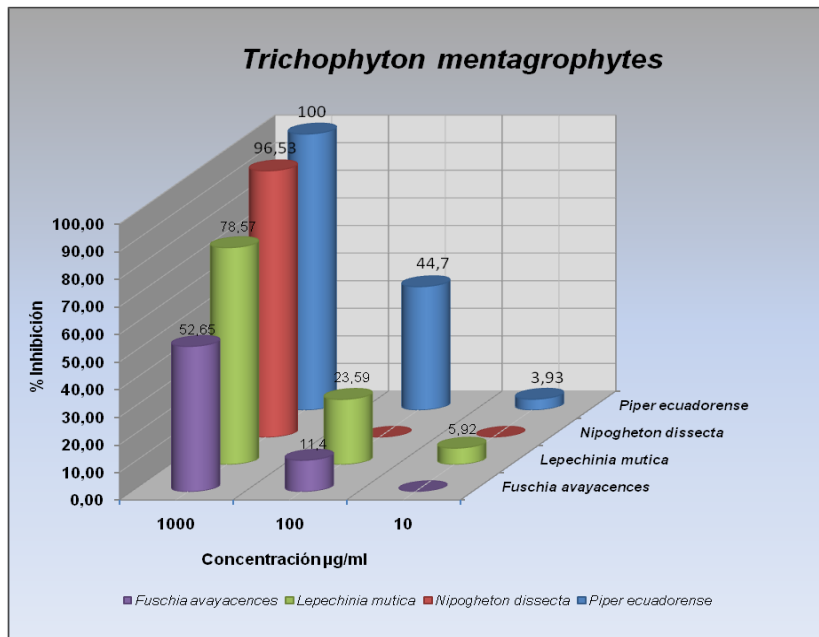


Figura 31.- Porcentaje de Inhibición del Crecimiento micelar de los cuatro extractos metanólicos frente a *T. mentagrophytes*.

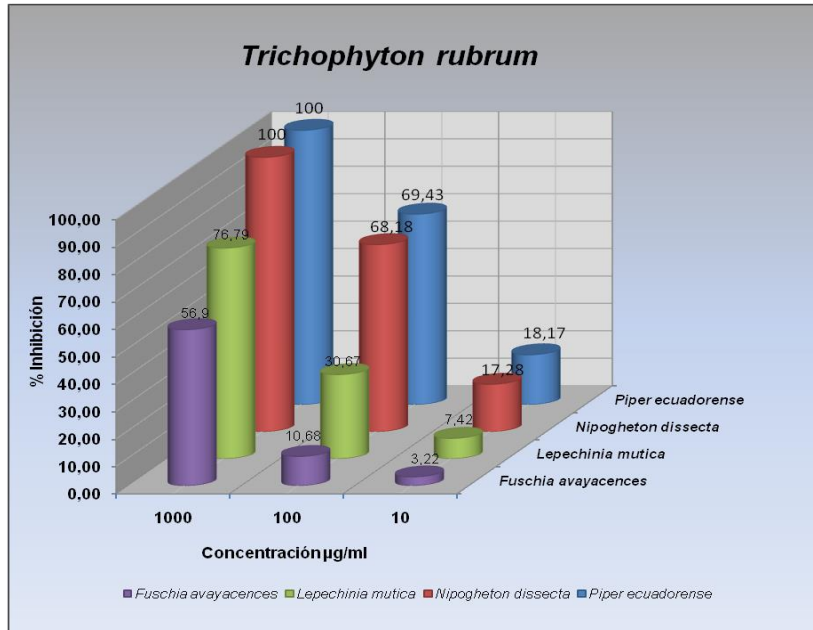


Figura 32.- Porcentaje de Inhibición del crecimiento micelar de los cuatro extractos metanólicos frente a *Trichophyton rubrum*.

