



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**  
*La Universidad Católica de Loja*

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**TEMA:**

**“Aplicación de Métodos Bioautográficos para la identificación de compuestos antimicrobianos en extractos totales de cuatro especies vegetales de las Provincias de Loja y Zamora Chinchipe: *Piper* sp., *Piper ecuadorensis* (Matico), *Lepechinia mutica* Benth (Turuyante) y *Niphogeton dissecta* (Culantrillo del cerro)”.**

*Tesis de Grado Previa a la  
obtención del título de  
Bioquímica Farmacéutica*

**AUTORA:**

Diana Carolina Palacios Chamba.

**DIRECTOR DE TESIS:**

Bioq Farm. Luis Emilio Cartuche Flores.

Loja- Ecuador

2009

## CERTIFICACIÓN DE APROBACIÓN

Loja, 13 de Noviembre del 2009

Bioq. Farm. Luis E. Cartuche F.

### INSTITUTO DE QUÍMICA APLICADA

Dejo constancia de haber revisado y estar de acuerdo con el Proyecto de fin de carrera, titulado: **“Aplicación de Métodos Bioautográficos para la identificación de compuestos antimicrobianos en extractos totales de cuatro especies vegetales de las Provincias de Loja y Zamora Chinchipe: *Piper sp.*, *Piper ecuadorensis* (Matico), *Lepechinia mutica* Benth (Turuyante) y *Niphogeton dissecta* (Culantrillo del cerro)”**, presentado por la Srta. Diana Carolina Palacios Chamba.

Particular que comunico para los fines legales pertinentes.

-----  
Nombres y Apellidos  
(DIRECTOR DE TESIS)

-----  
Firma  
(DIRECTOR DE TESIS)

## **AUTORÍA**

Los conceptos, y análisis emitidos en el presente trabajo de investigación, así como, los resultados, discusiones y conclusiones son responsabilidad directa de la autora.

-----  
Diana Carolina Palacios Chamba.

## DEDICATORIA

*Con mucho cariño dedico este trabajo a mis padres: Rolando y Gloria por el apoyo incondicional que me han brindado para realizar mis estudios, a mis hermanas: Gloria, Mónica y Betty por sus consejos los cuales me ayudan a crecer y ser una mejor persona y a todas mis amigas y amigos que han estado junto a mí a lo largo de mi carrera enseñándome que todos tenemos algo muy importante que ofrecernos unos a otros.*

## AGRADECIMIENTOS

*A Dios por haberme dado la sabiduría para cumplir con este reto.*

*A mis padres y hermanas por su apoyo incondicional e invaluable.*

*A la Universidad Técnica Particular de Loja y a todos mis maestros por haberme impartido sus conocimientos para mi formación profesional.*

*Al BF. Luis Cartuche por su valiosa dirección y asesoría en el desarrollo de esta investigación.*

*Agradezco de manera especial a la Planta de Productos Naturales del Instituto de Química Aplicada, por permitir el desarrollo de este proyecto, el acceso al material y equipos del laboratorio.*

*A todas las personas que hacen parte del laboratorio de Productos Naturales especialmente a mis compañeros que en determinado momento me ayudaron en la realización de esta investigación.*

*Finalmente agradezco a todas las personas cuyos nombres resultan largo enumerarlos y que de una y otra manera me impulsaron en el desarrollo de este trabajo.*

*A todos mil y mil gracias por confiar en mí.*

## **CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHOS**

Yo, Diana Carolina Palacios Chamba declaro conocer y aceptar la disposición del artículo 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 investigadores, trabajos científicos o técnicos o tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

-----  
Diana Carolina Palacios  
Tesisista

-----  
BF. Luis Cartuche  
Director de Tesis

## INDICE DE CONTENIDOS

Certificación.	II
Autoría.	III
Dedicatoria.	IV
Agradecimiento.	V
Cesión de derechos.	VI
Contenidos.	VII
Resumen.	XII
Abstract.	XIII

### CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN.	1
------------------	---

### CAPÍTULO II

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	4
2.1. Plantas Medicinales y Medicina Tradicional.	4
2.2. Metabolitos Secundarios.	4
2.3. Clasificación de los Metabolitos Secundarios.	5
2.3.1. Terpenoides.	7
2.3.2. Compuestos fenólicos.	7
2.3.3. Compuestos nitrogenados o Alcaloides.	7
2.4. Extractos vegetales.	9
2.4.1. Características de los extractos.	9
2.4.2. Usos de los Extractos.	10
2.5. Especies Vegetales de Estudio.	10
2.5.1. <i>Piper</i> sp.	11
2.5.2. <i>Piper ecuadorensis</i> Sodiroi.	11
2.5.3. <i>Lepechinia mutica</i> Benth.	12
2.5.4. <i>Niphogeton dissecta</i> Benth.	13
2.6. Enfermedades infecciosas.	13
2.6.1. Resistencia Bacteriana.	14
2.6.2. Mecanismos de Resistencia.	14
2.7. Microorganismos Patógenos.	16
2.7.1. Bacterias.	16
2.7.2. Clasificación de las Bacterias.	17
2.7.2.1. Por la Forma.	17

2.7.2.2. Clasificación Taxonómica.	17
2.7.2.3. De acuerdo con la constitución de la pared.	18
2.7.3. Hongos.	19
2.7.3.1. Estructura.	19
2.7.3.2. Reproducción.	19
2.7.4. Dermatofitos.	20
2.8. Microorganismos utilizados en la evaluación antimicrobiana.	23
2.8.1. Bacterias Gram- positivas.	23
2.8.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .	23
2.8.1.2. <i>Enterococcus faecalis</i> .	23
2.8.2. Bacterias Gram- negativas.	25
2.8.2.1. <i>Proteus vulgaris</i> .	25
2.8.3. Dermatofitos.	25
2.8.3.1. <i>Trichophyton rubrum</i> .	25
2.8.3.2. <i>Trichophyton mentagrophytes</i> .	26
2.9. Tratamiento de las Enfermedades Infecciosas.	26
2.9.1. Antimicrobianos.	26
2.9.2. Principios antimicrobianos Provenientes de Plantas.	27
2.10. Métodos de Evaluación Antimicrobiana.	28
2.10.1. Bioautografía.	28
2.10.2. Ventajas y desventajas de la Bioautografía.	30

### **CAPÍTULO III**

<b>3. OBJETIVOS.</b>	<b>33</b>
3.1. Objetivo General.	33
3.2. Objetivos específicos.	33
3.3. Fin del Proyecto.	33
3.4. Propósito del Proyecto.	34
3.5. Componentes del Proyecto.	34
3.6. Hipótesis del Proyecto.	34
3.7. Análisis e Interpretación de Datos.	34

## CAPÍTULO IV

<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>36</b>
4.1. Localización.	36
4.2. Recolección de la materia vegetal.	36
4.3. Tratamiento del Material vegetal.	37
4.4. Obtención de los extractos.	37
4.4.1. Extracto metanólico.	38
4.4.2. Obtención del extracto de <i>Lepechinia mutica</i> Benth.	38
4.5. Microorganismos de Prueba.	39
4.5.1. Bacterias.	40
4.5.2. Hongos Dermatofitos.	40
4.6. Evaluación de los Extractos.	40
4.6.1. Preparación de los Extractos.	40
4.6.2. Cromatografía de Capa Fina (CCF).	40
4.6.3. Bioautografía de Inmersión (Agar Overlay).	42
4.6.3.1. Principio.	42
4.6.3.2. Preparación del cultivo microbiano (Cultivo Overnight).	42
4.6.3.3. Procedimiento: Bacterias.	42
4.6.3.4. Procedimiento: Hongos.	43
4.6.4. Controles	43

## CAPITULO V

<b>5. RESULTADOS.</b>	<b>46</b>
5.1. Bioautogramas de <i>Lepechinia mutica</i> Benth (Turuyante).	46
5.2. Bioautogramas de <i>Piper</i> sp.	49
5.3. Bioautogramas de <i>Piper ecuadorensis</i> (Matico).	51
5.4. Bioautogramas de <i>Nipogheton dissecta</i> (Culantrillo de cerro).	52

## CAPITULO VI

<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>56</b>
---------------------	-----------

## CAPITULO VII

7.	CONCLUSIONES. Y RECOMENDACIONES.	61
7.1.	Conclusiones.	61
7.2.	Recomendaciones.	62
8.	BIBLIOGRAFÍA.	63

## INDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1.</b>	Vías Generales del Metabolismo Secundario de las Plantas.	6
<b>Fig. 2.</b>	Rutas Biosintéticas y Metabolitos Secundarios.	8
<b>Fig. 3.</b>	Fotografía de <i>Piper</i> sp.	11
<b>Fig. 4.</b>	Fotografía de <i>Piper ecuadorensis</i> Sodiroi.	11
<b>Fig. 5.</b>	Fotografía de <i>Lepechinia mutica</i> Benth.	12
<b>Fig. 6.</b>	Fotografía de <i>Nipogheton dissecta</i> Benth.	13
<b>Fig. 7.</b>	Mecanismos de Resistencia Bacteriana.	15
<b>Fig. 8.</b>	Anatomía de una bacteria sencilla.	17
<b>Fig. 9.</b>	Estructura de las envolturas de Bacterias Gram + y Gram -.	18
<b>Fig.10.</b>	Estructura morfológica de los diferentes tipos de géneros dermatofitos.	22
<b>Fig.11.</b>	Estructura morfológica de las bacterias gram-positivas: a) <i>S.aureus</i> b) <i>E. Faecalis</i> .	24
<b>Fig.12.</b>	Estructura morfológica de <i>Proteus vulgaris</i> .	25
<b>Fig.13.</b>	Dermatofitos: a) <i>T. rubrum</i> ; b) <i>T. mentagrophytes</i> .	26
<b>Fig.14.</b>	Área de recolección de las especies vegetales.	37
<b>Fig.15.</b>	Esquema para la obtención de los extractos vegetales.	39
<b>Fig.16.</b>	TLC Directa de: a) <i>L mutica</i> , b) <i>N dissecta</i> , c) <i>Piper</i> sp., d) <i>P ecuadorensis</i> .	41
<b>Fig.17.</b>	Esquema del Procedimiento de Bioautografía.	44
<b>Fig.18.</b>	<i>L. mutica</i> frente a <i>S. aureus</i> : a) 10 uL, b) 5 uL, c) 2 uL, d) 1 uL, e y f) Gentamicina: 10, 5, 2, 1 uL.	47
<b>Fig.19.</b>	<i>L. mutica</i> frente a <i>P. vulgaris</i> a) 10 uL, b) 5 uL, c) 2 uL, d) 1 uL, e y f) Gentamicina: 10, 5, 2, 1 uL.	47
<b>Fig.20.</b>	<i>L. mutica</i> frente a <i>T. mentagrophytes</i> a) 10 uL, b) 5 uL, c) 2 uL, d) 1 uL, e y f) Itraconazol: 10, 5, 2, 1 uL.	48

<b>Fig.21.</b> <i>L. mutica</i> frente a <i>T. rubrum</i> a) 10 $\mu$ L, b) 5 $\mu$ L, c) 2 $\mu$ L, d) 1 $\mu$ L, e) y f) control Itraconazol: 10, 5, 2, 1 $\mu$ L.	49
<b>Fig.22.</b> <i>Piper</i> sp., frente a <i>S. aureus</i> a) 10 $\mu$ L, b) 5 $\mu$ L. Control: Gentamicina: c) 10, 5 $\mu$ L.	50
<b>Fig.23.</b> <i>Piper</i> sp., frente a <i>E. faecalis</i> : a) 10 $\mu$ L, b) 5 $\mu$ L. Control: Ampicilina: c) 10, 5 $\mu$ L.	50
<b>Fig. 24.</b> <i>Piper ecuadorensis</i> frente a <i>T. mentagrophytes</i> a) 10 $\mu$ L, b) 5 $\mu$ L, c) 2 $\mu$ L, d) 1 $\mu$ L, e-f) Itraconazol:10, 5, 2,1 $\mu$ L.	52
<b>Fig. 25.</b> <i>Piper ecuadorensis</i> frente a <i>T. rubrum</i> : a) 10 $\mu$ L, b) 5 $\mu$ L, c) 2 $\mu$ L, d) 1 $\mu$ L, e y f) Itraconazol: 10, 5, 2, 1 $\mu$ L.	52
<b>Fig. 26.</b> <i>Niphogeton dissecta</i> frente a <i>T. mentagrophytes</i> : a) 10 $\mu$ L, b) 5 $\mu$ L, control Itraconazol: c) 10, 5, d) 2, 1 $\mu$ L.	53
<b>Fig. 27.</b> <i>Niphogeton dissecta</i> frente a <i>T. rubrum</i> : a) 10 $\mu$ L, b) 5 $\mu$ L, c) 2 $\mu$ L control Itraconazol: c) 10, 5, d) 2, 1 $\mu$ L.	54

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de los dermatofitos según su nicho ecológico.	21
<b>Tabla 2.</b> Lugares de recolección del material vegetal.	36
<b>Tabla 3.</b> Especies, Parte a evaluar y Extractos a Evaluar.	38
<b>Tabla 4.</b> Fases móviles utilizadas para cada extracto.	41
<b>Tabla 5.</b> Microorganismos utilizados en las pruebas y sus respectivos medios de cultivo y condiciones de incubación.	43
<b>Tabla 6.</b> Controles utilizados en las pruebas antimicrobianas para cada microorganismo.	44
<b>Tabla 7.</b> Resultados Antibacterianos: Concentración mínima requerida de los extractos para inhibir el crecimiento antibacteriano sobre placas de silica gel 60 F <sub>254</sub> de las concentraciones empleadas	51
<b>Tabla 8.</b> Resultados Antifúngicos: Concentración mínima requerida de los extractos para inhibir el crecimiento Antifúngico sobre placas de silica gel 60 F <sub>254</sub>	54

## RESUMEN

En el presente trabajo, se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos de cuatro especies vegetales: *Piper* sp., *Piper ecuadorensis*, *Lepechinia mutica* Benth, y *Niphogeton dissecta*, conocidas en la medicina tradicional por sus propiedades terapéuticas en el tratamiento de afecciones respiratorias, trastornos digestivos, antiinflamatorios, expectorantes, etc.

Se aplicó la técnica de Bioautografía en Agar Overlay la cual permite la localización de compuestos con actividad biológica sobre placas de Cromatografía de Capa Fina. En la determinación de la actividad antibacteriana se utilizaron las cepas bacterianas de: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Proteus vulgaris*, evaluándose frente a cada una de ellas los extractos de *L. mutica* y *Piper* sp., a las concentraciones de 200/10, 100/5, 40/2, 20/1 ug/uL. En las mismas condiciones se evaluó la actividad antifúngica de *L. mutica*, *P. ecuadorensis* y *N. dissecta* frente a los dermatofitos *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*. Los resultados se expresan mediante la visualización de zonas de inhibición alrededor del compuesto activo el cual se localizó según el Rf en los cromatogramas. Además se determinó la capacidad de inhibición del extracto mínima que fue de 1 uL.

