



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS**  
**CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA**



**TEMA**

---

“Investigación de la Actividad Antimicrobiana y Fitoquímica de Extractos de Plantas Medicinales frente a los Microorganismos Patógenos *Escherichia coli* y *Candida albicans*”

---

Trabajo de Graduación Modalidad Trabajo Estructurado de Manera Independiente (TEMI) previo a la Obtención del Título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

**Por:** Gabriela Isabel Yánez Arcos

**Tutor:** Ing. Ramiro Velasteguí, MSc., Ph.D

**AMBATO – ECUADOR**

**2014**

## APROBACIÓN DEL TUTOR DE TESIS

En mi calidad de Tutor de trabajo de investigación modalidad TEMI sobre el tema: “Investigación de la Actividad Antimicrobiana y Fitoquímica de Extractos de Plantas Medicinales frente a los Microorganismos Patógenos *Escherichia coli* y *Candida albicans*” de la estudiante Gabriela Isabel Yáñez Arcos egresada de la Carrera de Ingeniería Bioquímica contempla las orientaciones metodológicas de la investigación científica.

Que ha sido dirigida en todas sus partes cumpliendo con las disposiciones por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Por lo expuesto:

Autorizo su presentación ante los organismos competentes para la sustentación del mismo.

Ambato, mayo del 2014

---

Ing. Ramiro Velasteguí, Ms.C, Ph.D

Tutor

## **AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

Los criterios emitidos en el trabajo de investigación: “Investigación de la Actividad Antimicrobiana y Fitoquímica de Extractos de Plantas Medicinales frente a los Microorganismos Patógenos *Escherichia coli* y *Candida albicans*”, así como también los contenidos, ideas, análisis, conclusiones y propuesta copresponen exclusivamente Gabriela Isabel Yáñez Arcos, como autora de este trabajo de grado.

Ambato, mayo del 2014

---

Gabriela Isabel Yáñez Arcos

**AUTORA**

**APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO  
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

Los miembros del Tribunal Examinador aprueban el informe de investigación, sobre el tema: **“Investigación de la Actividad Antimicrobiana y Fitoquímica de Extractos de Plantas Medicinales frente a los Microorganismos Patógenos *Escherichia coli* y *Candida albicans*”**, de la estudiante Gabriela Isabel Yáñez Arcos.

Ambato, mayo del 2014

Por constancia firman:

---

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

---

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

---

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



## DEDICATORIA

*A mi familia, por todo el apoyo brindado a lo largo de mi experiencia estudiantil y en la elaboración de este trabajo.*

*A mi padre Francisco Yáñez, por ser ejemplo de fortaleza, perseverancia y dedicación. A mi madre Enma Arcos, por ser ejemplo de bondad, esfuerzo y esperanza. A ustedes padres de mi alma y corazón por ser los gestores de mis triunfos, por toda su confianza, por sus consejos, por sus palabras de sabiduría y sobre todo por su amor.*

*A mis hermanas, Estefanía y Dayanara, por la alegría, las bromas, la confianza mutua y por ser mis cómplices.*

*A mi pequeño angelito, Doménica, por ser la alegría de nuestra familia.*

*A ti mi amor, David Garcés, por tu apoyo en las buenas y en las malas, por depositar tu confianza en mí, por ser mi amigo, mi confidente y la voz de aliento en todas las ocasiones.*

*A Uds. Aby Poveda, Gaby Bassante y Lule Correa por ser mis amigas, cómplices y por todas las gratas experiencias. De manera especial a ti Lule, por todas las vivencias juntas, por la confianza, las locuras, las enseñanzas y experiencias, y por todas esas risas sin fin.*

# AGRADECIMIENTO

Dejo constancia de mi agradecimiento a:

A la Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos, Carrera de Ingeniería Bioquímica y por ende a todos mis virtuosos profesores por los conocimientos impartidos durante mi experiencia universitaria.

A mi tutor, Ing. Ramiro Velasteguí, Ph.D, por su amistad y confianza, por los conocimientos y sabiduría impartidos durante mi experiencia universitaria y por ser la guía durante la elaboración de este trabajo. Gracias por la experiencia.

Al equipo de los laboratorios UOITA, en especial a la Ing. Mónica Silva por sus guías y consejos. Y de manera especial al Ing. Giovanni Freire por compartir sus conocimientos y sabiduría en la elaboración de este trabajo.

A los laboratorios LABSU y en especial a Ing. Armando Melendrez por permitirme desarrollar ciertas etapas de la parte experimental en las instalaciones de este.

Ratifico mi agradecimiento a mi familia, en especial a mis padres, hermanas y sobrina por ser mi inspiración y los gestores de la realización de este trabajo. Muchas gracias David por la paciencia y el apoyo brindado en todas las ocasiones y a lo largo elaboración de esta investigación. Gracias amigas Lule, Aby y Gaby por sus consejos y guías en los debidos momentos.

Y finalmente, gracias a todas las personas quienes me dieron palabras de aliento y de apoyo para continuar en este largo camino.

# ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

## **CAPITULO I**

### **EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

1.1 Tema de Investigación	2
1.2 Planteamiento del problema	2
1.2.1 Contextualización	3
1.2.1.1 Macro Contextualización	3
1.2.1.2 Meso Contextualización	4
1.2.1.3 Micro Contextualización	5
1.2.2 Análisis crítico	6
1.2.3 Prognosis	7
1.2.4 Formulación del problema	7
1.2.5 Preguntas directrices	7
1.2.6 Delimitación	8
1.3 Justificación	8
1.4 Objetivos	9
1.4.1 Objetivo General	9
1.4.2 Objetivos Específicos	10

## **CAPITULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

2.1 Antecedentes investigativos	11
2.2 Fundamentación filosófica	13
2.3 Fundamentación legal	13
2.3.1 Constitución de la República del Ecuador	13
2.3.2 Plan Nacional Para El Buen Vivir	15
2.3.3 Reglamento para registro y control sanitarios de plantas Medicinales y Fitomedicamentos Vigente en Ecuador	16
2.3.4 Convenio sobre Diversidad Biológica (CBD)	17
2.3.5 Normas para la búsqueda, evaluación, producción y control de calidad de extractos vegetales	18
2.4 Categorías fundamentales	20
2.4.1 Marco Teórico de la Variable Independiente:	21
2.4.1.1 Plantas Medicinales	21
2.4.1.2 Plantas medicinales con acción antimicrobiana	22
2.4.1.3 Extractos de plantas	24
2.4.1.4 Metodologías para la preparación de extractos de plantas	24

2.4.1.4.1 Infusión	24
2.4.1.4.2 Decocción a fuego lento	25
2.4.1.4.3 Maceración	26
2.4.1.4.4 Extracto crudo o Jugo fresco	27
2.4.2 Marco Teórico de la Variable Dependiente:	28
2.4.2.1 Principios activos provenientes de plantas con acción antimicrobiana	28
2.4.2.1.1 Alcaloides	29
2.4.2.1.2 Terpenos y terpenoides	30
2.4.2.1.3 Esteroides	31
2.4.2.1.4 Taninos	32
2.4.2.1.5 Quinonas	33
2.4.2.1.6 Flavonoides	34
2.4.2.1.7 Saponinas	35
2.4.2.1.8 Lactonas	36
2.4.2.1.9 Cumarinas	37
2.4.2.2 Descripción de los microorganismos patógenos humanos	38
2.4.2.2.1 Escherichia coli	38
2.4.2.2.2 Candida albicans	40
2.5 Hipótesis	41
2.5.1 Hipótesis Nula (Ho)	41
2.5.2 Hipótesis Alternativa (Hi)	42
2.6 Señalamiento de variables	42
<b>CAPITULO III</b>	
<b>METODOLOGÍA</b>	
3.1 Enfoque	43
3.2 Modalidad básica de la investigación	43
3.3 Nivel o tipo de investigación	44
3.4 Población y muestra	44
3.4.1 Población:	44
3.4.2 Muestra:	45
3.5 Operacionalización de variables	45
3.6 Recolección de información	47
3.6.1 Identificación de la actividad antimicrobiana de extractos vegetales frente a <i>Escherichia coli</i> y <i>Candida albicans</i> . Estudio Exploratorio tipo Screening	47
a) Diseño Experimental	47
b) Tratamiento del material vegetal	48

c) Secado del material vegetal	48
d) Obtención de los extractos	48
Maceración en etanol	49
Maceración en hexano	49
Infusión	50
Decocción a fuego lento	50
e) Determinación de la concentración de los extractos	51
f) Preparación de los medios de cultivo	51
g) Testigos y blancos a emplearse.	52
h) Ensayos para la determinación de la acción antimicrobiana	52
Preparación de suspensiones de microorganismos	53
Caracterización morfológica y bioquímica de los microorganismos	53
Inoculación en los medios de cultivo	57
Rayado de los microorganismos por el método de Mitscher	58
i) Evaluación por el método de Mitscher	58
3.6.2 Selección de los extractos vegetales más promisorios con actividad antimicrobiana sobre <i>Escherichia coli</i> y <i>Candida albicans</i> .	59
3.6.3 Establecimiento de las concentraciones adecuadas para inhibir la actividad microbiana de los microorganismos <i>Escherichia coli</i> y <i>Candida albicans</i> .	60
a) Diseño Experimental	60
b) Evaluación	61
3.6.4 Identificación de los metabolitos secundarios contenidos en los extractos seleccionados, mediante análisis fitoquímico.	61
3.7 Procesamiento y análisis	62
<b>CAPITULO IV</b>	
<b>ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS</b>	
4.1 Análisis de los resultados	63
4.1.1 Identificación de la actividad antimicrobiana de extractos vegetales	63
Valores de pH de los extractos vegetales	64
Valores de conductividad eléctrica de los extractos vegetales	64
Valores de concentración de los extractos vegetales	65
Colores de los extractos vegetales	65
Activación de las cepas microbianas	66
Caracterización morfológica y bioquímica de los microorganismos	66
Determinación de los vegetales más promisorios para inhibir el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> y <i>Candida albicans</i> .	67
Extractos de paico	67

Extractos de tomillo	68
Extractos de matico	69
Extractos de ortiga negra	70
Extractos de hierba luisa	71
Extractos de albahaca	72
Extractos de ambo	72
Extractos de guayaba	73
4.1.2 Selección de los extractos vegetales más promisorios con actividad antimicrobiana	73
4.1.3 Establecimiento de las concentraciones adecuadas para inhibir la actividad microbiana	78
Valores de pH de los extractos vegetales	78
Valores de conductividad eléctrica de los extractos vegetales	78
Valores de concentración de los extractos vegetales	79
Colores de los extractos vegetales	79
Determinación de las concentraciones adecuadas para inhibir la actividad microbiana	79
4.1.4 Identificación de los metabolitos secundarios contenidos en los extractos seleccionados, mediante análisis fitoquímico.	83
4.2 Interpretación de datos	85
4.2.1 Identificación de la actividad antimicrobiana de extractos vegetales	85
Valores de pH de los extractos vegetales	86
Valores de conductividad eléctrica de los extractos vegetales	87
Valores de concentración de los extractos vegetales	88
Colores de los extractos vegetales	88
Activación de las cepas microbianas	89
Caracterización morfológica y bioquímica de los microorganismos	89
Determinación de los vegetales más promisorios para inhibir el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> y <i>Candida albicans</i> .	91
Extractos de paico	91
Extractos de tomillo	92
Extractos de matico	93
Extractos de ortiga negra	94
Extractos de hierba luisa	95
Extractos de albahaca	96
Extractos de ambo	97
Extractos de guayaba	98

4.2.2 Selección de los extractos vegetales más promisorios con actividad antimicrobiana	98
4.2.3 Establecimiento de las concentraciones adecuadas para inhibir la actividad microbiana	100
Valores de pH de los extractos vegetales	100
Valores de conductividad eléctrica de los extractos vegetales	100
Valores de concentración de los extractos vegetales	100
Colores de los extractos vegetales	101
Determinación de las concentraciones adecuadas para inhibir la actividad microbiana	101
4.2.4 Identificación de los metabolitos secundarios contenidos en los extractos seleccionados, mediante análisis fitoquímico.	102
4.2.4.1 Paico	102
4.2.4.2 Tomillo	103
4.3 Discusión General	104
4.4 Verificación de hipótesis	107
<b>CAPITULO V</b>	
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	
5.1 Conclusiones	108
5.2 Recomendaciones	109
<b>CAPITULO VI</b>	
<b>PROPUESTA</b>	
6.1 Datos Informativos	111
6.2 Antecedentes de la propuesta	111
6.3 Justificación	113
6.4 Objetivos	114
6.4.1 Objetivo General	114
6.4.2 Objetivos Específicos	114
6.5 Análisis de factibilidad	115
6.6 Fundamentación	116
6.7 Metodología	118
6.8 Administración	120
6.9 Previsión de la evaluación	121
<b>MATERIALES DE REFERENCIA</b>	
1. Bibliografía	123
2. Anexos	137

## ÍNDICE DE TABLAS

### **Anexo A. Respuestas Experimentales**

**Tabla A-1.** Valores de humedad de las especies vegetales después del proceso de secado.

**Tabla A-2.** Valores de pH de los extractos vegetales.

**Tabla A-3.** Valores de conductividad eléctrica de los extractos vegetales.

**Tabla A-4.** Valores de concentración de los extractos vegetales.

**Tabla A-5.** Colores de los extractos vegetales.

**Tabla A-6.** Crecimiento de *Escherichia coli* con los diferentes tratamientos.

**Tabla A-7.** Porcentajes de inhibición de *Escherichia coli* con los diferentes tratamientos.

**Tabla A-8.** Crecimiento de *Candida albicans* con los diferentes tratamientos.

**Tabla A-9.** Porcentajes de inhibición de *Candida albicans* con los diferentes tratamientos.

**Tabla A-10.** Promedios de los porcentajes de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* frente a cada tratamiento a las 24 y 48 horas de incubación (%).

**Tabla A-11.** Promedios de los porcentajes de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* frente a cada tratamiento a las 48 y 72 horas de incubación (%).

**Tabla A-12.** Conteo de las siembras de *Escherichia coli* en medio Chromocult y Petrifilm para las diluciones  $1/10^3$  y  $1/10^2$ .

**Tabla A-13.** Conteo de las siembras de *Candida albicans* en medio PDA (Potato Dextrose Agar) y Agar Sabouraud para las diluciones  $1/10^3$  y  $1/10^2$ .

**Tabla A-14.** Valores de humedad de las especies vegetales después del proceso de secado para la segunda etapa.



**Tabla A-15.** Valores de pH de los extractos vegetales para la segunda etapa.

**Tabla A-16.** Valores de conductividad eléctrica de los extractos vegetales para la segunda etapa.

**Tabla A-17.** Valores de concentración de los extractos vegetales para la segunda etapa.

**Tabla A-18.** Colores de los extractos vegetales para la segunda etapa.

**Tabla A-19.** Crecimiento de *Escherichia coli* frente a los diferentes tratamientos más eficaces a diferentes concentraciones.

**Tabla A-20.** Porcentajes de inhibición de *Escherichia coli* frente a los diferentes tratamientos más eficaces a diferentes concentraciones.

**Tabla A-21.** Crecimiento de *Candida albicans* *Escherichia coli* frente a los diferentes tratamientos más eficaces a diferentes concentraciones.

**Tabla A-22.** Porcentajes de inhibición de *Candida albicans* frente a los diferentes tratamientos más eficaces a diferentes concentraciones.

**Tabla A-23.** Promedio de los porcentajes de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* frente a cada tratamiento a las 24 y 48 horas de incubación (%).

**Tabla A-24.** Promedio de los porcentajes de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* frente a cada tratamiento a las 24 y 48 horas de incubación (%).

**Tabla A-25.** Caracterización morfológica de los microorganismos

**Tabla A-26.** Caracterización bioquímica de los microorganismos

## **Anexo B. Análisis estadístico.**

**Tabla B-1.** Análisis de Varianza para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales.

**Tabla B-2.** Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con intervalos de confianza del 95,0%.

**Tabla B-3.** Prueba de Tukey – para el Factor A (Factor A: metodología de obtención de los extractos vegetales) para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.

**Tabla B-4.** Prueba de Tukey – para el Factor B (Factor B: Especie vegetal) para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.

**Tabla B-5.** Prueba de Tukey – para la interacción AXB para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.

**Tabla B-6.** Análisis de Varianza para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales.

**Tabla B-7.** Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con intervalos de confianza del 95,0%.

**Tabla B-8.** Prueba de Tukey – para el Factor A (Factor A: metodología de obtención de los extractos vegetales) para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.

**Tabla B-9.** Prueba de Tukey – para el Factor B (Factor B: Especie vegetal) para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.

**Tabla B-10.** Prueba de Tukey – para la interacción AXB para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.

**Tabla B-11.** Análisis de Varianza para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales.

**Tabla B-12.** Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con intervalos de confianza del 95,0%.

**Tabla B-13.** Prueba de Tukey – para el Factor A (Factor A: metodología de obtención de los extractos vegetales) para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.

**Tabla B-14.** Prueba de Tukey – para el Factor B (Factor B: Especie vegetal) para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.

**Tabla B-15.** Prueba de Tukey – para la interacción AXB para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.

**Tabla B-16.** Análisis de Varianza para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales.

**Tabla B-17.** Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con intervalos de confianza del 95,0%.

**Tabla B-18.** Prueba de Tukey – para el Factor A (Factor A: metodología de obtención de los extractos vegetales) para el porcentaje de inhibición del

crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.

**Tabla B-19.** Prueba de Tukey – para el Factor B (Factor B: Especie vegetal) para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.

**Tabla B-20.** Prueba de Tukey – para la interacción AXB para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.

**Tabla B-21.** Análisis de Varianza para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 24 tratamientos.

**Tabla B-22.** Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 24 tratamientos con intervalos de confianza del 95,0%.

**Tabla B-23.** Prueba de Tukey – para el Factor A (Factor A: Tratamientos más eficaces) para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.

**Tabla B-24.** Prueba de Tukey – para el Factor B (Factor B: concentraciones) para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.

**Tabla B-25.** Prueba de Tukey – para la interacción AXB para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.

**Tabla B-26.** Análisis de Varianza para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos.

**Tabla B-27.** Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con intervalos de confianza del 95,0%.

**Tabla B-28.** Prueba de Tukey – para el Factor A (Factor A: Tratamientos más eficaces) para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.

**Tabla B-29.** Prueba de Tukey – para el Factor B (Factor B: concentraciones) para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.

**Tabla B-30.** Prueba de Tukey – para la interacción AXB para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.

**Tabla B-31.** Análisis de Varianza para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a 24 tratamientos.

**Tabla B-32.** Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con intervalos de confianza del 95,0%.

**Tabla B-33.** Prueba de Tukey – para el Factor A (Factor A: Tratamientos más eficaces) para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.

**Tabla B-34.** Prueba de Tukey – para el Factor B (Factor B: concentraciones) para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.

**Tabla B-35.** Prueba de Tukey – para la interacción AXB para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.

**Tabla B-36.** Análisis de Varianza para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 24 tratamientos.

**Tabla B-37.** Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 24 tratamientos con intervalos de confianza del 95,0%.

**Tabla B-38.** Prueba de Tukey – para el Factor A (Factor A: Tratamientos más eficaces) para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.

**Tabla B-39.** Prueba de Tukey – para el Factor B (Factor B: concentraciones) para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.

**Tabla B-40.** Prueba de Tukey – para la interacción AXB para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

### **Anexo B. Análisis estadístico**

**Gráfico B-1.** Dispersión entre la metodología y el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico B-2.** Dispersión entre la planta medicinal y el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico B-3.** Medias de la metodología para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico B-4.** Medias de las plantas medicinales para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico B-5.** Interacción entre los factores para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0% de Tuckey.

**Gráfico B-6.** Dispersión entre la metodología y el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico B-7.** Dispersión entre la planta medicinal y el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico B-8.** Medias de la metodología para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico B-9.** Medias de las plantas medicinales para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico B-10.** Interacción entre los factores para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0% de Tuckey.

**Gráfico B-11.** Dispersión entre la metodología y el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico B-12.** Dispersión entre la planta medicinal y el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico B-13.** Medias de la metodología para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico B-14.** Medias de las plantas medicinales para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico B-15.** Interacción entre los factores para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0% de Tuckey.

**Gráfico B-16.** Dispersión entre la metodología y el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico B-17.** Dispersión entre la planta medicinal y el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico B-18.** Medias de la metodología para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.



**Gráfico B-19.** Medias de las plantas medicinales para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico B-20.** Interacción entre los factores para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0% de Tuckey.

**Gráfico B-21.** Dispersión entre el tratamiento y el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico B-22.** Dispersión entre la concentración y el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico B-23.** Medias del tratamiento para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico B-24.** Medias de las concentraciones para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico B-25.** Interacción entre los factores para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0% de Tuckey.

**Gráfico B-26.** Dispersión entre el tratamiento y el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico B-27.** Dispersión entre la concentración y el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico B-28.** Medias del tratamiento para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico B-29.** Medias de las concentraciones para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico B-30.** Interacción entre los factores para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0% de Tuckey.

**Gráfico B-31.** Dispersión entre el tratamiento y el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico B-32.** Dispersión entre la concentración y el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico B-33.** Medias del tratamiento para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico B-34.** Medias de las concentraciones para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico B-35.** Interacción entre los factores para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0% de Tuckey.

**Gráfico B-36.** Dispersión entre el tratamiento y el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico B-37.** Dispersión entre la concentración y el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico B-38.** Medias del tratamiento para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico B-39.** Medias de las concentraciones para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico B-40.** Interacción entre los factores para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0% de Tuckey.

### **Anexo C. Fotografías**

**Gráfico C-1.** Especies vegetales en estudio. A) Albahaca, B) Ambo, C) Guayaba, D) Hierba luisa, E) Tomillo, F) Matico, G) Ortiga, H) Paico.

**Gráfico C-2.** Secado del material vegetal

**Gráfico C-3.** Obtención de los extractos vegetales por infusión y decocción. A) Infusión, B) Decocción

**Gráfico C-4.** Obtención de los extractos vegetales por maceración en hexano y etanol. A) Maceración en hexano, B) Maceración en etanol.

**Gráfico C-5.** Concentración en rota-vapor de los extractos vegetales por maceración en hexano y etanol.

**Gráfico C-6.** Determinación de la concentración de los extractos vegetales.

**Gráfico C-7.** Esterilización de los extractos vegetales.

**Gráfico C-8.** Activación de las cepas microbianas. A) Kwik-Stick con la cepa microbiana liofilizada, B) Activación de *Escherichia coli*, C) Activación de *Candida albicans*.

**Gráfico C-9.** Crecimiento de *Escherichia coli*.

**Gráfico C-10.** Crecimiento de *Candida albicans*.

**Gráfico C-11.** Caracterización bioquímica de las cepas microbianas.

**Gráfico C-12.** Caracterización microscópica de las cepas microbianas.

**Gráfico C-13.** Estandarización de las suspensiones microbianas. A) Estándar 0.5 McFarland, B) Suspensión de *Escherichia coli*. C) Suspensión de *Candida albicans*.

**Gráfico C-14.** Almacenamiento de las cepas microbianas en crioviales.

**Gráfico C-15.** Actividad antimicrobiana de los extractos por maceración en etanol frente a *Escherichia coli* después de 48h de incubación. Extractos por maceración en etanol de: A), B) Testigo, C) Albahaca, D) Ambo, E) Guayaba, F) Hierba Luisa, G) Matico, H) Ortiga negra, I) Paico, J) Tomillo.

**Gráfico C-16.** Actividad antimicrobiana de los extractos por maceración en etanol frente a *Candida albicans* después de 48h de incubación. Extractos por maceración en etanol de: A), B) Testigo, C) Albahaca, D) Ambo, E) Guayaba, F) Hierba Luisa, G) Matico, H) Ortiga negra, I) Paico, J) Tomillo.

**Gráfico C-17.** Actividad antimicrobiana de los extractos por maceración en etanol frente a *Candida albicans* después de 72h de incubación. Extractos por maceración en etanol de: A), B) Testigo, C) Albahaca, D) Ambo, E) Guayaba, F) Hierba Luisa, G) Matico, H) Ortiga negra, I) Paico, J) Tomillo.

**Gráfico C-18.** Actividad antimicrobiana de los extractos por maceración en hexano frente a *Escherichia coli* después de 24h de incubación. Extractos por maceración en hexano de: A), B) Testigo, C) Albahaca, D) Ambo, E) Guayaba, F) Hierba Luisa, G) Matico, H) Ortiga negra, I) Paico, J) Tomillo.

**Gráfico C-19.** Actividad antimicrobiana de los extractos por maceración en hexano frente a *Escherichia coli* después de 48h de incubación. Extractos por maceración en hexano de: A), B) Testigo, C) Albahaca, D) Ambo, E) Guayaba, F) Hierba Luisa, G) Matico, H) Ortiga negra, I) Paico, J) Tomillo.

**Gráfico C-20.** Actividad antimicrobiana de los extractos por maceración en hexano frente a *Candida albicans* después de 48h de incubación. Extractos por maceración en hexano de: A), B) Testigo, C) Albahaca, D) Ambo, E) Guayaba, F) Hierba Luisa, G) Matico, H) Ortiga negra, I) Paico, J) Tomillo.

**Gráfico C-21.** Actividad antimicrobiana de los extractos por maceración en hexano frente a *Candida albicans* después de 72h de incubación. Extractos por maceración en hexano de: A), B) Testigo, C) Albahaca, D) Ambo, E) Guayaba, F) Hierba Luisa, G) Matico, H) Ortiga negra, I) Paico, J) Tomillo.

**Gráfico C-22.** Actividad antimicrobiana de los extractos por decocción frente a *Escherichia coli* después de 24 h de incubación. Extractos por decocción de: A), B) Testigo, C) Ambo, D) Guayaba, E) Matico, F) Ortiga negra, G) Albahaca, H) Hierba Luisa, I) Paico, J) Tomillo.

**Gráfico C-23.** Actividad antimicrobiana de los extractos por decocción frente a *Escherichia coli* después de 48 h de incubación. Extractos por decocción de: A), B) Testigo, C) Albahaca, D) Matico, E) Ambo, F) Guayaba, G) Hierba Luisa, H) Paico, I) Ortiga negra, J) Tomillo.

**Gráfico C-24.** Actividad antimicrobiana de los extractos por decocción frente a *Candida albicans* después de 48 h de incubación. Extractos por decocción de: A), B) Testigo, C) Albahaca, D) Ambo, E) Guayaba, F) Hierba Luisa, G) Matico, H) Ortiga negra, I) Paico, J) Tomillo.

**Gráfico C-25.** Actividad antimicrobiana de los extractos por decocción frente a *Candida albicans* después de 72 h de incubación. Extractos por decocción de: A), B) Testigo, C) Albahaca, D) Ambo, E) Guayaba, F) Hierba Luisa, G) Matico, H) Ortiga negra, I) Paico, J) Tomillo.

**Gráfico C-26.** Actividad antimicrobiana de los extractos por infusión frente a *Escherichia coli* después de 24 h de incubación. Extractos por infusión de: A), B) Testigo, C) Albahaca, D) Ambo, E) Guayaba, F) Hierba Luisa, G) Matico, H) Ortiga negra, I) Paico, J) Tomillo.

**Gráfico C-27.** Actividad antimicrobiana de los extractos por infusión frente a *Escherichia coli* después de 48 h de incubación. Extractos por infusión de:

A), B) Testigo, C) Albahaca, D) Ambo, E) Guayaba, F) Hierba Luisa, G) Matico, H) Ortiga negra, I) Paico, J) Tomillo.

**Gráfico C-28.** Actividad antimicrobiana de los extractos por infusión frente a *Candida albicans* después de 48 h de incubación. Extractos por infusión de: A), B) Testigo, C) Albahaca, D) Ambo, E) Guayaba, F) Hierba Luisa, G) Matico, H) Ortiga negra, I) Paico, J) Tomillo.

**Gráfico C-29.** Actividad antimicrobiana de los extractos por infusión frente a *Candida albicans* después de 72 h de incubación. Extractos por infusión de: A), B) Testigo, C) Albahaca, D) Ambo, E) Guayaba, F) Hierba Luisa, G) Matico, H) Ortiga negra, I) Paico, J) Tomillo.

**Gráfico C-30.** Especies vegetales más promisorias. A) Paico, B) Tomillo.

**Gráfico C-31.** Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de paico a diferentes concentraciones frente a *Escherichia coli* después de 24 h de incubación. Concentraciones de: A), B) Testigo, C) 100 mg/l, D) 250 mg/l, E) 500mg/l, F) 1000 mg/l, G) 2500 mg/l, H) 5000 mg/l.

**Gráfico C-32.** Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de paico a diferentes concentraciones frente a *Escherichia coli* después de 48 h de incubación. Concentraciones de: A), B) Testigo, C) 100 mg/l, D) 250 mg/l, E) 500mg/l, F) 1000 mg/l, G) 2500 mg/l, H) 5000 mg/l.

**Gráfico C-33.** Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de paico a diferentes concentraciones frente a *Candida albicans* después de 48 h de incubación. Concentraciones de: A), B) Testigo, C) 100 mg/l, D) 250 mg/l, E) 500mg/l, F) 1000 mg/l, G) 2500 mg/l, H) 5000 mg/l.

**Gráfico C-34.** Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de paico a diferentes concentraciones frente a *Candida albicans* después de 72 h de incubación. Concentraciones de: A), B) Testigo, C) 100 mg/l, D) 250 mg/l, E) 500mg/l, F) 1000 mg/l, G) 2500 mg/l, H) 5000 mg/l.

**Gráfico C-35.** Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de tomillo a diferentes concentraciones frente a *Escherichia coli* después de 24 h de

incubación. Concentraciones de: A), B) Testigo, C) 100 mg/l, D) 250 mg/l, E) 500mg/l, F) 1000 mg/l, G) 2500 mg/l, H) 5000 mg/l.

**Gráfico C-36.** Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de tomillo a diferentes concentraciones frente a *Escherichia coli* después de 48 h de incubación. Concentraciones de: A), B) Testigo, C) 100 mg/l, D) 250 mg/l, E) 500mg/l, F) 1000 mg/l, G) 2500 mg/l, H) 5000 mg/l.

**Gráfico C-37.** Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de tomillo a diferentes concentraciones frente a *Candida albicans* después de 48 h de incubación. Concentraciones de: A), B) Testigo, C) 100 mg/l, D) 250 mg/l, E) 500mg/l, F) 1000 mg/l, G) 2500 mg/l, H) 5000 mg/l.

**Gráfico C-38.** Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de tomillo a diferentes concentraciones frente a *Candida albicans* después de 72 h de incubación. Concentraciones de: A), B) Testigo, C) 100 mg/l, D) 250 mg/l, E) 500mg/l, F) 1000 mg/l, G) 2500 mg/l, H) 5000 mg/l.

## RESUMEN

Para inhibir el crecimiento de los microorganismos *Escherichia coli* y *Candida albicans* se realizaron 4 metodologías de obtención de los extractos de 8 especies vegetales. Las metodologías de extracción emplearon solventes de diferente polaridad tales como: agua, etanol y hexano. Las plantas medicinales estudiadas fueron: albahaca (*Ocimum basilicum*), ambo (*Nicandra physalodes*), guayaba (*Psidium guajava*), hierba luisa (*Cymbopogon citratus*), matico (*Aristeguietia glutinosa*), ortiga negra (*Urtica dioica*), paico (*Chenopodium ambrosioides*), tomillo (*Thymus vulgaris*).