4.3 Método de Microdilución en Caldo

Los resultados con las bacterias ensayadas muestran que el extracto de la especie *L. mutica* es el que presenta mayor actividad contra las bacterias *P. vulgaris*, *E. faecalis* con una CMI de 500 µg/mL respectivamente y contra *S. aureus* con una CMI de 125 µg/mL, mostrándose estas cepas más sensibles al extracto ensayado. Los extractos *P. ecuadorensis*, *N. dissecta*, *F. ayavacensis* no presentaron ninguna actividad frente a los microorganismos ensayados confirmándose así los resultados obtenidos mediante el método de difusión en placa (ver tabla 13)

Los resultados obtenidos con los hongos muestra que con los hongos levaduriformes los extractos evaluados no mostraron ninguna actividad inhibitoria, a diferencia de los hongos esporulados *T. mentagrophytes* y *T. rubrum* cuyo crecimiento fue inhibido, siendo más activo el extracto metanólico *P. ecuadorensis* con una CMI de 62,5 µg/mL para *T. mentagrophytes* y una CMI de 31,25 µg/mL para *T. rubrum*, seguido tenemos al extracto de la especie *N. dissecta* con una actividad inhibitoria moderada frente a los hongos con una CMI para *T. rubrum* de 62,5 µg/mL y *T. mentagrophytes* de 125 µg/mL y finalmente los otros dos extractos metanólicos que presentan una actividad inhibitoria inferior frente a estos hongos como la especie *L. mutica* con una CMI de 125 µg/mL para ambos hongos y con el extracto *F. ayavacensis* una CMI de 250 µg/mL tanto para *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*.

Tabla 13.- Concentración Mínima inhibitoria (CMI) de los 4 extractos ensayados frente a los microorganismos de prueba.

ESPECIES EVALUADAS	Concentración Mínima Inhibitoria (µg/ml)											
	<i>Ec</i>	<i>Kp</i>	<i>Pa</i>	<i>Pv</i>	<i>St</i> (LT2)	<i>Sa</i>	<i>Ef</i>	<i>Ca</i>	<i>Sc</i>	<i>An</i>	<i>Tm</i>	<i>Tr</i>
<i>Niphogeton dissecta</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-	125	62,5
<i>Piper ecuadorensis</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-	62,5	31,25
<i>Lepechinia mutica</i>	NA	NA	NA	500	NA	125	500	-	-	-	125	125
<i>Fuchsia ayavacensis</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	250	250
CONTROLES												
Gentamicina 1mg/ml	<0,8	<0,8	<0,8	<0,8		<0,8						
Ampicilina 8mg/ml					<1,15		<1,15					
Itraconazol 1mg/ml										1,5	0,03	0,03

Microorganismos ensayados: Bacterias gram(-) *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona areuginosa*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella tiphymurium*, gram (+) *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*. Hongos: *levaduriformes Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, esporulados *Aspergillus niger*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*. Referencias NA= No activo a la dosis más alta probada (>1000).

Capítulo V: Discusión

V. DISCUSIÓN

Las plantas se han empleado desde tiempos ancestrales con fines medicinales para el tratamiento de diferentes enfermedades humanas, incluidas las de naturaleza infecciosa. Hasta el advenimiento de la medicina moderna, los humanos dependieron de ellas para el tratamiento de sus enfermedades (Castro 2006). El presente trabajo demuestra que el uso empírico de las plantas en medicina tradicional sigue siendo un buen punto de partida para la selección y el estudio de las propiedades farmacológicas de sus extractos (Tuttolomondo 2005). Por otra parte, la ausencia de estudios científicos anteriores sobre la actividad antimicrobiana de estas especies vegetales medicinales justifica la investigación realizada.

5.1 Actividad Antibacteriana

Mediante los ensayos in vitro para evaluar la susceptibilidad de las cepas bacterianas frente a los extractos ensayados se determinó que el extracto de la especie *Lepechinia mutica* presentó actividad relevante contra *S. aureus* con una CMI de 125 ug/ml, *P. vulgaris* y *E. faecalis* una CMI 500 ug/ml. De acuerdo a los resultados obtenidos se relaciono el diámetro de inhibición con la CMI y se determino que cuando mayor es la zona de inhibición, menor es la concentración del antimicrobiano que se requiere para inhibir el crecimiento. Entonces es probable que un halo de inhibición entre 10-14mm que presenta el extracto activo se encuentre con una CMI entre 125 y 1000µg/mL.