La especie que presentó mayor actividad fue *L. mutica* (Rf 0,8) frente a *S. aureus*, *P. vulgaris*, *T. mentagrophytes* y *T. rubrum* hasta 1 uL, seguido por *P. ecuadorensis* (Rf 0,6; 0,7) frente a *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* hasta 1 uL; *Piper* sp., mostro actividad intermedia (Rf 0,7), frente a *S. aureus* y *E. faecalis* hasta 5 uL y *N. dissecta* (Rf 0,6), se presento activo hasta 5 uL frente a *T. mentagrophytes* y hasta 2 uL contra *T. rubrum*. Los resultados obtenidos nos brindan la oportunidad de encontrar nuevos agentes activos desde el punto de vista farmacológico, a partir de una fuente de materia prima natural como lo son las plantas medicinales.

**Palabras claves:** Bioautografía, Cromatografía de Capa Fina, dermatofitos, Rf.

## ABSTRACT

In this study, we evaluated the antimicrobial activity of methanolic extracts of four plant species: *Piper* sp., *Piper ecuadorensis*, *Lepechinia mutica* Benth, and *Niphogeton dissecta*, known in traditional medicine for their therapeutic properties in the treatment of respiratory disorders, digestive disorders, anti-inflammatory, expectorant, and so on.

Agar Overlay Bioautography technique was applied, which allows the location of compounds with biological activity on plates of thin layer chromatography. In order to determine the antibacterial activity, the bacterial strains *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Proteus vulgaris* were assessed against each one of the extracts of *L. mutica* and *Piper* sp., at concentrations of 200/10, 100/5, 40/2, 20/1 ug/ $\mu$ L. Under the same conditions the extracts of *L. mutica*, *P. ecuadorensis* and *N. dissecta* were evaluated against dermatophytes *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. The results are expressed by displaying inhibition zones around the active compound which is located under the Rf on the chromatograms. Besides determining the activity minimum of inhibition of the extracts was 1  $\mu$ L.

The species with the highest activity were *L. mutica* (Rf 0.8) against *S. aureus*, *P. vulgaris*, *T. mentagrophytes* and *T. rubrum* with a minimal dose of 1  $\mu$ L, followed by *P. ecuadorensis* (Rf 0.6, 0.7) with a minimal dose of 1  $\mu$ L against *T. rubrum* and *T. Mentagrophytes* while as *Piper* sp., (Rf 0.7) showed intermediate activity, against *S. aureus* and *E. Faecalis* until dose of 5  $\mu$ L. The specie *N. dissecta* (Rf 0.6), showed activity in the dose of 5  $\mu$ L against *T. mentagrophytes* and 2  $\mu$ L to *T. rubrum*. Our findings provide an opportunity to find new active agents from the pharmacological standpoint, from a natural source such as medicinal plants.

**Keywords:** Bioatographic agar overlay method, thin layer chromatography, dermatophytes, Rf.

# Capítulo I

## **1. INTRODUCCIÓN**

Desde tiempos remotos el hombre se ha valido de las plantas para satisfacer sus necesidades más elementales y, dentro de sus propiedades para curar sus dolencias y enfermedades (Baquero., *et al.* 2007).

A pesar del tiempo transcurrido y los adelantos en la esfera de la Química Orgánica y el desarrollo alcanzado en la industria farmacéutica, el hombre continúa por diversas razones, valiéndose de los beneficios que le proporcionan las plantas del entorno en el que se encuentra, independiente de su ubicación geográfica, de su grado de desarrollo cultural y económico (Bussmann y Sharon. 2006).

De acuerdo con las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 80 por ciento de la población de los países en desarrollo dependen de sistemas tradicionales de curación como principal fuente de atención de la salud (Barthlott *et al.* 1995; Bussmann y Sharon. 2006).

En los países andinos de América del Sur, como Ecuador la medicina tradicional desempeña un importante papel en la atención de la salud de las comunidades indígenas, de hecho esta zona, constituye uno de los pocos lugares del planeta donde aún es posible descubrir y describir plantas vasculares nuevas para la ciencia, debido, a que es uno de los países con mayor biodiversidad por Km<sup>2</sup> del mundo (Cerón. 2002). En las provincias de Loja y Zamora se han reportado más de 3000 y 2000 especies respectivamente, que representan el 36% del total de las especies del Ecuador (Myers *et al.* 2000; Ordoñez *et al.* 2006; Richter *et al.* 2005).

En la actualidad el panorama de las enfermedades infecciosas es muy preocupante debido a la aparición de cepas multiresistentes a los agentes quimioterapéuticos utilizados comúnmente para tratar estas enfermedades, por esta razón es urgente el descubrimiento y desarrollo de nuevas sustancias antimicrobianas para combatir de manera más efectiva a dichos agentes infecciosos y sus formas resistentes. Para esto las plantas han demostrado ser un enorme

reservorio a partir del cual se han encontrado una gran diversidad de sustancias antimicrobianas que pueden servir para el desarrollo de nuevos medicamentos (Couvalin. 1988; Elliot. 1999; Gesta. 1997).

Desde el centro de investigación de la Planta de Productos Naturales del Instituto de Química Aplicada de la Universidad Técnica Particular de Loja, se ha realizado el proyecto de "Determinación de actividad antimicrobiana de Plantas medicinales del Sur del Ecuador" con el fin de afianzar el estudio de especies vegetales con actividad biológica, que nos permitan buscar nuevos compuestos activos con posible aplicación terapéutica en enfermedades infecciosas.

Para el desarrollo de la presente investigación se han considerado cuatro especies vegetales de la Provincia de Loja y Zamora, las mismas que son muy apreciadas por los lugareños de cada zona debido a sus propiedades terapéuticas. Las especies seleccionadas son: *Piper* sp., *Piper ecuadorensis* de la familia PIPERACEAE; *Lepechinia mutica* Benth (Turuyante) de la familia LAMIACEAE y *Niphogeton dissecta* de la familia APIACEAE. Según la bibliografía consultada se ha encontrado que cada una de estas especies posee compuestos con actividad antimicrobiana, entre los que tenemos a los flavonoides (Crisina), taninos, cumarinas, aceites esenciales, terpenoides (Capsaicina), alcaloides (piperina), entre otros (Baquero *et al.* 2007; Mongeli y Pomilio. 2002).

Actualmente se han desarrollado varios métodos para determinar actividad antimicrobiana en especies vegetales, entre los cuales se encuentra la bioautografía que es una técnica de laboratorio que permite detectar sustancias con actividad biológica en mezclas complejas (Choma. 2005; Marston. 2002). Esta técnica es muy útil en la realización de esta investigación ya que proporciona información rápida sobre la actividad biológica de los extractos vegetales y su localización (Hostettmann. 1999; Nostro. 2000).

## Capítulo II

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.**

### **2.1. Plantas Medicinales y Medicina Tradicional.**

En el contexto Latinoamericano y de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), al hacer referencia a la medicina tradicional, se incluye la medicación a base de materiales elaborados con hierbas que contienen ingredientes activos de plantas u otros materiales vegetales solos o combinados (Bussmann y Sharon. 2006; Dorman y Deans. 2000).

Las plantas contienen múltiples componentes químicos que se pueden tipificar como activos porque provocan diversos efectos o respuestas en el organismo, el perfil que los describe es referido como actividad biológica. En el contexto del uso tradicional de plantas medicinales, en general se propone que la actividad deriva de las combinaciones químicas presentes en la planta en su forma natural, en vez de considerar un componente específico como el responsable de la actividad biológica o de los beneficios atribuidos (Encarnación. 1996; Gurib. 2006).

### **2.2. Metabolitos Secundarios**

Un gran porcentaje de los principios activos de plantas está comprendido dentro de los llamados Productos Naturales o Metabolitos Secundarios (MS), que son compuestos químicos de estructuras relativamente complejas y de distribución más restringida y más característica de familias botánicas específicas, que los llamados metabolitos primarios. De los primeros (MS), podemos decir que son indispensables en las plantas en la cual ellos intervienen, en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente, por tal razón son considerados artículos de lujo en la planta (Gurib. 2006; Levin. 1976).

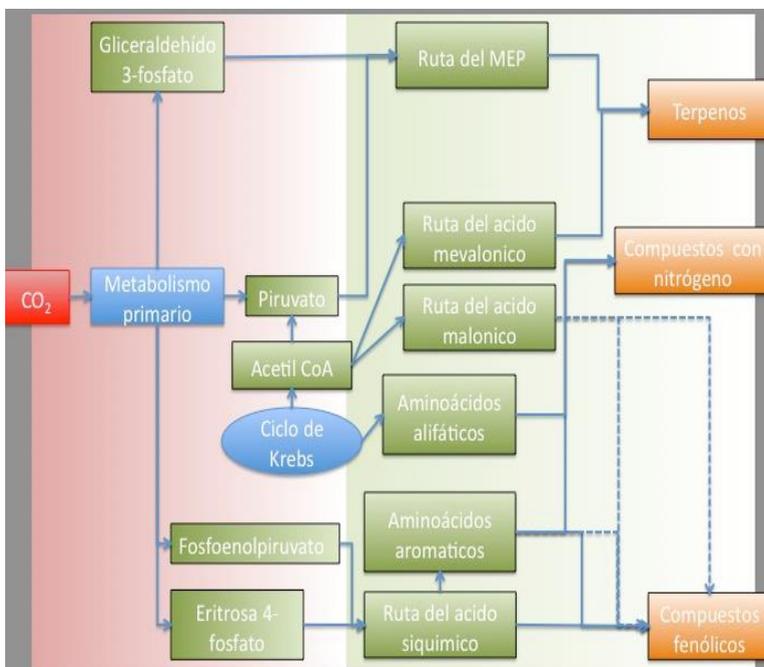
Por muchos años el valor adaptativo de la mayoría de los MS fue desconocido. El estudio de estas sustancias fue iniciado por químicos orgánicos del siglo XIX y de principios del siglo XX, que estaban interesados en estas sustancias por su importancia como drogas medicinales, venenos, saborizantes, pegamentos,

aceites, ceras, y otros materiales utilizados en la industria. De hecho, el estudio de los MS de las plantas estimuló el desarrollo de las técnicas de separación, la espectroscopía para dilucidar su estructura, y metodologías de síntesis y de actividad biológica que hoy constituyen la fundación de la química orgánica contemporánea (Gurib. 2006; Kagale *et al.* 2004; Levin. 1976).

En estudios biológicos más recientes se determinó que la mayoría de los MS cumplen funciones de defensa contra predadores y patógenos (Levin. 1976). El reconocimiento de las propiedades biológicas de muchos MS ha alentado el desarrollo de este campo, por ejemplo en la búsqueda de nuevas drogas, antibióticos, insecticidas y herbicidas. Además, la creciente apreciación de los altamente diversos efectos biológicos de los MS ha llevado a reevaluar los diferentes roles que poseen en las plantas, especialmente en el contexto de las interacciones ecológicas (Okunade., *et al.* 2004).

### **2.3. Clasificación de los Metabolitos Secundarios.**

En el siguiente esquema simplificado (Fig. 1) se muestra la interconexión existente entre el metabolismo primario y secundario, en este caso los metabolitos secundarios se dividen a grandes rasgos y considerando únicamente los grupos de mayor importancia, en tres grupos: compuestos terpenicos, compuestos fenólicos y compuestos con nitrógeno (Cuellar. 1983; Dorman y Deans. 2000; Taiz y Zeiger. 2006).



Fuente: Dewick Paul M. (2001).

**Fig. 1.** Vías generales del metabolismo secundario de las plantas.

Las relaciones existentes entre estas rutas y los grupos de metabolitos secundarios son las siguientes (Dewick. 2001):

- Los compuesto terpenoides se biosintetizan por las rutas Metil eritritolfosfato (MEP) o ácido mevalónico (MVA).
- Los compuestos fenólicos por la ruta del ácido siquímico, a partir de los aminoácidos aromáticos o por la ruta del ácido malónico. Estas vías pueden actuar solas o combinarse de las siguientes maneras: ruta ácido siquímico - aminoácidos aromáticos y aminoácidos aromáticos - ruta ácido malónico.
- Los compuestos de nitrógeno fundamentalmente provienen de los aminoácidos aromáticos y/o alifáticos (Dewick. 2001).

**2.3.1. Terpenoides:** Son compuestos químicamente diversos y estructuralmente complejos constituidos de unidades de isopreno de 5 carbonos. Se estima que en las plantas sintetizan más de 30.000 diferentes terpenoides lo cual los constituye como la clase más grande de MS. Los terpenoides tienen diferentes funciones, como son las de estabilizadores de membranas (fitoesteroles), hormonas (giberelinas y ácido abscísico), pigmentos fotosintéticos, transportadores de electrones, vitaminas como tocoferol (vitamina E), filoquinona (Vitamina K1). En adición a esas funciones fisiológicas, metabólicas y estructurales, muchos terpenoides específicos (familias C10, C15 y C20) sirven para comunicación y defensa (Taiz y Zeiger. 2006).

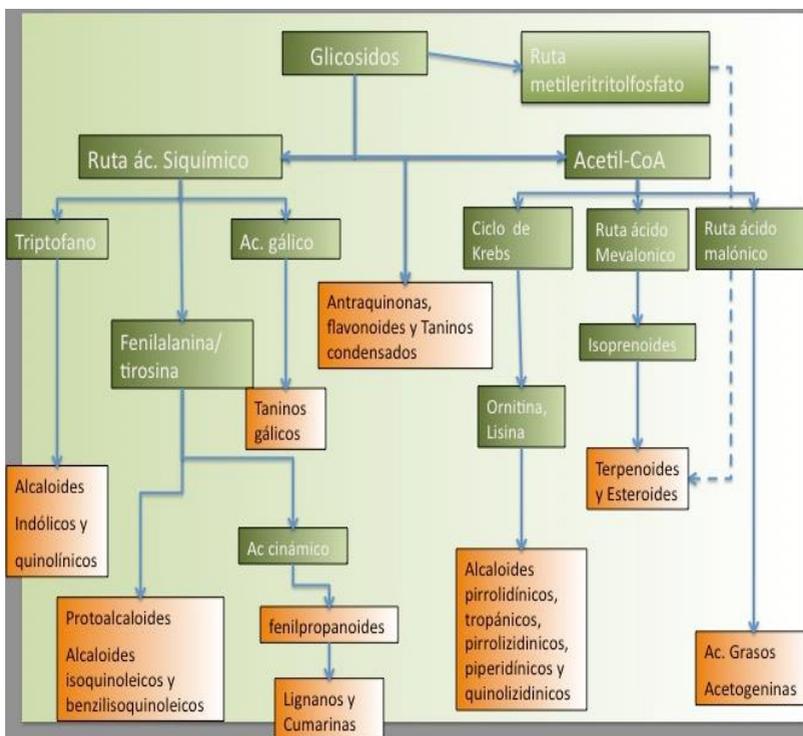
**2.3.2. Compuestos fenólicos como los fenilpropanoides y sus derivados:** Los más de 8.000 compuestos fenólicos que se conocen están formados o bien por la vía del ácido síquimico o bien por la vía del malonato/acetato. La acción farmacología es también extensa y variada, son bien conocidas sus actividades en la fragilidad capilar, como dilatadores de las coronarias, espasmolítica, antihepatotóxica, colerética, estrógena y diurética. Destacaremos así mismo la actividad antimicrobiana y la acción fungitóxica (Taiz y Zeiger. 2006; Williams y Grayser. 2004).