Los extractos que demostraron los mejores porcentajes de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* fueron la maceración en etanol de tomillo, con una media del 100% de inhibición del crecimiento; el macerado en etanol de paico, con una media del 100% de inhibición del crecimiento; decocción de tomillo, con una media del 75% de inhibición del crecimiento. Y, para la inhibición de *Candida albicans* fueron la maceración en etanol de paico, con una media del 100% de inhibición del crecimiento; el macerado en etanol de tomillo, con una media del 100% de inhibición del crecimiento; maceración en etanol de matico, con una media del 75% de inhibición del crecimiento.

En el caso del extracto etanólico de paico este demostró que inhibe en un 100% el crecimiento de *Escherichia coli* a una concentración de 2500 mg/l. En cambio, el extracto etanólico de tomillo inhibe el crecimiento de la bacteria a una concentración de 5000 mg/l. Para la levadura *Candida albicans* el extracto etanólico de paico y el extracto etanólico de tomillo demostraron que inhiben el crecimiento de la levadura a una concentración de 2500 mg/l.

Finalmente el análisis fitoquímico determinó que las hojas de paico y tomillo contienen metabolitos secundarios tales como: aceites esenciales, taninos, flavonoides y triterpenos, esteroides, alcaloides (paico) y saponinas (tomillo).



# CAPITULO I

## EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

### 1.1 Tema de Investigación

Investigación de la Actividad Antimicrobiana y Fitoquímica de Extractos de Plantas Medicinales frente a los Microorganismos Patógenos *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

### 1.2 Planteamiento del problema

*Escherichia coli* puede causar graves afecciones tales como cólicos y diarrea, que puede ser sanguinolenta (diarrea hemorrágica). También pueden aparecer fiebre, vómitos, insuficiencia renal y en algunos casos puede causar la muerte. Por otro lado, *Candida albicans* puede atacar órganos como la boca (afecciones bucofaringeas), vagina (vaginitis), tracto gastrointestinal y tracto urinario (cistitis), glándula prostática (infecciones), piel y dedos de las manos o pies (infecciones) (OMS, 2011).

Ecuador cuenta con centenares de plantas aromáticas y medicinales ya que hay aproximadamente 500 especies de plantas medicinales conocidas, de las cuales 228 son las más empleadas y de ellas 125 son ampliamente comercializadas para tratar varias enfermedades entre ellas las enfermedades causadas por microorganismos. Sin embargo, estas prácticas se basan en el conocimiento empírico y en la experiencia de los pueblos puesto que las características antimicrobianas de las plantas no han sido validadas científicamente.

En Ecuador los trabajos sobre actividad antimicrobiana y fitoquímica de plantas son escasos ya que existen dos publicaciones en Quito de la Escuela de Biotecnología del Departamento de Ciencias de la Vida de la Escuela Politécnica del Ejército. Mientras que en Tungurahua no existen trabajos de investigación relacionados a esta temática. Por lo cual existe la

necesidad de investigar la actividad antimicrobiana y fitoquímica de plantas medicinales frente a los patógenos *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

### **1.2.1 Contextualización**

#### **1.2.1.1 Macro Contextualización**

El consumo de plantas medicinales se está incrementando considerablemente alrededor del mundo (Arora y colaboradores, 2011). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que alrededor del 80% de personas que viven en países en vías de desarrollo emplea exclusivamente plantas medicinales tradicionales para necesidades primarias de salud. Esto quiere decir que alrededor de 3300 millones de personas en los países subdesarrollados utilizan básicamente plantas medicinales (Aswatha, 2006).

Varias encuestas realizadas en Asia revelaron que la mayor parte de la gente sufre de una enfermedad microbiana y otras personas sufren padecimientos desde, el rango de enfermedades terribles como tuberculosis o lepra, hasta otras como una fiebre. Se ha comprobado que la tendencia de la auto-medicación, resistencia a antibióticos, falta de conocimiento, falta de higiene son algunos de los factores responsables de tal propagación de enfermedades de carácter infeccioso (Mazumder y Mazumder, 2006).

Debido al indiscriminado uso de fármacos sintéticos se ha provocado la mutación de ciertas cepas patógenas creando resistencia a dichos fármacos. Actualmente, investigadores de diferentes regiones a nivel mundial están intentando revivir el conocimiento ancestral y se están analizando científicamente diferentes plantas que han sido usadas en la medicina tradicional en la búsqueda de plantas con componentes con eficacia antimicrobiana (Mazumder y Mazumder, 2006).

### **1.2.1.2 Meso Contextualización**

En general, la diversidad de fauna y flora del Ecuador representa un alto porcentaje de la biodiversidad mundial. Con una superficie territorial de 256370 km<sup>2</sup>, ocupa solamente el 0,19% de la superficie terrestre, pero alberga el 10,7% de los animales vertebrados y el 6,4% de las plantas del mundo. Por su parte la flora ecuatoriana es inmensamente rica. Se han hecho estimaciones de que existen alrededor de 25000 especies de plantas vasculares de las cuales alrededor de 4000 son endémicas (Estrella, 2005).

Asimismo, el Ecuador cuenta con centenares de plantas aromáticas y medicinales ya que hay aproximadamente 500 especies de plantas medicinales conocidas, de las cuales 228 son las más empleadas y de ellas 125 son ampliamente comercializadas y esto es solamente una fracción de la riqueza que se estima que existe en el país.

El uso y comercio de plantas aromáticas y medicinales es vasto ya que el 80% de la población ecuatoriana depende de la medicina tradicional y por consiguiente de las plantas o productos naturales, basándose en estas para la salud y bienestar (AGRISAVE, s/f).

Por otra parte, las plantas para tratar infecciones e infestaciones constituyen el 26% del total de especies medicinales. En esta categoría están las especies utilizadas para tratar afecciones causadas por bacterias, virus, hongos, protozoos, platelmintos, nemátodos, anélidos y artrópodos. Sin embargo, las plantas que tratan infecciones causadas por bacterias son las más comunes (De la Torre y colaboradores, 2008).

Por lo tanto, en el Ecuador el uso de plantas medicinales es una práctica usual basada, sobre todo, en la sabiduría cotidiana ya que durante siglos estas plantas han sido empleadas en forma empírica y, como se explicó anteriormente la flora del Ecuador ha sido estudiada desde hace tiempo, sin embargo, la investigación de eficacia antimicrobiana y fitoquímica es más bien escasa (USAB, 2009).

Estos hechos llaman la atención de la investigación científica a fin de determinar la veracidad de la acción antibacteriana y de descubrir los posibles principios activos que justifiquen los usos terapéuticos.

### **1.2.1.3 Micro Contextualización**

Los primeros habitantes del Ecuador (período Precerámico o Paleoindio) fueron recolectores, cazadores y pescadores (Almeida, 2000). Tras ellos otras culturas se desarrollaron en las tres regiones continentales del país y organizaron toda su vida y cultura con base en las plantas. Se alimentaron de diferentes partes de las plantas disponibles. Y, para tratar sus dolencias, infestaciones y enfermedades, mediante un largo proceso de prueba y error, utilizaron plantas como medicinas (De la Torre y Macía, 2008).

Para el caso concreto de la provincia de Tungurahua, se registra una mención temprana del siglo XVII en la cual el Márquez de Miraflores, comentando el hecho de que en la jurisdicción de Ambato existían solamente dos médicos, manifiesta que eran las mujeres quienes se encargaban de la labor de tratar enfermedades por medio del conocimiento empírico (CIDAP, 1992).

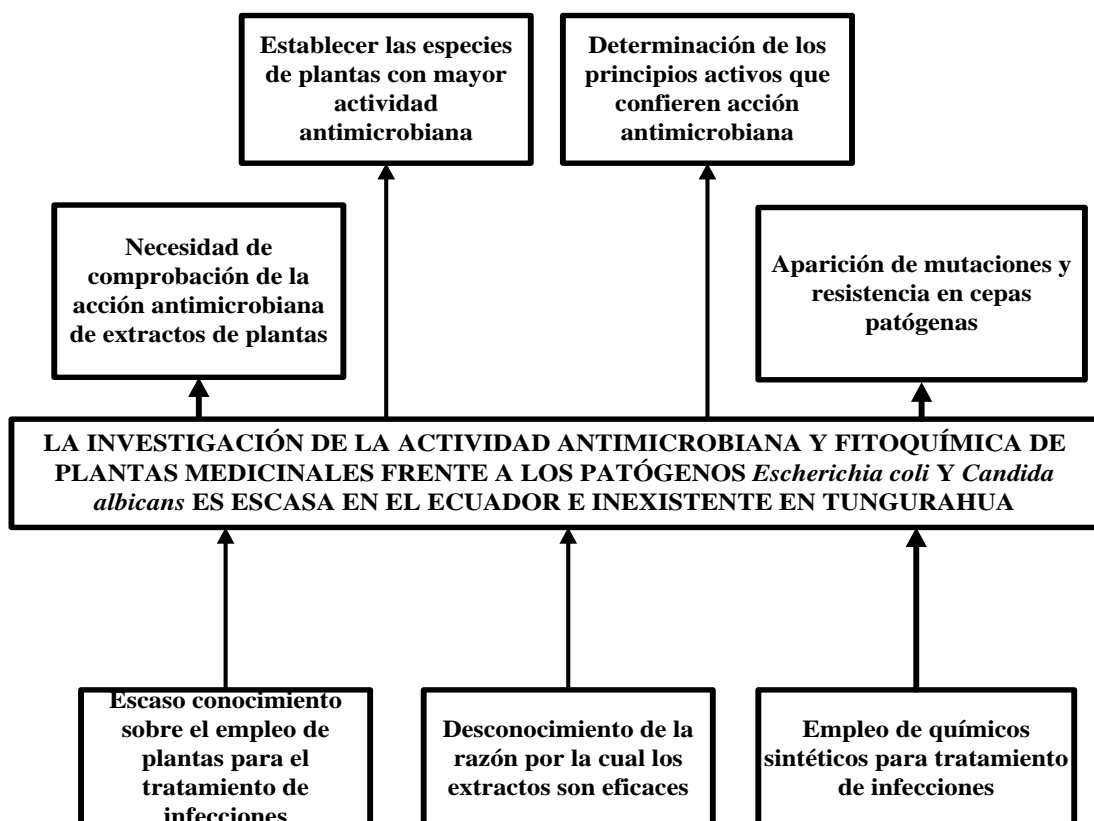
Estos registros confirman el hecho de que el Ecuador, en la región andina o sierra y en la provincia de Tungurahua, el uso de extractos de plantas medicinales está basado en el conocimiento cotidiano y ancestral.

De acuerdo a Cerón (2006), entre las especies vegetales que se expenden en las hierberías de los mercados en las capitales de provincia de los Andes ecuatorianos y las especies silvestres suman 432 plantas medicinales, siendo 92 compartidas entre las de mercado y las silvestres. En las plantas de los mercados se incluye no solamente a las plantas cultivadas en los Andes, sino también a algunas plantas de procedencia amazónica, tropical o fuera del Ecuador, que son comercializadas parcialmente o desecadas en los mercados.

Acosta (1964), registró casi 90 especies en los jardines de la ciudad de Ambato y reporta diversos usos etnobotánicos adicionales al ornamental, por ejemplo, la aplicación medicinal de ciertas especies de *Gentianella*. En general las plantas que tratan infecciones causadas por bacterias son las más comunes.

En el Ecuador los trabajos sobre actividad antimicrobiana y fitoquímica son escasos, existen dos trabajos de grado publicados en la Escuela de Biotecnología del Departamento de Ciencias de la Vida de la Escuela Politécnica del Ejército, Quito. En estos trabajos se han estudiado plantas del género *Baccharis* frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* y la levadura *Candida albicans* (García, 2007). Además, en la comunidad de El Chota en la provincia de Imbabura se ha evaluado extractos de especies vegetales (*Nicandra physalodes* (ambo), *Solanum nigrescens* (hierba mora) y *Sida poeppigiana* (escobillo)) sobre microorganismos causantes de enfermedades bucofaríngeas (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* y *Candida albicans* (Vallejo, 2010).

### 1.2.2 Análisis crítico



### 1.2.3 Prognosis

El papel de las plantas medicinales dentro de las prácticas de medicina popular es fundamental. El conocimiento de esta farmacopea popular es de uso extendido y común en el país, aunque esta sabiduría se ve representada en los agentes no formales de salud quienes se han especializado en este tipo de conocimiento a través del tiempo y la experiencia.

Si no se determina la acción antimicrobiana ni la fitoquímica de los extractos de las plantas, no se tendrá una comprobación científica de las propiedades medicinales de las plantas y de los principios activos que confieren dicha característica.

### 1.2.4 Formulación del problema

¿Cuáles son los extractos vegetales que tendrán actividad antimicrobiana sobre los microorganismos patógenos *Escherichia coli* y *Candida albicans* y cuál será la fitoquímica de los extractos más promisorios?

### 1.2.5 Preguntas directrices

¿Cuál es la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans*?

¿Cuáles son los extractos más promisorios vegetales más promisorios con actividad antimicrobiana sobre *Escherichia coli* y *Candida albicans*?

¿Cuáles serán las concentraciones más adecuadas para inhibir la actividad microbiana de los microorganismos *Escherichia coli* y *Candida albicans*?

¿Cuáles son los metabolitos secundarios contenidos en los extractos seleccionados?

### 1.2.6 Delimitación

Área: Biotecnología  
Sub-área: Etnofarmacología  
Sector: Microbiología  
Sub-sector: Actividad antimicrobiana y Fitoquímica  
Temporal: Abril 2013 – Diciembre 2013  
Espacial: Universidad Técnica de Ambato (Campus Huachi), Laboratorios de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Laboratorios Acreditados OAE.

### 1.3 Justificación

La flora del Ecuador representa un alto porcentaje de la biodiversidad mundial. En el territorio ecuatoriano se concentran el 6,4% de las plantas del mundo. De las cuales, centenares corresponden a plantas aromáticas y medicinales ya que hay alrededor de 500 especies de plantas medicinales conocidas (Estrella, 2005).

La participación de las plantas en las prácticas medicinales tradicionales de los pueblos originarios del Ecuador es fundamental puesto que aproximadamente el 80% de la salud de la población ecuatoriana aun depende de prácticas ancestrales, en las cuales la participación de extractos de plantas para curar enfermedades de carácter principalmente infeccioso es primordial (AGRISAVE, s/f).

En Ecuador el conocimiento tradicional relacionado con la naturaleza es indiscutible, este ha sido transmitido durante generaciones. Estas prácticas se basan solamente en el conocimiento empírico y en la experiencia de los pueblos puesto que las características antimicrobianas de las plantas no han sido validadas científicamente ya que mediante una exhaustiva búsqueda de información la investigación sobre actividad antimicrobiana y fitoquímica de plantas medicinales frente a los patógenos *Escherichia coli* y *Candida albicans* es escasa e inexistente en la provincia de Tungurahua.

Mediante la realización de la presente investigación se podrán conocer cuáles son los extractos de plantas medicinales más eficaces para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos tales como *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Además se conocerán los principios activos que permiten tal capacidad antimicrobiana.

Los resultados de esta investigación justificarán el uso de los extractos de plantas contra infecciones. Consecuentemente permitirá el aprovechamiento y estímulo del cultivo de las especies vegetales, además por medio de nuevas investigaciones se podrán desarrollar medicamentos naturales a base de extractos de plantas.

Es necesario por lo tanto, la comprobación de la eficacia antimicrobiana de extractos de plantas y de sus características fitoquímicas realizándola en una forma científica y tecnológicamente validada.

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo General**

Determinar la actividad antimicrobiana y la fitoquímica de extractos de plantas medicinales frente a los microorganismos *Escherichia coli* y *Candida albicans*.



## **1.4.2 Objetivos Específicos**

**1.4.2.1** Identificar la actividad antimicrobiana de extractos vegetales frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

**1.4.2.2** Seleccionar los extractos vegetales más promisorios con actividad antimicrobiana sobre *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

**1.4.2.3** Establecer las concentraciones adecuadas para inhibir la actividad microbiana de los microorganismos *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

**1.4.2.4** Identificar los metabolitos secundarios contenidos en los extractos seleccionados, mediante análisis fitoquímico.

## CAPITULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Antecedentes investigativos

En la naturaleza existe una gama muy amplia de plantas que producen una diversidad de metabolitos secundarios con características que les permiten actuar como antagonistas de patógenos bióticos. Una forma de aprovechar dicho antagonismo es mediante la preparación de extractos o infusiones a partir de sus diferentes tejidos (Zavaleta, 1999).

Se han utilizado diversas técnicas microbiológicas para demostrar la actividad antimicrobiana de plantas frente a microorganismos patógenos para el hombre.

Investigaciones en Asia se han llevado a cabo y han determinado que extractos de plantas como *Calendula officinalis*, entre otras plantas originarias de Asia, exhiben mayor actividad frente a *S. aureus* el cual ha sido uno de los organismos que agrava enfermedades de la piel. En este sentido hay un gran margen para el desarrollo de la formulación a base de hierbas para el tratamiento de enfermedades de la piel (Roopashree y colaboradores, 2008).

En Turquía se han hecho estudios de las actividades antibacterianas de los extractos de anís, cilantro, regaliz, canela china y enebro. Demostrando que los extractos de anís (*Pimpinella anisum*) mostraron actividad antibacteriana contra *Micrococcus luteus* y *Mycobacterium smegmatus*. Los extractos de regaliz (*Glycyrrhiza glabra*), enebro (*Juniperus oxycedrus*), canela china (*Cinnamomum cassia*) mostraron también actividad antibacteriana, mientras que los demás extractos de plantas no mostraron inhibición (Ayfer y Turgay, 2003).

En Cuba se han realizado investigaciones para validar el uso tradicional como antimicrobiano de especies vegetales que crecen en este país. Para ello se evaluó la actividad antimicrobiana extractos de albahaca y hierba

luisa en donde se demostró que de las especies microbianas estudiadas las más sensibles resultaron *B. subtilis*, la levadura *Candida albicans* y *Pseudomonas aeruginosa* (Hernández y Rodríguez, 2001).

La actividad antimicrobiana de extractos de plantas también se ha estudiado en Brasil sobre cepas microbianas resistentes a antibióticos. Los más altos potenciales antimicrobianos que observaron Nascimento y colaboradores (2000) fueron para los extractos de clavo de olor y jambolan. Además, los resultados demuestran que la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* fue inhibida por extractos de clavo de olor, jambolan, granada y tomillo.

En Venezuela se han evaluado extractos frescos y secos de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) sobre *Staphylococcus aureus*, obteniendo que los extractos produjeron efecto antimicrobiano a concentraciones de 5 y 10 %, afectando los parámetros de crecimiento de la bacteria (Colivet y colaboradores, 2011).

En el Ecuador García (2007) ha determinado la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de plantas del género *Baccharis* frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* y la levadura *Candida albicans*. En este estudio se encontró que el extracto de *Baccharis buxifolia* presentó mayor efectividad antibacteriana. Y, se determinó que la bacteria *Bacillus subtilis* es la bacteria más susceptible mientras que la bacteria más resistente es *Salmonella typhi* (García, 2007).

En la comunidad de El Chota en la provincia de Imbabura se ha evaluado extractos de especies vegetales (*Nicandra physalodes* (ambo), *Solanum nigrescens* (hierba mora) y *Sida poeppigiana* (escobillo)) sobre microorganismos causantes de enfermedades bucofaríngeas (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* y *Candida albicans*). Los resultados de esta investigación demostraron que existe actividad antimicrobiana los extractos de hierba mora y ambo inhiben el crecimiento de *S. pneumoniae* y *C. albicans* (Vallejo, 2010).

## **2.2 Fundamentación filosófica**

Las poblaciones aborígenes han sido portadoras de un gran conocimiento en lo que se refiere a las cualidades y propiedades curativas de un sin número de especies vegetales, este conocimiento ha sido adquirido por medio de la experiencia (García, 2007). Por lo tanto, en esta investigación se propone la validación científica de la práctica ancestral y empírica del uso de plantas medicinales para combatir microorganismos causantes de enfermedades infecciosas como lo son *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

Por lo dicho anteriormente, en esta investigación se considera el paradigma positivista debido a que este paradigma es también conocido como el modelo analítico, cuantificable y se apoya en las normas, criterios y postulados de las ciencias naturales. Además, se considera este paradigma, cuando el conocimiento se obtiene según las reglas del método científico, y sus leyes pueden utilizarse en la explicación y predicción de fenómenos. En este paradigma la investigación aspira a crear conocimiento y su predicción y es válido para todos los tiempos y lugares (Díaz y Rosales, 2004).

## **2.3 Fundamentación legal**

### **2.3.1 Constitución de la República del Ecuador** (Tomado de: Asamblea Constituyente, 2008)

Este trabajo de investigación se relaciona con los siguientes artículos de la Constitución de la República del Ecuador:

#### **Título I/Elementos Constitutivos Del Estado/Capítulo primero/Principios fundamentales:**

**Art. 3.-**Son deberes primordiales del Estado:

Punto 1. Garantizar sin discriminación alguna el efectivo goce de los derechos establecidos en la Constitución y en los instrumentos

internacionales, en particular la educación, la salud, la alimentación, la seguridad social y el agua para sus habitantes.

Punto 7. Proteger el patrimonio natural y cultural del país.

## **Título II/Derechos/Capítulo cuarto/Derechos de las comunidades, pueblos y nacionalidades**

**Art. 57.-** Se reconoce y garantizará a las comunas, comunidades, pueblos y nacionalidades indígenas, de conformidad con la Constitución y con los pactos, convenios, declaraciones y demás instrumentos internacionales de derechos humanos, los siguientes derechos colectivos:

Punto 12. Mantener, proteger y desarrollar los conocimientos colectivos; sus ciencias, tecnologías y saberes ancestrales; los recursos genéticos que contienen la diversidad biológica y la agrobiodiversidad; sus medicinas y prácticas de medicina tradicional, con inclusión del derecho a recuperar, promover y proteger los lugares rituales y sagrados, así como plantas, animales, minerales y ecosistemas dentro de sus territorios; y el conocimiento de los recursos y propiedades de la fauna y la flora.

Se prohíbe toda forma de apropiación sobre sus conocimientos, innovaciones y prácticas.

## **Título VII/Régimen Del Buen Vivir/Capítulo primero/Inclusión y equidad/Sección segunda/Salud**

**Art. 362.-** La atención de salud como servicio público se prestará a través de las entidades estatales, privadas, autónomas, comunitarias y aquellas que ejerzan las medicinas ancestrales alternativas y complementarias. Los servicios de salud serán seguros, de calidad y calidez, y garantizarán el consentimiento informado, el acceso a la información y la confidencialidad de la información de los pacientes.

Los servicios públicos estatales de salud serán universales y gratuitos en todos los niveles de atención y comprenderán los procedimientos de diagnóstico, tratamiento, medicamentos y rehabilitación necesarios.

**Art. 363.-** El Estado será responsable de:

Punto 4. Garantizar las prácticas de salud ancestral y alternativa mediante el reconocimiento, respeto y promoción del uso de sus conocimientos, medicinas e instrumentos.

**Título VII/Régimen Del Buen Vivir/Capítulo primero/Inclusión y equidad/Sección octava/Ciencia, tecnología, innovación y saberes ancestrales**

**Art. 385.-** El sistema nacional de ciencia, tecnología, innovación y saberes ancestrales, en el marco del respeto al ambiente, la naturaleza, la vida, las culturas y la soberanía, tendrá como finalidad:

Punto 1. Generar, adaptar y difundir conocimientos científicos y tecnológicos.

Punto 2. Recuperar, fortalecer y potenciar los saberes ancestrales.

Punto 3. Desarrollar tecnologías e innovaciones que impulsen la producción nacional, eleven la eficiencia y productividad, mejoren la calidad de vida y contribuyan a la realización del buen vivir.

**2.3.2 Plan Nacional Para El Buen Vivir** (Tomado de: SENPLADES, 2009)

**Objetivos nacionales para el Buen Vivir/Objetivo 3: Mejorar la calidad de vida de la población/ Políticas y Lineamientos**

**Política 3.5.** Reconocer, respetar y promover las prácticas de medicina ancestral y alternativa y el uso de sus conocimientos, medicamentos e instrumentos.

a. Incentivar la investigación sobre prácticas y conocimientos ancestrales y alternativos.

- b. Diseñar y aplicar protocolos interculturales que faciliten la implementación progresiva de la medicina ancestral y alternativa con visión holística, en los servicios de salud pública y privada.
- c. Introducir en la malla curricular de los programas de formación profesional en salud contenidos que promuevan el conocimiento, la valorización y el respeto de los saberes y conocimientos ancestrales y alternativos.
- d. Reconocer, formar con perspectiva de género e incorporar agentes tradicionales y ancestrales en el sistema general de salud.
- e. Generar y aplicar normativas de protección de los conocimientos y saberes ancestrales del acervo comunitario y popular.

**2.3.3 Reglamento para registro y control sanitarios de plantas Medicinales y Fitomedicamentos Vigente en Ecuador** (Tomado de: Dehesa, 2009).

**De la autoridad competente:**

En el artículo 3 se establece la conformación de una Comisión Asesora, integrada por médicos y/o farmacéuticos de los sectores: regulatorio, académico y productivo involucrados en la investigación, producción, comercialización y control de los productos naturales de uso medicinal.

La Comisión tiene las siguientes funciones:

- a) La rectoría, en todo lo que se refiera a políticas generales de medicamentos naturales en el Ecuador.
- b) Coordinar con las autoridades nacionales correspondientes, las investigaciones que se realicen para sustentar la eficacia y seguridad de los productos naturales de uso medicinal, a fin de garantizar que no se dupliquen esfuerzos en el estudio de las mismas especies vegetales o animales o materias minerales; que se empleen en la preparación de los productos naturales de uso medicinal.

### **De las categorías de productos naturales:**

Se consideran tres categorías de productos:

- a) Productos respaldados por estudios farmacológicos y toxicológicos, experimentales preclínicos y clínicos;
- b) Productos respaldados por estudios farmacológicos y toxicológicos experimentales (preclínicos); y,
- c) Productos provenientes del recurso natural de uso medicinal, que no ha sufrido transformaciones químicas, solo procesos físicos (lavado, secado o molienda) que estarán respaldados por referencia bibliográfica en uso tradicional, en estudios de toxicidad aguda y no se presenten formas farmacéuticas definidas.

#### **2.3.4 Convenio sobre Diversidad Biológica (CBD)** (Tomado de: Ripa, 2006)

El convenio sobre Diversidad Biológica fue firmado durante la Cumbre de Río de Janeiro en 1992 y entró en vigencia en 1994. Los cinco países andinos lo han ratificado. Este Convenio tiene por objetivos: “La conservación de la diversidad biológica, la utilización sostenible de sus componentes y la participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de la utilización de los recursos genéticos, mediante, entre otras cosas, un acceso adecuado a esos recursos y una transferencia apropiada de las tecnologías pertinentes, teniendo en cuenta todos los derechos sobre esos recursos y a esas tecnologías, así como mediante una financiación apropiada”. (artículo 1 del Convenio). Este artículo muestra las principales preocupaciones y compromisos que dieron lugar al convenio:

- La conservación y el uso sostenible se presentan de manera separada, lo que fue requerido por los países en desarrollo. Desde la publicación de la Estrategia Mundial para la Conservación en 1980, el concepto de conservación - que fue adoptado por la mayoría de los países del mundo – incluía el uso sostenible. Sin embargo, las actividades de conservación y la



cooperación recibida por los países en desarrollo puso mucho énfasis en la conservación y muy poco en el uso sostenible. De esta manera y teniendo en cuenta la importancia de la utilización de la diversidad biológica en estos países, se exigió que el uso sostenible apareciera de manera explícita.

- La distribución justa y equitativa se refiere sólo a los recursos genéticos. Sin embargo, en la aplicación del Convenio este objetivo se aplica a todas las acciones de conservación y uso sostenible. Por otra parte, este enunciado pone en evidencia que el acceso a los recursos genéticos fue una de las razones centrales de la firma del convenio.

- Como mecanismos centrales se mencionan el acceso a los recursos genéticos, la transferencia de tecnologías y la financiación apropiada. Estas prioridades se fundamentan en el reconocimiento que los países más pobres y en general ricos en biodiversidad, han aportado importantes recursos genéticos que han posibilitado el desarrollo tecnológico y económico de los países ricos. En este sentido, el Convenio reconoce la soberanía de los países sobre los recursos biológicos que posee (que antes se consideraban patrimonio de la humanidad y su acceso era libre) y establece orientaciones para que cuando se realice el acceso a estos recursos, se compense con la transferencia de tecnologías y el financiamiento apropiado.

### **2.3.5 Normas para la búsqueda, evaluación, producción y control de calidad de extractos vegetales** (Tomado de: Velasteguí, 2005)

#### **1. Proceso de investigación y producción de una sustancia alelopática de origen vegetal para manejo fitosanitario.**

##### **1. Etnobotánica.**

- a) Identificación botánica y antropológica del vegetal
- b) Recolección.
- c) Conservación en fresco o seco.

## **2. Fitoquímica**

- a) Moler plantas u órganos secos hasta polvo fino.
- b) Pesaje.
- c) Mezclar con un solvente [Ejemplos: diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl) para obtener un extracto apolar y con una mezcla de metanol y agua (MeOH-H<sub>2</sub>O 9:1) para extracto polar].
- d) Fraccionamiento y purificación. Aplicación de tecnologías HPLC (Cromatografía líquida de alta prestación)

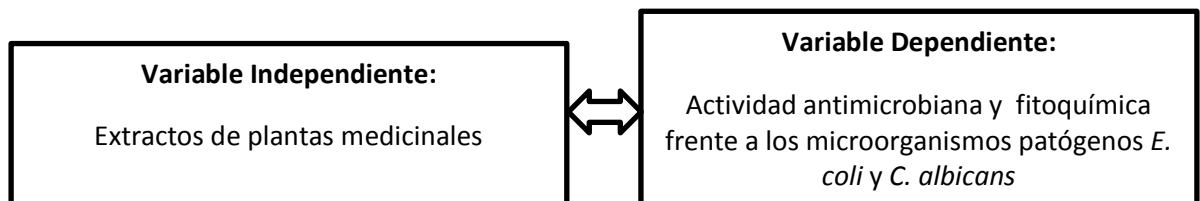
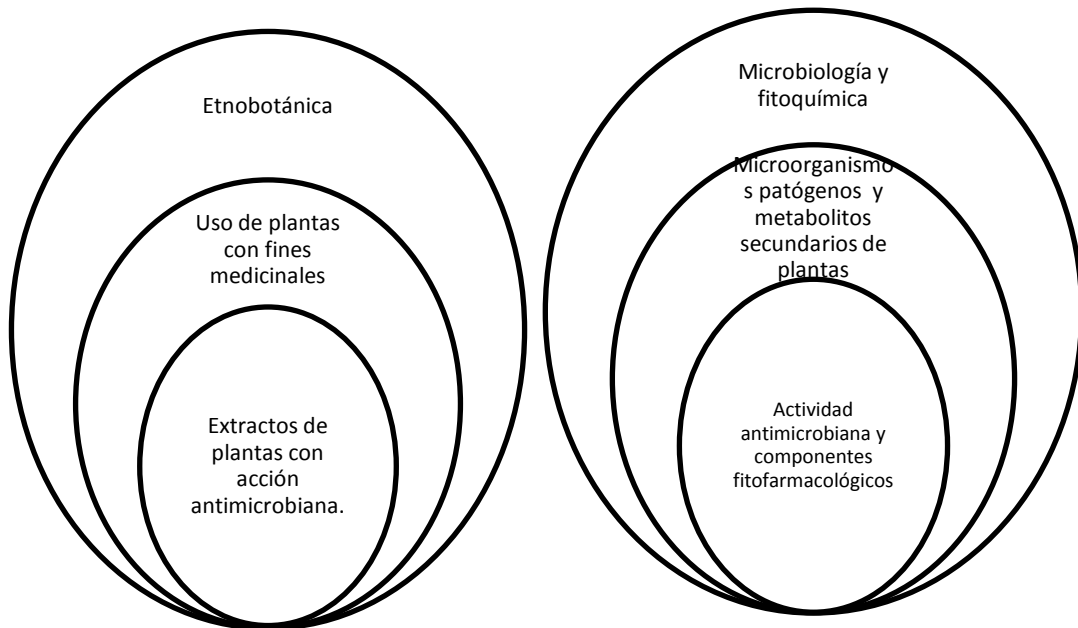
## **3. Farmacología.**

- a) Estrategia a corto plazo: Búsqueda de un extracto activo crudo, mediante biopruebas con extractos crudos polares y apolares sobre los agentes nocivos a investigarse.
- b) Estrategia a largo plazo: Biopruebas con diferentes fracciones de extractos purificados para obtener moléculas químicamente puras y poderlas patentar.