Los resultados mostraron mayor inhibición en las bacterias gram positivas que en gram negativas, esto podría deberse a que la pared bacteriana de las gram positivas tienen una estructura simple constituida por un monocomplejo fácilmente hidrolizable, que contienen una alta proporción de muranilpéptidos. Al contrario, las gram negativas presentan una compleja estructura de su pared celular constituida solo por 5-10% de muranilpéptidos, lo cual llevaría a obtener una CMI mayor que demuestra ello la menor sensibilidad al extracto (Roth *et al.* 2002).

Según lo reportado por Rossi *et al.* (2002) donde se evaluó la actividad antimicrobiana y fitoquímico de un extracto metanólico de la especie *Lepechinia meyeri* frente a bacterias Gram (+) y Gram (-), se encontró una buena respuesta de inhibición contra todas las bacterias gram positivas ensayadas *S.aureus* con una CMI 500ug/mL y el ensayo fitoquímico muestra presencia de flavonoides, compuestos fenólicos esteroides, saponinas, tatinos los cuales pueden ser los responsables de la actividad biológica. Por lo tanto los resultados obtenidos de esta especie son importantes dado que podría tener un uso potencial en infecciones causadas por estos microorganismos, inclusive ante una cepa resistente y muy difícil de erradicar como es la bacteria *S. aureus*. Por lo tanto es necesario realizar estudios que permitan aislar e identificar el compuesto responsable de la actividad.

En cuanto a los extractos de las especies *P. ecuadorensis*, *N. dissecta*, *F. ayavacensis* no mostraron actividad contra ninguno de los microorganismos en la concentración máxima evaluada, pero es probable que a mayores concentraciones si inhiba el crecimiento lo cual no es relevante para nuestro estudio por lo que se debe tomar en cuenta que las concentraciones muy altas tienen el riesgo de presentar toxicidad (Wuart *et al.* 2004).

5.2 Actividad Antifúngica

El aumento de la morbilidad y la mortalidad causado por infecciones fúngicas, ha estimulado la búsqueda de nuevas moléculas con novedosos mecanismos de acción. Una estrategia importante en esta búsqueda es la investigación en plantas (Rubio *et al.* 1999).

En décadas pasadas las fuentes más importantes para la obtención de sustancias con actividad antifúngica fueron especies de *Streptomyces*, algunos hongos y productos de síntesis orgánica; sin embargo, las plantas superiores han mostrado ser promisorias y múltiples trabajos en casi todo el mundo han dado resultados alentadores en este sentido no sólo con los extractos totales sino también con los aceites esenciales (Wuart *et al.* 2004).

Los resultados de la presente investigación mostraron que

los extractos metanólicos *Piper ecuadorensis*, *Niphogeton dissecta*, *Lepechinia mutica* y *Fuschia ayavacensis*, inhiben el crecimiento de los dermatofitos *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*. Se observó que *Piper ecuadorensis* tuvo mayor efecto antifúngico contra *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* con una CMI de 31,25-62,5 ug/mL respectivamente. En lo que respecta al porcentaje de inhibición se observó que en las dosis empleadas indujo un efecto antifúngico positivo frente a los dermatofitos, efecto que se manifestó a la dosis más alta inhibiendo el 100% del crecimiento.

Según lo reportado por Flores *et al.* (2000) donde se evaluó la actividad de 4 especies del género *Piper* (*P. hispidum*, *Piper sp.*, *P. aduncum*, *P. elongatum*) frente a los dermatofitos *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*, se encontró actividad inhibitoria selectiva de estas especies contra ambos hongos a una concentración de 625ug/ml para *T. mentagrophytes* y de 2500ug/ml para *T. rubrum*. En este género se han reportado varios compuestos antifúngicos como: hidroquinonas preniladas y sakuretina, canfor, monoterpenos y flavonoides que son los responsables de la actividad biológica (Danelutte *et al.* 2003, Navickiene *et al.* 2000). Estos datos apoyan los resultados obtenidos en nuestro estudio y nos dan además una importante información sobre los posibles compuestos que podrían tener las especies estudiadas lo cual puede servir de guía para estudios posteriores para realizar el fraccionamiento, aislamiento e identificación de los compuestos bioactivos localizados.