**2.3.3. Compuestos nitrogenados o alcaloides:** Los alrededor de 12.000 alcaloides que se conocen, que contienen uno o más átomos de nitrógeno, son biosintetizados principalmente a partir de aminoácidos. Los alcaloides poseen una gran diversidad de estructuras químicas. Son fisiológicamente activos en los animales, aún en bajas concentraciones, por lo que son muy usados en medicina (Dewick. 2001; Taiz y Zeiger. 2006).

En la (Fig. 2), se muestra de manera más detallada los metabolitos secundarios y las rutas metabólicas que le dan origen. Ahora ya es posible distinguir como aminoácidos alifáticos precursores al triptófano, lisina y a la ornitina y como aminoácidos aromáticos a la fenilamina y a la tirosina. A la par ya podemos reconocer nuevos intermediarios como el ácido gálico, ácido cinámico y los isoprenoides (Dewick. 2001).

Los grupos de metabolitos secundarios que se presentan a continuación pueden ser reordenados según la clasificación anterior de la siguiente manera (Dewick. 2001).

- Compuestos terpenoides: Terpenos y esteroides.
- Compuestos fenólicos: fenilpropanoides, lignanos, cumarinas, taninos gálicos, antraquinonas, flavonoides y taninos condensados.
- Compuestos con nitrógeno: alcaloides indólicos, quinolínicos, pirrolidínicos, tropanicos, pirrodizilínicos, piperidínicos y quinolizidínicos; protoalcaloides isoquinoleicos y benzilisoquinoleicos (Dewick. 2001).



Fuente: Dewick Paul M. (2001)

**Fig.2.** Rutas Biosintéticas y Metabolitos Secundarios

## **2.4. Extractos Vegetales**

Los extractos vegetales se han definido como un concentrado obtenido por tratamiento de productos vegetales con solventes apropiados, tales como agua, etanol o éter, de elementos solubles, constituidos por una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca (Barreto. 1997).

### **2.4.1. Características de los extractos.**

Estudios realizados por Corpas y Barrero entre 1988 y 1991, permitieron fundamentar las siguientes características específicas de los extractos:

- a.** Los extractos bien preparados son de color más o menos oscuros; cuando han sido preparados al vacío, son ligeramente más claros.
- b.** Algunos son de color café amarillento, otros rojizos; los extractos provenientes de hojas son verdosos debido a la clorofila
- c.** Su aspecto debe ser liso, fino y homogéneo.
- d.** Su olor y sabor son propiedades características de la materia prima que les ha dado su origen. Cuando son mal preparados, adquieren olor a caramelo o confitura poco conocida.
- e.** La solubilidad de los extractos es variable y está en relación directa con el tipo de preparación al cual fueron sometidos.
- f.** Los extractos acuosos son completamente solubles en agua y producen una solución transparente, algunas veces ligeramente turbia, debido a que han sido preparados con mucha anterioridad.
- g.** Los extractos alcohólicos son parcialmente solubles en agua y algunas veces son totalmente insolubles especialmente los extractos que han sido preparados con alcohol fuerte tienen un excelente índice de disolución, en el mismo título alcoholimétrico del alcohol con el cual han sido preparados.

- h. Los extractos alcohólicos preparados con hojas, dan soluciones coloreadas de verde, pues la eliminación de la clorofila no puede ser total. Cordell (1995), propuso ensayos generales para someter a los extractos a pruebas específicas para observar su calidad y composición final (Barreto. 1997).

#### **2.4.2. Usos de los extractos**

Diversos productos derivados de las plantas han mostrado un efecto antimicrobiano: entre estos compuestos se destacan los flavonoides, fenoles, terpenos, aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos (Barreto. 1997; Botz *et al.* 2001; Carrillo *et al.* 2001).

En los extractos de las plantas se han evidenciado propiedades antifúngicas, antibacterianas, estimuladoras del desarrollo fisiológico de la planta o activando mecanismos de defensa contra plagas y enfermedades (Barreto. 1997; Cowan. 1999).

Las plantas poseen una diversidad de compuestos bioactivos como lípidos, grasas, fragancias, pigmentos y sabores que son ampliamente utilizados en la agroindustria alimentaria, farmacéutica y cosmética (Barreto. 1997; Duan., *et al.* 2002).

#### **2.5. Especies vegetales de Estudio**

Para desarrollar el presente estudio se han considerado cuatro especies vegetales que fueron recolectadas en las Provincias de Loja y Zamora, las cuales son usadas tradicionalmente por los habitantes de dicha región para tratar diversas afecciones.

A continuación se presenta la clasificación etnobotánica de las plantas a estudiar y su respectiva fotografía tomada en la zona de recolección de las mismas y en el Herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja en la Planta de Productos Naturales.

## ***Piper* sp.**



**Fig.3.** Fotografía de *Piper* sp., tomada en el cantón Numbani Provincia de Zamora (izquierda) y *Piper* sp., tomada en el Herbario de la UTPI - PPN (derecha)

**FAMILIA:** PIPERACEAE.

**DISTRIBUCIÓN:** Estatus nativo de los andes y la Amazonía encontrado desde 0 a 1164 m s.n.m.

**PROVINCIAS:** Carchi, Pichincha, Zamora-Chinche

**DESCRIPCIÓN BOTÁNICA:** El género *Piper* se caracteriza por ser arbustos más o menos leñosos, sus tallos presentan nudos engrosados, hojas enteras lobuladas, nudosidades e inflorescencias en amento (Steyermark. 1984).

**USOS:** Se emplea los tallos, hojas, raíces para afecciones respiratorias, trastornos digestivos, antiinflamatorio, expectorante, antitúsgeno (Steyermark. 1984).

**MODO DE USO:** Tintura, Infusión, decocción y maceración (Steyermark. 1984).

### **2.5.2. *Piper ecuadorensis* Sodiroi (Matico)**



**Fig. 4.** Fotografía de *Piper ecuadorensis*, tomada en el cantón Numbani Provincia de Zamora (izquierda) y *P. ecuadorensis*, tomada en el Herbario de la UTPL- PPN (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-Chinchipe.

**DESCRIPCIÓN BOTÁNICA:** Arbusto delgado de 4 m de alto. Tallos verdes con nudos hinchados. Hojas con peciolo corto, la superficie escabrosa, ovada, de 15x9 cm oblicuamente redondeada en la base, largamente atenuada en el ápice, nervadura secundaria mayor. Flores aclamídeas e inflorescencia en espiga apretada o amentos (Steyermark. 1984).

**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 (Steyermark. 1984).

### 2.5.3. *Lepechinia mutica* Benth (Turuyante)



**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 estipulas. Flores bisexuales. Fruta seca. Semillas con o sin endospermo (www.zipcodezoo.com: Agosto del 2009).

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

**MODO DE USO:** Cocción. (www.zipcodezoo.com: Agosto del 2009).

#### **2.5.4. *Nipogheton dissecta* Benth (Culantrillo del cerro)**



**Fig. 6.** Fotografía de *Nipogheton dissecta* tomada en el Cantón Saraguro Provincia de Loja (izquierda), *N. dissecta* tomada en el Herbario de la UTPL- PPN (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 arrosetada, de 5-10 cm de altura. Hojas compuestas; pecíolos 5-10 cm de largo; lanceolada; con el ápice mucronado. Pétalos 0.8 mm de largo, obovados, blancos a verde claro. Ovario 0.8 mm de largo. Fruto 3 mm de largo (www.zipcodezoo.com: Agosto del 2009).

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

**MODO DE USO:** Cocción (www.zipcodezoo.com: Agosto del 2009).

## **2.6. Enfermedades Infecciosas**

Las enfermedades infecciosas constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. En el 2001 la OMS informo que las enfermedades infecciosas, causadas por bacterias, hongos y parásitos, fueron responsables de más de 5,7 millones de muertes, en países en desarrollo, esto debido a la aparición e incremento de microorganismos resistentes a los antibióticos a causa de su amplio y mal uso (Organización Mundial de la Salud: [www.who.int](http://www.who.int). Julio del 2009).

En América Latina las enfermedades infecciosas son responsables del (47%) de las muertes en niños menores de 5 años en los cuales se ha producido neumonía, diarrea, tuberculosis causada por microorganismos resistentes (Mesa., *et al.* 2004).

En el Ecuador la resistencia bacteriana ha incrementado enormemente convirtiéndose en un preocupante problema de salud. La mayoría de cepas resistentes son de origen hospitalario y comunitario (Hart. 1998; Zurita. 2001).

### **2.6.1. Resistencia Bacteriana**

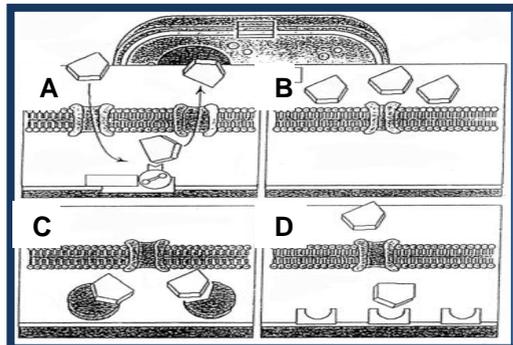
Se entiende por resistencia, el mecanismo mediante el cual la bacteria puede disminuir la acción de los agentes antimicrobianos (Elliot. 1999; Gesta. 1997; Hart. 1998).

Desde el punto de vista clínico se considera que una bacteria es sensible a un antibacteriano cuando la concentración de este en el lugar de la infección es al menos 4 veces superior a la concentración inhibitoria mínima (CIM). Una concentración por debajo de la CIM califica a la bacteria de resistente y los valores intermedios como de moderadamente sensibles (Elliot. 1999; Hart. 1998; Ponce y machado. 2003).

### **2.6.2. Mecanismos de Resistencia**

Las bacterias han desarrollado varios mecanismos para resistir la acción de los antibióticos (Fernández *et al.* 2003).

- El primero de ellos es por la posición de un sistema de expulsión activa del antimicrobiano, una especie de bomba expulsora que utilizan las bacterias para la excreción de productos residuales o tóxicos, con la que puede eliminar además muchos de estos agentes antibacterianos (Fig. 7A).
- El segundo, se realiza mediante la disminución de la permeabilidad de la pared bacteriana, con la pérdida o modificación de los canales de entrada porinas (Fig. 7B).
- La producción de enzimas inactivantes de los antibióticos constituye el tercer mecanismo (Fig. 7C). De esta forma son inhibidos los aminoglucósidos, el cloranfenicol por la acetil transferasa, y el caso más típico, el de las beta-lactamasas, para el grupo de los beta-lactámicos. En años recientes la aparición de beta lactamasas de amplio espectro que incluyen a las antibetalactamasas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam), dificulta el uso de estos antibióticos tan utilizados.
- Por último, algunos antibióticos ejercen su acción contra las bacterias uniéndose a una proteína esencial para la supervivencia de estas. La resistencia bacteriana se produce cuando el germen modifica la proteína diana, y cambia su función o produce enzimas distintas (Fig. 7D). (Fernández *et al.* 2003).



Fuente: Fernández F *et al.* (2003)

**Fig. 7.** Mecanismos de Resistencia Bacteriana

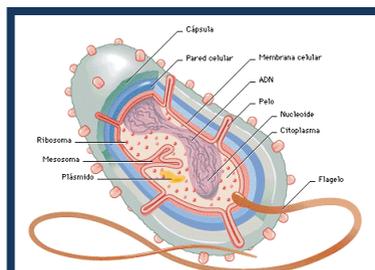
## 2.7. Microorganismos Patógenos

### 2.7.1. Bacterias

Son organismos unicelulares y microscópicos que miden entre 1 y 10 micrómetros de longitud, carecen de núcleo diferenciado y se reproducen por división celular sencilla. Están en casi todos los ambientes: en el aire, el suelo y el agua, desde el hielo hasta las fuentes termales. (Pelczar y Reid. 1992).

Una bacteria simplificada está formada por tres capas externas; la capa pegajosa protege la pared celular rígida, que a su vez cubre la membrana celular semipermeable. El flagelo es un medio de locomoción y los pelos que se extienden por fuera de la cápsula ayudan a la bacteria a sujetarse a las superficies. El material genético está contenido en una hebra doble de ADN circular que forma el nucleoide. Los ribosomas que flotan en el citoplasma intervienen en la síntesis de proteínas (Silva. 1999; Trabulsi. 1999).

Las células bacterianas se dividen por fisión; el material genético se duplica y la bacteria se alarga, se estrecha por la mitad y tiene lugar la división completa formándose dos células hijas idénticas a la célula madre. Algunas bacterias se dividen cada cierto tiempo (entre 20 y 40 minutos). En condiciones favorables, si se dividen una vez cada 30 minutos, transcurridas 15 horas, una sola célula habrá dado lugar a unos mil millones de descendientes. (Pelczar y Reid. 1992; Silva. 1999; Trabulsi. 1999).



*Fuente: Encarta (2009)*

**Fig.8.** Anatomía de una bacteria sencilla

## **2.7.2. Clasificación de las Bacterias:**

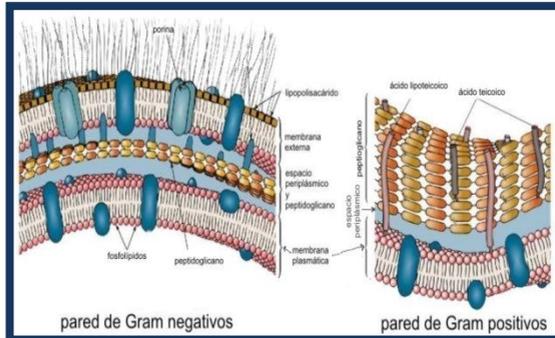
**2.7.2.1 Por la Forma:** Las bacterias con forma de bastón reciben el nombre de bacilos. Las bacterias esféricas se llaman cocos y las que presentan forma espiral se denominan espirilos (Silva. 1999).

**2.7.2.2 Clasificación taxonómica:** Divide a las bacterias en 4 grupos:

- *Gracilicutes*, bacterias con pared celular delgada del tipo Gram negativa.
- *Firmicutes*, tienen paredes celulares gruesas del tipo Gram positivas.
- *Tenericutes*, carecen de pared celular.
- *Mendosicutes*, tienen paredes celulares poco comunes, formadas por materiales distintos a los típicos peptidoglucanos bacterianos (Silva. 1999).

**2.7.2.3. De acuerdo con la constitución de la pared:** Tras la tinción, las bacterias Gram positivas retienen el tinte y se colorean de violeta, mientras que las bacterias Gram negativas liberan el tinte y se tiñen de color rosado (Silva. 1999).