### **2) Guía de práctica para la evaluación y el control de la calidad de los fitoterápicos.**

En esta sección se establecen las pautas para la evaluación y control de la calidad de fitoterápicos, para la consiguiente la obtención del registro Sanitario con fines comerciales. Este punto incluye 4 secciones en donde se especifica las definiciones de términos contemplados en esta normativa, las disposiciones generales para la elaboración de los fitoterápicos, las etapas de la investigación y obtención de los mismos y finalmente la etapa de producción para su comercialización.

## 2.4 Categorías fundamentales



## **2.4.1 Marco Teórico de la Variable Independiente**

### **2.4.1.1 Plantas Medicinales**

Por tiempos remotos la humanidad ha usado plantas en su intento por curar enfermedades y aliviar el sufrimiento físico. El conocimiento de la existencia de plantas medicinales se deriva de los intentos y de los errores de los primeros humanos que intentaron usar plantas (Kumar, 2010).

Este conocimiento se transmitió de generación en generación y fue incrementándose con la experiencia, hasta tal punto que en la actualidad el uso de plantas tradicionales como agentes medicinales es inquebrantable. En general las plantas que tratan infecciones causadas por bacterias son las más comunes (Acosta, 1965).

En el Ecuador el uso de plantas medicinales está inmerso en la cotidianidad de sus habitantes. La medicina popular se practica principalmente por habitantes de zonas rurales, pero también por ciudadanos de toda clase social. Se pueden encontrar gran variedad de plantas con usos medicinales que se expenden en mercados de la Sierra, Costa y Amazonía (De la Torre y colaboradores, 2008).

Existen muchas plantas medicinales de las cuales no se conoce en realidad si tienen o no principios activos que permitan combatir enfermedades. Parte de los estudios de plantas medicinales pueden realizarse en el país, algunos se vinculan con universidades extranjeras pero hay que hacerlo con criterio y cumpliendo las regulaciones existentes. En el país se extraen los principios activos y en el exterior se produce el fármaco y luego se prueba *in vitro*, en animales de laboratorio y en la especie humana (Buitrón, 1999).

En el Ecuador poco se conoce sobre la producción de fitofármacos. Algunas plantas han entrado a un proceso de revalidación y han sido sometidas a investigaciones fitoquímicas para determinar sus compuestos activos por parte de instituciones extranjeras (Buitrón, 1999).

#### 2.4.1.2 Plantas medicinales con acción antimicrobiana

El conocimiento de las propiedades terapéuticas de las plantas es un verdadero desafío para la ciencia moderna: día a día se suman importantes investigaciones clínicas y se descubren o confirman numerosos efectos benéficos, muchos de ellos ya conocidos por culturas milenarias. El uso de plantas como recurso terapéutico natural se remonta a tiempos muy remotos (Proaño y Haro, 2010).

En el Ecuador el uso de plantas medicinales es sumamente amplio ya se emplean para tratar cualquier tipo de dolencia.

De la Torre y colaboradores (2008) reporta que en el Ecuador se registran 5172 especies de plantas con usos medicinales de las cuales las plantas para tratar infecciones e infestaciones constituyen el 26% del total es decir alrededor de 1345 especies de vegetales utilizadas para tratar afecciones causadas por bacterias, virus, hongos, protozoos, platelmintos, nemátodos, anélidos y artrópodos.

De ellas las plantas que tratan infecciones causadas por virus y bacterias son las más comunes (63%), entre ellas se cuentan las utilizadas para curar abscesos con pus, gonorrea, herpes, sarampión, erisipela, neumonías y otras enfermedades infectocontagiosas. Las especies de uso más extendido son la nigua (*Margyricarpus pinnatus*) que trata el sarampión y la viruela, y *Dalea coerulea* que mitiga la pulmonía, la tos ferina e infecciones en general (De la Torre y colaboradores, 2008).

El 18% de especies se emplean para tratar afecciones fúngicas, siendo las más mencionadas *Iryanthera paraensis*, *Calathea metallica* y *Fittonia albivenis*. Gran parte de las plantas en esta categoría se utilizan para eliminar parásitos intestinales como las lombrices y amebas (16%). Las especies con mayor número de reportes son el paico (*Chenopodium ambrosioides*), el higuerón (*Ficus insipida*) y la papaya (*Carica papaya*). Para

tratar la sarna, causada por ácaros, se registró el 9% entre las especies utilizadas prevalecen el matico (*Aristeguietia glutinosa*), la hierba mora (*Solanum nigrescens*) y la huapa jandia (*Viola calophylla*). El 7% de especies curan la malaria o paludismo, uno de los principales problemas de salud en zonas calientes y húmedas del oriente y occidente de los Andes ecuatorianos. Las plantas más frecuentemente reportadas son la quina o cascarilla (*Cinchona pubescens*, *C. officinalis*), la verbena, el pitón (*Grias neuberthii*), tres dedos (*Neurolaena lobata*) y el cacao rojo (*Theobroma subincanum*). Otras infecciones e infestaciones que se tratan con plantas son la leishmania, la miasis humana e infestaciones de piojos y pulgas (De la Torre y colaboradores, 2008).

Estos estudios publicados están relacionados con el uso de plantas medicinales para el tratamiento de diferentes enfermedades. Sin embargo, los estudios publicados sobre la fitoquímica y la actividad antimicrobiana de los extractos son escasos. Existen estudios publicados en la Escuela de Biotecnología del Departamento de Ciencias de la Vida de la Escuela Politécnica del Ejército, Quito. En estos trabajos se han estudiado plantas del género *Baccharis* frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* y la levadura *Candida albicans* (García, 2007). En este estudio se destaca *Baccharis buxifolia* ya que esta presentó mayor efectividad antibacteriana (García, 2007).

Además, en la comunidad de El Chota en la provincia de Imbabura se ha evaluado extractos de especies vegetales (*Nicandra physalodes* (ambo), *Solanum nigrescens* (hierba mora) y *Sida poeppigiana* (escobillo)) sobre microorganismos causantes de enfermedades bucofaríngeas (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* y *Candida albicans* (Vallejo, 2010). En esta investigación se determinó que el extracto etanólico de *Nicandra physalodes* (ambo) tiene mayor efectividad antimicrobiana (Vallejo, 2010).

### **2.4.1.3 Extractos de plantas**

En extracto de plantas es una mezcla compleja, con multitud de compuestos químicos, obtenible por procesos físicos, químicos y/o microbiológicos a partir de una fuente natural y utilizable en cualquier campo de la tecnología (Pardo, 2002).

De acuerdo a Ortuño (2006) los extractos de plantas son los derivados de estas obtenidas por procedimientos tecnológicos adecuados con el fin de extraer los diferentes compuestos activos que se encuentran en ellas. En general, los extractos son productos más diluidos que, por ejemplo, los aceites esenciales, sin embargo pueden ser bastante concentrados para otros principios activos presentes en las plantas (Ortuño, 2006).

La obtención de extractos de vegetales y plantas aromáticas o medicinales es una práctica común a escala doméstica e industrial, existiendo gran cantidad de procedimientos y formas de actuación diferentes que sin embargo presentan en común el hecho de que todos son en realidad extracciones sólido – líquido (Ortuño, 2006). Según la OMS el 25% de los fármacos comercializados actualmente son de origen vegetal y un 25% contiene principios vegetales modificados químicamente (Pardo, 2002).

De acuerdo a Pardo (2002) un extracto de plantas medicinales puede ser una mezcla compleja de compuestos con actividad farmacológica, compuesta por un principio activo (con la supuesta actividad) dentro de una matriz, en principio, sin actividad terapéutica.

### **2.4.1.4 Metodologías para la preparación de extractos de plantas**

#### **2.4.1.4.1 Infusión**

La infusión es el procedimiento ideal para obtener una tisana (tisana: acción del agua sobre los productos vegetales) de las partes delicadas de las plantas: hojas, flores, sumidades y tallos tiernos. Con la infusión se pueden

extraer una gran cantidad de sustancias activas, con muy poco o ninguna alteración de su estructura química, conservando así al máximo las propiedades de las mismas (Pamplona, 2006).

El procedimiento habitual para conseguir una infusión pasa por hervir agua, retirar del calor, añadir el material vegetal cortado o triturado y tapar el recipiente. Posteriormente se agita brevemente y se cuela o filtra el líquido cuando este a menor temperatura. La infusión es indicada en plantas cuyos componentes no se alteren significativamente con el calor y cuyo extracto vaya a utilizarse seguidamente de forma directa (como en el té, poleo, manzanilla) o para preparaciones lociones y tónicos, jarabes, etc. (Ortuño, 2006).

La infusión es la metodología más idónea para obtener los principios activos cuando las partes de la planta empleadas sean blandas y frágiles, como en el caso de hojas, yemas o flores. Es preferible utilizar especias ligeramente desecadas que incrementan, por disminución del agua, la concentración de los compuestos principales. Este método permite, al contrario que la decocción, obtener una gran parte de los principios volátiles que de otro modo se pierden, y en cambio impide la extracción de los que requieren un grado de calor elevado y continuo. Esta diferencia inicial permite al experto conocedor de los compuestos contenidos en las plantas medicinales, distinguir el método más adecuado para obtener el o los principios activos deseados. La infusión se logra vertiendo agua hirviendo sobre una cantidad determinada de planta. El recipiente de cerámica o vidrio, debe taparse inmediatamente luego de la adición del agua. De este modo se logra condensar vapores con abundantes concentraciones de principios activos que se reincorporan a la infusión (Pinto, 2008).

#### **2.4.1.4.2 Decocción a fuego lento**

La decocción se utiliza para preparar tisanas (acción del agua sobre los productos vegetales) a base de partes duras de las plantas (raíces,



rizomas, cortezas, semillas), que precisan de una ebullición mantenida para liberar sus principios activos. La decocción presenta el inconveniente de que algunos de los principios activos pueden degradarse por la acción prolongada del calor si es que se hierve (Pamplona, 2006).

Es decir, la decocción es igual que la infusión pero a diferencia que se mantiene la calefacción una vez que se añade al agua el material vegetal. Es empleada en plantas con componentes preferiblemente no sensibles al calor y cuya estructura, muy fibrosa o con corteza dura, dificulta la penetración del agua y la disolución de las sustancias. Por este método pueden tratarse bayas, cortezas y frutos duros (Ortuño, 2006).

La decocción se aplica normalmente en las partes leñosas de la planta, o bien en las partes que requieren un calor prolongado. La extracción por decocción a fuego lento tiene lugar al calentar la planta o partes de la misma en agua a 80°C durante diez a quince minutos y así evitar la destrucción de sustancias como vitaminas o proteínas por acción del calor. Posteriormente se la deja macerar otro período antes de proceder a la filtración. Algunos autores aconsejan una maceración en agua fría, previa a la decocción (Pinto, 2008).

#### **2.4.1.4.3 Maceración**

La maceración consiste en la extracción de principios activos de una planta o parte de ella a temperatura ambiente, utilizando el agua como disolvente (pueden también hacerse con alcohol o aceite). Se trata sencillamente de poner a remojo las partes de la planta trituradas. Este es un método preferible para plantas cuyos principios activos se destruyen con el calor (Pamplona, 2006).

El proceso clásico de maceración consiste en dejar la parte de la planta en contacto con el solvente durante varios días, con agitación ocasional. Este proceso, también conocido como maceración simple o estática, es

sumamente lento. Para disminuir el tiempo de operación, la parte de la planta y el solvente deben mantenerse en movimiento constante. Este procedimiento, en cambio, es conocido como maceración dinámica. Tanto la maceración simple como la maceración dinámica pueden ser ejecutadas a temperatura ambiente o a temperaturas más elevadas. Este último método se conoce como digestión (Sharapin, 2000).

Para elaborar una maceración se pone las plantas desmenuzadas en agua fría, se tapa bien el recipiente y se deja reposar 24 horas, como mínimo y 3 días como máximo (Velasquí, 2005).

#### **2.4.1.4.4 Extracto crudo o Jugo fresco**

Es la obtención de sustancias activas de las plantas o frutas frescas mediante el proceso de trituración, machacado o presión. En este caso la especia debe ser necesariamente fresca y con abundantes contenidos acuosos. El jugo puede ser extraído mediante diversos procedimientos, el jugo resultante contiene sales minerales, vitaminas y alcaloides que la planta posee (Pinto, 2008).

Para la obtención del extracto crudo por medio de la trituración manual se remojan las plantas desmenuzadas se las machaca bien y la pasta se coloca en un lienzo para exprimir el jugo (Velasquí, 2005). Se pueden emplear otras tecnologías como el empleo de una trituradora o batidora.

Después de la obtención del jugo se lo debe conservar en refrigeración inmediatamente ya que el jugo contiene una serie de compuestos biológicos que, inmediatamente después de su obtención, experimentan procesos de oxidación y fermentación que cambian la naturaleza de las sustancias medicinales, haciendo que a menudo adquieran aspecto repugnante y sean nocivas (Pinto, 2008).

## **2.4.2 Marco Teórico de la Variable Dependiente**

### **2.4.2.1 Principios activos provenientes de plantas con acción antimicrobiana**

Como se describe anteriormente el uso de plantas con fines medicinales para combatir infecciones microbianas está relacionado al conocimiento ancestral y a la experiencia sin embargo, hoy se conoce que la acción antimicrobiana de las plantas se debe a la presencia de metabolitos secundarios que les confieren dicha capacidad. Se han aislado alrededor de 12000 compuestos procedentes de organismos vegetales y se estima que de ellos el 10% corresponde a metabolitos secundarios. Un porcentaje importante posee alguna actividad frente a microorganismos (Domingo y López, 2003).

Los antimicrobianos de origen vegetal tienen un potencial terapéutico enorme. Son eficaces en el tratamiento de enfermedades infecciosas y al mismo tiempo pueden mitigar muchos de los efectos secundarios que se asocian a menudo con antimicrobianos sintéticos (Joshi y colaboradores, 2009).

La búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos es un área de investigación activa. Aunque hasta el día de hoy, ningún derivado de vegetales superiores ha podido competir con los antibióticos usados clínicamente, la búsqueda de compuestos con diferente espectro de actividad y/o estructuras químicas novedosas que sirvan de cabeza de serie para el desarrollo de fármacos es un área de activo interés en todo el mundo (Almeida y colaboradores, 2007).

En plantas, estos compuestos son en su mayoría metabolitos secundarios tales como alcaloides, esteroides, taninos, y compuestos fenólicos, flavonoides, gomas de resinas de ácidos grasos que son capaces de producir una acción fisiológica definida en el cuerpo. Compuestos extraídos de diferentes partes de las plantas se puede utilizar para curar la diarrea,

disentería, tos, resfriado, cólera, fiebre bronquitis, etc. (Joshi y colaboradores, 2009).

#### **2.4.2.1.1 Alcaloides**

Los alcaloides son unos de los más diversos grupos de metabolitos secundarios encontrados en organismos vivos y tienen una colección de tipos de estructuras, rutas biosintéticas y actividades farmacológicas. Los alcaloides se pueden aislar en pocas proporciones de animales, insectos, invertebrados marinos y microorganismos pero la mayor parte de ellos han sido aislados de plantas. Varios alcaloides han sido utilizados por cientos de años en el campo de la medicina y varios son prominentes fármacos en la actualidad. Estos compuestos tienen roles importantes en la sobrevivencia de la planta, pero en grandes cantidades pueden convertirse en tóxicas para la misma planta por lo que en ellas se encuentran en bajas concentraciones (Roberts y Wink, 1998).

Reciben esta denominación los compuestos nitrogenados heterocíclicos, constituidos además por carbono e hidrógeno, muchos llevan oxígeno, lo que les confiere una serie de propiedades físicas (sólida, cristalizable), y raramente suelen contener azufre. Son sustancias provenientes del metabolismo secundario y sintetizadas a partir de aminoácidos principalmente de los aminoácidos ornitina, fenilalanina, triptófano, ácido antranílico y de la pirimidina. Tienen por característica ser amargos en el gusto, solubles en alcohol, éter, cloroformo o hexano, poco solubles en agua. La actividad biológica de los alcaloides es muy amplia, sin embargo su papel en los vegetales no es muy claro, se localizan generalmente en los tejidos periféricos de corteza, raíces, hojas, frutos y semillas. El mecanismo de acción de los alcaloides parece ser mediante intercalación entre la pared celular y el DNA del microorganismo (Villacís, 2009).

McCarthy y colaboradores (1992) citado por Kazanjian y Fariñas (2006) describen que el efecto antimicrobiano de los alcaloides puede estar

relacionado con la capacidad que presentan para inhibir la biosíntesis de ácidos nucleicos.

#### **2.4.2.1.2 Terpenos y terpenoides**

La clase común de compuestos químicos que se encuentran en los aceites esenciales son los terpenos y terpenoides. Los terpenos están constituidos de unidades de isopreno. Dos unidades combinadas de isoprenos son llamadas una unidad de terpeno. El isopreno (o 2-metil-1,3-butadieno), es un hidrocarburo de 5 átomos de carbono (Stewart, 2005; Velasteguí, 2012).

Las coníferas, árboles de bálsamo, frutos cítricos, cilantro, eucalipto, lavanda, huerba luisa, lirios, violetas y muchas otras plantas o partes de estas (raíces, rizomas, tallos, hojas, flores, frutas y semillas) son muy conocidas por tener olores, sabores característicos o por tener actividades farmacológicas específicas las cuales son provocadas principalmente por terpenos (Breitmaier, 2006).

Cuando los “terpenos” son modificados químicamente, por ejemplo por oxidación o reorganización del esqueleto hidrocarbonado, suelen denominarse “terpenoides” (como la vitamina A o retinol, que contiene un átomo de oxígeno) (Velasteguí, 2012).

Los terpenoides forman un grupo de compuestos de los cuales la mayoría aparece en plantas, unos pocos han sido obtenidos de otras fuentes. Los más simples mono y sesqui terpenoides son los componentes de los aceites esenciales; estos son los aceites volátiles obtenidos de la savia y tejidos de ciertas plantas y árboles. Los aceites esenciales han sido usados en perfumería desde tiempos tempranos. Los di y tri terpenoides los cuales no son volátiles, se obtienen de las gomas y resinas de plantas y árboles. Los tetraterpenoides forman un grupo de compuestos conocido como los carotenoides. El caucho es el politerpenoide más importante (Singh, 2007).

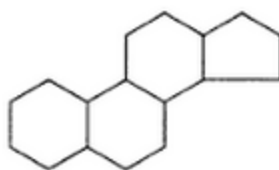
La mayoría de terpenos y terpenoides naturales tienen la fórmula molecular  $(C_{10}H_{16})_n$ , y el valor de  $n$  es usado para su clasificación.

Torres (2004) citado por Lizcano y Vegara (2008) describe que estas sustancias poseen propiedades farmacodinámicas muy variadas en relación con las diferentes funciones ligadas a su esqueleto terpénico. Algunos son rubefacientes (pineno), antisépticos (geraniol, cineol, linalol), vermífugos (ascaridol), abortivos y estupefacientes (tuyona), tóxicas y necrosantes (cucurbitáceas), y antiinflamatorias (ácido glicirricético).

#### 2.4.2.1.3 Esteroides

Los esteroides son un grupo de gran interés por la variedad de sus compuestos, la importancia biológica de la mayor parte de ellos, sus actividades fisiológicas y sus aplicaciones farmacológicas. Forman parte de este grupo el colesterol, hormonas, alcaloides esteroides, saponinas, entre otros (Primo, 1995).

Todos los esteroides se derivan de un grupo fundamental formado por los tres anillos de un fenantreno hidrogenado y un ciclopentano; son, por tanto, derivados de un cicloalcano tetracíclico: el ciclopentanohidrofenantreno (Primo, 1995).



**Figura 1.-** Esqueleto del ciclopentanohidrofenantreno.

(Fuente: Primo, 1995).

En la mayor parte de los esteroides los sustituyentes típicos son grupos metilos y cadenas alifáticas, las cuales se encuentran en el anillo del ciclopentano. Un ejemplo son los hidrocarburos colestano y coprostano. Los

esteroides están relacionados biosintéticamente con los triterpenos. Se sintetizan en animales y plantas a través del ácido mevalónico (Primo, 1995).

Como antimicrobianos pueden actuar siguiendo diferentes mecanismos en dependencia de su naturaleza química: los de naturaleza hidrocarbúrica, por ejemplo, tienen generalmente acción depresora sobre la tensión superficial lo cual, cuando tiene lugar en el entorno de la célula bacteriana, altera la selectividad de la membrana citoplasmática para el intercambio de sustancias. Los de naturaleza alcohólica pueden en cambio alterar la naturaleza coloidal del protoplasma de la célula provocando su muerte por (Lizcano y Vegara, 2008).

#### **2.4.2.1.4 Taninos**

Los taninos son sustancias no nitrogenadas, de estructura polifenólica, solubles en agua, alcohol, acetona, poco solubles en éter, de sabor astringente y con la propiedad de curtir la piel, haciéndola imputrescible e impermeable, fijándose sobre sus proteínas (distinto del curtido al cromo donde se utiliza alúmina y cromo). Los taninos, dada su composición, dan por hidrólisis total una molécula de hidrato de carbono y un número más o menos grande de moléculas de ácido gálico (UNLPAM, s/f).

Los taninos son una clase de polímeros fenólicos vegetales con propiedades defensivas. El término tanino fue usado por primera vez para describir aquellos compuestos que podían convertir la piel animal en cuero, en el proceso conocido como curtido. Los taninos se unen al colágeno de las pieles animales, aumentando su resistencia al calor, al agua y a los microbios (Taiz y Zeiger, 2006).

Los taninos vegetales también sirven como defensas contra microorganismos. Por ejemplo, la parte central de muchos árboles contiene elevadas concentraciones de taninos que ayudan a prevenir la podredumbre producida por hongos o bacterias (Taiz y Zeiger, 2006).

Los taninos se encuentran principalmente en las raíces, la corteza, y de vez en cuando en las hojas de la planta. Estos compuestos tienen propiedades antibacterianas, astringentes y antisépticas. Sus propiedades farmacológicas externas son astringentes, vasoconstrictoras (para hemorragias) y cicatrizantes (quemaduras). Internamente, antidiarreicas, y, al precipitar alcaloides, antídoto ante intoxicaciones (Arraiza, s/f).

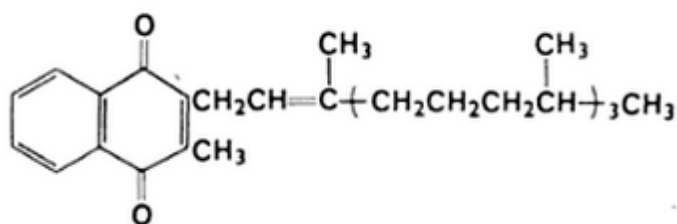
Marcano y Hasegawa (2002) citado por Kazanjian y Fariñas (2006) reportan que los taninos son compuestos fenólicos que pueden ser utilizados como protección contra infecciones, debido a que provocan desnaturalización de las proteínas.

#### **2.4.2.1.5 Quinonas**

Las quinonas son dicetonas aromáticas procedentes de la oxidación de fenoles (Arraiza, s/f). Las quinonas son muy ubicuas en la naturaleza y causantes del color marrón que se produce en las frutas son dañadas (Domingo y López, 2003).

Muchas clases de quinonas son compuestos importantes, tanto por su amplia distribución en la naturaleza como productos del metabolismo de animales y plantas, como por su aplicación en medicina. La 2-metil-1,4-naftoquinona es una vitamina K, clínicamente útil, y se utiliza para combatir ciertas enfermedades que se caracterizan por la reducción de la capacidad de coagulación de la sangre. Otras quinonas se encuentran en plantas, líquenes, hongos y organismos marinos en muchos de los cuales son las responsables de sus colores amarillo, anaranjado y rojo (Geissman, 1973).



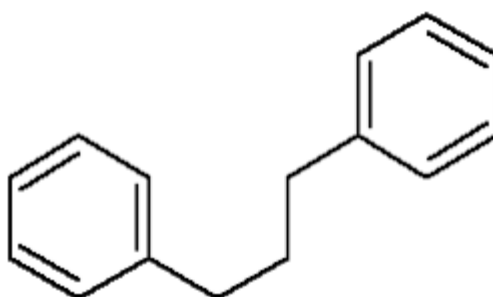


**Figura 2.-** Vitamina K. 2-metil-1,4-naftoquinona.  
(Fuente: Geissman, 1973)

Las quinonas poseen una alta reactividad, formando complejos con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas, la mayoría de las veces inactivando la proteína y anulando su función. Debido a esto, el potencial antimicrobiano de este grupo es amplio (Domingo y López, 2003).

#### 2.4.2.1.6 Flavonoides

Los flavonoides son los pigmentos amarillos derivados de la fenil-benzo y pirona o fenil cromona. Se dan mucho en el reino vegetal, normalmente en forma de heterósidos. Son una estructura molecular del tipo C6 – C3 – C6. Son una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua (Arraiza, s/f).



**Figura 3.-** Estructura básica de los flavonoides.  
(Fuente: Arraiza, s/f).

Para los vegetales, estos compuestos son importantes pues, además de ser responsables, como las antocianinas, de las coloraciones de muchas flores, frutos y hojas y por ello intervenir en la polinización atrayendo a los insectos,

participan en la vida del vegetal ejerciendo importantes funciones como por ejemplo protegerle de los efectos nocivos de la radiación UV y ejercer una eficaz actividad antioxidante y antimicrobiana (Arraiza, s/f).

Las flavonas son estructuras fenólicas que contienen un grupo carbonilo. Constituyen la familia más amplia de fenoles naturales. Su actividad frente a los microorganismos probablemente se debe a que forman complejos con las proteínas solubles y extracelulares y con las proteínas de la pared bacteriana, de forma similar a las quinonas (Domingo y López, 2003).

Los isoflavonoides (isoflavonas) son un grupo de flavonoides estos se encuentran frecuentemente en las legumbres y tienen diferentes funciones. Algunos tienen una actividad insecticida (rotenoides). Los isoflavonoides que han llegado a conocerse mejor son las fitoalexinas, compuestos antimicrobianos sintetizados en respuesta a la infección fúngica o bacteriana que ayudan a limitar la invasión del patógeno (Taiz y Zeiger, 2006).

#### **2.4.2.1.7 Saponinas**

Las saponinas son esteroides y glicósidos triterpénicos, y su nombre se debe a sus propiedades jabonosas. La presencia en una única molécula de elementos solubles en lípidos (el esteroide o triterpeno) y en agua (el azúcar) confiere a las saponinas propiedades detergentes, formando una cubierta jabonosa cuando se agitan en agua. Se cree que la toxicidad en humanos de las saponinas es debida a su capacidad para formar complejos con esteroides. Las saponinas pueden interferir con la absorción de los esteroides en el aparato digestivo o bien romper membranas celulares una vez incorporadas al torrente sanguíneo (Taiz y Zeiger, 2006).

Son los componentes principales de varios extractos de plantas, tienen actividad antiprotozoaria. Las saponinas se unen al colesterol y otros esteroides de la membrana celular de los protozoos causando su inestabilidad, lisis y muerte celular (Lizcano y Vegara, 2008).

Desde el punto de vista antimicrobiano se sabe que las saponinas son activas para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. También, aunque en menor grado, tienen actividad antiviral. Las saponinas son compuestos que poseen una importante actividad antibacteriana, debido a que reducen la tensión superficial y actúan sobre los lípidos de la membrana provocando alteraciones de las mismas, lo que conlleva a la muerte celular; para ello se sugiere la formación de complejos con el colesterol presente en la membrana (Kazanjian y Fariñas, 2006).

#### 2.4.2.1.8 Lactonas

Las lactonas se pueden considerar como ésteres internos de los ácidos hidroxicarboxílicos y se distinguen entre lactonas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y de anillos mayores. En general, las  $\alpha$ -lactonas solo se pueden detectar en disolución y las  $\beta$ -lactonas solo se pueden obtener por medio de procesos especiales (Beyer y Walter, 1987).

Las lactonas hierven por debajo de los correspondientes hidroxiácidos. Generalmente, las lactonas muestran un fuerte olor, agradable, sobre todo las de anillos grandes (de 15-17 miembros), entre las que se encuentran el ambretólido el aroma del almizcle, así como la lactona de la raíz de angélica, que se obtiene de manera sintética con el nombre de exaltólido (Beyer y Walter, 1987).



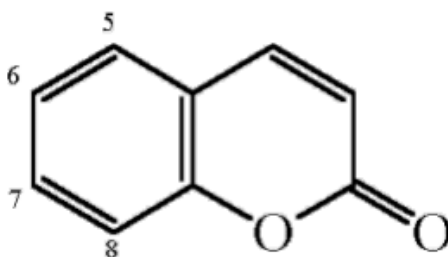
**Figura 4.-** Ejemplos de lactonas naturales y sintéticas.

(Fuente: Beyer y Walter, 1987).

Las lactonas sesquiterpénicas, un tipo de lactona, se encuentran abundantemente en la familia de las Compuestas, Lauraceas y Magnoliaceas, y son responsables del sabor amargo de muchas drogas como el cardo santo (*Cnicus benedictus*), el ajenjo (*Artemisia absinthium*) o el diente de león (*Taraxacum officinale*). Además, tienen actividad antibacteriana y antifúngica. Algunas producen dermatitis en la piel ya que inducen la formación de alérgenos (Arraiza, s/f).

#### 2.4.2.1.9 Cumarinas

Las cumarinas son benzo -  $\alpha$  - pironas. Con el nombre de cumarinas se conoce a un grupo muy amplio de principios activos fenólicos que se encuentran en plantas medicinales y tienen en común una estructura química de 2H-1-benzopiran-2-ona, denominada cumarina. Sobre esta estructura se disponen sustituyentes de distinta naturaleza química lo que da lugar a distintos tipos de cumarinas: sencillas y complejas (Arraiza, s/f).



**Figura 4.-** Estructura básica de las cumarinas.

(Fuente: Arraiza, s/f).