El extracto de la especie *Niphogeton dissecta* también mostró un efecto inhibitorio significativo frente a los dermatofitos, siendo más sensible el *T. rubrum* con una CMI de 31,25ug/ml y un porcentaje de inhibición del 100% en la dosis más alta probada en la prueba de crecimiento micelar; y contra *T. mentagrophytes* una CMI de 125ug/ml y un porcentaje de inhibición del 96,53%; esto podría tener importancia clínica por ser la cepas más comunes en la producción de lesiones micóticas en piel, y representan entre el 80-90% de todas las infecciones crónicas y recurrentes

(Arenas 2000, Torres *et al.* 2003). Por ello, es necesario desarrollar moléculas antifúngicas más potentes.

En cuanto a los resultados obtenidos para la especie *Lepechinia mutica* se determinó actividad antifúngica moderada frente a los dermatofitos *T. mentagrophytes* y *T. rubrum* con una CMI de 125ug/ml y un efecto significativo para la dosis más alta inhibiendo el 78% y 76% respectivamente. Los resultados obtenidos son importantes dado que podría tener un uso potencial en infecciones causadas por este tipo de microorganismos, no se ha reportado información de esta especie endémica pero si de este género que poseen actividad antimicrobiana encontrada en ciertas especies como *L. hastata*, *L. meyenii*. Estas propiedades biológicas han sido atribuidas a la presencia flavonoides, taninos, terpenos que le proporciona a la especie sus características medicinales para el tratamiento de enfermedades infecciosas (Rossi *et al.* 2002).

La especie *F. ayavacensis* se mostró menos activa contra los dermatofitos inhibiendo el 50% del crecimiento micelar para la concentración de 1000ug/ml y una CMI 250ug/ml para ambos hongos. Al parecer la actividad biológica de esta especie está relacionada con la presencia de compuestos fenólicos, taninos, glucósidos los cuales pueden intervenir en la inhibición del crecimiento micelar (Gusinde 2002).

Finalmente podemos decir que el presente estudio confirmó la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos evaluados, estos efectos podrían explicar el uso tradicional empírico en algunos procesos infecciosos, algunos involucrados en infecciones bacterianas y micóticas enfatizando la importancia de la investigación etnofarmacológica en búsqueda de nuevos compuestos bioactivos.

Capítulo VI: Conclusiones y Recomendaciones

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.2 Conclusiones

- Las especies vegetales *Lepechinia mutica*, *Piper ecuadorensis*, *Niphogeton dissecta* y *Fuschia ayavacensis* pueden constituirse una fuente de principios activos que contribuyan al descubrimiento de antimicrobianos de origen natural los cuales pueden ser utilizados como una línea de base para la síntesis de moléculas útiles a nivel farmacéutico.
- La especie *Lepechinia mutica* presentó actividad inhibitoria antimicrobiana contra la mayor parte de los microorganismos seleccionados, confirmando así su efectividad para inhibir el crecimiento bacteriano y fúngico.
- Las especies *Piper ecuadorensis* y *Niphogeton dissecta* se identificaron como especies promisorias con un alto potencial antifúngico contra *T. mentagrophytes* y *T. rubrum* inhibiendo en su totalidad el crecimiento micelar los cuales pueden ser empleados como agentes fúngicos.
- El extracto de la especie *Fuschia ayavacensis* fue la que se mostró menos activo contra la mayor parte de los microorganismos evaluados.
- El estudio realizado permitió conocer algunas de las potencialidades del uso de las especies vegetales presentes en los ecosistemas de la Región Sur del Ecuador contribuyendo así al conocimiento de las mismas y apoyando de esta manera al desarrollo de investigación científica en plantas medicinales.