- *Gram negativas*, están formadas por una doble capa lipídica: una compuesta de fosfolípidos y una externa con lipopolisacáridos y proteínas. Su interior posee características hidrofóbicas debido a los ácidos grasos y la parte polisacárido externo constituye un ambiente hidrofílico (Silva. 1999).
- *Gram positivas*. presentan una membrana externa formada por peptidoglicano, que impide el paso de compuestos hidrofóbicos, debido a la presencia de azúcares y aminoácidos (Silva. 1999).



Fuente: [www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar): Julio (2009)

**Fig. 9.** Estructura de las envolturas de Bacterias Gram + y Gram-

### 2.7.3. Hongos:

Los hongos son células eucarióticas, con núcleo bien definido rodeado por una membrana nuclear y una membrana celular que contiene lípidos, glicoproteínas y esteroides (Fisher. 2001; Trabulsi. 1999).

#### 2.7.3.1. Estructura:

La mayoría de los hongos están constituidos por finas fibras que contienen protoplasma, llamadas hifas que están divididas por tabiques llamados septos. En cada hifa hay uno o dos núcleos y el protoplasma se mueve a través de un diminuto poro que ostenta el centro de cada septo. Las hifas crecen por alargamiento de las puntas y también por ramificación. La proliferación de hifas, se llama micelio el cual puede llegar a formar grandes cuerpos fructíferos, tales como las setas y cuescos de lobo (Fisher. 2001; Trabulsi. 1999).

#### 2.7.3.2. Reproducción:

La mayoría de los hongos se reproducen por esporas. Las esporas se originan después de la unión de dos o más núcleos, lo que ocurre dentro de una o de varias células especializadas. Estas esporas, que tienen características diferentes, heredadas

de las distintas combinaciones de genes de sus progenitores, suelen germinar en el interior de las hifas (Fisher. 2001).

Los cuatro tipos de esporas que se producen de esta manera son: Las **oosporas** se forman por la unión de una célula macho y otra hembra; las **zigosporas** se forman al combinarse dos células sexuales similares entre sí. Las **ascosporas**, que suelen disponerse en grupos de ocho unidades, están contenidas en unas bolsas llamadas ascas. Las **basidiosporas**, se reúnen en conjuntos de cuatro unidades, dentro de unas estructuras con forma de maza llamadas basidios (Fisher. 2001; Trabulsi. 1999).

#### 2.7.4. Dermatofitos

Los dermatofitos son un grupo de hongos filamentosos queratinófilos; que tienen la capacidad de digerir y utilizar la queratina como sustrato produciendo infecciones en la piel, el pelo y las uñas denominadas dermatofitosis tanto del ser humano como de los animales (Butty., *et al.* 1995). Las dermatofitosis son micosis superficiales que, aunque suelen estar restringidas al estrato córneo de la piel y sus apéndices, también pueden afectar la dermis y el tejido subcutáneo causando granulomas o seudomicetomas (Fisher. 2001; Weitzman y Summerbell. 1995).

De acuerdo con su hábitat natural, los dermatofitos pueden dividirse en tres grupos ecológicos (Tabla 1):

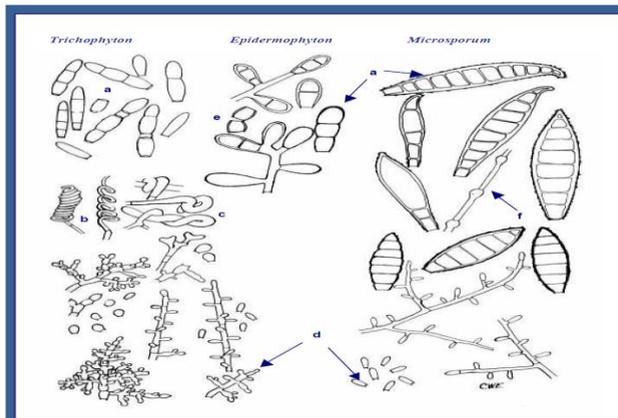
- **geofílicos:** Se encuentran en el suelo actuando como saprobios y se nutren de la queratina allí existente (pelos, escamas y plumas). Pueden infectar al ser humano como a los animales.
- **zoofílicos:** especies que infectan animales y éstos, a su vez, infectan al ser humano.
- **antropofílicos:** especies que infectan solamente el ser humano y que son transmisibles por contacto directo o indirecto (Gräser., *et al.* 2000; Rubio., *et al.* 1999).

**Tabla 1. Clasificación de los dermatofitos según su nicho ecológico**

Antropofilicos	Zoofilicos	Geofilicos
<i>E. floccosum</i>	<i>M. canis</i>	<i>M. amazonicum</i>
<i>M. audouinii</i>	<i>M. gallinae</i>	<i>M. cookei</i>
<i>M. ferrugineum</i>	<i>M. persicolor</i>	<i>M. fulvum</i>
<i>T. concentricum</i>	<i>T. erinacei</i>	<i>M. gypseum</i>
<i>T. interdigitale</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>M. nanum</i>
<i>T. rubrum</i>	<i>T. simii</i>	<i>M. praecox</i>
<i>T. schoenleinii</i>	<i>T. verrucosum</i>	<i>M. racemosum</i>
<i>T. tonsurans</i>		<i>T. ajelloi</i>
<i>T. violaceum</i>		<i>T. phaseoliforme</i>
		<i>T. terrestre</i>

Fuente: Gräser et al. (2000) y Rubio et al. (1999)

Las características morfológicas macroscópicas y microscópicas de algunas especies de dermatofitos están representadas en la Fig. 10(a-b)



Fuente: Emmons (1934)

**Fig. 10.** Estructura morfológica de los diferentes tipos de géneros dermatofitos.

## 2.8. Microorganismos utilizados en la evaluación antimicrobiana.

### 2.8.1. Bacterias Gram-positivas

**2.8.1.1. *Staphylococcus aureus*:** Es una especie bacteriana integrada por formas cocáceas, que se agrupan regularmente en racimos. Son inmóviles y carecen de esporas. Son gram positivas (Richardson *et al.* 2008).

Su metabolismo es de tipo fermentativo, son aerobios y anaerobios facultativos, catalasa positiva y oxidasa negativo. La temperatura óptima de crecimiento va de 35 a 40°C y el pH óptimo oscila entre 7,0 y 7,5 aunque soportan pHs mucho más extremos (Richardson *et al.* 2008; Silva. 1999).

El *S. aureus* es un agente patogénico que actúa como un microorganismo saprófito, se encuentra en la piel del individuo sano pero en ocasiones en que las defensas de la piel caen puede causar enfermedad. El principal grupo de riesgo son pacientes hospitalizados o inmunocomprometidos. Cerca de 2 mil millones de personas han sido colonizadas mundialmente por este microorganismo. El *S. aureus* puede causar Infección de piel y partes blandas (Richardson *et al.* 2008; Silva. 1999).

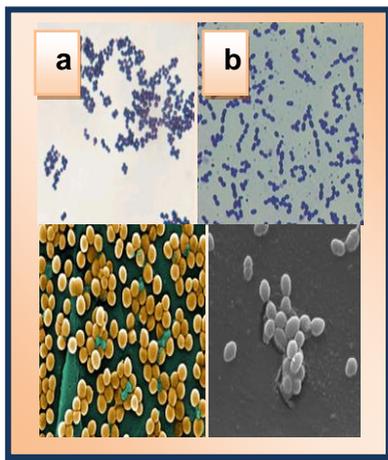
*S. aureus* posee resistencia mediante una beta lactamasa inducible que le confiere resistencia ante la penicilina, esta beta lactamasa está codificada en un plásmido presente en más del 90% de las cepas. La resistencia al óxido nítrico es una cualidad peculiar del *S. aureus*, capacidad que lo distingue de otros patógenos, incluyendo los comensales *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*. Esta resistencia se debe a que el microorganismo produce una enzima llamada lactato deshidrogenasa, que la faculta para tolerar el estrés causado por el radical del óxido nítrico. Esta observación se ha hecho en especies resistentes a la metilcilina como las que son susceptibles al antibiótico, así como en cepas hospitalarias como adquiridas en la comunidad (Richardson *et al.* 2008; Silva. 1999).

**2.8.1.2 *Enterococcus faecalis*:** Es una bacteria Gram-positiva comensal, que habita en el tracto gastrointestinal de humanos y otros mamíferos. Esta bacteria es una causa importante de

hospitalizaciones debido a que la existencia de enterococos se potencia porque ha tenido la habilidad de adquirir resistencia a virtualmente todos los antibióticos en uso (Blaimont *et al.* 1995).

El hábitat normal de este microorganismo es el tubo digestivo de animales de sangre caliente por lo que son buenos indicadores de contaminación fecal, su presencia en los alimentos indica falta de higiene o defectuosas condiciones de conservación, excepto en alimentos en los que interviene como flora bacteriana natural de procesos fermentativos, como es el caso de quesos, embutidos crudos e incluso productos cárnicos (Blaimont *et al.* 1995).

*E. faecalis* puede causar endocarditis, infecciones de vejiga, próstata y epidídimo; las infecciones de sistema nervioso son menos comunes (Blaimont *et al.* 1995).



Fuente: [www.netwellness.org/images](http://www.netwellness.org/images): Agosto (2009)

**Fig. 11.** Estructura morfológica de las bacterias gram-positivas  
a) *S.aureus* b) *E. Faecalis*.

## 2.8.2. Bacterias Gram-negativas

**2.8.2.1. *Proteus vulgaris*:** Es un bacilo gram-negativo, extremadamente móvil, responsable de muchas infecciones del tracto urinario; (más del 10% de complicaciones del tracto

urinario incluyendo cálculos y lesiones celulares del epitelio renal, enteritis (especialmente en niños), absceso hepático, meningitis, otitis media y neumonía con o sin empiema, entre otros (Largo *et al.* 1973).

Es un frecuente invasor secundario de quemaduras y heridas, así como de infecciones nosocomiales. Todas las especies de *Proteus* son resistentes a la ampicilina y a las polimixinas, un grupo de antibióticos bastante activo contra las demás enterobacterias y otros microorganismos Gram-negativos (Largo *et al.* 1973).



Fuente: Laboratorio de bioactividad de la PPN de UTPL

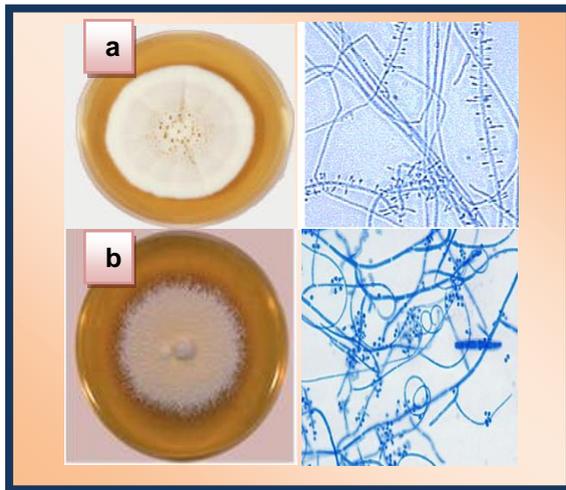
**Fig. 12.** Estructura morfológica de *P. vulgaris*

### 2.8.3. Dermatofitos

**2.8.3.1. *Trichophyton rubrum*:** Es el agente etiológico de la tinea corporis (dermatofitosis en el cuerpo), barbae (dermatofitosis en la barba), cruris (dermatofitosis en las ingles), manum (dermatofitosis en las manos) y onicomicosis de las manos y pies. Especie antropofílica de distribución mundial, alcanza cerca de un 40% de los casos de tinea. Este hongo puede infectar los vellos y la piel. Procesos inflamatorios causados por estos agentes son generalmente crónicos, algunas veces con lesiones profundas llamadas granulomas tricofíticos (Ajello y Georg. 1957).

**2.8.3.2. *Trichophyton mentagrophytes*:** Es un dermatofito cosmopolita, es la especie más aislada del hombre y animales. De acuerdo con la variedad de especies aislada puede ser zoofílicos o antropofílico. Por ejemplo, la variedad

mentagrophytes provoca tinea pedis y tinea corporis, algunas veces invade la lámina ungueal, presentando puntos blancos en la uña. Es un agente contagioso, pudiendo ser transmitido entre animales, de animales a personas y de persona a persona (Ajello y Georg. 1957).



Fuente: [www.facmed.unam.m](http://www.facmed.unam.m): Agosto (2009)

Fig.13. Dermatofitos: a) *T. rubrum*; b) *T. mentagrophytes*.

## 2.9. Tratamiento de las Enfermedades Infecciosas

### 2.9.1. 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 término antibiótico, se refiere a un producto metabólico de un organismo que es perjudicial o inhibitorio para otros microorganismos en muy pequeñas cantidades, 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 fungicidas 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; Cordiés., *et al.* 1998; Croteau., *et al.* 2000).

### **2.9.2. 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; Mongeli y Pomilio. 2002). 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 y Pomilio. 2002; Sáenz. 2003).
- Los compuestos esteroidales pueden interferir en determinados procesos de síntesis vitales en la célula bacteriana (Mongeli y Pomilio. 2002; Sáenz. 2003).
- Los triterpenos siguen diversos mecanismos en dependencia con su naturaleza química: los de naturaleza hidrocárbónica, 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 (Mongeli y Pomilio. 2002; 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 y Grayer. 2004).

## **2.10. Métodos de Evaluación Antimicrobiana**

Estas técnicas fueron desarrolladas al ver que los microorganismos eran capaces de inducir resistencia al antimicrobiano que se ha utilizado contra el durante un periodo largo de tiempo. Las técnicas que permiten determinar efectividad de los antimicrobianos nos van ayudar a la selección del compuesto más adecuado para inhibir el crecimiento bacteriano. Dentro de las pruebas más utilizadas se encuentra el enfrentamiento *in vitro* de la bacteria con distintas concentraciones del agente (Barreto. 1997; Botz *et al.* 2001).

Es indispensable en la evaluación de la actividad antimicrobiana conocer y controlar las condiciones del laboratorio y del modelo microbiano, tanto en procedimientos *in vivo* como *in vitro* (Barreto. 1997; Botz *et al.* 2001; Hostettmann. 1999).

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 (Barreto. 1997; Botz *et al.* 2001; Hostettmann. 1999).

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 (Barreto. 1997; Botz *et al.* 2001; Hostettmann. 1999).

### 2.10.1. Bioautografía

Esté método consiste en incluir los cromatogramas obtenidos por cromatografía en capa fina (CCF), en un medio de cultivo. Para ello se utilizan placas cromatográficas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> de MERCK o de celulosa las cuales se colocan en las cajas petri correspondientes. Previamente se procede a eliminar el disolvente para evitar falsas bandas de inhibición (Choma. 2005).

La Bioautografía ha sido considerada como el ensayo más eficiente para la detección de componentes antimicrobiales, porque está técnica permite la localización de la actividad en un complejo matriz y por lo tanto permite un directo aislamiento de los constituyentes activos (Choma. 2005).