Las cumarinas son aromatizantes, tienen propiedades vitamínicas, disminuyen la permeabilidad capilar y aumentan la resistencia de las paredes de capilares (protegen la fragilidad capilar y actúan como tónico venoso). Algunos tienen propiedades sedantes, como la angelicina. Pueden tener propiedades hipnóticas (Arraiza, s/f).

Las cumarinas son compuestos derivados de la benzo- $\alpha$ -pirona, como la cumarina, esculetina, umbeliferona y la escopoletina. Están presentes en las

margaritas y tienen propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas y vaso dilatadoras. La warfarina, un anticoagulante, pertenece a este grupo. Probablemente su mecanismo de acción antimicrobiano es mediante interacción con el ADN eucariota, lo que explica también su actividad antiviral (Domingo y López, 2003).

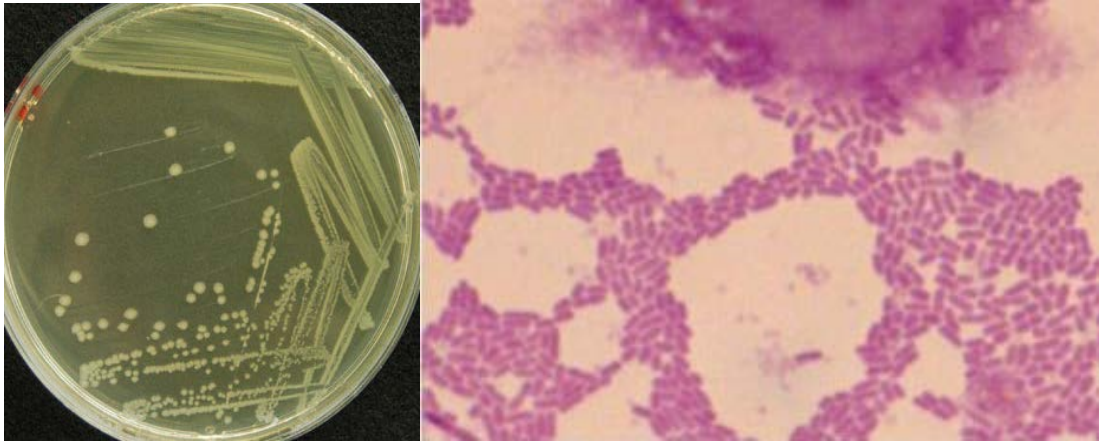
En los estudios publicados en la Escuela de Biotecnología del Departamento de Ciencias de la Vida de la Escuela Politécnica del Ejército, Quito no se realizó el análisis fitoquímico de las especies *Baccharis buxifolia* (García, 2007), sin embargo Vallejo (2010), realizó el análisis fitoquímico de *Nicandra physalodes* (ambo) ya que esta presentó mayor efectividad antimicrobiana sobre los microorganismos patógenos estudiados.

La fitoquímica de los extractos de *Nicandra physalodes* determinó la presencia de alcaloides (concentración moderada), flavonoides (concentración escasa), taninos (concentración abundante), esteroides (concentración moderada) y cumarinas (concentración escasa) (Vallejo, 2010). Mientras que García (2007), no realizó análisis fitoquímicos.

#### **2.4.2.2 Descripción de los microorganismos patógenos humanos**

##### **2.4.2.2.1 Escherichia coli**

*Escherichia coli* es un bacilo Gram-negativo recto y corto de 1-3  $\mu\text{m}$  por 0.5  $\mu\text{m}$  que no espora, usualmente es móvil con flagelo peritricos, a menudo fimbrias individuales. Una cápsula o microcápsula suele estar presente (Sussman, 1997).



**Figura 5.-** Características macro y microscópicas de *Escherichia coli*.

(Fuente: Gutiérrez y colaboradores, 2012)

Es una bacteria que se encuentra normalmente en el intestino del ser humano y de los animales de sangre caliente. La función de *Escherichia coli* en la flora fecal es difícil de evaluar. Se ha sugerido que tiene un significativo papel nutricional al proveer una fuente de vitaminas en algunos animales. En la naturaleza es también encontrado en el suelo, agua o en cualquier otro sitio que haya sido contaminado con material fecal (Sussman, 1997).

La mayoría de las cepas de *Escherichia coli* son inofensivas. Sin embargo algunas de ellas, como *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), pueden causar graves enfermedades a través de los alimentos. La bacteria se transmite al hombre principalmente por el consumo de alimentos contaminados, como productos de carne picada cruda o poco cocida, leche cruda, y hortalizas y semillas germinadas crudas contaminadas (OMS, 2011).

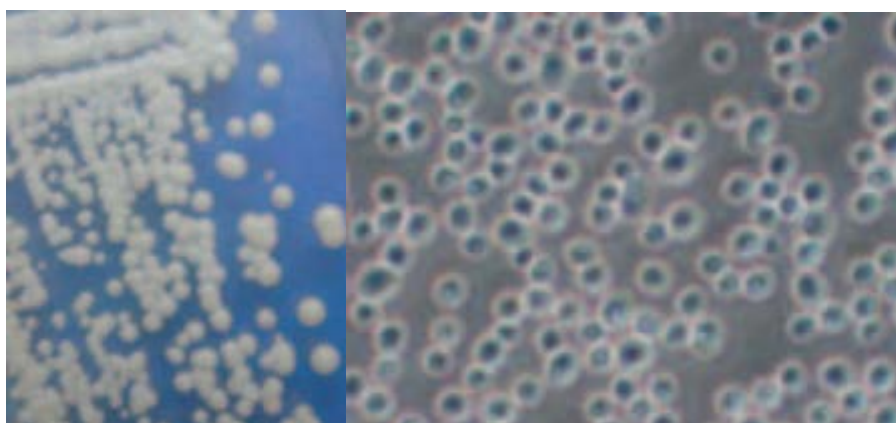
Los síntomas de la enfermedad incluyen cólicos y diarrea, que puede ser sanguinolenta. También pueden aparecer fiebre y vómitos. La mayoría de los pacientes se recuperan en el término de 10 días, aunque en algunos casos la enfermedad puede causar la muerte (OMS, 2011).

Para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por este microorganismo se han reportado frecuentemente especies como la

guayaba (*Psidium guajava*), el jengibre (*Zingiber officinale*) y *Abuta grandifolia* (De la Torre y colaboradores, 2008). Además, se ha demostrado que extractos acuosos de tomillo ejercen significativa actividad antimicrobiana sobre *Escherichia coli* (Aragón y colaboradores, 2009).

#### 2.4.2.2.2 *Candida albicans*

Es un hongo microscópico dimorfo que forma largas pseudohifas, hifas y blastoconidios (células gemantes subesféricas de 3-8 x 2-7  $\mu\text{m}$ ). Asimilan y fermentan azúcares. Tienen numerosas clamidosporas unicelulares, redondas u ovaladas, con gruesa pared refringente (8-16  $\mu\text{m}$  de diámetro), situadas al final de las hifas, pseudohifas o laterales sobre blastoconidios ovalados (Berkhout, 2002).



**Figura 6.-** Características macro y microscópicas de *Candida albicans*.

(Fuente: Berkhout, 2002)

*Candida albicans* está asociada ecológicamente a seres vivos (animales) de sangre caliente. Su temperatura óptima de crecimiento es 37 °C. Los tractos digestivo y respiratorio, junto con la mucosa genital (vagina), son los reservorios más importantes en los seres humanos. En estas localizaciones se comporta como un saprobio y su aislamiento no implica por sí solo la presencia de infección. *Candida albicans* no sobrevive durante mucho tiempo en superficies secas pero su supervivencia es mayor cuando hay

humedad y se ha aislado de los cepillos dentales, cremas de manos, cosméticos y ropa (Berkhout, 2002).

*Candida albicans* puede invadir una variedad de tejidos causando inflamación local. Esta ataca típicamente la boca (afecciones bucofaríngeas), vagina, tracto gastrointestinal, tracto urinario, glándula prostática, piel y dedos de las manos o pies. Esta levadura es capaz de producir sustancias venenosas cuando se multiplica, estos a su vez circulan en el torrente sanguíneo causando todo tipo de síntomas y desordenes (Elkins y Tenney, 1997).

Aunque *Candida* más frecuentemente infecta la piel y las mucosas, puede causar infecciones sistémicas que se manifiestan como neumonía, septicemia o endocarditis en pacientes severamente inmunodeprimidos. El establecimiento de la infección parece ser determinado por factores del huésped y no el propio organismo (MicrobiologyBytes, 2001).

La mayoría de las infecciones por *Candida* se pueden tratar con fármacos antifúngicos como clotrimazol, miconazol, nistatina, tioconazole. Las plantas medicinales como la canela, el tamerlán, tulsí y orégano se utilizan tradicionalmente para el tratamiento de inflamaciones causadas por algunos hongos infecciosos como candidiasis (Joshi y colaboradores, 2009). Además, extractos de albahaca y hierba luisa han demostrado que la levadura *Candida albicans* tiene sensibilidad a los mismos.

## **2.5 Hipótesis**

### **2.5.1 Hipótesis Nula (H<sub>0</sub>)**

Los extractos de plantas medicinales, no tienen actividad antimicrobiana frente a los microorganismos patógenos *Escherichia coli* y *Candida albicans*.



### **2.5.2 Hipótesis Alternativa (Hi)**

Los extractos de plantas medicinales, tienen actividad antimicrobiana frente a los microorganismos patógenos *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

### **2.6 Señalamiento de variables**

Variable Independiente:

Extractos de plantas medicinales.

Variable Dependiente:

Actividad antimicrobiana y fitoquímica frente a los microorganismos patógenos *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

## **CAPITULO III**

### **METODOLOGÍA**

#### **3.1 Enfoque**

La presente investigación mostró resultados cuantitativos y cualitativos. Cuantitativos debido a que se realizaron bioensayos para medir los porcentajes de eficacia que ejercieron los extractos de las plantas medicinales a probarse. Y, cualitativos-semicuantitativo porque se determinaron por medio de análisis de laboratorio cuáles y en qué proporción se encuentran los metabolitos secundarios presentes en los extractos más promisorios. Estos análisis se realizaron por parte de Laboratorios Acreditados OAE del Instituto de Ciencias Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador, Quito.

#### **3.2 Modalidad básica de la investigación**

##### **De laboratorio**

El presente estudio se realizó determinando a nivel de laboratorio la efectividad de los extractos de plantas medicinales y determinando las metodologías con mayor actividad antimicrobiana sobre los microorganismos patógenos *E. coli* y *C. albicans*. La fitoquímica de los extractos más promisorios se realizó en un laboratorio acreditado OAE.

##### **Experimental**

Los extractos de las plantas medicinales más promisorios fueron sometidos a análisis fitoquímicos, los cuales dieron a conocer la composición fitofarmacológica de los extractos de las plantas medicinales con actividad antimicrobiana.

## **Bibliográfica-documental**

Esta investigación analizó estudios relacionados con la evaluación de extractos vegetales sobre los microorganismos patógenos *E. coli* y *C. albicans* a nivel local y mundial. Las fuentes de información que se emplearon fueron estudios publicados en la web en inglés y en español. Dentro de las cuales se destacan los estudios publicados en la Escuela de Biotecnología del Departamento de Ciencias de la Vida de la Escuela Politécnica del Ejército, Quito por García (2007) y Vallejo (2010).

### **3.3 Nivel o tipo de investigación**

#### **Descriptiva**

En la presente investigación se determinó la composición fitoquímica de los extractos de plantas medicinales con mayor actividad antimicrobiana sobre los microorganismos patógenos *E. coli* y *C. albicans*.

#### **Exploratorio**

La investigación determinó cuáles son los extractos de plantas medicinales que tienen mayor acción antimicrobiana sobre los microorganismos patógenos *E. coli* y *C. albicans*.

### **3.4 Población y muestra**

#### **3.4.1 Población:**

La población de plantas en estudio fueron las siguientes plantas: paico (*Chenopodium ambrosioides*), tomillo (*Thymus vulgaris*), hierba luisa (*Cymbopogon citratus*), ortiga negra (*Urtica dioica*), guayaba (*Psidium guajava*), albahaca (*Ocimum basilicum*), matico (*Aristeguietia glutinosa*), ambo (*Nicandra physalodes*). A partir de las cuales se realizó un estudio

exploratorio tipo screening para determinar los extractos más eficaces en contra de los microorganismos patógenos *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

### 3.4.2 Muestra:

A partir de las plantas de la población en estudio se prepararon los extractos vegetales en una proporción 1/10 (P/V), para un total de 200 ml de extracto. Es decir se colocaron 20 g de material vegetal y se aforaró a 200 ml con el respectivo solvente. En los extractos vegetales se determinaron los siguientes parámetros: color, pH, conductividad y concentración.

### 3.5 Operacionalización de variables

**Tabla N. 1.-** Operacionalización de Variables

OBJETIVOS ESPECÍFICOS	VARIABLES	INDICADORES	ÍNDICES
Identificar la actividad antimicrobiana de extractos vegetales frente a <i>Escherichia coli</i> y <i>Candida albicans</i> .	VI: Extractos vegetales	Análisis físicos, químicos	Color, pH, Conductividad, Metabolitos Secundarios
	VD: Actividad antimicrobiana frente a <i>Escherichia coli</i> y <i>Candida albicans</i> .	Mortalidad	Porcentaje (%) de efectividad

<p>Seleccionar los extractos vegetales más promisorios con actividad antimicrobiana sobre <i>Escherichia coli</i> y <i>Candida albicans</i></p>	<p>VI: Extractos vegetales más promisorios.</p>	<p>Análisis físicos, químicos</p>	<p>Color, pH, Conductividad, Metabolitos Secundarios</p>
	<p>VD: Actividad antimicrobiana frente a <i>Escherichia coli</i> y <i>Candida albicans</i></p>	<p>Mayor porcentaje de mortalidad</p>	<p>Porcentaje (%) de efectividad</p>
<p>Establecer las concentraciones adecuadas para inhibir la actividad microbiana de los microorganismos <i>Escherichia coli</i> y <i>Candida albicans</i></p>	<p>VI: Concentración de los extractos.</p>	<p>Análisis físicos, químicos</p>	<p>Color, pH, Conductividad, Concentración, Metabolitos Secundarios.</p>
	<p>VD: Inhibición de la actividad microbiana.</p>	<p>Mayor porcentaje de mortalidad</p>	<p>Porcentaje (%) de efectividad</p>
<p>Identificar los metabolitos secundarios contenidos en los extractos seleccionados, mediante análisis fitoquímico.</p>	<p>VI: Extractos vegetales.</p>	<p>Análisis físicos, químicos.</p>	<p>Color , pH, Conductividad, Metabolitos Secundarios</p>
	<p>VD: Metabolitos secundarios.</p>	<p>Análisis fitoquímicos</p>	<p>Presencia (+) o ausencia (-).</p>

Elaborado por: Gabriela Yáñez

### 3.6 Recolección de información

#### 3.6.1 Identificación de la actividad antimicrobiana de extractos vegetales frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Estudio Exploratorio tipo Screening

##### a) Diseño Experimental

En el ensayo tipo screening se empleó un diseño experimental factorial complemente al azar de dos factores (AXB) con un arreglo factorial 4X8 con 2 réplicas. Siendo el factor A la metodología de obtención con 4 niveles; factor B las hojas de las especies vegetales, con 8 niveles; y, con 2 réplicas para cada microorganismo.

**Tabla N. 2.- Factores y niveles de estudio para la selección de extractos vegetales con actividad antimicrobiana más promisorios.**

<b>Factor</b>	<b>Niveles</b>
<b>A.</b> Metodología de obtención de extractos	a0 Maceración en etanol
	a1 Maceración en hexano
	a2 Decocción a fuego lento
	a3 Infusión
<b>B.</b> Especie vegetal	b0 Albahaca
	b1 Ambo
	b2 Guayaba
	b3 Hierba luisa
	b4 Matico
	b5 Ortiga negra
	b6 Paico
	b7 Tomillo

Elaborado por: Gabriela Yáñez

## **b) Tratamiento del material vegetal**

Cada uno de los materiales vegetales en estado fresco fueron cuidadosamente seleccionados. Se trabajó con las plantas que se especifican en la tabla 3. Se lavó el material vegetal fresco minuciosamente, utilizando agua potable para evitar que posibles impurezas interfieran en el estudio. Finalmente, se eliminó el exceso de agua.

Las materiales vegetales para la obtención de los extractos estuvieron en estado seco con el fin de conservar las especies vegetales y evitar la descomposición o alteración de los principios activos debido a la actividad microbiana.

## **c) Secado del material vegetal**

El material vegetal fue deshidratado en una cámara de secado a una temperatura entre 55 - 60°C durante 24 horas, para evitar desnaturalizar los principios activos y con el fin de conservar las especies vegetales. Una vez terminado el proceso de secado el material vegetal seco se almacenó en fundas de plástico herméticas y se procedió a determinar el porcentaje de humedad final.

## **d) Obtención de los extractos**

La obtención de los extractos de las plantas se realizó por medio de maceración en etanol, maceración en hexano, decocción a fuego lento, infusión y extracto crudo con el fin de determinar el mejor solvente para extraer los metabolitos de las plantas.

Para la obtención de los extractos se empleó las siguientes plantas con sus respectivas partes.

**Tabla N. 3.- Nombre común, científico y órganos a usarse de las especies vegetales para la obtención de extractos.**

<b>Nombre Común</b>	<b>Nombre científico</b>	<b>Familia Botánica</b>	<b>Órganos a usarse</b>
Albahaca	<i>Ocimum basilicum</i>	Lamiaceae	Hojas
Ambo	<i>Nicandra physalodes</i>	Solanaceae	Hojas
Guayaba	<i>Psidium guajava</i>	Myrtaceae	Hojas
Hierba Luisa	<i>Cymbopogon citratus</i>	Poaceae	Hojas
Matico	<i>Piper aduncum</i>	Piperaceae	Hojas
Ortiga Negra	<i>Urtica dioica</i>	Urticaceae	Hojas
Paico	<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Amaranthaceae	Hojas
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	Lamiaceae	Hojas

Elaborado por: Gabriela Yáñez

### **Maceración en etanol**

Cada material vegetal triturado se colocó en proporción 1:10 (P/V) en etanol grado reactivo (99% de pureza) en un recipiente cerrado a temperatura ambiente durante 3 días. A continuación se filtrará la muestra utilizando papel filtro No. 4. Con el fin de concentrar las muestras estas fueron sometidas a rotoevaporación a presión reducida y a una temperatura de 60°C hasta obtener un volumen del concentrado de aproximadamente 10 ml, a partir de 200ml, como lo describe Vallejo (2010). Las muestras fueron transportadas en envases aislados y con hielo en su interior. Los extractos se envasaron en frascos de vidrio color ámbar esterilizados y se conservaron en refrigeración. A continuación los concentrados se esterilizaron en filtros de jeringa de 0,45 µm y se colocaron en envases plásticos estériles.

### **Maceración en hexano**

Cada material vegetal triturado se colocó en proporción 1:10 (P/V) en hexano (99% de pureza) en un recipiente cerrado a temperatura ambiente durante 3 días. A continuación, se filtró la muestra utilizando papel filtro No. 4. Con el fin de concentrar las muestras estas fueron sometidas a rotoevaporación a presión reducida y a una temperatura de 45°C hasta obtener un volumen del concentrado de aproximadamente 10 ml, a partir de



200ml, como lo describe Vallejo (2010). Las muestras fueron transportadas en envases aislados y con hielo en su interior. Los extractos se envasaron en frascos de vidrio color ámbar esterilizados y se conservaron en refrigeración. A continuación los concentrados se esterilizaron en filtros de jeringa de 0,45  $\mu\text{m}$  y se colocaron en envases plásticos estériles.

### **Infusión**

El material vegetal triturado se colocó en proporción 1:10 (P/V). La infusión se elaboró con agua potable la cual se sometió hasta ebullición. Una vez que el agua llegó a ebullición se retiró del fuego y se trasvasó a un recipiente de vidrio en el que se encontraba la muestra vegetal. Esto permite que la temperatura del agua disminuya a aproximadamente 60-70°C, lo que evitó que se desnaturalicen los compuestos termolábiles. A continuación se dejó reposar hasta que el extracto alcance la temperatura ambiente. Los extractos se envasaron en frascos de vidrio color ámbar esterilizados y se conservaron en refrigeración. A continuación los concentrados se esterilizaron en filtros de jeringa de 0,45  $\mu\text{m}$  y se colocaron en envases plásticos estériles.

### **Decocción a fuego lento**

La decocción contrariamente a la infusión se elaborará con agua potable la cual se sometió hasta 80°C. A continuación se agregó el material vegetal en proporción de 1:3 (P/V) durante 10 minutos y se tapó. A continuación se dejó reposar hasta que el extracto alcanzo temperatura ambiente. Los extractos se envasaron en frascos de vidrio color ámbar esterilizados y se conservaron en refrigeración. A continuación los concentrados se esterilizaron en filtros de jeringa de 0,45  $\mu\text{m}$  y se colocaron en envases plásticos estériles.

Para cada extracto se evaluaron los siguientes parámetros: color del extracto con una tabla internacional de colores, pH y conductividad eléctrica, concentración.

#### e) Determinación de la concentración de los extractos

Se determinó la concentración de los extractos de acuerdo a lo descrito por Cytel (1995) citado por García (2007). Se pesó un vidrio reloj limpio y seco y se colocó 1 ml del extracto sobre el vidrio reloj. Se colocó en la estufa a 36° C durante 24 a 48 h. Se pesó la muestra seca sobre el vidrio reloj.

De acuerdo a los pesos se determinó la concentración del extracto en 1 ml y a continuación en 1 l. Se realizó los cálculos correspondientes para determinar la cantidad de extracto correspondiente a 5000 mg/l, la cual fue la concentración que se inoculó en cada medio de cultivo.

#### f) Preparación de los medios de cultivo

Se trabajará con Agar nutritivo compuesto de extracto de carne, peptona y agar (Tabla N. 4) para *Escherichia coli* y con Agar Sabouraud con cloranfenicol compuesto de dextrosa, digerido pancreático de caseína, digerido péptico de tejido animal, cloranfenicol y agar (Tabla N. 5) para *Candida albicans*; los cuales serán preparados en la cantidad necesaria para colocar 10 ml en cada compartimiento de una caja bipetri descartable.

**Tabla N. 4.- Formulación de agar nutritivo para *Escherichia coli***

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad</b>
Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

(Fuente: ATCC, s/f)

Elaborado por: Gabriela Yáñez

**Tabla N. 5.- Formulación de agar Sabouraud con cloranfenicol para *Candida albicans***

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad</b>
Dextrosa	40 g
Digerido pancreático de caseína	5 g
Digerido peptídico de tejido animal	5 g
Cloranfenicol	50 mg
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

(Fuente: ATCC, s/f)

Elaborado por: Gabriela Yáñez

**g) Testigos y blancos a emplearse.**

**Blanco:** Caja de agar nutritivo (*Escherichia coli*) y caja de agar Sabouraud con cloranfenicol (*Candida albicans*)

**Testigo:** Caja de medio de cultivo sin extracto y con microorganismos.

**h) Ensayos para la determinación de la acción antimicrobiana**

En la presente investigación se trabajó con las siguientes cepas microbianas: *Escherichia coli* ATCC 8739 y la levadura *Candida albicans* ATCC 10231 las cuales fueron adquiridas en MEDIBAC S.A. (Importadores y Distribuidores Av. República del Salvador N 34-399 e Irlanda Telf.: (02) 2261478, Quito). Se activó la bacteria *Escherichia coli* en agar sangre de cordero y la levadura *Candida albicans* en agar nutritivo tal como se indica en los certificados de calidad de los ambos microorganismos. Se incubó a 37°C por 24 horas.

- **Preparación de suspensiones de microorganismos**

Con el fin de estandarizar el inóculo microbiano se empleó el standard 0.5 McFarland cuya turbidez corresponde a  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml aproximadamente. Mediante la turbidez se ajustó la concentración de las suspensiones de la bacteria *Escherichia coli* y de la levadura *Candida albicans*. Para ello se seleccionaron colonias microbianas aisladas y se transfirieron a tubos con 10 ml de solución salina al 0.9% estéril.

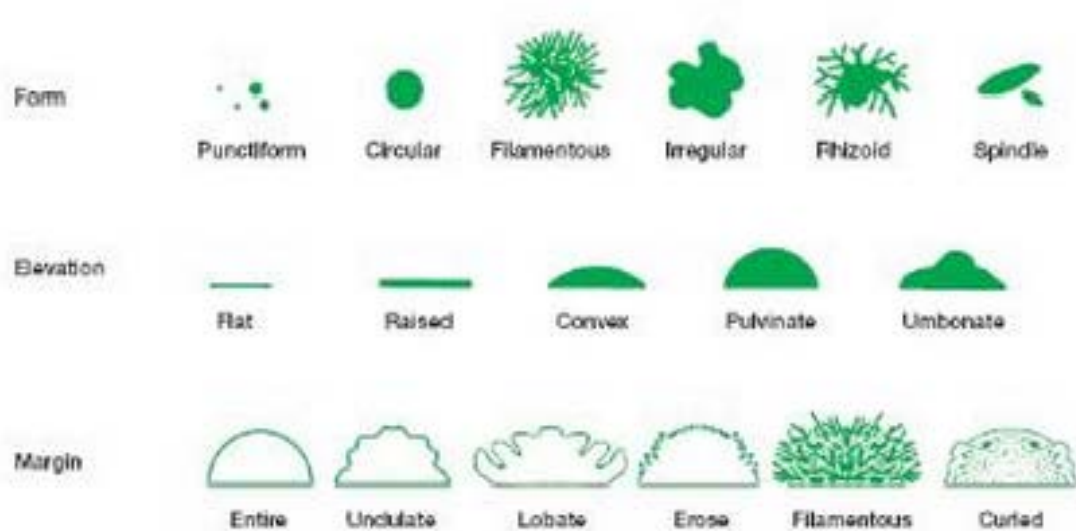
Para confirmar la concentración del inóculo microbiano se realizó diluciones seriadas de las suspensiones microbianas de cada microorganismo comenzando desde  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml (primera suspensión) hasta llegar a  $1.5 \times 10^2$  UFC/ml. A continuación se sembró 1 ml de las suspensiones de concentración  $1.5 \times 10^3$  UFC/ml y de  $1.5 \times 10^2$  UFC/ml de *Escherichia coli* en el medio de cultivo selectivo Chromocult y en placas petrifilm para *Escherichia coli* y se incubó a 37°C durante 24 h. Para *Candida albicans* se sembró 1 ml de las suspensiones de concentración  $1.5 \times 10^3$  UFC/ml y de  $1.5 \times 10^2$  UFC/ml en medio Sabouraud y en agar PDA (Potato Dextrosa Agar) y se incubó a 25°C durante 48h. Finalmente se determinó el número exacto de colonias en cada suspensión.

Para conservar las cepas microbianas puras se almacenó cada cepa en congelación a -30°C. Para ello se colocó en crioviales 0,1 ml de la suspensión que corresponde a  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml en 0,9 ml de solución de glicerol al 10% en medio BHI (Brain Heart Infusion).

### **Caracterización morfológica y bioquímica de los microorganismos**

Se realizó la caracterización morfológica y bioquímica de las cepas microbianas. La morfología de los microorganismos se realizó por medio de la determinación del color, forma, elevación y margen de las colonias microbianas. Los colores de la colonia fueron determinados por medio del uso de una tabla internacional de colores (British Standard Specification for

Colours for Identification Coding and Special Purposes-Anexo E) en los cultivos en los que se realizó la activación de las cepas microbianas. La forma, elevación y margen de la colonia se determinó de acuerdo a lo detallado por Prescott y colaboradores (2004):



**Figura 7.-** Características morfológicas (forma, elevación y margen) de colonias microbianas.

(Fuente: Prescott y colaboradores, 2004)

Las pruebas bioquímicas se realizaron por medio de la utilización de Microgen GN-ID A+B el cual contiene 24 sustratos bioquímicos estandarizados en pocillos. El sistema Microgen GN-ID comprende dos tiras de micropocillos por separado (GN A y GN B). Cada tira contiene 12 sustratos bioquímicos estandarizados. Los sustratos deshidratados en cada pocillo se reconstituyen con una suspensión del organismo. Si los sustratos son metabolizados por el organismo, se observó un cambio de color durante la incubación o después de la adición de reactivos específicos (ver la Tabla de Referencia de los Sustratos).

**Tabla N. 6.- Pruebas bioquímicas realizadas por medio de Microgen GN-ID**

Pocillo	Reacción	Descripción	Positiva	Negativa
1	Lisina	La Lisina decarboxilasa – al azul de Bromotimol pasa de verde/azul, indicando la producción de la amina cadaverina.	Verde/ Azul	Amarillo
2	Ornitina	La Ornitina decarboxilasa – el azul de Bromotimol se mantiene azul indicando la producción de la amina putrescina.	Azul	Amarillo/ Verde
3	H <sub>2</sub> S	Producción de H <sub>2</sub> S – el Tiosulfato se reduce a H <sub>2</sub> S que reacciona con las sales de hierro produciendo un precipitado negro.	Marrón/ Negro	Color paja
4	Glucosa	Fermentación – el azul de Bromotimol cambia de azul a amarillo como resultado de la producción de ácido a partir de la fermentación de carbohidratos.	Amarillo	Azul / Verde
5	Manitol			
6	Xilosa			
7	ONPG	Hidrólisis – la hidrólisis de la ONPG por la β-galactosidasa da lugar a la producción de amarillo de orto-nitrofenol.	Amarillo	Incoloro
8	Indol	El indol se produce a partir de triptófano y da lugar a un complejo rosa / rojo cuando se añade el reactivo de Kovac's.	Rosa / Rojo	Incoloro
9	Ureasa	La hidrólisis de la urea da lugar a la formación de amoníaco que provoca un incremento de pH que hace virar el rojo de fenol de amarillo a rosa / rojo.	Rosa muy profundo	De color paja a rosa salmón pálido
10	VP	La producción de acetoína a partir de glucosa se detecta por la formación de un complejo rosa / rojo después de la adición de alfa naftol y creatina en presencia de KOH.	Rosa profundo/ Rojo	Incoloro a rosa pálido
11	Citrato	La utilización de citrato (solo como fuente de carbono) da lugar a un incremento de pH que proporciona un cambio de color del azul de bromotimol de verde a azul.	Azul	Amarillo/ Verde pálido

<b>12</b>	TDA	El ácido Indolpirúvico se produce a partir de triptófano por la triptófano deaminasa dando un color rojo cereza cuando se añaden los iones de hierro. Los microorganismos indolo positivos pueden dar coloración marrón – en caso de resultado negativo.	Rojo cereza	Color paja
<b>13</b>	Gelatina	Los enzimas proteolíticos licuan la gelatina dando lugar a partículas negras que quedarán dispersadas por el pocillo.	Negro	Incoloro
<b>14</b>	Malonato	Cuando el malonato sódico es la única fuente de carbono se inhibe la conversión del ácido succínico a ácido fumárico. Un microorganismo incapaz de usar ese substrato da lugar a la acumulación de ácido succínico y el microorganismo no crece. Una reacción positiva es resultado de la utilización de malonato sódico a la vez que el sulfato de amonio se utiliza como fuente de nitrógeno dando lugar a hidróxido sódico que aumentará la alcalinidad dando color azul.	Azul	Verde
<b>15</b>	Inositol	Fermentación – el azul de Bromotimol cambia de azul a amarillo como resultado de la producción de ácido por la fermentación de carbohidratos.	Amarillo	Azul
<b>16</b>	Sorbitol			
<b>17</b>	Ramnosa			
<b>18</b>	Sucrosa			
<b>19</b>	Lactosa			
<b>20</b>	Arabinosa			
<b>21</b>	Adonitol			
<b>22</b>	Rafinosa			
<b>23</b>	Salicina			
<b>24</b>	Arginina	La Arginina para a ornitina, amoníaco y CO <sub>2</sub> por la acción de la arginina dihidrolasa dando lugar a un incremento del pH y a un cambio de color del azul de bromotimol de verde a azul. A las 48 horas las reacciones verdes son negativas.	Verde/ Azul azul Amarillo	Amarillo/ Verde

(Fuente: Microgen™ GN-ID Identificación. Instrucciones de Uso-Anexo F)

Una vez inoculados 100µL de la suspensión microbiana a cada uno de los pocillos de las tiras por medio de una micro-pipeta estéril se siguió con el procedimiento que se detalla en el Anexo-F. Los resultados de las pruebas bioquímicas se reportaron en la ficha de reporte de Microgen™ GN-ID que se detalla en el Anexo-G.