6.1 Recomendaciones

- Continuar con el estudio de las especies vegetales *Piper ecuadorensis*, *Lepechinia mutica* que fueron más activas mediante aislamiento biodirigido a fin de identificar los compuestos responsables de la inhibición bacteriana y fúngica mediante los ensayos empleados.
- Debido a la gran aplicabilidad etnomédica de las cuatro especies en el tratamiento de muchas afecciones se debería continuar con su estudio utilizando otros sistemas de evaluación *in vitro* a fin de confirmar su actividad antimicrobiana mediante mecanismos de acciones alternativas.
- Estudiar nuevas especies vegetales que desde la perspectiva etnomédica han demostrado tener propiedades antimicrobianas a fin de potenciar el aprovechamiento sustentable de los recursos naturales en beneficio de la salud y el bienestar de la población.

BIBLIOGRAFIA

- **Arenas R.**, (2000). Dermatofitosis. Rev. Iberoam. Micol. 19:63 -67.
- **Bauer A., et al.** (1966). Antibiotic susceptibility by standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 45 (4): 493-96.
- **Barreto, B.J.** (1997). Efectos antimicrobianos del diente de león (*Taxacum officinale*) y el gualanday (*Jacaranda obtusifolia*) sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa* causantes de enfermedades de la piel. Carrera de Bacteriología. Pontifica Universidad Javeriana. Trabajo de Pregrado. Bogota D. C. Pag. 9, 23-29.
- **Bergstrom C., et al.** (2004). "Ecological theory suggests that antimicrobial cycling will not reduce antimicrobial resistance in hospitals". Proc Natl Acad Sci USA 101 (36): 13:285-90.
- **Cáceres A., et al.** (1996). Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. 1ª. Edición. Guatemala, Guatemala. Editorial Universitaria. pp. 27-33.
- **Castro I.** (2006). Actualidad de la Medicina Tradicional Herbolaria. Editorial. Rev Cubana Plant Med. 2006;11(2).
- **Carrillo, A., Brió, S., Quindós, G.** (2001). Una nueva generación de fármacos antifúngicos. Rev. Iberoam. Micol. 18:2-5.
- **Cos et al.** (2006). "Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro proof-of-concept". Ethnopharmacology 106:290-302.
- **Cowan, M.** (1999). "Plant Products as Antimicrobial Agents". Clinical Microbiology Reviews 12(4): 564-582.
- **Cordiés, L., Machado, L y Hamilton, M.** (1998). Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. Acta Med. 8(1):13-27.
- **Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G.** (2000). "Natural Products (Secondary Metabolites)". En: Buchanan, Grissem, Jones (editores). Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland, Estados Unidos. Capítulo 24.

- **Cuellar A., Rojas N.** (1990). Nueva estructura antimicrobiana del propóleo colectado en Cuba. *Rev. Cub. Farm.*, 24(1): p.51-58.
- **Danelutte A., Lago J., Young M., Kato M.**, (2003). Antifungal flavonones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervum* Kunth. *Phytochemistry*. 2003; 64: 555-559.
- **Debnam A., Jackson C., Avellaneda G., Barrett J., y Hofacre C.**, (2005). Effect of growth promotant usage on *enterococci* species on a poultry farm. *Av Dis*. 49(3): 361-65.
- **Drobnic L.** (2002). Principios generales del tratamiento antibiótico, En: *Tratamiento Antimicrobiano*, Madrid: Emisa; 639-650.
- **Encarnación R.**, (1996). *Medicina Tradicional y Popular de Baja California del Sur*. Universidad Nacional Autónoma de México. 250pp.
- **Encarnación R., et al.** (2000). Minimum antimicrobial inhibitory concentration of carnosol and of the ethanol extract from *Lepechinia hastate*. *Phytomedicine*, 5: 301-305.
- **Fisher, F., Cook, N.B.** (2001). *Micología: Fundamentos y diagnóstico*, Rio de Janeiro: revinter.
- **Flores K., et al.** (2000) Estudio Fitoquímico de especies del Género *Piper* con actividad antifúngica y/o Leishmanicida *in vitro*. *Revista IIFB*, pag.
- **Gale, G. Kiser, J.** (2006). *Antibiotic Resistance Theory and Practice*. Trans. N. Y. Academy of Scientific Serology. II, 29: 960-968.
- **García D., et al.** (2006) "Evaluación antimicrobiana de los extractos metanólicos de *Ficus carica* y hexánico de *Jatropha dioica* sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* y *Candida albicans*" Tesis PROVERICYT San Nicolás de los Garza NL. Pp 1-9.
- **Gavilán M., Martín F., Sánchez B.** (2004) Recomendaciones para el tratamiento de las enfermedades infecciosas. En: *Eficacia in vivo, Eficacia in vitro*. Madrid-Barcelona. ed Doyma S.A. 1997; 97-111.