Los métodos de bioautografía son usualmente divididos en tres categorías:

- a. **Bioautografía Directa:** Se aplica específicamente cuando los microorganismos pueden crecer directamente sobre los cromatogramas como es el caso de los hongos esporulados. En el método de bioautografía directa los cromatogramas son rociados con un medio inoculado con el microorganismo a evaluar puede ser en caldo o agar. Luego las placas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> son incubadas y la visualización y localización de los compuestos antimicrobianos se realiza usando sales de tetrazolium (MTT), directamente sobre las placas (Choma. 2005).
- b. **Bioautografía de contacto:** Llamada también difusión en agar; en la bioautografía de contacto los compuestos antimicrobianos se difunden desde los cromatogramas, hacia una placa de agar inoculado. Los cromatogramas son colocados sobre la capa de agar inoculado con los microorganismos a ensayar por algunos minutos u horas hasta que ocurra el proceso de difusión de los compuestos. Luego de este proceso los cromatogramas son removidos del medio y el agar es incubado. Las

zonas de inhibición son observadas sobre la superficie del agar (Choma. 2005; Marston. 2002).

- c. Bioautografía en Agar Overlay:** Este método es una versión mejorada del método de difusión en disco clásico. En la bioautografía en agar Overlay se combinan la bioautografía de contacto y directa, y es aplicable a un amplio espectro de microorganismos como son: bacterias, hongos y levaduras. En esta técnica el medio inoculado se dispersa sobre la placa formando una capa muy fina de aproximadamente 1 mm. La sustancia a evaluar se difunde desde el adsorbente hasta ponerse en contacto con el inóculo en donde ejerce el efecto. Después de la incubación las cromatogramas, son rociadas con sales de tetrazolio (MTT), lo cual permite observar zonas de inhibición claras sobre un fondo coloreado (Nostro. 2000).

## **2.10.2. Ventajas y Desventajas de la Bioautografía.**

### **2.10.2.1 Ventajas**

- a)** Permite la localización del compuesto bioactivo.
- b)** Requiere poca cantidad de muestra.
- c)** Permite la separación de los compuestos a partir del extracto crudo mediante cromatografía de capa fina, para poder simplificar el proceso de aislamiento e identificación de los compuestos activos.
- d)** Es un bioensayo guía para el fraccionamiento de los extractos vegetales (Choma. 2005; Marston. 2002; Nostro. 2000).

### **2.10.2.2. Desventajas.**

- a)** Se necesita remover completamente el residuo del solvente de las placas TLC.
- e)** El crecimiento de los microorganismos puede estar limitado en las placas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Choma. 2005; Marston. 2002; Nostro. 2000).

Para superar los posibles inconvenientes que se pueden presentar al aplicar técnicas bioautográficas se deben tomar en consideración los siguientes parámetros los cuales nos permitirán estandarizar los métodos para obtener mejores resultados (Choma. 2005; Marston. 2002; Nostro. 2000).

- Fases móviles y sus aditivos:
  - Tipo de adsorbente
  - Microorganismos de prueba
- Condiciones de viabilidad de los microorganismos
  - Tipo de medio de crecimiento
  - Densidad del inóculo.
- Desarrollo de los cromatogramas
  - Secado
  - Eliminación de restos de solvente.
- Detección Post- cromatográficas por ejemplo:
  - Humedad de la cabina
  - Tiempo de incubación
  - Concentración del microorganismo
  - Agente revelador.

# Capítulo III

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo General:**

Determinar mediante Bioautografía en Agar Overlay la presencia de compuestos con capacidad antifúngica y antibacteriana presentes en los extractos totales de cuatro especies vegetales nativas de la Provincia de Loja y Zamora Chinchipe.

#### **3.2. Específicos:**

1. Detectar la presencia de compuestos con capacidad antibacteriana a partir del extracto metanólico de *Piper* sp., y *Lepechinia mutica* empleando la técnica de Bioautografía de inmersión o Agar Overlay frente a bacterias Gram positivas: *S. aureus* *E. faecalis* y Gram negativas: *P. vulgaris*.

2. Detectar la presencia de compuestos con capacidad antifúngica a partir de los extractos metanólicos de *Piper ecuadorensis*, *Lepechinia mutica* y *Niphogeton dissecta* mediante Bioautografía de inmersión o Agar Overlay, frente a dos dermatofitos: *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*.

3. Identificar compuestos bioactivos presentes en extractos totales de las especies ensayadas en base a la presencia de una zona de inhibición alrededor del mismo, identificada con sales de tetrazolio.

#### **3.3. Fin del Proyecto**

Lograr mediante el estudio de la actividad antimicrobiana localizar compuestos activos a partir de extractos totales de cuatro plantas medicinales frente a microorganismos patógenos: bacterias y hongos, mediante técnicas Bioautográficas; con la finalidad de que puedan constituirse como modelos para la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos con posible aplicación terapéutica.

### **3.4. Propósito del Proyecto**

Determinar la actividad antimicrobiana de los extractos totales de: *Piper* sp., *Piper ecuadorensis* (Matico), *Lepechinia mutica* Benth (Turuyante), y *Niphogeton dissecta* (Culantrillo del cerro), y localizar cuales son los compuestos responsables de la actividad inhibitoria de los agentes microbianos.

### **3.5. Componentes del Proyecto**

1. Recolección de las especies vegetales objeto de estudio
2. Obtención de los extractos totales.
3. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos totales empleando métodos de Bioautografía frente a diferentes microorganismos patógenos: bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y hongos dermatofitos.

### **3.6. Hipótesis del Proyecto**

¿Tendrán compuestos con actividad antimicrobiana los extractos vegetales obtenidos de: *Piper* sp., *Piper ecuadorensis* (Matico), *Lepechinia mutica* Benth (Turuyante) y *Niphogeton dissecta* (Culantrillo del cerro), contra *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. vulgaris* y los hongos dermatofitos *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*?

### **3.7. Análisis e Interpretación de Datos**

Previo a la realización del bioautograma, se identificarán cada uno de los compuestos presentes en el cromatograma, mediante su respectivo valor de R<sub>f</sub>; para hacer un seguimiento de los compuestos responsables de la actividad. Una vez desarrollados los bioautogramas se detectará la actividad antimicrobiana en base a la presencia de una zona de inhibición alrededor del compuesto bioactivo, manifestado como ausencia de coloración en la zona de inhibición sobre un fondo coloreado (Choma. 2005; Nostro. 2000).

# Capítulo IV

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Localización

La presente investigación se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de bioactividad de la PPN del IQA de la Universidad Técnica Particular de Loja.

### 4.2. Recolección de la Materia Vegetal

Las especies vegetales utilizadas en la realización de este estudio fueron recolectadas en las provincias de Loja y Zamora Chinchipe como se detalla a continuación:

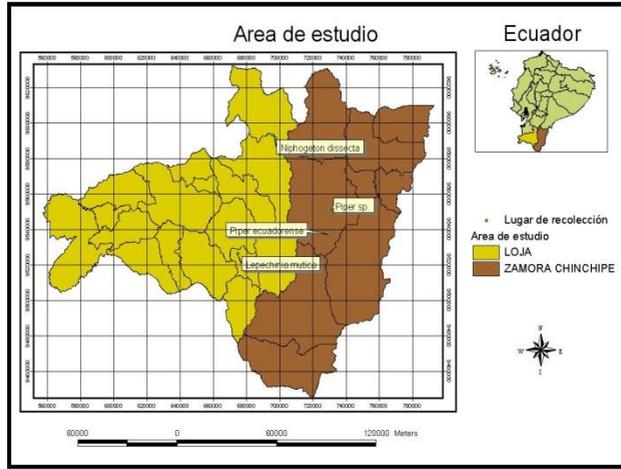
**Tabla 2.** Lugares de recolección del material vegetal

Nombre común	Nombre científico	Lugar de recolección	Provincia
	<i>Piper</i> sp.	Numbani	Zamora
<b>Mático</b>	<i>Piper ecuadorensis</i>	Numbani	
<b>Culantrillo del cerro</b>	<i>Niphogeton dissecta</i>	Loma de Oro Saraguro	Loja
<b>Turuyante</b>	<i>Lepechinia mutica</i>	Ungunanche vía a Quilanga	

Fuente: La autora

Las provincias de Loja y Zamora Chinchipe son consideradas como una de las zonas más importantes a nivel nacional y de gran relevancia internacional, debido a su diversidad de especies y ecosistemas considerados algunos de ellos únicos en el Ecuador (Cerón. 2002).

Para tener una apreciación más detallada del área de estudio a continuación se presenta el mapa (Fig. 14), de la provincia de Loja y Zamora Chinchipe el cual nos indica la ubicación geográfica de las especies vegetales de la presente investigación.



*Fuente: Investigación experimental*

*Elaboración: La autora*

**Fig. 14.** Área de recolección de las especies vegetales

### 4.3. Tratamiento del Material Vegetal

Las características de las especies vegetales fueron identificadas en el herbario de la UTPL. Las plantas de las diferentes especies se separaron por partes y se realizó la selección de las partes útiles, eliminando las partes dañadas y se secó a 37°C por 8 días, una vez secas se cortaron independientemente con el fin de obtener partículas uniformes de (1 cm) aproximadamente, para facilitar el proceso de extracción.

### 4.4. Obtención de los extractos

Para obtener un extracto que contenga la mayor parte de los constituyentes químicos del material vegetal se debe utilizar un solvente de alta polaridad como el alcohol etílico o metanol. En el caso de que se quiera obtener constituyentes químicos con determinadas características se emplea solventes de menor polaridad como por ejemplo el hexano o el diclorometano que permiten extraer compuestos apolares y grasas vegetales (Cuellar. 1983).

**Tabla 3.** Especies, Parte a evaluar y Extractos a Evaluar

<b>Especies</b>	<b>Parte a evaluar</b>	<b>Extractos a Evaluar</b>
<i>Piper sp.</i>	Hojas y flores	Extracto Metanólico
<i>Piper ecuadorensis</i>	Hojas y flores	Extracto Metanólico
<i>Niphogeton dissecta</i>	Toda la parte aérea de la planta	Extracto Metanólico
<i>Lepechinia mutica</i>	Hojas y flores	Extracto Metanólico (Fraccionado)

*Fuente: La Autora*

#### **4.4.1. Extracto Metanólico.**

La obtención de los extractos se realizó por maceración dinámica a temperatura ambiente por 5 horas, con una relación metanol: planta 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 fueron almacenados a -20° C hasta su posterior empleo.

#### **4.4.2. Obtención del Extracto de *Lepechinia mutica* Benth.**

Se obtuvo el extracto metanólico tal como se describió anteriormente en el apartado 4.4.1. A partir de este extracto se realizó una partición líquido - líquido con etanol, agua en una proporción 1:1. Para eso se pesó 3 gramos del extracto metanólico y se disolvió en 200 ml de agua y 200 ml de etanol, una vez disuelto el extracto se colocó en un decantador y se dejó en reposo por 3 días. Posteriormente se separó el sobrenadante del precipitado y se filtró al vacío. Para asegurarse de obtener la mayor parte de compuestos químicos de la especie el precipitado se resuspendió con agua y etanol y se filtró nuevamente. Finalmente se concentró el sobrenadante con ayuda de un Rotaevaporador hasta obtener un extracto totalmente seco el cual tuvo un peso final de 2 gramos y se almacenó a -20°C hasta su utilización.



- \* PEM: *Piper ecuadorensis*
- \* PSPL: *Piper sp.*
- \* NDM: *Niphogeton dissecta*
- \* LMM: *Lepechinia mutica*

Fuente: La Autora

**Fig. 15.** Esquema para la obtención de extractos vegetales

#### 4.5. Microorganismos de Prueba

Los microorganismos utilizados en la evaluación antimicrobiana fueron seleccionados bajo los siguientes criterios:

- Representan diferentes grupos
- Son agentes patógenos para humanos, por su relación con los diferentes cuadros clínicos que causan.
- Crean resistencia con mucha facilidad.

**4.5.1. Bacterias:** Se emplearon 2 cepas Gram positivas: *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212 y *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 y una cepa Gram negativa: *Proteus vulgaris* ATCC® 8427, para la evaluación de la susceptibilidad bacteriana.

**4.5.2. Hongos Dermatofitos:** *Trichophyton mentagrophytes* ATCC® 28185 y *Trichophyton rubrum* ATCC® 28188, para la evaluación antifúngica.

## 4.6. Evaluación de los Extractos

### 4.6.1. Preparación de los extractos

A partir de los extractos secos se preparó una disolución de 20 mg de extracto por 1 mL de solvente en este caso metanol. Los extractos preparados se utilizaron en los ensayos Bioautográficos.

La evaluación de la actividad antibacteriana se probó para los extractos de *Lepechinia mutica* y *Piper sp.*, y la determinación de actividad antifúngica se la realizó para los extractos de *Piper ecuadoreense*, *Niphogeton dissecta* y *Lepechinia mutica*. Los criterios de selección de los extractos para cada prueba se basaron en los resultados obtenidos en un estudio anterior de las especies vegetales en el cual se reporta la actividad de las mismas frente a determinados microorganismos, aplicando otra metodología. Por tal razón se realizó este estudio con el fin de confirmar la actividad antimicrobiana que presentaron los extractos y localizar el compuesto o los compuestos responsables de tal actividad.

### 4.6.2. Cromatografía de Capa fina (CCF)

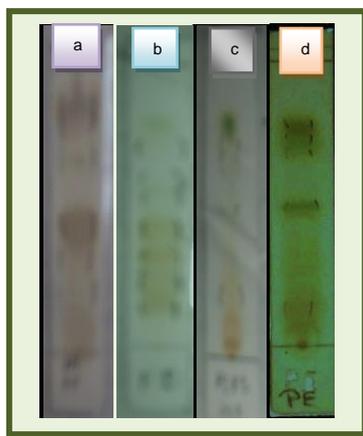
Los extractos de cada una de las especies a evaluar fueron sometidos a cromatografía de capa fina, utilizando placas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck) de 6 cm de largo por 1 cm de ancho.

Se tomó para la siembra alícuotas de 1, 2, 5 y 10  $\mu$ l de la muestra preparada con el extracto, el cual está a una concentración de 20 mg/mL de metanol. La separación de compuestos se llevó a cabo usando distintas fases móviles las cuales se presentan en la (Tabla 4), y que permitieron una mejor separación e identificación de los compuestos. La visualización posterior se realizó con luz UV 254 y 366 nm. Como controles se emplearon placas reveladas con vainillina para identificar los compuestos y adicionalmente medir el valor de R<sub>f</sub> los cuales nos permitieron localizar los compuestos bioactivos (Choma. 2005).