- **Inoculación en los medios de cultivo**

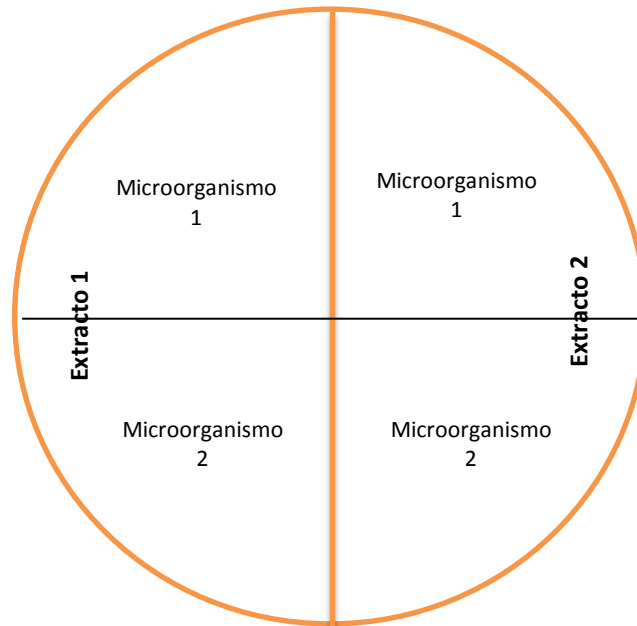
De acuerdo a Cytel (1995) citado por García (2007) se dividió la base de las cajas bipetri en dos cuadrantes (para cada microorganismo), empleando un marcador negro. Cada cuadrante fué enumerado y rotulado con el nombre del extracto de cada planta.

Una vez preparados los medios de cultivos se esterilizaron en el autoclave durante 15 min a 121°C a 15 psi y se dejó enfriar. A continuación, se tomó un volumen de extracto equivalente a una concentración de 5000 mg/l y se colocó en el interior de tubos de tapa rosca y se aforó con medio de cultivo hasta 10ml. A continuación, se agitó vigorosamente para lograr una mezcla homogénea de agar y extracto. Inmediatamente, se colocó la solución de agar y extracto en un compartimiento de las cajas bipetri procurando que el medio se deposite en toda la caja y evitando la formación de grumos, igualmente en el otro compartimiento. Este procedimiento se realizó para cada uno de los extractos y para cada medio de cultivo.



## Rayado de los microorganismos por el método de Mitscher (Cytel, 1995 citado por García, 2007)

Con un asa estéril, se tomó una cantidad de cada microorganismo de la suspensión de concentración  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml. El asa con el inóculo microbiano fue rayado en la caja bipetri siguiendo la plantilla:



Los medio de cultivo con microorganismos inoculados se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 48 h para *Escherichia coli* y durante 72h para *Candida albicans*.

### i) Evaluación por el método de Mitscher

Las lecturas de crecimiento de los microorganismos se realizaron cada 24 y 48h para *Escherichia coli* y cada 48 y 72h para *Candida albicans*; y se registraron en porcentaje de efectividad ende los extractos de acuerdo al método descrito por Cytel (1995), citado por García (2007).

**Tabla N. 7.- Porcentaje de efectividad de los extractos con los que se evaluó la actividad antimicrobiana.**

Porcentaje de Efectividad de actividad antimicrobiana (%)	Crecimiento Microbiano	Especificación Crecimiento
100	-	Nulo
75	+	Escaso
50	++	Leve
25	+++	Moderado
0	++++	Abundante

(Fuente: García, 2007)

Elaborado por: Gabriela Yáñez

Para obtener el % de inhibición microbiana por extracto se empleó la fórmula de Abbott (Ecuación 1).

$$M = \frac{m_e - m_b}{1 - m_b} \text{ (Ecuación 1)}$$

Dónde:

M = Inhibición.

$m_e$  = inhibición en el extracto.

$m_b$  = inhibición en el testigo

### **3.6.2 Selección de los extractos vegetales más promisorios con actividad antimicrobiana sobre *Escherichia coli* y *Candida albicans*.**

A partir del estudio exploratorio tipo screening, detallado anteriormente, se seleccionaron las metodologías y las especies vegetales que presentaron los mejores resultados para cada microorganismo. Se seleccionaron los 2

mejores tratamientos que presentaron porcentajes de efectividad y mortalidad iguales o superiores al 50%.

### 3.6.3 Establecimiento de las concentraciones adecuadas para inhibir la actividad microbiana de los microorganismos *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

#### a) Diseño Experimental

Para la determinación del método más eficiente de obtención de los extractos seleccionados se evaluaron los extractos vegetales a diferentes concentraciones. En este ensayo se empleó un diseño experimental factorial complemente al azar de dos factores (AXB) con un arreglo factorial 2X6 con 2 réplicas. De los extractos más promisorios (dos tratamientos) se determinó la actividad antimicrobiana de acuerdo a las concentraciones de los extractos (seis niveles) para cada microorganismo como lo detalla Neira (2010). Por lo tanto, se contó con 12 tratamientos con 2 réplicas para cada microorganismo.

**Tabla N. 8.- Factores y niveles de estudio para la selección de extractos vegetales con actividad antimicrobiana más promisorios.**

<b>Factor</b>	<b>Niveles</b>
<b>A. Tratamiento</b>	a0 Tratamiento 1
	a1 Tratamiento 2
<b>B. Concentración</b>	c0 100 mg/l
	c1 250 mg/l
	c2 500 mg/l
	c3 1000 mg/l
	c4 2500 mg/l
	c5 5000 mg/l

Elaborado por: Gabriela Yáñez

## b) Evaluación

Los resultados se evaluaron tal como se describió en el punto 3.5.1 literal h). Además, de cada una de las etapas experimentales se llevó registro fotográfico.

### 3.6.4 Identificación de los metabolitos secundarios contenidos en los extractos seleccionados, mediante análisis fitoquímico.

Se realizaron análisis fitoquímicos para determinar los metabolitos secundarios de los extractos vegetales más efectivos contra *Escherichia coli* y *Candida albicans* que se obtuvieron en el punto anterior (3.5.3). Las muestras se enviaron a los laboratorios del Instituto De Ciencias Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador, Quito.

Tabla N. 9.- Ejemplo de tabla de resultados de un análisis fitoquímico.

Metabolitos	Órgano		
	Raíz	Tallo	Hojas
Alcaloides	+	+++	+++
Taninos	-	+	+
Saponinas	+	++	++
Flavonoides	+	+	+
Aceites esenciales	+	-	-
Coumarinas	-	+	-
Triterpenos y Esteroides	-	++	+
Glicósidos Cardiotónicos	-	-	-
Aceites Fijos	-	-	-
Glicósidos cianogénéticos	-	+	-

(Fuente: Carvajal y colaboradores, 2009)

Elaborado por: Gabriela Yáñez

#### Equivalencias:

Abundante cantidad	+++
Mediana cantidad	++
Poca cantidad	+
No detectado	-

### **3.7 Procesamiento y análisis**

Para el procesamiento, análisis e interpretación de los resultados en la presente investigación se tabularon de acuerdo al número de tratamientos y repeticiones propuestos en cada diseño experimental. Además, en cada diseño experimental se realizó un análisis de varianza (ANOVA) mediante el programa estadístico STATGRAPHICS e InfoStat y se empleó la prueba de Tukey al 0.05 de aceptabilidad.

Los resultados acerca de las plantas más eficaces se compararon con la información bibliográfica recolectada en Antecedentes Investigativos relacionada con las plantas estudiadas. Además, los resultados fitoquímicos fueron sustentados con revisión bibliográfica en estudios similares publicados por otras universidades nacionales e internacionales.

## CAPITULO IV

### ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

#### 4.1 Análisis de los resultados

##### 4.1.1 Identificación de la actividad antimicrobiana de extractos vegetales

Se realizaron 32 extractos de las especies vegetales. Para la obtención de los extractos se empleó el follaje del vegetal seco determinándose anteriormente la humedad (Tabla A-1), pues en la mayoría de especies la mayor concentración de metabolitos secundarios se encuentra en este órgano y se empleó en estado seco para aumentar la concentración de metabolitos secundarios. Los extractos se obtuvieron por medio de cuatro metodologías utilizando 3 solventes con diferentes polaridades ya que muchos de los metabolitos secundarios son hidrofóbicos y por lo tanto se extraen por medio de solventes orgánicos como: etanol y el hexano; mientras que otros son hidrofílicos y se extraen en agua y pueden disolverse a diferentes temperaturas.

Como se puede observar en la Tabla A-7 los extractos vegetales que presentaron mayor porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* fueron los extractos por maceración en etanol de paico y tomillo cuyos porcentajes de efectividad de inhibición del crecimiento fueron del 100% a una concentración de 5000 mg/l. Además, en la Tabla A-9 se indica que los extractos vegetales que presentaron mayor porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* fueron los extractos por maceración en etanol de matico, paico y tomillo cuyos porcentajes de efectividad de inhibición del crecimiento fueron del 50 al 100% a una concentración de 5000 mg/l.

### **Valores de pH de los extractos vegetales**

Los promedios de las lecturas de los valores de pH de los 32 extractos vegetales para cada réplica se muestran en la Tabla A-2. Los valores de pH fluctúan entre 5,00 y 8,91; hay que considerar que cada microorganismo tiene un rango de pH dentro del cual es posible el crecimiento.

Los extractos que se encuentran en rangos ácidos (pH oscila entre 5 y 6,5) son los extractos etanólicos de albahaca, ambo, guayaba, hierba luisa, matico, paico y tomillo; el extracto hexánico de hierba luisa y matico; los extractos por decocción de guayaba, hierba luisa, matico y tomillo; y, los extractos por infusión de ambo, hierba luisa y tomillo. Los extractos que se encuentran en el rango de la neutralidad (pH oscila entre 6,5 y 7,5) son los extractos etanólicos de matico; los extractos hexánicos de ortiga y paico; los extractos por decocción de albahaca, ambo; y, los extractos por infusión de albahaca, hierba luisa y matico. Los extractos que se encuentran en el rango de la alcalinidad (pH oscila entre 7,5 y 9) son los extractos hexánicos de albahaca, hierba luisa y tomillo; el extracto por decocción de ortiga y paico; y, el extracto por infusión de ortiga y paico. Adicionalmente, cabe resaltar que el pH del solvente etanol oscila entre 8,59 y 8,63; el pH del solvente hexano oscila entre 6,61 y 6,68; y, el pH del solvente agua potable oscila entre 7,42 y 7,55.

### **Valores de conductividad eléctrica de los extractos vegetales**

Los promedios de las lecturas de los valores de conductividad eléctrica de los 32 extractos vegetales para cada réplica se muestran en la Tabla A-3. Los valores de conductividad eléctrica fluctúan entre 0,11 y 13450  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . El valor de la conductividad de una solución es un indicador para la medida de su concentración de sales disueltas. En las soluciones acuosas, cuanto mayor sea la cantidad de electrolito disuelto, mayor es la conductividad (Andrés y colaboradores, 2008).

La conductividad eléctrica de los extractos etanólicos varía desde 46 a 532  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , la conductividad de los extractos hexánicos varía desde 0,17 a 0,84  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ; la de los extractos por decocción varía de 1642 a 13445  $\mu\text{S}/\text{cm}$  y la conductividad eléctrica de los extractos por infusión varía de 1278 a 12435  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Adicionalmente, cabe resaltar que la conductividad eléctrica del solvente etanol oscila entre 0,58 y 0,61  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ; la conductividad eléctrica del solvente hexano oscila entre 0,11 y 0,13  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ; y, la conductividad eléctrica del solvente agua potable oscila entre 132,25 y 147,34  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ; mientras que la conductividad del agua destilada es de 7,24 y 9,76  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

### **Valores de concentración de los extractos vegetales**

Los promedios de las lecturas de los valores de concentración de los 32 extractos vegetales para cada réplica se muestran en la Tabla A-4. La concentración de los extractos indica la concentración aproximada de metabolitos extraídos por cada metodología.

La concentración de los extractos varía desde 8200 a 521300 mg/l siendo los extractos hexánicos los que presentan menor concentración y los extractos etanólicos los que presentan mayor concentración.

### **Colores de los extractos vegetales**

Los colores de los 32 extractos vegetales para cada réplica se muestran en la Tabla A-5. Estos fueron comparados con la ayuda de una tabla internacional de colores (British Standard Specification for Colours for Identification Coding and Special Purposes-Anexo E).

La coloración de los extractos varía desde colores amarillos tenues como en el caso de los extractos obtenidos por medio de maceración en hexano, decocción e infusión; mientras que la coloración de los extractos obtenidos por maceración en etanol presentan una coloración verde oscura.



### **Activación de las cepas microbianas**

Las cepas microbianas fueron activadas de acuerdo al procedimiento que se observa en el Anexo D. En la Tabla A-12 se muestran los resultados de los conteos de las diluciones realizadas a partir del estándar de McFarland 0.5 de *Escherichia coli*. Se sembró 1 ml de las suspensiones correspondientes a de concentración 1500 UFC/ml y de 150 UFC/ml y se determinó que en realidad tienen una concentración 75 UFC/ml y 8 UFC/ml respectivamente, siendo el Agar selectivo Chromocult en el que se observó mejor crecimiento de *E. coli*. Para el caso de *Candida albicans*, los resultados se muestran en la Tabla A-13 y se determinó que las suspensiones de concentración 1500 UFC/ml y de 150 UFC/ml en realidad tienen una concentración 14 UFC/ml y 2 UFC/ml, respectivamente, siendo el medio de cultivo en el que mejor se desarrolló la levadura del medio Sabouraud.

### **Caracterización morfológica y bioquímica de los microorganismos**

La caracterización morfológica tanto macroscópica como microscópica de las cepas se reporta en la Tabla A-25, en donde se observa que las colonias de *E. coli* son bacilos, Gram negativos y que en medio Sangre de cordero forman colonias circulares, convexas y enteras color "Dove Gray". Mientras que *C. albicans* son levaduras ovoidales, Gram positivas y que en agar nutritivo forman colonias circulares, pulvinadas y enteras color "Pale Cream" (Anexo E).

La caracterización bioquímica se reporta en la Tabla A-26, en donde se indica con signo + o – la presencia o ausencia de reacción para cada prueba bioquímica de las tiras GN A y GN B de Microgen GN.

## **Determinación de los vegetales más promisorios para inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* y *Candida albicans*.**

Por medio de un estudio exploratorio tipo screening se determinó los vegetales más promisorios para la inhibición del crecimiento de los microorganismos *Escherichia coli* y *Candida albicans*. En esta etapa se analizó dos factores experimentales: la planta medicinal y el método de obtención del extracto; y se aplicó en el medio de cultivo correspondiente a una concentración de 5000 mg/l, con lo cual se determinó el ensayo más efectivo para inhibir el crecimiento de *Echerichia coli* y *Candida albicans*.

### **Extractos de paico**

En el estudio tipo screening uno de los extractos vegetales que presentó mayor porcentaje de inhibición del crecimiento tanto para *Escherichia coli* como para *Candida albicans* fue el extracto de paico, lo que indica que esta planta medicinal es importante para combatir posibles infecciones causadas por estos microorganismos ya que a una concentración de 5000 mg/l produjo una inhibición del crecimiento del 100% en ambos.

En el caso de *Escherichia coli* al aplicar las diferentes metodologías de extracción utilizando diferentes solventes se determinó que los métodos de maceración en etanol y hexano fueron las metodologías más eficaces para la extracción de metabolitos secundarios tanto para las 24 y 48 horas de incubación. Para las 24 h de incubación, en la Tabla B-2 se observa que la media del porcentaje de inhibición para la maceración en etanol y en hexano de paico es del 100%; mientras que en las metodologías que emplean el agua como solvente, infusión y decocción, la media del porcentaje de inhibición es del 0%. Y, para las 48 h de incubación, en la Tabla B-7 se muestra que la media del porcentaje de inhibición del extracto por maceración en etanol de paico es del 100% mientras en la maceración en hexano es del 75%. Y en las metodologías de infusión y decocción la inhibición es del 0%.

Para el caso de la levadura *Candida albicans* a las 48 horas de incubación se determinó que el mejor método fue el método de maceración en etanol ya que como se observa en la Tabla B-12 la media del porcentaje de inhibición para la maceración en etanol es del 100%. En la maceración en hexano se obtuvo una media del porcentaje de inhibición del 50% y en el caso de la infusión se determinó una media del 12,5% y, finalmente en la extracción de metabolitos secundarios por medio de decocción no se observó inhibición del crecimiento de *Candida albicans*. Para las 72 h de incubación, como se observa en la Tabla B-17 la media del porcentaje de inhibición del extracto por maceración en etanol es del 100% mientras en la maceración en hexano es del 50%. Y en las metodologías de infusión y decocción la inhibición es del 0%.

En todas las metodologías se determinó la concentración del extracto lo cual se muestra en la Tabla A-4 y, a partir de lo cual se determinó la cantidad correspondiente para llegar a una concentración de 5000 mg/l en el medio de cultivo.

### **Extractos de tomillo**

Los extractos de tomillo demostraron eficaz actividad inhibitoria frente a las dos cepas microbianas estudiadas. Siendo una planta medicinal importante en el momento de combatir las diferentes afecciones que puedan ser causadas por estos microorganismos. Los porcentajes de inhibición del crecimiento que presento el tomillo se encuentran alrededor del 100% tanto para *Escherichia coli* como para *Candida albicans* a una concentración de 5000 mg/l.

En el caso *Escherichia coli* la metodología más eficaz de extracción de metabolitos secundarios capaces de inhibir su crecimiento a las 24 h de incubación fue la maceración en etanol puesto que como se puede observar en la Tabla B-2 la media del porcentaje de inhibición para la maceración en etanol del tomillo es del 100%; el macerado en hexano también demostró buenos resultados ya que presentó una media del porcentaje de inhibición

correspondiente al 75%; además, la decocción de tomillo fue igualmente eficaz puesto que presentó un 75% de inhibición del crecimiento de la bacteria. Mientras que en la metodología de infusión la media del porcentaje de inhibición es del 0%. Similares resultados se muestran en la Tabla B-7 para las 48 h de incubación en donde se reporta que la media del porcentaje de inhibición para la maceración en etanol de esta planta es del 100%; el macerado en hexano también demostró una media del porcentaje de inhibición correspondiente a 62,5%; la decocción de tomillo presentó igualmente un 75% de inhibición y la infusión un 0% de inhibición del crecimiento de la bacteria.

Para *Candida albicans* la metodología de obtención del extracto más eficaz a las 48 h de incubación fue igualmente la maceración en etanol puesto que como se muestra en la Tabla B-12 esta metodología demostró una media del porcentaje de inhibición del 100%, además, la maceración en hexano también demostró buenos resultados ya que se registró una media del porcentaje de inhibición de hasta el 50%. Mientras que en las metodologías que emplean el agua como solvente se observó un desarrollo normal de la levadura, es decir, una media del porcentaje de inhibición igual a 0%. Mientras que a las 72 horas de incubación como se puede ver en la Tabla B-17 la media del porcentaje de inhibición de la maceración en etanol es del 100% mientras que la media del porcentaje de inhibición de la maceración en hexano desciende a 37,5%, y en las metodologías de infusión y decocción la media del porcentaje de inhibición del crecimiento de *C. albicans* no cambia siendo este del 0%.

### **Extractos de matico**

Los extractos de matico también muestran efectividad para inhibir el crecimiento de los microorganismos *Escherichia coli* y *Candida albicans*. A una concentración de 5000 mg/l se obtuvo porcentajes de inhibición del crecimiento de hasta un 62,5%.

En el caso de la bacteria *Escherichia coli* a las 24 horas de incubación en la Tabla B-2 se muestra que tanto el macerado en etanol como el macerado en hexano de matico demostraron una media del porcentaje de inhibición del crecimiento del 62,5%. En el caso de las metodologías de infusión y decocción la bacteria se desarrolló normalmente lo que indica que la media del porcentaje de inhibición del crecimiento en ambos procedimientos es del 0%. Mientras que a las 48 h de incubación (Tabla B-7) la media del porcentaje de inhibición del crecimiento para el macerado en etanol es del 37,5% y para el macerado en hexano la media del porcentaje de inhibición es del 50%. Finalmente, tanto el extracto por infusión como por decocción tienen una media del porcentaje de inhibición del 0%.

Como se puede observar en la Tabla B-12 para *Candida albicans* a las 48 h de incubación el macerado en etanol presenta una media del porcentaje de inhibición del crecimiento del 75%; mientras que el macerado en hexano demostró una media del porcentaje de inhibición del 50% y las demás metodologías con el solvente agua (infusión y decocción) demostraron una media del porcentaje de inhibición del 0%. Como se observa en la Tabla B-17 a las 72 h de incubación se muestra que para el macerado en etanol la media de inhibición del crecimiento es del 50% y para el macerado en hexano es del 25%. En las metodologías de infusión y decocción la media del porcentaje de inhibición es del 0%.

### **Extractos de ortiga negra**

Los extractos de ortiga demostraron un porcentaje menor de inhibición para los dos microorganismos en estudio a una concentración de 5000 mg/l. Siendo así que para *Escherichia coli* a las 24 horas de incubación como se observa en la Tabla B-2 el macerado en etanol demostró una media del porcentaje de inhibición del 50%, el macerado en hexano por su parte demostró un porcentaje de inhibición del 12,5% y la metodología de decocción un porcentaje de inhibición del 25%. Mientras que la otra metodología infusión y demostró una media del porcentaje de inhibición del 0%. Después de 48 h de incubación como se muestra en la Tabla B-7 el

porcentaje de inhibición del macerado en etanol al igual que la decocción es del 25% y la media del porcentaje de inhibición del macerado en hexano al igual que la infusión es del 0%.

Para el caso de la levadura *Candida albicans* a las 48 h de incubación (Tabla B-12), el macerado en etanol demostró una media del porcentaje de inhibición del 25% y las metodologías (maceración en hexano, decocción e infusión) tuvieron una media del porcentaje de inhibición del 0%. A las 72 h de incubación, tal como se muestra en la Tabla B-17 tanto el macerado en etanol como en hexano demostraron una media del porcentaje de inhibición del 25%. Y, los extractos por infusión y decocción un porcentaje de inhibición del 0%.

### **Extractos de hierba luisa**

Los extractos de hierba luisa demostraron con menor eficacia inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* y *Candida albicans* a una concentración de 5000 mg/l.

En el caso de *Escherichia coli* como se puede observar en la Tabla B-2 a las 24 h de incubación el macerado en etanol demostró una media del porcentaje inhibición del crecimiento del 37,5%, el macerado en hexano una media del porcentaje de inhibición del 25% y los extractos de infusión y decocción un porcentaje del 0%. A las 48 h de incubación (Tabla B-7) el macerado en etanol demostró una media del porcentaje de inhibición del 37,5% mientras que los demás extractos estudiados (maceración en hexano, infusión, decocción) reportan una media del porcentaje de inhibición del 0%.

En el caso de *Candida albicans* como se puede observar en la Tabla B-12 a las 48 h de incubación la media del porcentaje de inhibición es mayor en el caso de la maceración en etanol con un porcentaje de 31,25% y en el caso del macerado en hexano el porcentaje es del 25%. Mientras que las metodologías de infusión y decocción demostraron una media del porcentaje de inhibición del 0%. A las 72 h de incubación (Tabla B-17) ambas metodologías de maceración (en hexano y etanol) reportan una media del

porcentaje de inhibición del 25% mientras que las metodologías de infusión y decocción demuestran un porcentaje de inhibición del crecimiento del 0%.

### **Extractos de albahaca**

Los extractos de albahaca demostraron la efectividad que se detalla a continuación a una concentración de 5000 mg/l.

Para *Escherichia coli* a las 24 h de incubación (Tabla B-2) el macerado en hexano reportó una media del porcentaje de inhibición del crecimiento del 25% al igual que la metodología de decocción la cual reportó el mismo porcentaje. Mientras que las metodologías de infusión y maceración en etanol reportaron una media del porcentaje de inhibición del 0%. A las 48 h de incubación como se muestra en la Tabla B-7 la metodología de decocción demostró una media del porcentaje de inhibición del 25% mientras que las demás probadas (maceración en alcohol y en hexano e infusión) reportaron un porcentaje del 0%.

Para *Candida albicans* a las 48 h de incubación (Tabla B-12) los macerados en etanol y hexano demostraron una media del porcentaje de inhibición del 25%. Y, la metodología de infusión y decocción un porcentaje de inhibición del 0%. Después de las 72 h de incubación como se muestra en la Tabla B-17 se reportaron los mismos resultados.

### **Extractos de ambo**

A una concentración de 5000 mg/l los extractos de ambo demostraron los siguientes porcentajes de inhibición.

Para *Escherichia coli* después de las 24 h de incubación (Tabla B-2) se reporta una media del porcentaje de inhibición del 25% tanto para la maceración en etanol como para la maceración en hexano; y, las metodologías de infusión y decocción muestran una media del porcentaje de inhibición del 0%. A las 48 h de incubación (Tabla B-7) la media del porcentaje de inhibición es del 0% para todas las metodologías estudiadas.

Para el caso de *Candida albicans* a las 48 h de incubación (Tabla B-12) los macerados en etanol y hexano demostraron una media del porcentaje de inhibición del 25% y los extractos por infusión y decocción una media del porcentaje de inhibición del 0%. Después de las 72 h de incubación (Tabla B-17) se mantuvieron los mismos resultados que a las 48 h de incubación.

### **Extractos de guayaba**

Los extractos de guayaba presentaron menor efectividad para inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* y *Candida albicans* a una concentración de 5000 mg/l.

Para *Escherichia coli* a las 24 h de incubación (Tabla B-2) la metodología de infusión demostró una media del porcentaje de inhibición del 25% y la maceración en hexano del 12,5% mientras que las metodologías de maceración en etanol y decocción presentaron un porcentaje del 0%. A las 48 h de incubación (Tabla B-7) la metodología de infusión mantuvo el porcentaje del 25% y las demás metodologías mostraron una media del porcentaje de inhibición del 0%.

Para *Candida albicans* después de 48 h de incubación (Tabla B-12) la metodología de maceración en etanol mostro una media del porcentaje de inhibición del 50% y la maceración en hexano un porcentaje del 25% mientras que las metodologías de decocción e infusión reportaron una media del porcentaje de inhibición del 0%. Después de las 72 h de incubación (Tabla B-17) se mantuvieron las medias del porcentaje de inhibición para cada metodología a las 48 h de incubación.

#### **4.1.2 Selección de los extractos vegetales más promisorios con actividad antimicrobiana**

Los resultados del porcentaje de inhibición del crecimiento microbiano de los 32 tratamientos frente a los dos microorganismos patógenos se reportan en la sección de Anexos. En la Tabla A-10 se reportan los porcentajes de



inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 y 48 horas de incubación; en la Tabla A-11 se reportan los porcentajes de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 y 72 horas de incubación. Estos resultados se obtuvieron inoculando una concentración del extracto de 5000 mg/l en cada medio de cultivo; después se realizaron dos lecturas por cada réplica de cada tratamiento.

Para seleccionar los extractos vegetales más promisorios con actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans* se estudiaron dos factores significativos como son el vegetal (Factor B) y el método de extracción (Factor A) y se realizó a una dosificación estándar de 5000 mg/l. Los datos de los promedios de los porcentajes de inhibición, que se detallan en la Tabla A-10 (*Escherichia coli*) y Tabla A-11 (*Candida albicans*), se emplearon para la realización de los cálculos estadísticos para determinar el mejor tratamiento. Estos datos se estudiaron por medio de la utilización de un diseño factorial AXB para cada microorganismo y fueron procesados con el paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI, los resultados obtenidos se reportan en el Anexo B (Análisis Estadístico), literal A.

El análisis de varianza (ANOVA) del experimento para *Escherichia coli* después de 24 h de incubación se muestran en la en la Tabla B-1, en esta tabla se señala que el Valor-P de la covariable replica es de 0,66; ya que es un valor mayor a 0,05 quiere decir que los datos del porcentaje de inhibición del crecimiento tomados entre cada réplica no son significativos y que no existe variación entre cada replica. El Valor-P para la Especie Vegetal (Factor B), para la Metodología de Extracción (Factor A) y para la interacción entre los dos factores AB es menores que 0,05 para cada uno lo que indica que estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo y que estos factores interactúan entre sí para presentar un efecto combinado que influyen significativamente sobre el porcentaje de inhibición del crecimiento con un 95,0% de nivel de confianza.

El análisis de varianza del experimento para *Escherichia coli* después de 48 h de incubación se muestra en la Tabla B-6 en esta tabla se reportan valores estadísticos similares a lo reportado a las 24 h de incubación, lo que indica

que el efecto de los factores frente a *E. coli* es el mismo tanto a las 24 como a las 48 horas de incubación.

En el caso de esta bacteria (*Escherichia coli*); en la Tabla A-7 se muestra el porcentaje de inhibición microbiano para cada tratamiento para las 24 y 48 horas de incubación. A las 24 h se observa que los extractos con mayor efectividad fueron los extractos etanólicos de: paico, tomillo y en menor cantidad el extracto etanólico de matico. Para confirmar esta información se aplicó un análisis estadístico mediante una prueba estadística de Tukey al 95% de confiabilidad para determinar la metodología más eficaz, la cual se muestra en la Tabla B-3, observando tres grupos homogéneos siendo el método que presentó mayor diferencia significativa la maceración en etanol. En la Tabla B-4 se aplicó el análisis estadístico mediante una prueba estadística de Tukey al 95% para determinar las plantas más promisorias observando cinco grupos homogéneos, siendo las plantas que presentaron mayor diferencia significativa el paico y el tomillo. Además, como se observa en el Grafico B-3, la metodología que alcanza mayor porcentaje de inhibición del crecimiento de *E. coli* es la maceración en etanol; y, la plantas medicinales que demostraron mejores porcentajes de inhibición son el tomillo y paico, en su orden (Gráfico B-4). Esto se demuestra en la Tabla B-5 en donde se observa que para la interacción de los dos factores la maceración en etanol de paico y la maceración de tomillo presentan mayor diferencia significativa. En el Gráfico B-5 se representa la interacción entre factores AB, y se observa claramente como los porcentajes de inhibición se incrementan en los casos de la maceración en etanol de las plantas tomillo y paico. A las 48 horas de incubación se observan resultados similares y al aplicar el análisis estadístico mediante una prueba estadística de Tukey al 95% para determinar el mejor método de extracción, lo cual se detalla en la Tabla B-8, se observan cuatro grupos homogéneos siendo la metodología que presento mayor diferencia significativa la maceración en etanol. Mediante el mismo análisis estadístico se determinó las plantas más promisorias a las 48 h de incubación siendo las que presentaron mayor diferencia significativa el paico y el tomillo (Tabla B-9). En la Tabla B-10 se

observa que para la interacción de los dos factores la maceración en etanol de paico y la maceración de tomillo presentan mayor diferencia significativa. Los Gráficos B-8, B-9 y B-10 demuestran que la metodología que mejor metodología fue la maceración en etanol; las mejores plantas medicinales tomillo y paico, en su orden; y, que la mejor interacción entre factores AB maceración en etanol de las plantas tomillo y paico, respectivamente. Es decir, tanto para las 24 y 48 horas de incubación los tratamientos que muestran mayor diferencia significativa para inhibir el crecimiento de *E. coli* fueron la maceración en etanol de tomillo y la maceración en etanol de paico.