- **Gräser, Y., de Hoog, GS., Kuijpers, A.F.A.** (2000). Recent advances in the molecular taxonomy of dermatophytes. *Rev. Iberoam. Micol.* 17:19-23.
- **Gusinde, M.** (2002). *Plantas medicinales que los indios araucanos recomiendan.* Anthropos, Vol. XXXI, pág. 561.
- **Hernández D. L., M. Rodríguez.** (2001). Actividad antimicrobiana de plantas de cuba. *Rev. Cubana plant med.* (2): 44-27.
- **Kalemba D., Kunicka A.** (2003). Antibacterial and Antifungal properteis of Essential Pils. *Curent medicinal Chemistry.* Poland, 10 pág 813-829.
- **Kane J, Summerbell R, Sigler L, Krajden S, Land G.** (1997). *Laboratory handbook of dermatophytes: a clinical guide and laboratory handbook of dermatophytes and other filamentous fungi from skin, hair, and nails.* Star Publishing Co, Belmont.
- **Lacaz, C.S. et al.** (2002). *Tratado de Microbiologia Medica,* Sarvier: San Paulo.
- **López Y.** (1995). Determinación de los fitoconstituyentes de las hojas de *Piper angustifolium* L. "matico" ensayo de la actividad antihemorrágica de sus extractos en *Oryctolagus cuniculus.* Tesis Bach. Farmacia Universidad Nacional de Trujillo - Perú
- **Manrique E., Mosquera O.** (1997). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos y fracciones obtenidas a partir de *Espeltia murilloi* *cuatr.* Carrera Bacteriológica. Pontificia UJ. Trabajo de pregrado. Bogotá pág. 15-16.
- **Márquez R., et al.** (2007) "Actividad antifúngica del extracto total de las hojas frescas de *Pedilanthus Tithymaloides* Poit (Untimorrial)" *Scientia Et Tecnica,* abril, ano/vol.XIII. Colombia pp155-159.
- **Mesa G, Rodríguez I, Teja J.** (2004). Las enfermedades emergentes y reemergentes: un problema de salud en las Américas. *Rev Panam Salud Pública;*15(4):285-7.
- **Mims, C., et al.** (1999). *Microbiologia Médica,* 2ed. Manole: Saõ Paulo.
- **Mongeli, E., Pomilio, A.** (2002). Nuevos Medicamentos y etnomedicina del uso popular a la industria. *Revista de*

divulgación científica y tecnología de la asociación ciencia hoy; 12: 2-3.

- **National Committee for Clinical Laboratory Standards. CLSI.** (2006). Performance standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard- Ninth Edition. M2-A9: National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- **Navickiene HM, et al.** (2000). Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*; 55(6):621-6.
- **Nimrichter L, Rodrigues ML, Rodrigues E.** (2005). The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall. *Microbes Infect*; 7: 789-798.
- **Organización Mundial de la Salud.** Reporte anual de salud. Disponible en: <http://www.who.int/>. Consultado Enero 3, 2007.
- **Payne, D.** (2004). Antimicrobials –where next? *Microbiology today*, 31:55-57.
- **Pazos C., Moragues M., Quindós G., Pontón J,** (2006). Diagnostic potential of detection of (1-3)- β -D-glucan and antibodies to *Candida albicans* germ tubes for diagnosis and therapeutic monitoring of invasive candidiasis in neutropenic adult patients. *Rev Iberoam Micol.*; 23: 209-215.
- **Pellecuer, S., et al.** (2002). Huiles Essentielles Bactericidas et Fongicides. *Revue de l'Institute Pasteur de Lyon.* 9:135-159.
- **Peñaranda L., et al.** (2003). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de partes aéreas de las especies *Bursera Simanba* y *Bursera Graveolans* contra algunos microorganismos patógenos. Facultad Ciencias Básicas. Pontificia UJ. Trabajo de Pregrado, Bogota pag.50-68.
- **Ríos, J.L., et al.** (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity. *J. Ethnofarmacol.* 28: 127-149.
- **Richardson, A.R., Libby, S.J., Fang, F.C.** (2008). A nitric oxide-inducible lactate dehydrogenase enables *Staphylococcus aureus* to resist innate immunity. *Science.* 319 (5870):1672-6.