**Tabla 4.** Fases móviles utilizadas para cada extracto

Extracto	Fase móvil	Proporción
LMM	n-Butanol: Act de Etilo: Agua	2:0,25,025 ml
PSPL	Act de Etilo: Metanol: Agua	2: 0,5: 0,5 ml
PEM		
NDM		

Fuente: La Autora



Fuente: La Autora

**Fig. 16.** TLC Directa de: a) *L. mutica*; b) *N. dissecta*, c) *Piper* sp., d) *P. ecuatorense*

### **4.6.3. Bioautografía de Inmersión (Agar Overlay)**

#### **4.6.3.1. Principio**

Esta prueba se basa en la inhibición del crecimiento antimicrobiano, mediante la difusión de sustancias activas a través de placas cromatográficas previamente realizadas. La técnica nos permite observar zonas de inhibición sobre las placas de sílica gel 60 F<sub>254</sub>, alrededor del compuesto bioactivo (Nostro, 2000).

#### **4.6.3.2. Preparación del cultivo microbiano (Cultivo Overnight)**

Se preparó los inóculos bacterianos a partir de cepas en reserva criogénica mantenidas a -80°C. Posteriormente se sembró 30  $\mu$ L de la cepa bacteriana en 7 mL de caldo y se incubó a 37°C durante 14 a 16 horas.

#### **4.6.3.3. Procedimiento: Bacterias**

Inicialmente se rotularon las cajas petri con el nombre de cada uno de los microorganismos empleados, y con el nombre y la concentración del extracto a evaluar. A continuación se colocaron los cromatogramas y se las humectó con caldo Müller Himton lo cual facilitó la difusión del agar sobre los cromatogramas. El inóculo bacteriano se preparó sembrando 10  $\mu$ L del cultivo bacteriano previamente realizado en 2.5 ml de agar Müller Himton para obtener una concentración aproximada de  $1 \times 10^7$  UFC/ml. Posteriormente se distribuyó 1 mL de este medio de cultivo ya inoculado, sobre los cromatogramas desarrollados anteriormente formando una película de aproximadamente 1mm de espesor. Finalmente se permitió solidificar el agar, se selló e incubó alrededor de 6 horas a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a la tinción con sales de tetrazolio (MTT 0,025g/10mL de agua); nuevamente se incubó para el desarrollo de las zonas de inhibición. Se permitió que la incubación se desarrolle con la sal de tetrazolio durante una hora inicialmente (para visualización de actividad) y hasta las 24 horas de realizada la prueba para que se desarrolle completamente el bioautograma.

La evaluación de los extractos de *L. mutica* y *Piper* sp., se realizó por duplicado con cuatro concentraciones diferentes para cada uno. (10, 5, 2 y 1  $\mu$ L).

#### 4.6.3.4. Procedimiento: Hongos

Se desarrolló los cromatogramas como se indicó anteriormente en placas (apartado 4.6.2). A continuación se procedió a rotular las cajas y a humedecer las placas en caldo Sabouraud. A partir de reservas criogénicas, se tomó 50  $\mu$ L de la cepa fúngica para el caso de *T. mentagrophytes* ATCC® 28185 y 150  $\mu$ L para *T. rubrum* ATCC® 28188, para obtener una concentración final de  $2.5 \times 10^4$  esporas por mL y se inoculó en el medio que contenía 2,5 mL de agar Sabouraud. Posteriormente se tomó 1 mL de medio inoculado con el hongo y sembramos sobre las placas. Finalmente se permitió la incubación a las condiciones de 28° C con una humedad relativa de 70%. La separación, incubación y visualización de zonas de inhibición se llevó a cabo directamente sobre el bioautograma. Cada ensayo se realizó por duplicado con 4 concentraciones diferentes para cada extracto de *P. ecuatorense* y *N. dissecta* (10, 5, 2 y 1  $\mu$ L).

**Tabla 5.-** Microorganismos utilizados en las pruebas y sus respectivos medios de cultivo y condiciones de incubación.

Microorganismos		Medios de cultivo	Condiciones de incubación
<b>Bacterias</b>	<i>S. aureus</i> <i>E. faecalis</i> <i>P. vulgaris</i>	Agar Müller Himton	37°C por 6 – 8 horas
<b>Hongos</b>	<i>T. mentagrophytes</i> <i>T. rubrum</i>	Agar Sabouraud	28°C por 24 – 48 horas

*Fuente: La Autora*

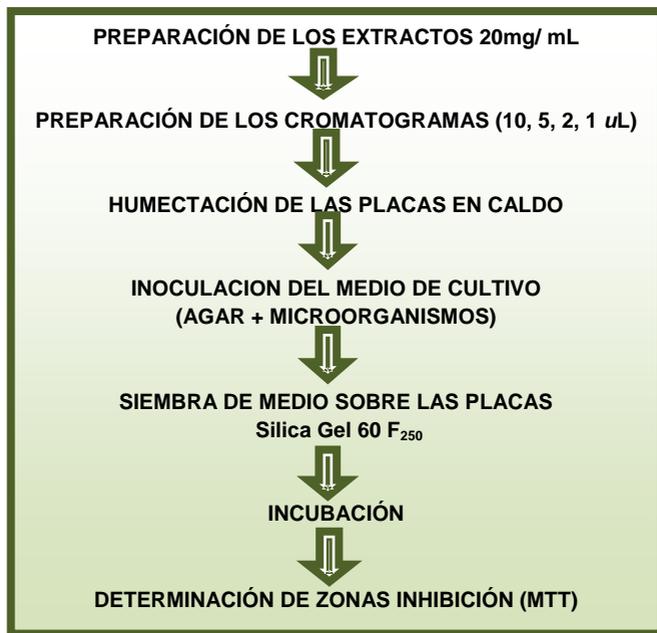
#### 4.6.4. Controles

Los controles utilizados fueron específicos para los diferentes microorganismos como se detalla en la Tabla 6. Además cabe recalcar que cada control se utilizó en las mismas concentraciones que los extractos las cuales fueron de: 10, 5, 2 y 1  $\mu$ L para cada uno, partiendo de una concentración inicial específica para cada control como se indica a continuación.

**Tabla 6.** Controles utilizados en las pruebas antimicrobianas para cada microorganismo.

Microorganismos		Controles
Bacterias	<i>S. aureus</i>	Gentamicina 1mg/ml
	<i>P. vulgaris</i>	
	<i>E. faecalis</i>	Ampicilina 8mg/ml
Hongos	<i>T mentagrophytes</i>	Itraconazol 1mg/ml
	<i>T. rubrum</i>	

Fuente: La Autora



Fuente: La Autora

**Fig. 17.** Esquema del procedimiento de Bioautografía.

# Capítulo V

## 5. **RESULTADOS**

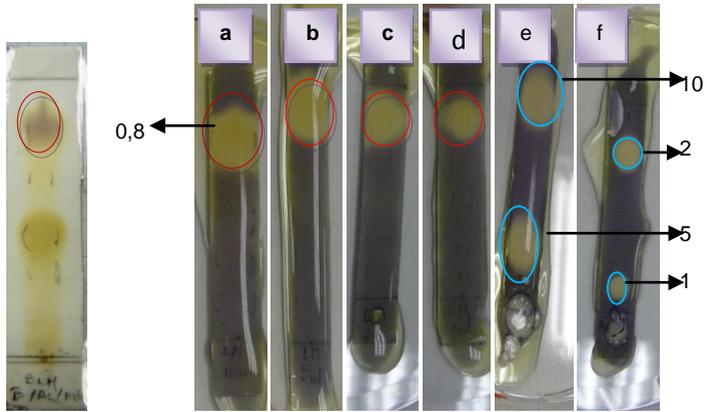
Es común el empleo popular de las especies vegetales con la finalidad de obtener diversos efectos terapéuticos. Varios estudios han validado científicamente la eficacia de numerosos usos de la medicina tradicional utilizada por la gente. Entre las varias aplicaciones terapéuticas de las plantas se incluyen aquellas con actividad antimicrobiana (Baquero., *et al.* 2007).

En esta investigación, los resultados de actividad antimicrobiana se expresan semi- cuantitativamente, ya que la técnica empleada nos permitió visualizar zonas de inhibición claras alrededor del compuesto activo el cual se localizó en base al valor de Rf que se midió directamente en los cromatogramas, por tal razón se considero como actividad a la presencia de zonas de inhibición y no activo a la ausencia de las mismas. Además se trabajo con 4 concentraciones del extracto para poder determinar la capacidad de inhibición de las especies estudiadas

Basados en las especificaciones anteriormente mencionadas se describe a continuación los resultados obtenidos para cada una de las especies.

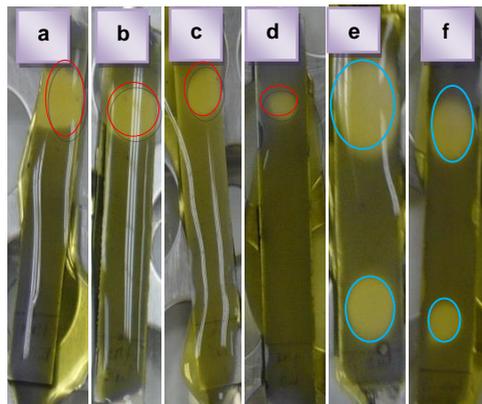
### 5.1. **Bioautogramas de *Lepechinia mutica* Benth (Turuyante)**

Se determinó la actividad antibacteriana de *L. mutica*, frente a *S. aureus*, *P. vulgaris* y *E. faecalis*. Los resultados indicaron zonas de inhibición claras alrededor del compuesto que presentó un Rf de 0.8 el cual se indica en el cromatograma, presentándose activo para *S. aureus* y *P. vulgaris* hasta 1  $\mu$ L y hasta 5  $\mu$ L., para *E. faecalis*. Las figuras. 18 y 19, indican los resultados más relevantes de esta evaluación frente a los dos microorganismos donde se observó mayor actividad de la especie.



Fuente: La Autora

**Fig. 18.** *L. mutica* frente a *S. aureus*: a) 10  $\mu$ L, b) 5  $\mu$ L, c) 2  $\mu$ L, d) 1  $\mu$ L, e y f) Gentamicina: 10, 5, 2, 1  $\mu$ L



Fuente: La Autora

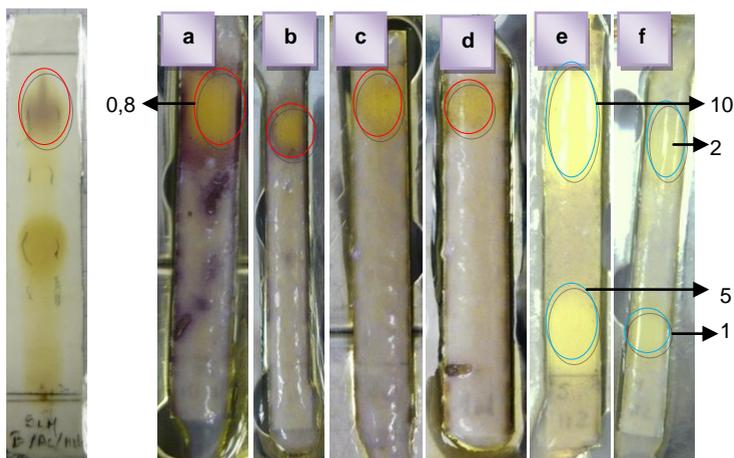
**Fig. 19.** *L. mutica* frente a *P. vulgaris* a) 10  $\mu$ L, b) 5  $\mu$ L, c) 2  $\mu$ L, d) 1  $\mu$ L, e y f) Gentamicina: 10, 5, 2, 1  $\mu$ L.

La capacidad inhibitoria del extracto de *L. mutica* frente a *S. aureus* y *P. vulgaris* se compararon con el control positivo gentamicina, y como se puede apreciar en las figuras 18 y 19, la zona de inhibición del control y el compuesto se parecen mucho y su actividad antibacteriana llego hasta la mínima

concentración de 1  $\mu\text{L}$  lo cual nos sugiere que el compuesto es una fuente importante de bioactividad.

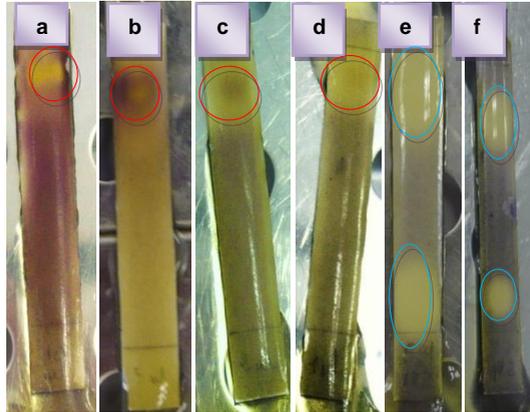
En la determinación de la actividad antifúngica de *L. mutica* frente a los hongos dermatofitos *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*, los resultados nos indican la actividad de la especie mediante zonas de inhibición visibles en el mismo compuesto que mostro actividad antibacteriana con un Rf de 0.8. Esto podría sugerir el amplio espectro de actividad que tiene el compuesto frente a bacterias y hongos.

Los resultados obtenidos se compararon con la inhibición del control de itraconazol el cual inhibió efectivamente el crecimiento de los dos hongos ensayados, y al igual que el compuesto de *L. mutica* su capacidad antifúngica se presentó hasta 1  $\mu\text{L}$  como se indican en las figuras 20 y 21.



Fuente: La Autora

**Fig. 20.** *L. mutica* frente a *T. mentagrophytes* a) 10  $\mu\text{L}$ , b) 5  $\mu\text{L}$ , c) 2  $\mu\text{L}$ , d) 1  $\mu\text{L}$ , e y f) Itraconazol: 10, 5, 2, 1  $\mu\text{L}$ .



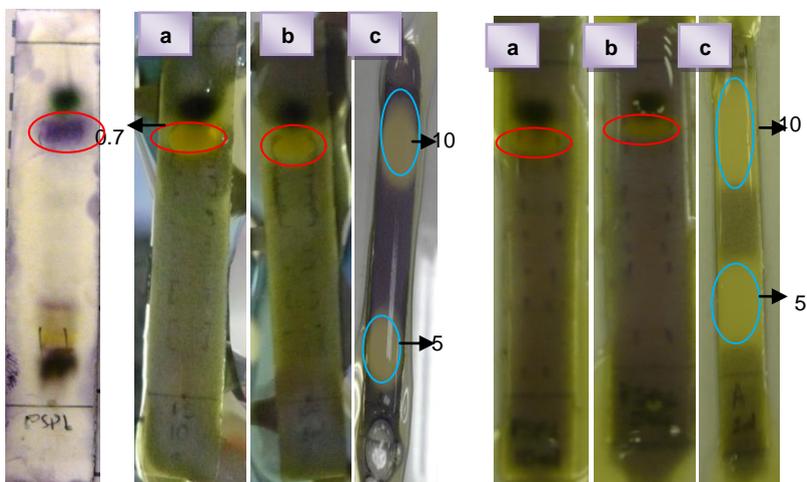
Fuente: La Autora

**Fig. 21.** *L. mutica* frente a *T. rubrum* a) 10  $\mu$ L, b) 5  $\mu$ L, c) 2  $\mu$ L, d) 1  $\mu$ L, e) y f) control Itraconazol: 10, 5, 2, 1  $\mu$ L.