El análisis de varianza (ANOVA) del experimento para *Candida albicans* después de 48 h de incubación se muestran en la en la Tabla B-11, en esta tabla se señala que el Valor-P de la covariable replica es de 0,19 lo que quiere decir que los datos del porcentaje de inhibición del crecimiento tomados entre cada réplica no son significativos y que no existe variación entre cada replica. Los Valores-P para la Especie Vegetal (Factor B), para la Metodología de Extracción (Factor A) y para la interacción entre los dos factores AXB indican que estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo y que estos factores interactúan entre sí para presentar un efecto combinado que influyen significativamente sobre el porcentaje de inhibición del crecimiento con un 95,0% de nivel de confianza.

El análisis de varianza del experimento para *Candida albicans* después de 72 h de incubación se muestra en la Tabla B-16 en esta tabla se reportan valores estadísticos similares a lo reportado a las 48 h de incubación, lo que indica que el efecto de los factores frente a *C. albicans* es el mismo tanto a las 48 como a las 72 horas de incubación.

Para el caso de esta levadura (*Candida albicans*); en la Tabla A-9 se muestra el porcentaje de inhibición microbiano para cada tratamiento a las 48 y 72 horas de incubación. A las 48 h de incubación se observa igualmente que los extractos con mayor efectividad fueron los extractos etanólicos de: paico, tomillo y en menor cantidad el extracto etanólico de matico. Para confirmar esta información se aplicó el análisis estadístico

mediante una prueba estadística de Tukey al 95% la cual se muestra en la Tabla B-13 para determinar la metodología más eficaz, observando tres grupos homogéneos, siendo la metodología que presentó mayor diferencia significativa es la maceración en etanol. En la Tabla B-14 se aplicó el análisis estadístico mediante una prueba estadística de Tukey al 95% para determinar las plantas más promisorias observando cuatro grupos homogéneos, siendo las plantas que presentaron mayor diferencia significativa el paico y el tomillo y para la interacción de los dos factores los tratamientos con mayor diferencia significativa son la maceración en etanol de tomillo y la maceración en etanol de paico (Tabla B-15). Esto se ratifica con lo representado en los Gráficos B-13, B-14 y B-15; en donde se observa que la metodología de extracción con mayor diferencia significativa es la maceración en etanol (Gráficos B-13), las plantas que demuestran mejores porcentajes de inhibición el paico y el tomillo, en su orden (Gráficos B-14); y, que en la interacción entre factores A y B se observa como la inhibición es mayor en los casos de maceración en etanol de paico y tomillo con respecto a las demás metodologías en donde la inhibición es menor (Gráficos B-15). A las 72 h se aplicó el mismo análisis estadístico para determinar el mejor método de extracción lo cual se reporta en la Tabla B-18, observándose tres grupos homogéneos siendo el que presenta mayor diferencia significativa la metodología por maceración en etanol. En la Tabla B-19 se detalla el análisis estadístico mediante una prueba estadística de Tukey al 95% para determinar la mejor planta para inhibir el crecimiento de *C. albicans* obteniéndose tres grupos homogéneos en donde las plantas que presentan mayor diferencia significativa son el tomillo y el paico en la Tabla B-20 se observa que la maceración en etanol de tomillo y la maceración en etanol de paico presentan mayor diferencia significativa. Como se describió a las 48 h de incubación se observa que la metodología de extracción con mayor diferencia significativa es la maceración en etanol (Gráficos B-18), las mejores plantas son el paico y el tomillo, en su orden (Gráficos B-19); y, que en la interacción entre factores A y B el mejor tratamiento es la maceración en etanol de paico y tomillo (Gráficos B-20). Es decir, tanto para las 48 y 72 horas de incubación los tratamientos que muestran mayor diferencia

significativa para inhibir el crecimiento de *C. albicans* fueron la maceración en etanol de tomillo y la maceración en etanol de paico.

#### **4.1.3 Establecimiento de las concentraciones adecuadas para inhibir la actividad microbiana**

Una vez determinadas como las especies vegetales más eficaces para inhibir el crecimiento de ambos microorganismos al tomillo y paico se procedió a la determinación de las concentraciones más adecuadas para dicho efecto. Se obtuvieron los extractos vegetales siguiendo los mismos lineamientos de la primera etapa. Los valores de humedad obtenidos después del proceso de secado de las hojas de paico y tomillo se reportan en la Tabla A-14.

#### **Valores de pH de los extractos vegetales**

Los valores promedio de pH de los extractos vegetales de los mejores tratamientos se reportan en la Tabla A-15. Los valores de pH de los extractos etanólicos de paico y tomillo fluctúan entre 5,17 y 6,16 lo que quiere decir que se encuentran en rangos ácidos (pH oscila entre 5 y 6,5) lo cual coincide con los datos obtenidos en la primera etapa. Resaltando que el pH del solvente etanol oscila entre 7,81 y 7,85; y, el pH del agua destilada oscila entre 7,00 y 7,06.

#### **Valores de conductividad eléctrica de los extractos vegetales**

Los promedios de las lecturas de los valores de conductividad eléctrica de los extractos vegetales más eficaces para cada réplica se muestran en la Tabla A-16. Los valores de conductividad eléctrica para estos tratamientos fluctúan entre 87 y 299  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Siendo los valores promedio reportados para los extractos etanólicos de paico valores entre 87 a 91  $\mu\text{S}/\text{cm}$  y la conductividad eléctrica de los extractos etanólicos de tomillo varía desde 288 a 299  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . En lo referente a los solventes, la conductividad eléctrica del

solvente etanol oscila entre 0,61 y 0,64  $\mu\text{S}/\text{cm}$  mientras que la conductividad del agua destilada oscila entre valores de 7,60 y 8,61  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

### **Valores de concentración de los extractos vegetales**

Los promedios de las lecturas de los valores de concentración de los extractos vegetales para cada réplica de la segunda etapa se muestran en la Tabla A-17. La concentración de los extractos varía desde 28450 a 76150 mg/l siendo los extractos etanólicos de tomillo los que presentan mayor concentración y los extractos etanólicos de paico los que presentan menor concentración.

### **Colores de los extractos vegetales**

Los colores de los extractos vegetales para cada réplica de la segunda etapa se muestran en la Tabla A-18. Estos fueron comparados con la ayuda de una tabla internacional de colores (Anexo E).

La coloración de los extractos etanólicos de paico presentan una coloración verde oscura mientras que la coloración de los extractos etanólicos de tomillo tienen una coloración anaranjada oscura.

### **Determinación de las concentraciones adecuadas para inhibir la actividad microbiana**

A partir de los extractos vegetales seleccionados se realizó un nuevo ensayo para determinar las concentraciones adecuadas para inhibir la actividad microbiana, de acuerdo a un diseño experimental AXB en donde el factor A es el tratamiento y el factor B es la concentración del extracto en el medio de cultivo.

Los resultados del porcentaje de inhibición del crecimiento microbiano de los tratamientos (maceración en etanol de paico y tomillo) a diferentes

concentraciones frente a *Escherichia coli* a las 24 y 48 horas de incubación se reporta en la Tabla A-20 y en la Tabla A-22 se reportan los porcentajes de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 y 72 horas de incubación. Estos resultados se obtuvieron inoculando en cada medio de cultivo el extracto a las diferentes concentraciones que se detallan en el punto 3.6.3; y, después se realizaron dos lecturas por cada réplica de cada tratamiento. Los datos de los promedios de los porcentajes de inhibición, que se detallan en la Tabla A-23 (*Escherichia coli*) y Tabla A-24 (*Candida albicans*), se emplearon para la realización de los cálculos estadísticos para determinar la dosis más adecuada. Estos datos se estudiaron por medio de la utilización de un diseño factorial AXB para cada microorganismo y fueron procesados con el paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI, los resultados obtenidos se reportan en el Anexo B (Análisis Estadístico), literal B.

El análisis de varianza (ANOVA) del experimento con extractos más eficaces a diferentes concentraciones para *Escherichia coli* de 24 h de incubación se muestran en la Tabla B-21, en donde se indica que el Valor-P de la covariable replica es de 0,34; ya que este es un valor mayor a 0,05 indica que los datos del porcentaje de inhibición del crecimiento tomados entre cada réplica no son significativos y que no existe variación entre cada replica. El Valor-P para el mejor tratamiento (Factor A), para la Concentración (Factor B) y para la interacción entre los dos factores AB es menor que 0,05 para cada uno lo que indica que estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo y que estos factores interactúan entre sí para presentar un efecto combinado que influyen significativamente sobre el porcentaje de inhibición del crecimiento con un 95,0% de nivel de confianza.

El análisis de varianza del experimento para *Escherichia coli* después de 48 h de incubación se muestra en la Tabla B-26 en esta tabla se reportan valores estadísticos similares a lo reportado a las 24 h de incubación, lo que indica que el efecto de los factores frente a *E. coli* es el mismo tanto a las 24 como a las 48 horas de incubación.

Para *Escherichia coli* en la Tabla A-20 se muestra el porcentaje de inhibición microbiano para cada tratamiento para las 24 y 48 horas de incubación. A las 24 h se observa que el extracto que presenta mayor inhibición del crecimiento fue el extracto etanólico de paico a una concentración de 5000 mg/l. Al realizar un análisis estadístico mediante una prueba estadística de Tukey al 95% de confiabilidad para determinar el extracto más eficaz, Tabla B-23, se observa dos grupos homogéneos siendo el tratamiento que presentó mayor diferencia significativa la maceración en etanol de paico. Para determinar las concentraciones más adecuadas se aplicó el análisis estadístico mediante una prueba estadística de Tukey al 95%, Tabla B-24, observando tres grupos homogéneos, siendo la concentración que presenta mayor diferencia significativa la concentración de 5000 mg/l. En la Tabla B-25 se observa que la maceración en etanol de tomillo a 5000 mg/l y la maceración en etanol de paico a 2500 y 5000 mg/l presentan mayor diferencia significativa. A las 48 horas de incubación se observan resultados similares y al aplicar el análisis estadístico mediante una prueba estadística de Tukey al 95% para determinar el mejor tratamiento, lo cual se detalla en la Tabla B-28, se observan dos grupos homogéneos siendo el tratamiento que presentó mayor diferencia significativa el macerado en etanol de paico. Mediante el mismo análisis estadístico se determinó la concentración más adecuada a las 48 h de incubación siendo las concentraciones que presentan mayor diferencia significativa las concentraciones de 2500 y 5000 mg/l (Tabla B-29). En la Tabla B-30 se observa que la maceración en etanol de tomillo a 5000 mg/l y la maceración en etanol de paico a 2500 y 5000 mg/l son los tratamientos que presentan mayor diferencia significativa. Esto se ratifica en los Gráficos B-28, B-29 y B-30; en donde se observa que la metodología de extracción con mayor diferencia significativa es la maceración en etanol de paico (Gráficos B-28), las concentraciones que demuestran mejores porcentajes de inhibición son 2500 mg/l y 5000 mg/l, en su orden (Gráficos B-29); y, que en la interacción entre factores A y B se observa como la inhibición es mayor en los casos de maceración en etanol de paico a 2500 mg/l y 5000 mg/l con respecto a las demás concentraciones en donde la inhibición es menor (Gráficos B-30); lo cual coincide a las 24 h



de incubación (Gráfico B-23, B-24, B-25). Es decir, tanto para las 24 y 48 horas de incubación el tratamiento que muestra mayor diferencia significativa para inhibir el crecimiento de *E. coli* fue la maceración en etanol de paico a una concentración 2500 y 5000 mg/l, a estas concentraciones se observa inhibición total del crecimiento. Mientras que la maceración en etanol de tomillo es eficaz a una concentración 5000 mg/l.

El análisis de varianza (ANOVA) del experimento con extractos más eficaces a diferentes concentraciones para *Candida albicans* de 48 h de incubación se muestran en la en la Tabla B-31, en donde se indica que el Valor-P de la covariable replica es de 0,08; ya que este es un valor mayor a 0,05 indica que los datos del porcentaje de inhibición del crecimiento tomados entre cada réplica no son significativos y que no existe variación entre cada replica. El Valor-P para el mejor tratamiento (Factor A), para la Concentración (Factor B) y para la interacción entre los dos factores AB es menor que 0,05 para cada uno lo que indica que estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo y que estos factores interactúan entre sí para presentar un efecto combinado que influyen significativamente sobre el porcentaje de inhibición del crecimiento con un 95,0% de nivel de confianza.

El análisis de varianza del experimento para *Candida albicans* después de 72 h de incubación se muestra en la Tabla B-36, en esta tabla se reportan valores estadísticos similares a lo reportado a las 48 h de incubación, lo que indica que el efecto de los factores frente a *C. albicans* es el mismo tanto a las 48 como a las 72 horas de incubación.

Para *Candida albicans* en la Tabla A-22 se muestra el porcentaje de inhibición microbiano para cada tratamiento para las 48 y 72 horas de incubación. A las 48 h se observa que el extracto que presenta mayor inhibición del crecimiento fue el extracto etanólico de paico a una concentración de 5000 mg/l. Al realizar un análisis estadístico mediante una prueba estadística de Tukey al 95% de confiabilidad para determinar el extracto más eficaz, Tabla B-33, se observa un grupo homogéneo lo que quiere decir que no existe diferencia significativa entre la maceración en etanol de paico y la maceración en etanol de tomillo. Para determinar las

concentraciones más adecuadas se aplicó el análisis estadístico mediante una prueba estadística de Tukey al 95%, Tabla B-34, observando tres grupos homogéneos, siendo la concentración que presenta mayor diferencia significativa la concentración de 2500 y 5000 mg/l. En la Tabla B-35 se observa que la maceración en etanol de tomillo y paico a una concentración de 2500 y 5000 mg/l presentan la mayor diferencia significativa. A las 72 horas de incubación se observan resultados similares y al aplicar el análisis estadístico mediante una prueba estadística de Tukey al 95% para determinar el mejor tratamiento, lo cual se detalla en la Tabla B-38, se observan un grupo homogéneo lo que indica que no existe diferencia significativa entre la maceración en etanol de paico y la maceración en etanol de tomillo. Mediante el mismo análisis estadístico se determinó la concentración más adecuada a las 72 h de incubación siendo las concentraciones que presentan mayor diferencia significativa las concentraciones de 2500 y 5000 mg/l (Tabla B-39). Para la interacción se observa en la Tabla B-40 que la maceración en etanol de tomillo y paico a una concentración de 2500 y 5000 mg/l presentan la mayor diferencia significativa. En el Gráfico B-38, se observa que no existen diferencias significativas entre las metodologías de extracción, las mejores concentraciones son 2500 y 5000 mg/l, en su orden (Gráficos B-39); y, que en la interacción entre factores A y B el mejor tratamiento es la maceración en etanol de paico y tomillo a 2500 mg/l y 5000 mg/l (Gráficos B-40); lo cual coincide a las 48 h de incubación (Gráfico B-33, B-34, B-35). Es decir, tanto para las 48 y 72 horas de incubación los tratamientos para inhibir el crecimiento de *C. albicans* fueron la maceración en etanol de paico y tomillo a una concentración 2500 y 5000 mg/l.

#### **4.1.4 Identificación de los metabolitos secundarios contenidos en los extractos seleccionados, mediante análisis fitoquímico.**

La identificación de metabolitos secundarios mediante análisis fitoquímico se realizó de las especies vegetales que demostraron mejores resultados de inhibición del crecimiento tanto para *Escherichia coli* como para *Candida*

*albicans*. Los análisis fitoquímicos se realizaron en los laboratorios acreditados OAE del Instituto De Ciencias Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador, Quito.

El análisis fitoquímico se realizó de las hojas en estado seco de las plantas de tomillo y paico, en el cual se determinó los siguientes metabolitos secundarios: aceites fijos, alcaloides, taninos, saponinas, flavonoides, aceites esenciales, coumarinas, triterpenos y esteroides, glicósidos cardiotónicos, glicósidos cianogenéticos (Tabla E-1 y E-2).

**Tabla 4.1. Metabolitos secundarios presentes en las hojas de las especies vegetales más promisorias frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans*.**

Grupo fitoquímico	Especie Vegetal	
	Paico	Tomillo
Alcaloides	+	-
Taninos	+	+
Saponinas	-	+/-
Flavonoides	+	++
Aceites esenciales	++	++
Coumarinas	-	-
Triterpenos y esteroides	+	+
Glicósidos Cardiotónicos	-	-
Aceites fijos	-	-

Fuente: Instituto De Ciencias Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador, Quito.

#### **EQUIVALENCIAS:**

Abundante cantidad	+++
Mediana cantidad	++
Poca cantidad	+
Indicios	+/-
Ausencia	-

## 4.2 Interpretación de datos

### 4.2.1 Identificación de la actividad antimicrobiana de extractos vegetales

La identificación de los extractos que tienen actividad antimicrobiana se realizó por medio de un estudio exploratorio tipo “screening”. Los extractos se obtuvieron con el uso de las hojas secas las 8 plantas medicinales estudiadas para aumentar la concentración de metabolitos secundarios en estos órganos. Se realizaron 4 metodologías de extracción de los extractos de cada una de las 8 especies vegetales. Las metodologías de extracción emplearon solventes de diferente polaridad. De tal manera que el agua extrajo metabolitos secundarios polares solubles a diferentes temperaturas, el etanol extrajo moléculas de baja polaridad y el hexano metabolitos secundarios apolares (Vallejo, 2010).

De acuerdo a Vivanco y colaboradores (2005), en el reino vegetal existe una extensa colección de “metabolitos secundarios”, presentes en concentraciones variables, en todos los tejidos vegetales adultos, cuya función primordial parece ser la defensa contra invasiones microbianas, estos compuestos se caracterizan por su estado permanente en la planta. Su función es servir de barrera inicial a la propagación de bacterias u hongos dentro de los tejidos de la planta. Por lo cual pueden presentar inhibición contra ciertos microorganismos que son causantes de enfermedades en animales tales como lo son *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

Los metabolitos secundarios ejercen una presión selectiva sobre los microorganismos patógenos potenciales; éstos, a su vez, desarrollan, por mutación, mecanismos de resistencia, y perpetúan así el ciclo de cambio por mutación en patógeno y hospedador. A ese fenómeno se debe, en parte, la enorme diversidad química de los productos naturales derivados de plantas (Vivanco y colaboradores, 2005).

Además, según Waterman y Mole (1994) citado por Santacoloma y Granados (2012) el contenido de varios tipos de metabolitos secundarios

está influenciado por el genotipo de la planta (especie y variedad), las características ambientales (clima, radiación solar y disponibilidad de agua), la velocidad de crecimiento, la madurez, la condición nutricional del suelo, la depredación y las enfermedades.

Los extractos vegetales que presentaron mayor cantidad de metabolitos secundarios capaces de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* y *Candida albicans* fueron los extractos por maceración en etanol de paico y tomillo ya que sus porcentajes de efectividad de inhibición del crecimiento fueron del 100% a una concentración de 5000 mg/l de extracto. Esto se debe a que el etanol tiende a arrastrar gran cantidad de compuestos polares como saponinas, taninos, flavonoides, esteroides/terpenos; y, de acuerdo a Espinoza (2003), estos compuestos tienen propiedades antimicrobianas, debido a que inhiben la síntesis o dañan la pared celular o inhiben la síntesis de ADN o ARN, ya que la estructura que tienen éstos compuesto es similar a la de las bases púricas y pirimídicas y se pueden intercalar formando puentes de hidrógeno, alterando así la estructura tridimensional de los ácidos nucleicos.

### **Valores de pH de los extractos vegetales**

Los valores de pH de los extractos de las plantas medicinales fluctúan entre 5,00 y 8,91 (Tabla A-2); se debe tener en cuenta que cada microorganismo tiene un rango de pH dentro del cual es posible el crecimiento y normalmente cada uno posee un pH óptimo bien definido. Generalmente, el crecimiento de bacterias es impedido por descensos de pH mientras que en el caso de levaduras y hongos un aumento en el pH inhibe su crecimiento. El valor de pH óptimo para *Escherichia coli* es de 7.0 mientras que de *Candida albicans* es de 4.0 (Michael y colaboradores, 2004).

Dentro de los extractos que se encuentran en rangos ácidos de pH (pH oscila entre 5 y 6,5) se encuentran los extractos por maceración en etanol de paico y tomillo; la acidificación del medio de cultivo ejercida por estos extractos pudo interactuar en el efecto inhibitorio del crecimiento de

*Escherichia coli*. Además, dado que el pH óptimo para *Candida albicans* es de 4.0 esta modificación del pH también pudo influenciar en la inhibición del crecimiento de esta levadura. Los extractos ácidos que presentaron también efectos inhibitorios en menor porcentaje frente a ambos microorganismos fueron los extractos de maceración en etanol de ambo, hierba luisa y matico; los extractos de maceración en hexano de hierba luisa y matico y el extracto por decocción de tomillo frente a *E. coli*.

La alteración del pH del medio de cultivo por los extractos que se encuentran en el rango de la neutralidad (pH oscila entre 6,5 y 7,5) pudo haber influenciado en el crecimiento de *Candida albicans* ya que los siguientes extractos inhibieron el crecimiento de la levadura en menores porcentajes: extractos etanólicos de matico y los extractos hexánicos de paico.

Los cambios en el pH del medio de cultivo por parte de los extractos que se encuentran en el rango de la alcalinidad (pH oscila entre 7,5 y 9) pudieron interactuar para inhibir el crecimiento de ambos microorganismos estos extractos son los macerados en hexano de albahaca, hierba luisa y tomillo. Además el extracto por decocción de ortiga inhibió en menor porcentaje a *E. coli* al igual que el extracto por infusión de paico a *C. albicans*.

### **Valores de conductividad eléctrica de los extractos vegetales**

Los valores de conductividad eléctrica de los 32 extractos de las plantas medicinales fluctúan entre 0,11 y 13450  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (Tabla A-3). El valor de la conductividad de una solución es un indicador para la medida de su concentración de sales disueltas. En las soluciones acuosas, cuanto mayor sea la cantidad de electrolito disuelto, mayor es la conductividad (Andrés y colaboradores, 2008).

Los extractos con mayor valor de conductividad eléctrica fueron los extractos por decocción e infusión ya que alcanzan valores de hasta 13445  $\mu\text{S}/\text{cm}$  y 12435  $\mu\text{S}/\text{cm}$  respectivamente. Mientras que las maceraciones en etanol y hexano alcanzar valores de 532  $\mu\text{S}/\text{cm}$  y 0,84  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , respectivamente. Lo cual quiere decir que la metodología que extrajo mayor cantidad de

electrolitos fueron las metodologías de infusión y decocción. Mientras que los extractos etanólicos y hexánicos extrajeron en menor proporción electrolitos capaces de conducir electricidad.

### **Valores de concentración de los extractos vegetales**

La concentración de los 32 extractos de las plantas medicinales indica la concentración aproximada de metabolitos extraídos por cada metodología (Tabla A-4). Estos valores fueron obtenidos por medio de un análisis gravimétrico por medio del cual se midió los cambios de masa al someter a calentamiento una muestra del extracto con el fin de evaporar el solvente y pesar a continuación los sólidos suspendidos secos. A este análisis se lo llama un análisis directo porque la sustancia de interés es el objeto que está siendo pesado directamente (Harvey, 2000).

Los extractos por maceración en etanol y hexano fueron sometidos a un proceso de rota-evaporación con el fin de evaporar los solventes y concentrar las muestras. Los extractos por maceración en hexano presentan menor concentración mientras que los extractos por maceración en etanol fueron los extractos que presentaron mayor concentración.

### **Colores de los extractos vegetales**

Los colores de los extractos de las plantas medicinales se determinaron por medio de la comparación con una tabla internacional de colores (British Standard Specification for Colours for Identification Coding and Special Purposes- Anexo E).

En el caso de los extractos obtenidos por medio de maceración en hexano, decocción e infusión la coloración varía desde colores amarillos (355 Lemon) a colores oscuros como Deep Bronze Green. Mientras que la coloración de los extractos obtenidos por maceración en etanol presentan una coloraciones verdes oscuras (224 Deep Bronze Green).

## **Activación de las cepas microbianas**

Después de la activación de las cepas microbianas y la determinación de la concentración de las soluciones microbianas preparadas a partir del estándar de McFarland 0.5 se determinó que la bacteria *Escherichia coli* presenta mejor desarrollo en el agar selectivo Chromocult. Los medios selectivos favorecen el crecimiento de microorganismos particulares el colorante contenido en este medio de cultivo Tergitol<sup>®</sup>7 favorece el crecimiento de bacterias Gram negativas, al inhibir el crecimiento de las Gram positivas, sin afectar a las primeras. Las colonias de *E. coli* en este medio de cultivo son color azul oscuro (Merck, 2004). Además, se cultivó a la bacteria en agar nutritivo el cual es un medio de cultivo complejo cuyo pH favorece el crecimiento de bacterias.

La levadura *Candida albicans* presentó mejor desarrollo en el medio de cultivo Sabouraud. Este medio es un medio de cultivo complejo ya que contiene algunos ingredientes cuya composición química exacta se desconoce. Estos medios son muy útiles, pues un único medio complejo puede ser suficientemente rico para satisfacer las necesidades nutricionales de diversos microorganismos (Prescott y colaboradores, 2004). La alta concentración de glucosa del medio Sabouraud provee de una ventaja para el crecimiento de hongos y levaduras mientras que las bacterias no toleran la alta concentración de glucosa. Además, el bajo pH es óptimo para hongos y levaduras, pero no para muchas bacterias. El agar Sabouraud es solamente ligeramente selectivo en contra de bacterias. Conjuntamente el agar Sabouraud contenía cloranfenicol el cual es un antibiótico de amplio espectro que inhibe a un amplio rango de bacterias gram-positivas y gram-negativas (BD, 2013).

## **Caracterización morfológica y bioquímica de los microorganismos**

La caracterización morfológica tanto macroscópica como microscópica de las cepas microbianas coincide con la información reportada en los Certificados de Calidad reportados por Microbiologics (Anexo E).



A continuación se detallan las reacciones positivas de las pruebas bioquímicas realizadas en los paneles GN-ID A+B con un total de 24 sustratos evaluados. *Escherichia coli* tuvo reacción positiva para los siguientes sustratos como fuente de carbono: fue positivo para la producción de ácido a partir de la fermentación de carbohidratos glucosa, manitol, xilosa, sorbitol, ramnosa, lactosa, arabinosa y salicina; y produce acetoina por la vía butanodiólica a partir de la glucosa lo cual se determina por la prueba de Voges Proskauer. También es productor de  $\beta$ -galactosidasa con lo cual hidroliza el ONPG (Ortho-Nitrofenyl- $\beta$ -galactosido). Fue positivo para los siguientes sustratos como fuente de nitrógeno: el aminoácido lisina el cual se degrada por acción de la lisina decarboxilasa, indicando la degradación y la producción de la amina cadaverina, además, utiliza triptófano y forma el indol, además el ácido indol-pirúvico (TDA) se produce a partir de triptófano por la triptófano D-aminasa para el cual también fue positivo, utiliza arginina por acción de la arginina dihidrolasa con lo cual la arginina pasa a ornitina, amoníaco y CO<sub>2</sub> por dando lugar a un incremento del pH. Y por último es productor de H<sub>2</sub>S.

*Candida albicans* tuvo reacción positiva para los siguientes sustratos como fuente de carbono: fue positivo para la producción de ácido a partir de la fermentación de carbohidratos glucosa, xilosa y sucrosa. También es productor de  $\beta$ -galactosidasa con lo cual hidroliza el ONPG (Ortho-Nitrofenyl- $\beta$ -galactosido). Como fuente de nitrógeno fue positivo para los siguientes sustratos: el aminoácido lisina el cual se degrada por acción de la lisina decarboxilasa, indicando la degradación y la producción de la amina cadaverina, y utiliza arginina por acción de la arginina dihidrolasa con lo cual la arginina pasa a ornitina, amoníaco y CO<sub>2</sub> por dando lugar a un incremento del pH. Y por último es productor de H<sub>2</sub>S.

## **Determinación de los vegetales más promisorios para inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* y *Candida albicans*.**

De manera natural el cuerpo humano convive en simbiosis con billones de microorganismos como bacterias, hongos y protozoarios, principalmente concentrados en el tracto gastrointestinal y la piel. Estos microorganismos juegan un papel trascendental para la salud humana, así como constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades (Medina y colaboradores, 2013). *Escherichia coli* y *Candida albicans* son microorganismos que viven de manera natural en el cuerpo humano pero que pueden causar enfermedades infecciosas las cuales se tratan por medio del uso de antibióticos, sin embargo tradicionalmente se emplean plantas medicinales cuando no se conoce en realidad si tienen o no principios activos capaces de inhibir su crecimiento (García, 2007). Por medio de un estudio exploratorio tipo screening se determinó los extractos de 8 vegetales más promisorios para la inhibición del crecimiento de los microorganismos *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Las especies vegetales estudiadas que mejores resultados presentaron fueron el tomillo, paico, y matico para *Escherichia coli* y paico, tomillo y matico para *Candida albicans*, en su orden.

### **Extractos de paico**

*Chenopodium ambrosioides* es una planta usada tradicionalmente para tratar varias enfermedades de carácter infeccioso (Sousa y colaboradores, 2012). En el presente estudio el paico fue uno de los vegetales que presentó mayor porcentaje de inhibición del crecimiento tanto para *Escherichia coli* como para *Candida albicans* a una concentración de 5000 mg/l. La efectividad del vegetal depende del método de extracción aplicado ya que diferentes metabolitos secundarios se disuelven en diferentes solventes.

Para la inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* y *Candida albicans* se determinó que los solventes que extraen metabolitos secundarios eficaces frente a estos microorganismos fueron el etanol y el hexano lo que coincide

con el estudio realizado por Sousa y colaboradores (2013), en donde se determinó que los extractos en etanol y hexano presentan actividad antimicrobiana frente a estos microorganismos y que además contienen compuestos potencialmente citotóxicos por lo tanto estos extractos deben ser considerados como herramientas importantes en la investigación y desarrollo de productos naturales. Además, en un estudio realizado por Goka y colaboradores (2010), se demuestra que el aceite esencial de paico inhibe el crecimiento de *Candida albicans* ATCC 10231 lo que coincide con los resultados alcanzados en esta investigación.