- **Roth BL, Poot M, Yue ST, Millard PJ.** (2002). Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with Sytox green nucleic acid stain. *App Environm Microbiol.* 1997;63:2421-31.
- **Rossi C., Arias G y Lozano N.** (2002). Evaluación Antimicrobiana y Fitoquímica de *Lepechinia meyeri* Walp "Salvia". *Ciencia e Investigación.* Vol.5 (1).
- **Rubio MC, Rezusta A, Gill J, Ruesca RB.** (1999). Perspectiva micológica de los dermatofitos en el ser humano. *Rev. Iberoam. Micol.* 1999. 16:16-22.
- **Ryan, K. J.** (1994). *Sherris Medical Microbiology: An Infectious Diseases.* Appleton and Lange: Stamford.
- **Schaechter, M., et al.** (2002) *Microbiologia: Mecanismos das Doenças Infecciosas*, 3ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro.
- **Sáenz, D.** (2003). Medicamentos + Plantas medicinales. *Fármacos.* Vol 16 (1 y 2): 13 – 18..
- **Silva, C.** (1999). *Bacteriologia: um texto ilustrado.* Eventos: Rio de Janeiro..
- **Tavares, W.** (1999). *Manual de Antibioticos e Quimioterapeuticos Antitifecciosos*, 2ed. Atheneu: San paulo,.792p.
- **Trabulsi, L.R., et al.** (1999). *Microbiologia*, 3ed. Atheneu: Saõ Paulo.
- **Torres J, Madrenys N, Urrea A.** (2003).Terbinafina por vía oral en el tratamiento de la tinea unguium de los pies. Eficacia entre 12 y 14 semanas de tratamiento. *Rev. Iberoam. Micol.*, 15:160–162.
- **Tuttolomondo M.,** (2005) Actividad antimicrobiana y antiviral de especies autóctonas de la flora Argentina. *Rev Cubana Plan Med.* (Suplemento especial).
- **Vogel, H., et al.** (2004). Antioxidant properties and TLC characterization of four Chilean Haplopapps-species know as bailahuen. *Repositorio Académico de la Universidad de Chile*, 2005. 97(97-100).
- **Wiat C., Mogana S., Califa S.** (2004). Antimicrobial screening of plants used for traditional medicine in the state of Perak, Peninsular Malaysia. *Fitoterapia*, 75:68-73.

- **Williams, C.A. y Grayer, R.J.** (2004). "Anthocyanins and other flavonoids". Nat. Prod. Rep. 21: 539-573.
- **World Health Organization.** Scaling up the response to infectious diseases. Geneva: WHO. 2001. Disponible en <http://www.who.int/infectious-diseasereport/2002>.
- www.zipcodezoo.com/Plants/L/Lepechinia_mutica/
- www.zipcodezoo.com/Plants/N/Niphogeton_dissectus/
- **Yamada, H., et al.** (2000) rapid and Highly reproducible method for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* species. Journal of clinical Microbiology, v.31,n.4,p.1009.
- **Yarseny R.** (2005) "Determinacion de la actividad biocida del extracto etanolico y sus particiones (hexanica, cloroformica, acetate de estilo y acuosa) de hojas de *Cornutia pyramidata* L. (Jorobté)" Universidad de San Carlos de Guatemala 56pp.
- **Zin J.,** (1958). *La salud por medio de las plantas medicinales*. Ed. Freeland, Bs. As., pág. 220
- **Zurita, J. (2001).** Red Nacional de Vigilancia de Resistencia bacteriana. Ecuador. Boletín de la Red. Informe N°.1.