## 5.2. Bioautogramas de *Piper* sp.

Se evaluó la actividad antibacteriana de *Piper* sp., frente a *S. aureus*, *E. faecalis* y *P. vulgaris*. Los resultados nos indicaron actividad de la especie mediante la visualización de zonas de inhibición alrededor del compuesto que presentó un Rf de 0.7 hasta la concentración de 5  $\mu$ L contra *S. aureus* y *E. faecalis* (Fig. 21-22), frente a *P. vulgaris* la especie se mostró inactiva.

Los controles utilizados fueron gentamicina para *S. aureus* y Ampicilina para *E. faecalis*, como se puede observar en las imágenes de las figuras. 21 (c) y 22 (c), las zonas de inhibición de los controles respecto al compuesto de *Piper* sp., son mas claras y definidas lo cual es un indicativo de la efectividad de la prueba y la sensibilidad y especificidad de los antibióticos.



Fuente: La Autora

**Fig. 22.** *Piper* sp., frente a *S. aureus*  
 a) 10  $\mu$ L, b) 5  $\mu$ L. Control:  
 Gentamicina: c) 10, 5  $\mu$ L.

**Fig. 23.** *Piper* sp., frente a *E. faecalis*  
 a) 10  $\mu$ L, b) 5  $\mu$ L. Control:  
 Ampicilina: c) 10, 5  $\mu$ L.

En la (Tabla 7), se presenta los resultados antibacterianos de *L. mutica* y *Piper* sp., en la cual se expone la concentración mínima de extracto que inhibió el crecimiento de los microorganismos ensayados. En este estudio se localizó un compuesto en *L. mutica* que presenta una buena actividad antibacteriana frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. En cambio *Piper* sp., presento un compuesto con actividad intermedia solo frente a bacterias gram positivas. Los controles de Gentamicina y Ampicilina fueron activos hasta 1  $\mu$ L.

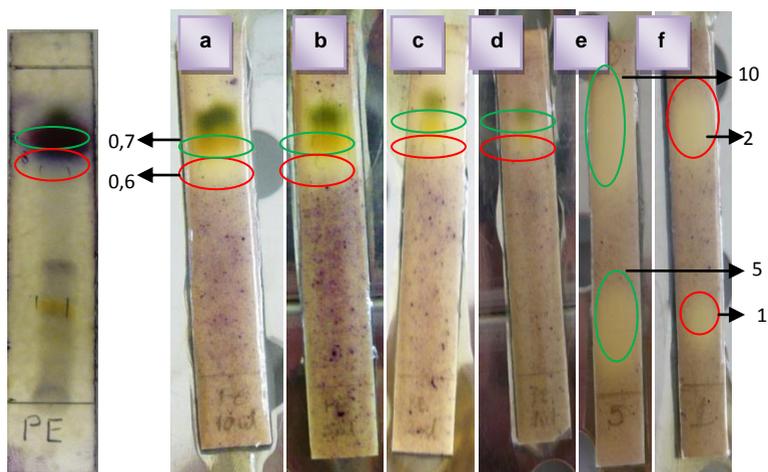
**Tabla 7.** Resultados Antibacterianos: Concentración mínima de los extractos requerida para inhibir el crecimiento antibacteriano sobre placas de silica gel 60 F<sub>254</sub>.

Especies vegetales	Compuesto (Rf)	Actividad inhibitoria ( $\mu$ L)		
		<i>S aureus</i>	<i>E faecalis</i>	<i>P vulgaris</i>
<i>L. mutica</i>	0.8	1.0	5.0	1.0
<i>Piper</i> sp.	0.7	5.0	5.0	NA
Gentamicina		1.0	--	1.0
Ampicilina		--	1.0	--

### 5.3. Bioautogramas de *Piper ecuadorensis* (Matico).

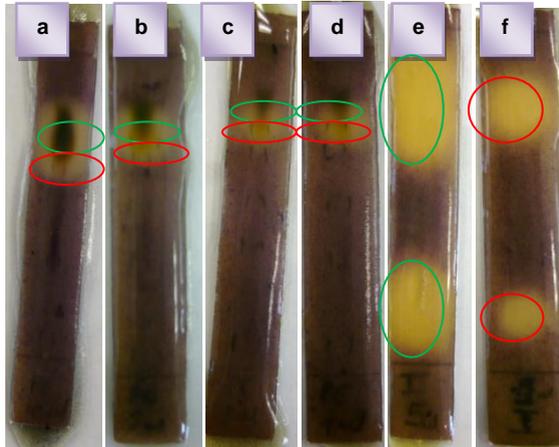
Se determinó la actividad antifúngica de *Piper ecuadorensis* frente a los hongos dermatofitos: *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*. Los resultados obtenidos nos indicaron la presencia de dos compuestos bioactivos, los cuales miden un Rf 0,7 y 0,6 contra los dos microorganismos ensayados.

Como se puede apreciar en las Figuras 23 y 24, la especie muestra actividad hasta 1  $\mu\text{L}$  para los dos microorganismos evaluados, igual que el control de Itraconazol que es un antifúngico muy utilizado en el tratamiento de enfermedades infecciosas producidas por hongos.



Fuente: La Autora

**Fig. 24.** *Piper ecuadorensis* frente a *T. mentagrophytes* a) 10  $\mu\text{L}$ , b) 5  $\mu\text{L}$ , c) 2  $\mu\text{L}$ , d) 1  $\mu\text{L}$ , e-f) Itraconazol: 10, 5, 2, 1  $\mu\text{L}$ .



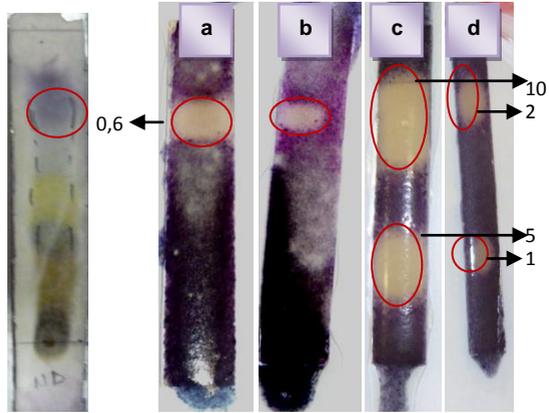
Fuente: La Aurora

**Fig. 25.** *Piper ecuadorensis* frente a *T. rubrum*: a) 10  $\mu$ L, b) 5  $\mu$ L, c) 2  $\mu$ L, d) 1  $\mu$ L, e y f) Itraconazol: 10, 5, 2, 1  $\mu$ L.

#### 5.4. Bioautogramas de *Nipogheton dissecta* (Culantrillo de cerro)

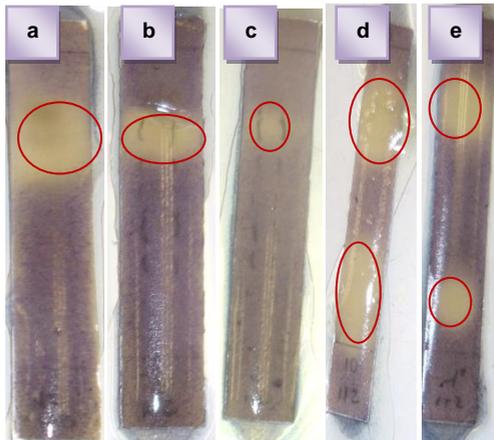
Los resultados obtenidos de *Nipogheton dissecta* frente a los dermatofitos *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*, mostraron la presencia de un compuesto bioactivo con un Rf de 0,6 el cual mostró una zona de inhibición en los cromatogramas expuestos en las figuras. 25 y 26 respectivamente.

Las imágenes presentadas señalan una inhibición hasta 5  $\mu$ L para *T. mentagrophytes*, y hasta 2  $\mu$ L frente *T. rubrum*, comparados con los controles positivos de Itraconazol los cuales indican una actividad mayor hasta 1  $\mu$ L lo cual determina que el compuesto vegetal tiene una actividad intermedia respecto a los controles.



Fuente: La Autora

**Fig. 26.** *Niphogeton dissecta* frente a *T. mentagrophytes*: a) 10  $\mu$ L, b) 5  $\mu$ L, control Itraconazol: c) 10, 5, d) 2, 1  $\mu$ L.



Fuente: La Autora

**Fig. 27.** *Niphogeton dissecta* frente a *T. rubrum*: a) 10  $\mu$ L, b) 5  $\mu$ L, c) 2  $\mu$ L control Itraconazol: d) 10, 5, e) 2, 1  $\mu$ L.

En la determinación de actividad antifúngica *L. mutica* y *P. ecuadorensis* presentaron una buena actividad hasta 1  $\mu$ L para los dermatofitos ensayados. *N. dissecta* en cambio presentó un compuesto medianamente activo como se detalla a continuación

en la (Tabla 8). Estos resultados se pueden comparar con el control de Itraconazol que es un agente antifúngico que inhibió el crecimiento de los microorganismos hasta 1  $\mu$ L.

**Tabla 8.** Resultados Antifúngicos: Concentración mínima de los extractos requerida para inhibir el crecimiento antifúngico sobre placas de silica gel 60 F<sub>254</sub>.

Especies vegetales	Compuesto (Rf)	Actividad inhibitoria ( $\mu$ L)	
		<i>T mentagrophytes</i>	<i>T rubrum</i>
<i>L. mutica</i>	0.8	1.0	1.0
<i>P. ecuadorensis</i>	0.7	1.0	1.0
	0.6		
<i>N. dissecta</i>	0.6	5.0	2.0
<i>Itraconazol</i>		1.0	1.0

Control positivo: Itraconazol

Fuente: La Autora

# Capítulo VI

## 6. DISCUSION

La determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro* se hace necesaria para evaluar y garantizar la potencia de los extractos vegetales con actividad antimicrobiana. Por consiguiente es indispensable establecer una metodología confiable y práctica que logre garantizar el uso de las plantas como fuente de compuestos activos para tratar enfermedades infecciosas (Botz *et al.* 2001).

El primer aspecto importante a considerar para analizar los resultados obtenidos lo constituye la metodología utilizada en el presente estudio. Anteriormente se realizó un estudio en las cuatro especies vegetales para determinar su actividad antibacteriana por métodos clásicos como son: Difusión en agar, Microdilución en caldo para bacterias e Inhibición del Crecimiento micelar para hongos, y en base a los resultados obtenidos se planteó el presente estudio aplicando métodos Bioautográficos los cuales nos permitieron confirmar la actividad de las especies vegetales y localizar los compuestos responsables de la inhibición del crecimiento de los microorganismos ensayados (Choma. 2005; Hostettmann. 1999; Nostro. 2000).

Los controles utilizados en los ensayos de bioactividad fueron gentamicina para *S. aureus* y *P. vulgaris*, Ampicilina para *E faecalis*, e Itraconazol para *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*. Como se presentó en los resultados todos los controles muestran zonas de inhibición mucho más claras y definidas que las de los extractos con una actividad de inhibición mínima hasta 1  $\mu$ L. Estos resultados son un indicativo de la efectividad del método y la sensibilidad y especificidad de los antibióticos. Sin embargo al comparar la capacidad de actividad antimicrobiana de los extractos con los controles, debemos tomar en cuenta que estos son sustancias puras con estándares de concentración y dosificación establecidos para mostrar una buena actividad (Cordiés *et al.* 1998). Por lo tanto lo que se debe considerar importante en este estudio es que se pudo localizar compuestos bioactivos en todas las especies vegetales y estos resultados nos permitirán continuar con el estudio de las mismas para poder

identificar dichos compuestos con la finalidad de poder determinar una posible aplicación terapéutica.

El extracto de *L. mutica* mostró actividad antimicrobiana frente a bacterias y hongos hasta una concentración de 1  $\mu$ L. Sin embargo al observar los cromatogramas de la especie podemos apreciar que las zonas de inhibición son más claras y específicas frente *S. aureus* y *P. vulgaris* que en los dermatofitos *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*, una posible explicación para estos resultados podría ser el hecho de que los hongos son microorganismos más complejos que las bacterias y poseen varios mecanismos de resistencia como son: la pared celular compuesta de polisacáridos, proteínas, lípidos, iones inorgánicos y mananos lo cual influye en la actividad de los antimicrobianos sobre estos microorganismos (Drobnic. 1997; Kagale *et al.* 2004). Sin embargo esto no significa que el compuesto responsable de la actividad antifúngica de *L. mutica* no muestre actividad a mayores concentraciones con la finalidad de inhibir totalmente el crecimiento de hongos. Por otro lado se debe tomar en cuenta que las concentraciones muy altas tienen el riesgo de presentar toxicidad (Barreto. 1997). Por lo tanto es necesario realizar estudios que permitan aislar e identificar el compuesto responsable de la actividad antimicrobiana de la especie para poder establecer concentraciones más específicas y efectivas que inhiban el total crecimiento microbiano.

Por otra parte la bibliografía consultada reporta la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos, triterpenos, esteroides, saponinas y taninos en especies del género *Lepechinia*. La presencia de estos metabolitos secundarios le proporcionan a la especie sus características medicinales para el tratamiento de enfermedades infecciosas (Rossi *et al.* 2002).

Para la especie de *Piper ecuadorensis*, en los resultados obtenidos del presente estudio se encontró una importante actividad antifúngica de la especie frente al hongo dermatofito *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*, hasta una concentración de 1  $\mu$ L. Por otra parte *Piper sp.*, presentó una mediana actividad antibacteriana frente a bacterias gram positivas como *S. aureus* y *E. faecalis* hasta 5  $\mu$ L, sin embargo frente a *P. vulgaris* no tuvo

ninguna actividad inhibitoria. Esta especificidad del compuesto de *Piper sp.*, por bacterias gram positivas podría apoyarse en muchas investigaciones en las cuales se reporta que los microorganismos gram positivos son más sensibles a los antimicrobianos que los gram negativos; este concepto se puede explicar debido a que la pared de las bacterias gram negativas es más compleja que el de las bacterias gram positivas lo cual disminuye la permeabilidad de la pared celular por poseer una pequeña capa de peptidoglicano la cual es más sensible, a la adquisición de mecanismos de eflujo y cambio de vía metabólica generando mecanismos de resistencia a los compuestos antimicrobianos (Hart.1998; Ponce y Machado. 2003; Reddy., *et al.* 2004). Sin embargo los resultados expuestos sobre la especificidad de *Piper sp.*, frente a las bacterias gram positivas es preliminar ya que se necesita de mas estudios utilizando un mayor número de cepas gram negativas y positivas para poder validar esta interpretación.

Las fuentes bibliográficas consultadas han reportado que las especies vegetales del genero *Piper*, tienen una importante utilidad como antiviral, antibacteriano y particularmente antimicótico (Lago., *et al.* 2005; Mesa., *et al.* 2007). Estas propiedades biológicas han sido atribuidas a la presencia de lignanos y flavonoides en los extractos (Nayive. 2008; Reddy., *et al.* 2004). 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 nos sirve de guía para realizar el fraccionamiento, aislamiento e identificación de los compuestos bioactivos localizados, en estudios posteriores.