Los resultados del estudio fitoquímico de esta planta se detallan en el punto 4.2.4.1.

### **Extractos de tomillo**

*Thymus vulgaris* es una planta perenne que es endémica del área mediterránea y asiática y que se ha difundida por toda América. Es una planta utilizada medicinalmente o como especia. Los metabolitos secundarios de esta planta son saborizantes y actúan también como agentes antimicrobianos y antioxidantes (Millezi y colaboradores, 2012). En el presente trabajo a una concentración de 5000 mg/l los extractos de tomillo fueron unos de los extractos que presentaron mayor actividad antimicrobiana frente a los microorganismos en estudio. Siendo una planta medicinal importante en el momento de combatir las diferentes afecciones que puedan ser causadas por estos microorganismos.

Para la bacteria *Escherichia coli* la metodología más eficaz de extracción de metabolitos secundarios capaces de inhibir su crecimiento fueron la maceración en etanol y hexano además la metodología de infusión también demostró buenos resultados. Estos resultados coinciden con el estudio realizado por Shinshal y colaboradores (2008), en donde se demuestra que el extracto en agua y en etanol de tomillo presentan actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*. En el estudio de Millezi y colaboradores (2012), se determinó que el aceite esencial de tomillo presenta actividad antimicrobiana

frente a esta bacteria pero además tiene actividad antimicrobiana especialmente frente a microorganismos Gram-positivos. El solvente hexano al ser un solvente apolar tiene la capacidad de extraer aceites por lo que el aceite esencial de tomillo se disolvió en este extracto lo que explica la inhibición de la bacteria.

Para *Candida albicans* la metodología que demostró mejores resultados para inhibir el crecimiento de la levadura fue la maceración en etanol y la maceración en hexano pero esta última en menor porcentaje. Esto se comprueba con el estudio de Nascimento y colaboradores (2000), en donde se demuestra que el extracto etanólico de *Thymus vulgaris* tiene actividad antifúngica frente a esta levadura. Además, Rahimifard y colaboradores (2008), demostraron que el aceite esencial de esta planta medicinal presenta una actividad inhibitoria significativa del crecimiento de *Candida albicans* ATCC 10231 lo que coincide con los resultados alcanzados en esta investigación.

Los resultados del estudio fitoquímico de esta planta se detallan en el punto 4.2.4.2.

### **Extractos de matico**

*Piper aduncum* es una planta empleada tradicionalmente por las poblaciones en varios países por lo cual ha sido objeto de estudios fitoquímicos y biológicos (Sánchez y colaboradores, 2009). En la presente investigación a una concentración de 5000 mg/l los extractos de matico mostraron efectividad para inhibir el crecimiento de los microorganismos *Escherichia coli* y *Candida albicans* de hasta un 62,5%.

Varios compuestos como hidrochalconas y cromonas aisladas de las hojas de matico han demostrado actividad contra microorganismos como *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Cryptococcus neoformans*, *Mycobacteria intracellulare*, *Micrococcus luteus* y *Pseudomonas aeruginosa*; los cuales son importantes patógenos de humanos (Kloucek y colaboradores, 2005). Dicha información coincide con los resultados

alcanzados en esta investigación ya que los extractos por maceración en etanol y hexano demostraron inhibición del crecimiento de *Escherichia coli*.

Además en el estudio realizado por Lentz y colaboradores (1998) se demostró que los extractos por maceración en etanol de esta planta poseen actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Lo cual coincide con el presente trabajo ya que en el caso de la levadura en estudio el extracto por maceración en etanol presentó un alto porcentaje de inhibición.

La acción bactericida y fungicida presentada por los extractos de esta planta se pueden deber a la presencia de fenileteres y aceites esenciales, tal como lo reporta Maia y colaboradores (1998) *P. aduncum* puede presentar un contenido de aceites esenciales de hasta el 3% aunque existe en mayor cantidad el fenileter dilapiol el cual puede estar contenido desde el 30% hasta un 90%. Además contiene aminos que han demostrado poseer actividad antimicrobiana tal como la aduncamida, terpenos como el tranfitol y el camfor y esteroides como el sitosterol entre otros (Parmar y colaboradores, 1996).

### **Extractos de ortiga negra**

*Urtica dioica* es una planta medicinal utilizada desde tiempos antiguos. Esta planta es miembro de la familia Urticaceae la cual es nativa de Eurasia y se encuentra ampliamente distribuida y empleada en Ecuador (Marrassini y colaboradores, 2010). En este estudio esta planta demostró un porcentaje de inhibición de la bacteria y levadura menor que las plantas anteriores.

Gülçina y colaboradores (2004) demostraron que los extractos de ortiga tienen un efecto inhibitorio frente a microorganismos Gram-negativos como *Escherichia coli* y Gram-positivos como *Candida albicans*. Sin embargo la acción inhibitoria de esta planta es menor que las plantas descritas anteriormente en este estudio.

En estudios realizados por Dulger y Gonuz (2004) y por Amir y colaboradores (2012) se reporta que la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y hexánicos de ortiga poseen mínima actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans* lo cual coincide con los resultados de esta investigación.

Entre los metabolitos secundarios reportados para *U. dioica* y que pudieron ser responsables del efecto inhibitorio frente a las cepas estudiadas se encuentran: ácidos, fenoles, flavonoides y otros constituyentes como: sitosterol, glucoproteínas, aminoácidos libres, sales minerales. Los pelos de las hojas contienen acetilcolina, histamina y serotonina (Calderón, 2011).

### **Extractos de hierba luisa**

*Cymbopogon citratus* es una hierba perenne, robusta, de tallos muy ramificados utiliza en medicina tradicional como expectorante y antigripal, y sus preparados se utilizan por sus efectos ansiolíticos, hipnóticos, analgésicos y diuréticos (Antolínez y colaboradores, 2008). Los extractos de hierba luisa demostraron con menor eficacia inhibición del crecimiento de los microorganismos en estudio.

Fagbemi, y colaboradores (2009) demostró que a altas concentraciones (500000 mg/l) los extractos etanólicos de hierba luisa pueden mostrar actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* mientras que a menores concentraciones la actividad es menor tal como se reportó en este estudio. Sin embargo, a concentraciones más bajas el extracto presenta actividad antimicrobiana frente a otros microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis*.

Además, los resultados reportado por Falco y colaboradores (2011) explican que los extractos etanólicos de hierba luisa no presentan actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* ni *Candida albicans* ya que se utilizaron concentraciones bajas del extracto.

En el estudio realizado por Almeida y colaboradores (2008) se demuestra que a altas concentraciones (30000 mg/l) el extracto etanólico de hierba luisa puede inhibir el crecimiento de *Candida albicans* lo cual explica la mínima inhibición del crecimiento de la levadura en este estudio ya que se empleó una concentración de 5000 mg/l.

Los metabolitos secundarios responsables de la acción frente a los microorganismos estudiados pueden ser los aceites esenciales ya que la planta contiene un porcentaje de 1.3% de aceites esenciales. El terpenoide presente en mayor cantidad es el citral, el cual se encuentra conformado por sus dos isómeros, el geranial y el neral. Además presenta compuestos como el geraniol, limoneno, citronenal, pineno y farnesol (Ríos, 2010 y Sigma Aldrich, 2010).

### **Extractos de albahaca**

*Ocimum basilicum* llamada popularmente como albahaca es muy utilizada en medicina tradicional para curar afecciones gastrointestinales (diarreas, parasitismo), respiratorias (bronquitis, tos), dolor de oídos y reumatismo. Además, es muy utilizada en el ámbito gastronómico (Sánchez y colaboradores, 2000).

Patil y colaboradores (2011) demostraron que los extractos que el extracto hexánico, en comparación con el extracto etanólico, tiene mayor efecto para inhibir el crecimiento de *Escherichia coli*. Sin embargo el porcentaje de inhibición es menor en comparación a las demás plantas estudiadas en este trabajo. Además, en este estudio se demostró que la metodología de decocción puede inhibir a *Escherichia coli* en igual porcentaje que la maceración en hexano.

En el caso de la levadura *Candida albicans* los macerados en etanol y hexano demostraron de inhibición del crecimiento; similares resultados se obtuvieron por Adigüzel y colaboradores (2005). Sin embargo el porcentaje de inhibición es menor en comparación a las demás plantas estudiadas en este trabajo.

El tamizaje fitoquímico de las hojas de albahaca evidencia la presencia de triterpenos y esteroides (abundante), taninos, azúcares, principios amargos, flavonoides, saponinas (escasa) y aceites esenciales los cuales se encuentran en un porcentaje del 1% (Sánchez y colaboradores, 2000). En el aceite esencial el compuesto más abundante es el linalol seguido de canidol, bergamoteno y candineno (Hussain y colaboradores, 2008). Además, contiene la presencia de compuestos fenólicos en un 5.36% y flavonoides en un 1.86% siendo el ácido rosmarinico el principal compuesto fenólico (Fathiazad y colaboradores, 2012).

### **Extractos de ambo**

*Nicandra physalodes* es una planta anual familia de las solanáceas. Es ampliamente distribuida en el Ecuador en especial en las zonas cálidas siendo una de las provincias en donde más se cultiva la provincia de Imbabura. Aunque en países como Estados Unidos es considerada como una plaga, en Ecuador es muy empleada con fines medicinales para tratar infecciones microbianas (Felix y colaboradores, 2001; Vallejo, 2010).

A pesar de la realización de una búsqueda exhaustiva tanto en inglés como en español no se encontraron publicaciones relacionadas con la inhibición de los extractos de esta planta frente a *Escherichia coli*. Los resultados alcanzados en esta investigación determinaron que los extractos etanólicos y hexánicos de esta planta pueden inhibir a *Escherichia coli* en bajas cantidades.

Vallejo (2010) coincide con los resultados alcanzados en esta investigación ya que los extractos hexánicos y etanólicos de ambo lograron inhibir el crecimiento *Candida albicans* en porcentajes bajos.

Los metabolitos secundarios con acción antimicrobiana contenidos en esta planta son flavonoides, saponinas terpenoides y alcaloides (Devi y colaboradores, 2010). Vallejo (2010) demostró que contiene además taninos, esterol y cumarinas.



## **Extractos de guayaba**

*Psidium guajava* pertenece a la familia Myrtaceae y es el árbol frutal de la guayaba. La guayaba es originaria de la América tropical. *P. guajava* es una fruta tropical consumida tanto fresca como procesada. Las propiedades medicinales de la guayaba son bien conocidas en el sistema medicinal tradicional (Joseph y Prys, 2011).

En este estudio los extractos hexánicos de guayaba muestran mínima actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* lo cual coincide con el estudio realizado por Biswas y colaboradores (2013). Sin embargo el extracto por infusión demostró inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* en bajos porcentajes coincidiendo con lo reportado por Vieira y colaboradores (2001).

Para la levadura *Candida albicans* el extracto etanólico inhibió su crecimiento considerablemente, similares resultados fueron obtenidos por Ruiz y Huamaní (2005). Jebashree y colaboradores (2011) determinaron que el extracto hexánico de guayaba puede inhibir el crecimiento de esta levadura en un bajo porcentaje lo que se demostró en la presente investigación.

Los metabolitos secundarios contenidos en esta planta que pudieron intervenir en la inhibición de la actividad de microbiana son alcaloides, saponinas, flavonoides y taninos (Ezekwesili y colaboradores, 2010). La quercitina es el principal compuesto flavonoide presente en la guayaba.

### **4.2.2 Selección de los extractos vegetales más promisorios con actividad antimicrobiana**

Por medio de la evaluación de las cuatro metodologías de extracción (Factor A) de las ocho especies vegetales (Factor B) se determinó los mejores tratamientos para inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

Las plantas han desarrollado rutas bioquímicas secundarias que les permiten sintetizar una serie de productos químicos, a menudo en respuesta a los estímulos ambientales específicos, tales como el daño inducido herbívoro, ataques de microorganismos patógenos, o privación de nutrientes (Kennedy y Wightman, 2011). Estos metabolitos secundarios pueden tener efecto inhibitorio frente a los microorganismos estudiados.

Para seleccionar los extractos vegetales más promisorios con actividad antimicrobiana frente a los microorganismos estudiados se evaluaron dos factores significativos como son el método de extracción (Factor A) y el vegetal (Factor B) y se realizó a una dosificación estándar de 5000 mg/l. Los vegetales que presentaron mejores resultados fueron el paico y tomillo ya que mostraron inhibición de hasta el 100% del crecimiento de la bacteria y la levadura. Sin embargo otros vegetales como el matico y la ortiga también mostraron inhibición del crecimiento microbiano pero en menor porcentaje.

La metodología de obtención de los extractos se realizó con diferentes solventes ya que varios de los metabolitos secundarios de las plantas se pueden disolver en solventes orgánicos como el hexano y el etanol o a su vez en solventes inorgánicos como el agua (Vallejo, 2010). El solvente que demostró mejores resultados fue el etanol seguido del hexano, mientras que las metodologías de infusión y decocción demostraron ser ineficaces en la mayoría de los casos debido a que el calor que se aplicó no fue prolongado y por lo tanto no se pudo llegar a extraer sustancias que son de difícil disolución (Vargas, 2012).

Estos resultados fueron comprobados por medio el análisis estadístico que se reporta en el Anexo B, determinándose como los mejores tratamientos para inhibir tanto el crecimiento de *Escherichia coli* como de *Candida albicans* a la maceración en etanol de paico y la maceración en etanol de tomillo.

### **4.2.3 Establecimiento de las concentraciones adecuadas para inhibir la actividad microbiana**

Una vez determinados los mejores tratamientos para inhibir el crecimiento de ambos microorganismos estudiados se determinó de las concentraciones más adecuadas para dicho efecto. De tal manera que se definió si existe una concentración menor a 5000 mg/l (concentración empleada en la primera etapa) capaz de lograr el mismo efecto. Los extractos vegetales se obtuvieron manteniendo las mismas condiciones de la primera etapa.

#### **Valores de pH de los extractos vegetales**

Los valores promedio de pH de los extractos vegetales de los mejores tratamientos (extractos etanólicos de paico y tomillo) coinciden con los valores obtenidos en la primera etapa (rango ácido) lo cual es un indicativo de que los metabolitos extraídos por estas metodologías se encuentran en los rangos ácidos.

#### **Valores de conductividad eléctrica de los extractos vegetales**

Los promedios de las lecturas de los valores de conductividad eléctrica de los extractos vegetales más eficaces muestran relación con los datos obtenidos en la primera etapa; lo cual es indicador de que existen los mismos electrolitos suspendidos en las soluciones preparadas (Andrés y colaboradores, 2008).

#### **Valores de concentración de los extractos vegetales**

Los promedios de las lecturas de los valores de concentración de los extractos vegetales para de la segunda etapa son indicativos de la concentración de metabolitos secundarios en el extracto. Estos valores son diferentes a los valores reportados en la primera etapa debido a que los

extractos fueron sometidos a un proceso de evaporación al vacío con el fin de evaporar el solvente.

### **Colores de los extractos vegetales**

Los colores de los extractos de las plantas se determinaron por medio de la comparación con una tabla internacional de colores (British Standard Specification for Colours for Identification Coding and Special Purposes-Anexo E). La coloración de los extractos presenta similitud a los colores de los extractos obtenidos en la primera etapa.

### **Determinación de las concentraciones adecuadas para inhibir la actividad microbiana**

Las concentraciones adecuadas para inhibir la actividad microbiana es un elemento es muy importante debido a que a mayor cantidad de metabolitos secundarios mayor será la concentración de metabolitos en el extracto por tal razón será más se inhibe el crecimiento microbiano (Vargas, 2012).

En el caso del extracto etanólico de paico este demostró que inhibe en un 100% el crecimiento de *Escherichia coli* a partir de una concentración de 2500 mg/l. En cambio, el extracto etanólico de tomillo inhibe el crecimiento de la bacteria a una concentración de 5000 mg/l. Para la levadura *Candida albicans* el extracto etanólico de paico y el extracto etanólico de tomillo demostraron que inhiben el crecimiento de la levadura a una concentración de 2500 mg/l. Por lo tanto se determinó que la dosificación para obtener mejores resultados debido a la mayor disponibilidad de metabolitos secundarios. En el caso de la bacteria las dosificaciones medias y bajas no demostraron inhibición mientras que en el caso de la levadura las concentraciones medias (500 y 1000 mg/l) del extracto etanólico de paico demostraron inhibición baja. Así mismo las concentraciones medias del extracto etanólico de tomillo demostraron inhibición media del crecimiento de la levadura; y, las concentraciones bajas (100 y 250 mg/l) de los extractos de ambas plantas no presentaron inhibición frente a la levadura.

#### **4.2.4 Identificación de los metabolitos secundarios contenidos en los extractos seleccionados, mediante análisis fitoquímico.**

La identificación de metabolitos secundarios mediante análisis fitoquímico se realizó de las especies vegetales que demostraron mejores resultados de inhibición del crecimiento tanto para *Escherichia coli* como para *Candida albicans*, es decir de las plantas de paico (*Chenopodium ambrosioides*) y tomillo (*Thymus vulgaris*).

##### **4.2.4.1 Paico**

En el análisis fitoquímico realizado en este estudio se determinó que las hojas de paico poseen aceites esenciales en mediana cantidad y que posee también alcaloides, taninos, flavonoides y triterpenos y esteroides en poca cantidad.

Felix y colaboradores (2012), han reportado que el extracto de paico contiene aceites esenciales, alcaloides, taninos, flavonoides y esteroides lo cual coincide con los resultados de esta investigación los cuales conjuntamente con capaces del inhibir el crecimiento microbiano.

Los aceites esenciales son compuestos hidrófobos compuestos comúnmente por terpenos y terpenoides (Stewart, 2005). Estos compuestos deben su actividad fungicida y/o bactericida a la sobrecarga a la que es sometida la membrana celular de los microorganismos de forma tal que la hace perder el control y la integridad. Los aceites esenciales al igual que la membrana celular son hidrofóbicos por lo cual se introducen a través de la membrana celular alterando su estructura y haciéndola más permeable. Consecuentemente se altera la permeabilidad selectiva y se pierden contenidos celulares (Sánchez y colaboradores, 2009).

Los alcaloides compuestos sintetizados a partir de aminoácidos, el mecanismo de acción de los alcaloides parece ser mediante intercalación entre la pared celular y el DNA del microorganismo (Villacís, 2009). En el

caso de los alcaloides, describen que el efecto antimicrobiano de los estos compuestos puede estar relacionado con la capacidad que presentan para inhibir la biosíntesis de ácidos nucleicos. Los taninos por su lado, son compuestos fenólicos que provocan desnaturalización de las proteínas celulares (Kazanjian y Fariñas, 2006).

Los flavonoides son pigmentos amarillos derivados de compuestos fenólicos (Arraiza, s/f). La acción de los flavonoides contra los microorganismos se debe a la inhibición enzimática. Posiblemente dada por la acción de estos compuestos sobre los grupos sulfhidrilos de los aminoácidos de cisteína de las enzimas microbianas o por medio de otras reacciones más inespecíficas con proteínas microbianas (Araujo y salas, 2008).

Los triterpenos y esteroides están relacionados biosintéticamente, ambos se derivan del isopreno (Primo, 1995). Uno de los principales mecanismos de acción propuestos para los terpenos y esteroides consiste en la disrupción de la membrana celular bacteriana mediante tres posibles vías: aumentando la permeabilidad de la membrana a iones pequeños, afectando la estabilidad estructural de la membrana y desestabilizando el empaquetamiento de la bicapa lipídica, cualquiera de estos efectos produce la muerte en la célula microbiana (Sánchez y colaboradores, 2009).

#### **4.2.4.2 Tomillo**

En el análisis fitoquímico realizado en esta investigación se determinó que las hojas de tomillo poseen flavonoides y aceites esenciales en mediana cantidad, además posee taninos, saponinas y triterpenos y esteroides.

De acuerdo a Salah y Ahmed (2013) y Lizcano (2007), *Thymus vulgaris* debe su acción fungicida y bactericida a la acción conjunta de por metabolitos secundarios como taninos y saponinas, aceites esenciales, flavonoides y triterpenos lo cual coincide con los resultados obtenidos en esta investigación.

Las saponinas son glicósidos que aparecen en una gran variedad de plantas, son triterpenos o esteroides unidos a una o más cadenas de azúcar (Neira, 2010). Las saponinas son compuestos que poseen una importante actividad antibacteriana, debido a que reducen la tensión superficial y actúan sobre los lípidos de la membrana provocando alteraciones de las mismas, lo que conlleva a la muerte celular; para ello se sugiere la formación de complejos con el colesterol presente en la membrana (Kazanjian y Fariñas, 2006).

#### **4.3 Discusión General**

La identificación de los extractos de plantas medicinales que tienen actividad antimicrobiana se realizó por medio de un estudio exploratorio tipo “screening”. Las 4 metodologías de extracción emplearon solventes de diferente polaridad. De tal manera que el agua extrajo metabolitos secundarios polares solubles a diferentes temperaturas, el etanol extrajo moléculas de baja polaridad y el hexano metabolitos secundarios apolares (Vallejo, 2010).

De acuerdo a Vivanco y colaboradores (2005), en el reino vegetal existe una extensa colección de “metabolitos secundarios”, presentes en concentraciones variables. Su función es servir de barrera inicial a la propagación de bacterias u hongos dentro de los tejidos de la planta. Por lo cual pueden presentar inhibición contra ciertos microorganismos que son causantes de enfermedades en animales tales como lo son *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

De los extractos vegetales preparados se determinaron características como pH, conductividad eléctrica, color y concentración. Los valores de pH de los extractos de las plantas medicinales fluctúan entre 5,00 y 8,91 (Tabla A-2). Generalmente, el crecimiento de bacterias es impedido por descensos de pH mientras que en el caso de levaduras y hongos un aumento en el pH inhibe su crecimiento; esto se debe a que cada microorganismo tiene un pH definido dentro del cual es posible su crecimiento. El valor de pH óptimo para

*Escherichia coli* es de 7.0 mientras que de *Candida albicans* es de 4.0 (Michael y colaboradores, 2004). Los valores de conductividad eléctrica de los extractos fluctúan entre 0,11 y 13450  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (Tabla A-3). El valor de la conductividad de una solución es un indicador para la medida de su concentración de sales disueltas (Andrés y colaboradores, 2008). La coloración de los extractos varía desde colores amarillos tenues como en el caso de los extractos obtenidos por medio de maceración en hexano, decocción e infusión; mientras que la coloración de los extractos obtenidos por maceración en etanol presentan una coloración verde oscura. Finalmente, la concentración de los extractos se determinó por gravimetría obteniéndose valores de concentración entre 28450 y 76150 mg/l.

Después de la activación de las cepas microbianas se determinó que la bacteria *Escherichia coli* buen crecimiento en agar nutritivo el cual es un medio de cultivo complejo cuyo pH favorece el crecimiento de bacterias. La levadura *Candida albicans* presentó mejor desarrollo en el medio de cultivo Sabouraud. Estos medios son muy útiles, pues un único medio complejo puede ser suficientemente rico para satisfacer las necesidades nutricionales de diversos microorganismos (Prescott y colaboradores, 2004).

A continuación, se determinó que los extractos vegetales que presentaron mayor cantidad de metabolitos secundarios capaces de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* y *Candida albicans* fueron los extractos por maceración en etanol de paico y tomillo ya que sus porcentajes de efectividad de inhibición del crecimiento fueron del 100% a una concentración de 5000 mg/l de extracto. Esto se debe a que el etanol tiende a arrastrar gran cantidad de compuestos polares como saponinas, taninos, flavonoides, esteroides/terpenos; y, de acuerdo a Espinoza (2003), estos compuestos tienen propiedades antimicrobianas, debido a que inhiben la síntesis o dañan la pared celular o inhiben la síntesis de ADN o ARN, ya que la estructura que tienen éstos compuesto es similar a la de las bases púricas y pirimídicas y se pueden intercalar formando puentes de hidrógeno, alterando así la estructura tridimensional de los ácidos nucleicos.



Una vez determinados los mejores tratamientos para inhibir el crecimiento de ambos microorganismos estudiados se determinó las concentraciones más adecuadas para dicho efecto. En esta etapa se determinó el pH, conductividad y color de los extractos obteniéndose resultados similares a los obtenidos en la primera etapa. De esta manera se determinó si existe una concentración menor a 5000 mg/l (concentración empleada en la primera etapa) capaz de lograr el mismo efecto. En el caso del extracto etanólico de paico este demostró que inhibe en un 100% el crecimiento de *Escherichia coli* a partir de una concentración de 2500 mg/l. En cambio, el extracto etanólico de tomillo inhibe el crecimiento de la bacteria a una concentración de 5000 mg/l. Para la levadura *Candida albicans* el extracto etanólico de paico y el extracto etanólico de tomillo demostraron que inhiben el crecimiento de la levadura a una concentración de 2500 mg/l.

Finalmente, se realizó un análisis fitoquímico de las plantas que demostraron mejores resultado. En el análisis fitoquímico se determinó que las hojas de paico poseen aceites esenciales en mediana cantidad y que posee también alcaloides, taninos, flavonoides y triterpenos y esteroides en poca cantidad. Y, que las hojas de tomillo poseen flavonoides y aceites esenciales en mediana cantidad, además posee taninos, saponinas y triterpenos y esteroides.

Al poseer ambas plantas aceites esenciales en mayor cantidad que los demás metabolitos secundarios es indicativo de que este metabolito secundario es el responsable de la acción bactericida y fungicida de las mismas. Estos compuestos deben su actividad fungicida y/o bactericida a la sobrecarga a la que es sometida la membrana celular de los microorganismos de forma tal que la hace perder el control y la integridad. Los aceites esenciales al igual que la membrana celular son hidrofóbicos por lo cual se introducen a través de la membrana celular alterando su estructura y haciéndola más permeable. Consecuentemente se altera la permeabilidad selectiva y se pierden contenidos celulares (Sánchez y colaboradores, 2009). Por otro lado, la presencia de flavonoides en las hojas de tomillo es

indicativo de la acción de estos compuestos sobre los grupos sulfhidrilos de los aminoácidos de cisteína de las enzimas microbianas o por medio de otras reacciones más inespecíficas con proteínas microbianas lo cual impide la reproducción de las células microbianas (Araujo y salas, 2008).

#### **4.4 Verificación de hipótesis**

De acuerdo a los resultados reportados se rechaza la hipótesis nula que indica que los extractos de plantas medicinales, no tienen actividad antimicrobiana frente a los microorganismos patógenos *Escherichia coli* y *Candida albicans* pues como se reporta en este capítulo los extractos de las plantas medicinales demostraron poseer actividad antimicrobiana frente a ambos microorganismos.

Consecuentemente, se acepta la hipótesis alternativa la cual señala que los extractos de plantas medicinales, tienen actividad antimicrobiana frente a los microorganismos patógenos *Escherichia coli* y *Candida albicans*, pues así lo demuestran los resultados obtenidos en el estudio.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

**5.1.1** Se determinó que tanto la planta medicinal como la metodología de obtención del extracto y la interacción de ambos factores influyen significativamente sobre el porcentaje de actividad antimicrobiana frente a los microorganismos *Escherichia coli* y *Candida albicans* siendo las mejores metodologías de obtención de los extractos la maceración en etanol de paico y la maceración en etanol de tomillo. El subsecuente análisis fitoquímico determinó que las hojas de paico y tomillo contienen metabolitos secundarios tales como: aceites esenciales, taninos, flavonoides y triterpenos, esteroides, alcaloides (paico) y saponinas (tomillo).

**5.1.2** Por medio de la obtención de extractos se determinó que el paico, tomillo, matico, ortiga, hierba luisa, albahaca, ambo y guayaba, en su orden ejercen la actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans* a una concentración estándar de 5000 mg/l. Las medias del porcentaje de inhibición de los extractos de estas plantas medicinales oscilan entre 12,5 hasta el 100%.

**5.1.3** Los extractos vegetales más promisorios con actividad antimicrobiana frente a los microorganismos *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Los extractos que presentaron mayor diferencia significativa fue el extracto por maceración en etanol de paico (100% de efectividad) y el extracto por maceración en etanol de tomillo (100% de efectividad) a una concentración de 5000 mg/l.

**5.1.4** Las concentraciones más adecuadas para inhibir en un 100% la actividad microbiana de *Escherichia coli* con el extracto etanólico de paico es de 2500 mg/l y con el extracto etanólico de tomillo es de 5000 mg/l. En el

caso de la *Candida albicans* las concentraciones más adecuadas para inhibir en un 100% la actividad microbiana con el extracto etanólico de paico es de 2500 mg/l y con el extracto etanólico de tomillo es de 2500 mg/l. Sin embargo, se puede lograr una inhibición del 50% del crecimiento de la levadura a una concentración de 1000 mg/l.

**5.1.5** Los metabolitos secundarios contenidos en las hojas secas de las plantas medicinales con mayor actividad antimicrobiana fueron los siguientes: las hojas de paico contienen metabolitos secundarios tales como aceites esenciales, alcaloides, taninos, flavonoides y triterpenos y esteroides mientras que las hojas de tomillo contienen flavonoides, aceites esenciales, taninos, saponinas y triterpenos y esteroides.

## **5.2 Recomendaciones**

**5.2.1** Para la elaboración de los extractos en el presente estudio se utilizó las hojas secas de las plantas por lo cual es recomendable realizar un estudio sobre la actividad antimicrobiana y fitoquímica de extractos vegetales elaborados a partir de diferentes partes de la planta tales como raíces, tallos y flores así como en las etapas de su ciclo fenológico.

**5.2.2** Es recomendable evaluar los mejores extractos determinados en este estudio frente a otros microorganismos que sean causantes de infecciones en animales.

**5.2.3** En la presente investigación se obtuvo resultados favorables con los extractos de matico (*Piper aduncum*) por lo cual es recomendable realizar una investigación más detallada de las dosificaciones y componentes fitoquímicos de este extracto.

**5.2.4** Ciertos extractos presentaron una mínima inhibición del crecimiento de los microorganismos estudiados a una concentración de 5000 mg/l, por lo

tanto es recomendable probar estos extractos a concentraciones más altas para determinar si inhiben en mayor porcentaje el crecimiento microbiano.

**5.2.5** Tanto el paico (*Chenopodium ambrosioides*) como el tomillo (*Thymus vulgaris*) demostraron mediante el análisis fitoquímico que poseen aceites esenciales por lo cual es importante determinar cuáles son los principales componentes y la acción antimicrobiana de estos aceites.

**5.2.6** En el caso de los extractos por maceración con los solvente etanol y hexano es de suma importancia realizar meticulosamente la extracción de los solventes por medio del uso de un rota-vapor en el cual se volatilizan los solventes a presión reducida con el fin de que no se alteren los compuestos presentes en la solución y que los solventes no interfieran con los resultados de la investigación.

## CAPÍTULO VI PROPUESTA

### 6.1 Datos Informativos

- 1 Título:** Determinación de la composición química y actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Chenopodium ambrosioides* (paico) y *Thymus vulgaris* (tomillo) frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans*.
- 2 Unidad Ejecutora:** Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Carrera de Ingeniería Bioquímica.
- 3 Beneficiario:** Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Carrera de Ingeniería Bioquímica.
- 4 Director del Proyecto:** Ing., MSc. Ramiro Velasteguí, Ph.D.
- 5. Personal Operativo:** Egda. Gabriela Yáñez
- 6 Tiempo de Duración:** 6 meses
- 7 Fecha de Inicio:** Julio 2014
- 8 Lugar de Ejecución:** Universidad Técnica de Ambato
- 9 Costo:** \$ 2000

### 6.2 Antecedentes de la propuesta

La bacteria *Escherichia coli* puede causar graves enfermedades (cólicos y diarrea, que puede ser sanguinolenta, fiebre y vómito) a través del consumo de alimentos contaminados (OMS, 2011). La levadura *Candida albicans*

puede invadir una variedad de tejidos causando inflamación local. Esta ataca típicamente la boca (afecciones bucofaríngeas), vagina, tracto gastrointestinal, tracto urinario, glándula prostática, piel y dedos de las manos o pies (Elkins y Tenney, 1997).