En cuanto a los resultados obtenidos para el extracto metanólico de la especie *N. dissecta* se determinó actividad antifúngica moderada frente a *T. mentagrophytes* hasta 5  $\mu$ L y para *T. rubrum* mostró actividad inhibitoria más relevante hasta 2  $\mu$ L. Estos resultados preliminares son muy importantes debido a que los dermatofitos causan infecciones que en algunos casos, como en el de los pacientes inmunocomprometidos, no responden al tratamiento con los antifúngicos disponibles en el mercado. Por ello, es necesario desarrollar moléculas antifúngicas más

potentes (Butty *et al.* 1995; Carrillo *et al.* 2001; Dorman y Deans. 2000; Duan *et al.* 2002).

Según los resultados obtenidos en los cromatogramas de los extractos vegetales los compuestos activos localizados en las diferentes especies vegetales aparecen en un alto grado de polaridad. La información bibliográfica consultada hace referencia a la presencia de metabolitos secundarios como quinonas y flavonoides los cuales muestran una alta polaridad y presentan propiedades antimicrobianas (Cowan. 1999; Dorman y Deans. 2000). Esta información es muy importante en este estudio ya que nos sirve de guía para identificar a los posibles compuestos responsables de la actividad antibacteriana y antifúngica de las especies evaluadas.

Finalmente podemos decir que el presente estudio confirmó la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales de *Piper* sp., *P. ecuadorensis*, *L. mutica* y *N. dissecta*, estas actividades respaldan, los usos de estas plantas en la medicina tradicional para tratar diferentes dolencias, entre ellas las enfermedades infecciosas. Además la presente investigación contribuyó a la búsqueda y localización de nuevos compuestos con posible aplicación terapéutica a partir de fuentes naturales.

# Capítulo VII

## 7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 7.1. Conclusiones

- ❖ Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la presente investigación podemos concluir que las especies vegetales de *Piper* sp., *Piper ecuadorensis*, *Lepechinia mutica* y *Niphogeton dissecta* son una fuente importante de compuestos con actividad antimicrobiana de origen natural los cuales pueden ser utilizados como una línea de base para la síntesis de moléculas útiles a nivel farmacéutico.
- ❖ La especie vegetal *L. mutica* presentó la mayor actividad antimicrobiana contra todos los microorganismos seleccionados, confirmando así su efectividad para inhibir el crecimiento bacteriano y fúngico.
- ❖ Los microorganismos Gram positivos: como *S. aureus* y *E. faecalis* fueron más sensibles al poder inhibitor de *Piper* sp., siendo *P. vulgaris* una cepa Gram-negativa que mostró resistencia.
- ❖ *Piper ecuadorensis* fue la especie vegetal que presentó mejor actividad antifúngica frente a los dermatofitos *T. mentagrophytes* y *T. rubrum* hasta una concentración del extracto mínima de 1  $\mu$ L.
- ❖ 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.

## 7.2. Recomendaciones

- ❖ Se recomienda continuar con el estudio de las especies vegetales que presentaron actividad antimicrobiana realizando el aislamiento, la identificación y purificación de los compuestos activos localizados en el presente trabajo con el fin de generar alternativas para la obtención de nuevos antimicrobianos de amplio espectro a partir de fuentes de origen natural.
  
- ❖ Realizar estudios *in vitro* sobre la toxicidad de los extractos vegetales estudiados en la presente investigación.
  
- ❖ Se recomienda realizar estudios *in vivo* para determinar la concentración inhibitoria mínima de los compuestos activos con el objetivo de utilizarlos como principios activos en la formulación de fitofármacos con potencial biocida.
  
- ❖ Se recomienda también realizar estudios *in vivo* con el fin de determinar la estabilidad de los extractos vegetales obtenidos frente a agentes físicos y químicos que puedan interferir en la actividad antimicrobiana descrita en el presente trabajo.
  
- ❖ Finalmente se recomienda estudiar nuevas especies vegetales que desde la perspectiva etnomédica han demostrado tener propiedades medicinales con la finalidad de potenciar el uso de los recursos naturales en beneficio de la salud y el bienestar de la población.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. **Ajello, L., Georg, L.** (1957). In vitro hair cultures for differentiating between atypical isolates of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. Mycopath. Mycol. Appl. 8:3-17.
2. **Alécio, A., Vanderlan, M., Marx, J., Massuo, K y Burlan, M.** (1998). Antifungal amide from leaves of *Piper hispidum*. Nat Prod. 61 (5): 639- 9.
3. **Baquero, E., Benavides, J., Sepulveda, L., Quiñones, W., Torres, F., Cardona, D., Archbold, R., Guzman, J., Cuca, L., Franzblau, S.** (2007). Actividad Antimicobacteriana de algunas plantas de la Flora Colombiana. Scientia Et Technica. 13 (33): 133-136.
4. **Barreto, B.J.** (1997). Efectos antimicrobianos del diente de león (*Taxacum officinale*) y el gualanday (*Jacaranda obtusifolia*) sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeuruginosa* causantes de enfermedades de la piel. Carrera de Bacteriología. Facultad de Ciencias Básicas. Pontifica Universidad Javeriana. Trabajo de Pregrado. Bogota D. C. Pag. 9, 23-29.
5. **Barthlott, W., Biedinger, N., Braun, G., Feig, F., Kier, G y Mutke, J.** (1999). Terminological and methodological aspects of the mapping and analysis of global biodiversity. Acta Botánica Fennica 162: 103-110.
6. **Blaimont, B., Charlier, J y Wausters, G.** (1995). Comparative distribution of *Enterococcus* species in faeces and clinical samples. Microb. Ecol. Health Dis. 8: 87 - 92.
7. **Botz, L., Nagy, S., Kocsis, B.** (2001). Detection of microbiologically active compounds In: Sz Nyiredy ed. Proc Int Symp Planar Chromatography. Lillafüred Hungary: 489-516.
8. **Bussmann, R. y Sharon, D.** (2006). Traditional medicinal plant use in Northern Peru: tracking two thousand years of healing culture. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine. 2:47.
9. **Butty, P., Lebecq, J.C., Mallié, M., Bastide, JM.** (1995). Evaluation of the susceptibility of dermatophytes to antifungal drugs: a new technique. J. Med. Vet. Mycol. 33: 403-409.

10. **Carrillo, A., Brió, S., Quindós, G.** (2001). Una nueva generación de fármacos antifúngicos. *Rev. Iberoam. Micol.* 18:2-5.
11. **Cerón, C. E.** (2002). La etnobotánica en el Ecuador. *Cinchonia* 3(2): 1-16.
12. **Chiabra, S.** (1991). Antibacterial activity of source Tanzanian plants used in traditional medicine. *Fitoterapia*, LXII : 499-503.
13. **Choma, I.** (2005). The use of Thin Layer Chromatography with Direct Bioautography for Antimicrobial Analysis. LCGC Europe.
14. **Cordiés, L., Machado, L y Hamilton, M.** (1998). Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta Med.* 8:13-27.
15. **Cowan, A.** (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology reviews*; 12: 564-582.
16. **Couvalin, A.J.** (1988). El final de la edad de oro de los antibióticos. *Ther Nat*; 314(3):50-2.
17. **Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G.** (2000). "Natural Products (Secondary Metabolites)". En: Buchanan, Grisseem, Jones (editores). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland, Estados Unidos. Capítulo 24.
18. **Cuellar, A.** (1983). Química de los fármacos naturales. Breves apuntes teóricos y prácticos. Universidad de la Habana. 564 pp.
19. **Dewick, P.M.** (2001). *Medicinal Natural Products*. Second Edition. Editorial: John Wiley and Sons.
20. **Dorman, H y Deans, S.** (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol.* 88: 308- 316.
21. **Drobnic, L.** (1997). Principios generales del tratamiento antibiótico, En: *Tratamiento Antimicrobiano*, Madrid: Emisa. 639-650.
22. **Duan, H., Takaishi, Y., Fujimoto, Y., Garzon C., Osorio, C y Duque, C.** (2002). Chemical Constituents from the Colombian Medicinal Plant *Niphogeton ternata*. *Chem. Pharm. Bull.* 50(1): 115-117.
23. **Elliot, T.S.** (1999). Antibacterial resistance in the intensive care unit. Mechanisms and management. *Br Med Bull.* 55(1):259-76.

24. **Encarnación, R.** (1996). Medicina Tradicional y Popular de Baja California del Sur. Universidad Nacional Autónoma de México. 250pp.
25. **Emmons, C.W.** (1934). Dermatophytes: Natural grouping based on the form of the spores and accessory organs. Arch. Derm. Syphilol. 30:337-362.
26. **Fernández, R.F., López, H.J., Ponce, M.L. y Machado, B.C.** (2003). Resistencia Bacteriana. Rev Cubana Med Milit. 32(1):44-8
27. **Fisher, F., Cook, N.B.** (2001). Micología: Fundamentos y diagnostico, Rio de Janeiro.
28. **Gesta Otero, J.J.** (1997). Enfermedades Infecciosas Emergentes. Alerta Mundial, Respuesta Mundial. Rev Esp Salud Pública. 71 (3): 125-279.
29. **Gräser, Y., de Hoog, GS., Kuijpers, A.F.A.** (2000). Recent advances in the molecular taxonomy of dermatophytes. Rev. Iberoam. Micol. 17:19-23.
30. **Gurib, A.** (2006). Medicinal Plant: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular Aspects of Medicine. 27: 1-93.
31. **Hart, C.A.** (1998). La resistencia a los antibióticos. ¿un problema creciente? Br Med J. Ed Latinoam; 6:147-8.
32. **Hostettmann, K.** (1999). Strategy for the Biological and Chemical Evaluation of Plant Extracts. Pure Appl. Chem.
33. **Kagale, S., Marimuthu, T., Thayumanavan, B., Nandakuman, R.** (2004). Physiological and molecular plant pathology. 65: 91- 100
34. **Lago, E., Tanizaki, T., Young, M., Guimarães, E., Kato, M.** (2005). Antifungal Piperolides from *Piper malacophyllum* (Prels) C. DC. J. Braz. Chem. Soc. 16 (2): 153-156.
35. **Largo, R., Donoso J., Pruyas M.** (1973). Neumopatía a *Proteus*. Rev. Chilena Pediatría. 44(4): 354-358.
36. **Levin, D.A.** (1976). "The chemical defenses of plants to pathogens and herbivores". Ann Rev. Ecol. Syst. 7: 121-159.
37. **Marston, A.** (2002). A Rapid TLC Bioautographic Method for the Detection of Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase Inhibitors in Plants. Phytochemical Analysis 13: 51-54.
38. **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.

39. **Mesa, A.C., Montiel, J., Martínez, C., Zapata, B., Pino, N., Bueno, J. G., Stashenko, E.** (2007). Actividad in vitro Anti-*candida* y Anti-*aspergillus* de aceites esenciales de plantas de la familia PIPERACEAE. *Scientia et Technica*. XIII (33): 247-249.
40. **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.
41. **Myers, N., Mittermeier, R., Mittermeier, G., Fonseca, D y Kent, J.** (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
42. **Nayive, P. B.** (2008). Actividad Antibacteriana A Partir Del Extracto de Hojas de Seis Especies del Género *Piper L.* (PIPERACEAE). *Revista Institucional Tecnológica del Choco*. 27 (1): 67- 75.
43. **Nostro, A.** (2000). Extraction Methods and Bioautography for evaluation of Medicinal Plant Antimicrobial Activity. *Letters in Applied Microbiology* 30: 379-384.
44. **Okunade, A., Elvin-Lewis, M., Lewis, W.** (2004). Natural antimycobacterial metabolites: current Status: *Phytochemistry*; 65: 1017-1032.
45. **Ordoñez, L., Ambrose, K., Borja, R., Cueva, K y Gonzales, L.** (2006). Proyecto “La biodiversidad como sustento de vida en los bosques de ceja andina: uso sustentable de la agrobiodiversidad de los bosques de ceja de montaña del Carchi- Ecuador”, Anexos 1- 4 Informe final del Proyecto Ceja Andina. Ecopar, IDRC y CRDI. 86 p.
46. **Organización Mundial de la Salud.** Reporte anual de salud. In: <http://www.who.int/>. Consultado Julio 2009.
47. **Pelczar, M. J. y Reid, R. D.** (1992). *Microbiología*. Editorial Pueblo y Educación. La Habana. 664 pp.
48. **Ponce, L y Machado, C.** (2003). Resistencia Bacteriana. *Rev. Cubana Med Milit.* 32(1):44-8.
49. **Reddy, S.V., Srinivas, P.V., Praveen, B.** (2004). Antibacterial constituents from the berries of *Piper nigrum*. *Phytomedicine* 11:697-700.
50. **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.
51. **Richter, M y Moreira, A.** (2005) Heterogeneidad climática y diversidad de la vegetación en el sur de Ecuador: un método de fitoindicación. Rev. Peru. biol. 12(2): 217- 238.
  52. **Rossi C., Arias G y Lozano N.** (2002). Evaluación Antimicrobiana y Fitoquímica de *Lepechinia meyeri* Walp "Salvia". Ciencia e Investigación. Vol.5 (1).
  53. **Rubio, M.C., Rezusta, A., Gil, J., Ruesca, R.B.** (1999). Perspectiva micológica de los dermatofitos en el ser humano. Rev. Iberoam. Micol. 16:16-22.
  54. **Sáenz, D.** (2003). Medicamentos + Plantas medicinales. Fármacos. Vol 16 (1 y 2): 13 – 18.
  55. **Silva, C.** (1999). Bacteriología: Un texto ilustrado. Eventos: Rio de Janeiro
  56. **Steyermark, J.** (1984). Flora de Venezuela. Piperaceae. Vol II. Instituto Nacional de Parques. Direcciones de Investigación Científica. Segunda Parte. Merida: Ediciones Fundación.
  57. **Taiz, Lincoln y Zeiger Eduardo.** (2006). "Secondary Metabolites and Plant Defense". En: Plant Physiology, Fourth Edition. Sinauer Associates, Inc. Capítulo 13.
  58. **Torre, L., Muriel, P y Balslev, H.** (2006). Etnobotánica en los Andes del Ecuador. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz: 246-267.
  59. **Trabulsi, L.R.** (1999). Microbiología, 3ed. Atheneu: Saõ Paulo.
  60. *Lepechinia mutica* In; [www.zipcodezoo.com](http://www.zipcodezoo.com): Consultado en Agosto del 2009.
  61. *Niphogeton dissectus* In: [www.zipcodezoo.com](http://www.zipcodezoo.com): Consultado en Agosto del 2009.
  62. **Williams, C.A. y Grayer, R.J.** (2004). "Anthocyanins and other flavonoids". Nat. Prod. Rep. 21: 539-573.
  63. **Weitzman I y Summerbell R.C.** (1995). The dermathopytes. Clinical Microbiology Reviews, 8(2):240-259.
  64. **Zurita, J.** (2001). Red Nacional de Vigilancia de Resistencia bacteriana. Ecuador. Boletín de la Red. Informe N<sup>o</sup>.1