En la actualidad, se observa el auge de la química de los productos naturales en el ámbito mundial para tratar enfermedades producidas por microorganismos. Entre los grupos de productos de origen botánico con mayor impacto se encuentran los aceites esenciales y sus constituyentes, provenientes de diferentes especies vegetales debido a las propiedades que se les atribuyen (Sánchez y colaboradores, 2009).

Los aceites esenciales son compuestos hidrófobos compuestos comúnmente por terpenos y terpenoides (Stewart, 2005). Los aceites esenciales son usados como agentes carminativos, estimulantes, diuréticos y antireumáticos; algunos poseen propiedades insecticidas, antifúngicas y antibacterianas frente a microorganismos patógenos y han sido considerados como ingredientes activos en algunos plaguicidas botánicos, debido a su eficacia frente a un número considerable de plagas, su toxicidad mínima en mamíferos y su disponibilidad general. Estos son causantes del olor agradable de determinadas plantas y algunos poseen actividad antimicrobiana (Lizcano y Vergara, 2008; Sánchez y colaboradores, 2009).

Todos estos aceites esenciales contienen varios compuestos o principios activos, específicos para cada especie vegetal, los cuales son los responsables de la acción antimicrobiana de estos. Aunque la actividad biológica de los aceites esenciales ha sido confirmada en varios estudios, los datos recogidos en esos materiales muestran una gran variabilidad. Las causas de ese comportamiento parecen ser las diferencias en la composición del aceite esencial debido a factores genéticos y ambientales y es por eso que resulta de interés la identificación de los principales constituyentes responsables de la actividad del aceite esencial de las plantas de paico y tomillo oriundas de la zona centro de Ecuador (Sánchez y colaboradores, 2009).

En el presente estudio se determinó que tanto la planta medicinal como la metodología de obtención del extracto y la interacción de ambos factores influyen significativamente sobre el porcentaje de actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Siendo maceración en etanol de paico y la maceración en etanol de tomillo las mejores metodologías de obtención de los extractos para inhibir el crecimiento de ambas cepas microbianas. Por medio del análisis fitoquímico se determinó que estos extractos están compuestos de aceites esenciales en mayor cantidad que los demás metabolitos secundarios. Por lo cual resulta de interés la identificación de la actividad antimicrobiana y de los principales constituyentes del aceite esencial de las plantas de paico y tomillo.

### **6.3 Justificación**

En el Ecuador el conocimiento tradicional relacionado con la naturaleza es indiscutible, este ha sido transmitido durante generaciones, estas prácticas se basan solamente en el conocimiento empírico y en la experiencia de los pueblos puesto que las características antimicrobianas de las plantas no han sido validadas científicamente. Plantas como el paico y el tomillo han sido usadas tradicionalmente para tratar varias enfermedades de carácter infeccioso.

En el presente estudio el paico y tomillo fueron los vegetales que presentaron mayor porcentaje de inhibición del crecimiento tanto para *Escherichia coli* como para *Candida albicans* y se determinó que poseen aceites esenciales en mayor cantidad que los demás metabolitos secundarios presentes en estas plantas.

Sin embargo, todavía en el país no se encuentran estudios desarrollados acerca del potencial antimicrobiano del aceite vegetal de estas plantas medicinales frente a los microorganismos *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Además no han sido investigados los componentes de estos aceites esenciales que les confieran dicha actividad. Por lo tanto por medio de este estudio se pretende realizar una meticulosa determinación de la



actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de estas plantas y la caracterización de los componentes de estos, lo cual brinde la información necesaria para la identificación puntual de los constituyentes responsables de la actividad antimicrobiana y sus mecanismos de acción.

Por lo tanto permitirá el aprovechamiento y estímulo del cultivo de las especies vegetales, además se podrán desarrollar medicamentos naturales a base de los aceites esenciales de estas plantas.

## **6.4 Objetivos**

### **6.4.1 Objetivo General**

Determinación de la composición química y actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Chenopodium ambrosioides* (paico) y *Thymus vulgaris* (tomillo) frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

### **6.4.2 Objetivos Específicos**

**6.4.2.1** Determinar el rendimiento de la obtención de los aceites esenciales de paico y tomillo por medio de la extracción Soxhlet.

**6.4.2.2** Identificar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de paico y tomillo frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

**6.4.2.3** Establecer las concentraciones adecuadas de aceites esenciales para inhibir la actividad microbiana de los microorganismos *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

**6.4.2.4** Identificar los compuestos activos presentes en los aceites esenciales mediante cromatografía.

## 6.5 Análisis de factibilidad

El proyecto de investigación es de tipo tecnológico e investigativo, debido a que se determinará la actividad antimicrobiana y la composición de los aceites esenciales de paico y tomillo.

El análisis de factibilidad es de carácter científico social, ya que con este se justificará el uso de aceites esenciales de paico y tomillo para tratar infecciones y se conocerá su compuesto activo lo que posteriormente permitirá desarrollar medicamentos naturales o formulaciones a base de los aceites esenciales de estas plantas para el consumo de la sociedad en general.

**Tabla 6.1. Recursos económicos para el desarrollo de propuesta.**

	<b>Tutor</b>	<b>Tesista</b>
<b>Recursos Humanos</b>		
Tutor	0,00	0,00
Tesista	0,00	0,00
<b>Recursos Materiales</b>		
Materia prima		50
Equipos		1500
Reactivos		500
Material de oficina		100
<b>Otros</b>		
Tramites		20,00
Transporte		30,00
<b>SUBTOTAL (USD)</b>		2200
<b>Imprevistos (5%)</b>		110
<b>Total (USD)</b>		2310

Elaborado por: Gabriela Yáñez

## 6.6 Fundamentación

### 6.6.1 Paico

*Chenopodium ambrosioides*, familia Chenopodiace, es conocida en México como epazote o hierba del zorrillo; paico, en Argentina y Perú; mastruz, en Brazil. Es una planta aromática, perenne, con el tallo usualmente postrado, olor fuerte, de aproximadamente 40 cm de altura; las hojas son oblongo-lanceoladas y serradas, de entre 4 cm de longitud y 1 cm de ancho, con pequeñas flores verdes en panículos terminales densos, cada uno con cinco sépalos; el cáliz persistente circunda al fruto, y las semillas son negras y no mayores a 0,8 mm de longitud (Castellanos, 2008).

La medicina popular de muchos países de América Latina y el Caribe utilizan las decocciones e infusiones de *C. ambrosioides*, así como su aceite esencial como antihelmíntico, vermífugo, emenagogo y abortifaciente. *C. ambrosioides* es una planta que se encuentra comúnmente en los hogares como remedio a un gran número de enfermedades, así como ingrediente culinario (Castellanos, 2008).

Felix y colaboradores (2012), han reportado que el extracto de paico contiene aceites esenciales, alcaloides, taninos, flavonoides y esteroides lo cual coincide con los resultados de esta investigación los cuales conjuntamente con capaces del inhibir el crecimiento microbiano.

### 6.6.2 Tomillo

*Thymus vulgaris* pertenece a la familia Laminaceae. Es una planta aromática, vivaz, leñosa, polimorfa, de 10 a 40 cm de altura, con numerosas ramas leñosas, erectas, compactas, parduzcas o blanco aterciopeladas. Las hojas de 3 a 8 mm son lineares, oblongas, parduzcas o blanco-aterciopeladas. Las flores son axilares y agrupadas en la extremidad de las ramas, a veces con inflorescencia interrumpida (Lizcano, 2007).

*Thymus vulgaris* es una planta perenne que es endémica del área mediterránea y asiática y que se ha difundida por toda América. Es una planta utilizada medicinalmente o como especia. Los metabolitos secundarios de esta planta son saborizantes y actúan también como agentes antimicrobianos y antioxidantes (Millezi y colaboradores, 2012).

Es una especie muy variable, tanto en su morfología como en la composición química de su aceite, en la que se ha detectado siete quimotipos. Debido a esto ha dado lugar a confusiones taxonómicas en este género, en el que se han considerado como especies distintas a sus variedades o ecotipos (Lizcano, 2007).

### **6.6.3 Aceites esenciales**

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética, de alimentos y farmacéutica (Martínez, 2003). Los aceites esenciales son compuestos hidrófobos compuestos comúnmente por terpenos y terpenoides (Stewart, 2005).

Estos compuestos deben su actividad fungicida y/o bactericida a la sobrecarga a la que es sometida la membrana celular de los microorganismos de forma tal que la hace perder el control y la integridad. Los aceites esenciales al igual que la membrana celular son hidrofóbicos por lo cual se introducen a través de la membrana celular alterando su estructura y haciéndola más permeable. Consecuentemente se altera la permeabilidad selectiva y se pierden contenidos celulares (Sánchez y colaboradores, 2009).

## 6.7 Metodología

**Tabla 6.2. Modelo Operativo (Plan de acción) en el que el Responsable es el Investigador**

Fases	Metas	Actividad	Recursos	Presupuesto	Tiempo
1. Formulación de la propuesta	Determinación de la composición química y actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de paico y tomillo frente a <i>Escherichia coli</i> y <i>Candida albicans</i> .	Revisión bibliográfica	Humanos Técnicos Económicos	\$200	2 meses
2. Desarrollo preliminar de la propuesta	Cronograma de la propuesta.	Obtención de los aceites esenciales por medio de la extracción Soxhlet.	Humanos Técnicos Económicos	\$400	1 mes
3. Implementación de la propuesta	Ejecución de la propuesta	Ensayo de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales y determinación de su composición.	Humanos Técnicos Económicos	\$400	2 mes

<p>4. Evaluación de la propuesta</p>	<p>Comprobación del proceso de la implementación.</p>	<p>Constatación actividad antimicrobiana de los aceites esenciales y determinación de su composición.</p>	<p>Humanos  Técnicos  Económicos</p>	<p>\$400</p>	<p>2 mes</p>
--	---	---	--	--------------	--------------

Elaborado por: Gabriela Yáñez

## 6.8 Administración

Tabla 6.3. Administración de la Propuesta

Indicadores a mejorar	Situación actual	Resultados esperados	Actividades	Responsables
<p>Porcentajes de inhibición del crecimiento de <i>Escherichia coli</i> y <i>Candida albicans</i>.</p>	<p>Desconocimiento del efecto inhibitorio de los aceites esenciales de paico y tomillo y su composición.</p>	<p>Determinación de las concentraciones de aceites esenciales para inhibir el crecimiento microbiano y la composición de los mismos, además de los métodos adecuados para la obtención del aceite.</p>	<p>Determinación del rendimiento de la obtención de los aceites esenciales de paico y tomillo por medio de la extracción Soxhlet.                      Identificación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de paico y tomillo frente a <i>Escherichia coli</i> y <i>Candida albicans</i>.                      Establecimiento de las concentraciones adecuadas de los aceites esenciales.                      Identificación los compuestos activos presentes en los aceites esenciales mediante cromatografía.</p>	<p>Investigador:                      Gabriela Yáñez,                      Dr. Ramiro Velasteguí</p>

Elaborado por: Gabriela Yáñez

## 6.8 Previsión de la Evaluación

**Tabla 6.4. Previsión de la Evaluación**

Preguntas Básicas	Explicación
¿Quiénes solicitan evaluar?	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sector científico</li> </ul>
¿Por qué evaluar?	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Para determinar el rendimiento de la obtención de los aceites esenciales de paico y tomillo por medio de la extracción Soxhlet.</li> <li>- Para identificar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de paico y tomillo frente a <i>Escherichia coli</i> y <i>Candida albicans</i>.</li> <li>- Para establecer las concentraciones adecuadas de los aceites esenciales.</li> <li>- Para identificar los compuestos activos presentes en los aceites esenciales mediante cromatografía.</li> </ul>
¿Para qué evaluar?	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Determinar las concentraciones de los aceites esenciales para inhibir el crecimiento microbiano y determinar la composición de los aceites esenciales.</li> </ul>
¿Qué evaluar?	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tecnología utilizada.</li> <li>- Materias primas.</li> <li>- Resultados obtenidos</li> <li>- Efecto insecticida producido.</li> </ul>
¿Quién evalúa?	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Director del proyecto</li> <li>- Tutor</li> <li>- Calificadores</li> </ul>



¿Cuándo evaluar?	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Todo el tiempo desde las pruebas preliminares, hasta la determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales y su composición.</li> </ul>
¿Cómo evaluar?	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mediante observación de campo, análisis de laboratorio y comprobaciones estadísticas de los resultados obtenidos.</li> </ul>
¿Con qué evaluar?	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Experimentación.</li> <li>- Normas establecidas</li> </ul>

Elaborado por: Gabriela Yáñez

## MATERIALES DE REFERENCIA

### 1. Bibliografía

Abreu, O.; Rodríguez, A.; Morgado, M.; Cao, L. 2012. Farmacognosia, farmacobotánica, farmacogeografía y farmacoetimología del platanillo de Cuba (*Piper aduncum* subespecie *ossanum*). Revista Cubana de Plantas Medicinales 17(2). Cuba. Pp.: 181-193.

Acosta, M. 1964. Flores y plantas ornamentales de la ciudad Ambateña. Pío XII. Ecuador. Pp.: 43.

Adigüzel, A.; Güllüce, M.; Şengül, M.; Ögütcü, H. Şahin, F.; Karaman, Ü. 2005. Antimicrobial Effects of *Ocimum basilicum* (Labiatae) Extract. Turkish Journal Of Biology 29. Turquía. Pp.: 155-160.

Agricultura Sana de Verdad (AGRISAVE). s/f. Hierbas aromáticas. Consultado en: [http://www.agrisave.com/biblioteca/agricola/perfil\\_producto\\_hierbas\\_aromaticas551.pdf](http://www.agrisave.com/biblioteca/agricola/perfil_producto_hierbas_aromaticas551.pdf) (28/01/2013).

Almedia, P.; Bertucci, A.; Cerdeiras, M. P.; Olivaro, C.; Ramos, D.; Vázquez, A. 2007. Actividad antimicrobiana de plantas del bosque de galería del río Uruguay. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales Vol. 6 (6). Pp.: 317-318.

Almeida, E. 2000. Culturas prehispánicas del Ecuador. Viajes Chasquiguiñán Cía. Ltda. Ecuador. Pp.: 180.

Almeida, R.; Carretto, C.; Santana, R.; Furlan, M.; Junqueira, J.; Jorge, A. 2008. Atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf sobre *Candida* spp. Revista de Odontologia da UNESP 37(2). Brasil. Pp.: 147-153.

American Type Culture Collection (ATCC). ATCC Medium: 1245 YPD Medium. Consultado en:

<https://www.atcc.org/~media/03BCCC2867C744EC8912F56A410A7F58.ashx> (11/04/2013)

American Type Culture Collection (ATCC). s/f. ATCC Medium: 3 Nutrient Agar/Broth. Consultado en: <https://www.atcc.org/~media/E6FA2163B72E4DCD880719A2612F2C92.ashx> (11/04/2013)

Amir, M.; Darah, I.; Shaida, F. Leila, M. 2012. Screening antimicrobial activity of various extracts of *Urtica dioica*. International Journal of Tropical Biology Vol. 60 (4). Malasia. Pp.: 1567-1576.

Andrés, D.; Barrio, J.; Antón, J. 2008. Física y química, 1 Bachillerato. Editex. España. Pp.: 123.

Antolínez, J.; De Colmenares, N.; Usubillaga, A.; Darghan, E.; Linares, S. 2008. Evaluación de variables agronómicas en el cultivo de limonaria (*Cymbopogon citratus* Stapf) para la producción de aceite esencial. Interciencia 33 (9). Venezuela.

Aragón, F.; Marín, E.; Ramos, B.; Uribe, Y. 2009. Evaluación mediante antibiogramas del efecto bactericida de quina amarilla (*Hintonia latiflora* (Sesse et Moc. Ex. DC.) Bullock), cuachalalate (*Hypopterygium adstringens* Schltdl.), tomillo (*Thymus vulgaris* L.) y estafiate (*Artemisia ludoviciana* ssp. Mexicana (Willd. Ex Spreng.) Keck) en cepas patógenas de *Escherichia coli*. Medicina tradicional de la Escuela de Enfermería. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México. Consultado en: [http://www.tlahui.com/medic/medic29/escherichia\\_coli\\_herbo.pdf](http://www.tlahui.com/medic/medic29/escherichia_coli_herbo.pdf) (09/04/2013)

Araujo, J.; Salas, R. 2008. Actividad antimicrobiana de plantas. Revista Científica de la Universidad Científica del Sur. Perú. Consultado en: <http://www.apicoladelalba.cl/actividad-antimicrobiana-de-plantas-sci/> (13/01/2014).

Arora, R. Mathur, A.; Mathur, K. 2011. Emerging Trends in Medicinal Plant Biotechnology. Medicinal Plant Biotechnology. CAB International. Reino Unido. Pp.: 1.

Arraiza, M.P. s/f. Uso Industrial de Plantas Aromáticas y Medicinales. Universidad Politécnica de Madrid (UPM). Consultado en: <http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales/material-de-clase> (21/02/2013).

Asamblea Constituyente. 2008. Constitución de la República del Ecuador. Ecuador. Pp.3, 24, 106,111.

Aswatha, H.N. 2006. Herbal Formulations and their Standardization. Medicinal Plants: Traditional Knowledge. I. K. International Pvt Ltd. India . Pp.: 1.

Ayfer, D.; Turgay, Ö. 2003. Antimicrobial Activities of Various Medicinal and Commercial Plant Extracts. Turquía. Turkish Journal of Biology 23. Pp.: 157-162.

Becton Dickinson and Company (BD). 2013. Instructions For Use – Ready-To-Use Plated Media. BD Sabouraud Glucose Agar. Sabouraud Agar with Chloramphenicol. Consultado en: <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8984> (12/12/2013).

Berkhout, R. 2002. *Candida albicans*. Revista Iberoamericana de Micología. Pp.: 25-26.

Beyer, H.; Walter, W. 1987. Manual de química orgánica. Reverte. España. Pp.: 299-301.

Biswas, B.; Rogers, K.; McLaughlin, F.; Daniels, D.; Yadav, A. 2013. Antimicrobial Activities of Leaf Extracts of Guava (*Psidium guajava* L.) on Two Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. International Journal of Microbiology. Estados Unidos. Pp.: 1-7.

Breitmaier, E. 2006. Terpenes: Flavor, fragrances, pharmaca, pheromones. John Wiley & Sons. Alemania. Pp.: 1-3.

Buitron, X. 1999. Ecuador Uso y Comercio de Plantas medicinales. Situación Actual y aspectos Importantes para su Conservación. Red TRAFFIC. Pp.: 1 – 101.

Calderón, J. 2011. Caracterización fitoquímica, actividad antibacteriana y antioxidante de extractos de plantas medicinales utilizadas en Pereira y Santa Rosa de Cabal (Risaralda). Universidad Tecnológica de Pereira. Tesis Tecnología Química. Colombia. Pp.: 14.

Carvajal, L.; Hata, Y.; Sierra, N.; Rueda, D. 2009. Análisis Fitoquímico Preliminar de Hojas, Tallos y Semillas de Cupatá (*Strychnos schultesiana krukoff*). Revista Colombia Forestal Vol. 12: 161-170.

Castellanos, J. 2008. Epazote (*Chenopodium ambrosioides*). Revisión a sus características morfológicas, actividad farmacológica, y biogénesis de su principal principio activo, ascaridol. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, vol. 7, núm. 1. Chile. Pp. 3-9.

Centro Interamericano de Artesanías y Artes Populares (CIDAP). 1992. Cultura Popular en el Ecuador. Tomo VII Tungurahua. Ecuador. Pp.: 278-287.

Cerón, C. 2006. Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos. Botánica Económica de los Andes Centrales. Bolivia. Pp.: 285-293.

Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (Programa Iberoamericano) (CYTED). 1995. Plantas bajo estudio por los grupos de investigadores. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Proyecto X-1 Búsqueda de Principios Bioactivos en plantas.

Colivet, J.; Marcano, G.; Belloso, G.; Brito, D.; Gómez, E. 2011. Efecto antimicrobiano de extractos etanólicos de albahaca (*Ocimum basilicum* L.)

sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 2 (2). Pp.: 313-320.

De la Torre, L.; Alarcón, D. Kvist, L.P. Salazar, J. 2008. Usos medicinales de las plantas. Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. Herbario QCA & Herbario AAU. Ecuador. Pp.: 105–114.

De la Torre, L.; Macía, M. 2008. La etnobotánica en el Ecuador. Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. Herbario QCA & Herbario AAU. Ecuador. Pp.: 13–27

Dehesa, M. 2009. La legislación vigente en Ecuador para la fabricación, uso y comercialización de plantas medicinales y fitomedicamentos. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 8 (1). Chile. Pp.: 52 – 57

Devi, P.; Meera, R.; Muthumani, P.; Ratnaji, C.; Vijayakumar, T.; Duddu, V.; Murthy, K. 2010. Evaluation of Alcoholic and Aqueous Extracts of *Nicandra physalodes* Leaves for Diuretic Activity. International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives 1(4). India. Pp.: 331-334.

Díaz, F.; Rosales, R. 2004. Los resultados de la investigación. Editorial Universidad Estatal a Distancia (EUNED). Costa Rica. Pp.: 9-10.

Domingo, D. López, M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. Revista Española de Quimioterapia V. 16(4). España. Pp.: 385-393.

Dulger, S.; Gonuz, A. 2004. Antimicrobial activity of certain plants used in Turkish traditional medicine. Asian Journal of Plant Sciences 3(1). Turquía. Pp.: 104-107.

Elkins, R.; Tenney, L. 1997. Candida Albicans: A Nutritional Approach. Woodland Publishing. Estados Unidos. Pp.: 6.

Espinoza, I. 2003. Análisis fitoquímico y actividad antibacteriana de *Tillandsia revurvata*. Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. México. Pp.: 2-30.

Estrella, J. 2005. Biodiversidad y Recursos Genéticos: Una Guía para Su Uso y Acceso en el Ecuador. Editorial Abya Yala. Ecuador. Pp.: 31.

Ezekwesili, J.; Nkemdilim, O.; Okeke, C. 2010. Mechanism of antidiarrhoeal effect of ethanolic extract of *Psidium guajava* leaves. *Biokemistri* 22(2). Nigeria. Pp.: 85-90.

Fagbemi, J.; Ugoji, E.; U.; Adelowotan, O. 2009. Evaluation of the antimicrobial properties of unripe banana (*Musa sapientum* L.), lemon grass (*Cymbopogon citratus* S.) and turmeric (*Curcuma longa* L.) on pathogens. *African Journal of Biotechnology* Vol. 8 (7). Nigeria. Pp.: 1176-1182.

Falco, A.; Rodríguez, J.; Núñez, M.; Sevillano, E. 2011. Actividad antimicrobiana de extractos hidroetanólicos de limoncillo (*Cymbopogon citratus*) y cúrcuma (*Curcuma longa*). *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 2 (1). Venezuela. Pp.: 085-093.

Fathiazad, F.; Matlobi, A. Khorrami, A.; Hamedeyazdan, S.; Soraya, H.; Hammami, M.; Maleki-Dizaji, N.; Garjani A. 2012. Phytochemical screening and evaluation of cardioprotective activity of ethanolic extract of *Ocimum basilicum* L. (basil) against isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 20. Pp.: 87.

Felix, J.; Doohan, D.; Koenig M. 2001. 2001. Apple of Peru: A New Invasive Weed in Ohio. Ohio Agricultural Research and Development Center (OARDC). Universidad De Ohio. Estados Unidos. Disponible en: <http://ohioline.osu.edu/hyg-fact/1000/pdf/1649.pdf> (12/11/2014).

Félix, J.; Tomaz, I.; Silva, M.; Santos, K.; Silva, A.; Carvalho, M.; Soares, L.; Fernandes, M. 2012. Identificação botânica e química de espécies vegetais de uso popular no Rio Grande do Norte, Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinales* v.14, n.3. Brasil. Pp.: 548-555.

García, V. 2007. Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos etanólicos totales de cinco especies del género *Baccharis*. Tesis Ingeniería en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejército. Ecuador. Pp.: ix, 2.

Geissman, T.A. 1973. Principios de química orgánica. Reverte. España. Pp.: 755-758.

Goka, M.; Lunga, P.; Tamokou, J.; Kuate, J.; Tane, P.; Vilarem, G.; Cerny, M. 2010. Antifungal Properties of *Chenopodium ambrosioides* Essential Oil Against Candida Species. Pharmaceuticals 3. Brasil. Pp.: 2900-2909.

Gülçina, I.; Küfrevioğlu, I.; Oktayb, M.; Büyükkuroğlu, M. 2004. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). Journal of Ethnopharmacology 90. Turquía. Pp.: 205–215.

Gutiérrez, J.; Schlie, M.A.; Montejó, E.; Cruz, A.; Martínez, L.; Herrera, M. 2012. Enteroaggregative *Escherichia coli* Adherence to SW-480 Cells. Consultado en: <http://microbelibrary.org/library/laboratory-test/3685-diagnostic-methods-for-the-enteroaggregative-escherichia-coli-infection> (21/02/2013).

Harvey, D. 2000. Modern Analytical Chemistry. McGraw-Hill Higher Education. Estados Unidos. Pp.: 233.

Hernández, L.; Rodríguez, M. 2001. Actividad antimicrobiana de plantas que crecen en cuba. Revista Cubana de Plantas Medicinales (2). Cuba. Pp.: 44-7.

Hussain, A.; Anwar, F.; Sherazi, S.; Przybylski, R. 2008. Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Basil (*Ocimum basilicum*) Essential oils Depends on Seasonal Variations. Food Chemistry 108. Canada. Pp.: 986-995.

Jebashree, H.; Kingsley, J.; Sathish, E. Devapriya, D. 2011. Antimicrobial Activity of Few Medicinal Plants against Clinically Isolated Human Cariogenic Pathogens—An In Vitro Study. ISRN Dentistry. India. Pp.: 1-6.



Joseph, B.; Prya, M. 2011. Review on nutritional, medicinal and pharmacological properties of guava (*Psidium guajava* Linn.). International Journal of Pharma and Bio Sciences 2(1). Estados Unidos. Pp.: 53-69.

Joshi, B.; Lekhak, S.; Sharma, A. 2009. Antibacterial Property of Different Medicinal Plants: *Ocimum sanctum*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Xanthoxylum armatum* and *Origanum majorana*. Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology Vol. 5 (I). Nepal. Pp.: 143- 150.

Kazanjian, A.; Fariñas, M. 2006. Actividades biológicas del extracto acuoso de la esponja *Aplysina lacunosa* (Porifera: Aplysinidae). Universidad de Oriente. Venezuela. Pp.: 189-200.

Kennedy, D.; Wightman, E. 2011. Herbal Extracts and Phytochemicals: Plant Secondary Metabolites and the Enhancement of Human Brain Function. Advances in Nutrition 2. Reino Unido. Pp.: 32-50.

Kloucek, P.; Polesny, Z.; Svobodova, B.; Vlkova, E.; Kokoska, L. 2005. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Callería District. Journal of Ethnopharmacology 99. República Checa. Pp.: 309–312.

Kumar, A. 2010. Medicinal Plants. Mittal Publications. India. Pp.: 1.

Lizcano, A.J.; Vegara, J.L. 2008. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Heperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia.

Lizcano, M. 2007. Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de tomillo (*thymus vulgaris*) contra *Botritis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia sclerotiorum*. Pontificia Universidad Javeriana. Tesis de microbiología agrícola y veterinaria. Colombia. Pp.: 16.

Maia, J.; Zohhbi, M.; Andrade, E.; Santos, A.; Silva, M.; Luz, A.; Bastos, C. 1998. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the Amazon region. *Flavour and fragrance journal* 13. Pp.: 269-272.

Marrassini, C.; Gorzalczany, S. Ferraro, G. 2010. Actividad analgésica de dos especies de *Urtica* con usos etnomédicos en la República Argentina. Universidad de Buenos Aires. Argentina. Pp.: 21-29.

Martínez, P. 2003. Aceites Esenciales. Universidad de Antioquia. Colombia. Consultado en: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/esencias2001b.pdf> (02/02/2014)

Mazumder, A.; Mazumder, R. 2006. Herbal Remedies to Antibacterial Therapy: Its Current status in the 21 st Century. *Medicinal Plants: Traditional Knowledge*. I. K. International Pvt Ltd. India. Pp.: 51.

Medina, D.; Mendoza, M.; Nuñez, L.; Pacheco, D. 2013. Actividad antimicrobiana de extractos acuosos de ajo, canela y epazote contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Academia de Ciencias de Morelos (ACMOR). México. Pp.: 1-2.

Merck. 2004. ChromoCult<sup>®</sup> Coliform Agar. For detection of coliforms in drinking water and processed food samples. Alemania. Consultado en: [http://www.amco-instruments.com/index\\_files/pdf/chromocult-coliform.pdf](http://www.amco-instruments.com/index_files/pdf/chromocult-coliform.pdf) (12/12/2013).

Michael, T.; Madigan, J.; MArtinko, J. Brock. 2004. *Biología de los Microorganismos*. Decima Edición. Pearson Educación S.A. España. Pp.: 158 – 159.

MicrobiologyBytes. 2001. *Candida albicans*. Consultado en: <http://www.microbiologybytes.com/video/Candida.html> (21/02/2013).

Millezi, A.; Caixeta, D.; Rossoni, D.; Cardoso, M.; Piccoli, R. 2012. In vitro antimicrobial properties of plant essential oils *Thymus vulgaris*,

*Cymbopogon citratus* and *Laurus nobilis* against five important foodborne pathogens. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 32(1). Brasil. Pp.: 167-172.

Nascimento, G.; Locatelli, J.; Freitas, P.; Silva, G. 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Universidade de São Paulo. Brazilian Journal of Microbiology* 31. Brasil. Pp.: 247-256.

Nascimento, G.; Gislene, G.F.; Locatelli, J.; Freitas, P.; Silva, J. 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology* 31. Brasil. Pp.: 247-256.

Neira, M. 2010. Estudio fitofarmacológico del manejo del oídio (*Oidium* sp.), trips (*Frankliniella occidentalis*) y pulgones (*Myzus* sp.), en rosas de exportación con la utilización de extractos vegetales. *Nevado Ecuador S.A. Tesis Ingeniería Bioquímica. Universidad Técnica de Ambato. Ecuador.*

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2011. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). Consultado en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/index.html> (21/02/2013).

Ortuño, M. 2006. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. *AIYANA ediciones. España. Pp.: 223-224.*

Pamplona, J. 2006. *Salud por las Plantas Medicinales. Nuevo estilo de vida. Editorial Safeliz S.L. España. Pp.: 36 -37.*

Parmar, V.; Jain, S.; Bisht, K.; Jain, R.; Taneja, P.; Jha, A.; Tyagi, O.; Prasad, A.; Wengel, J.; Olsen, C.; Boll, P. 1996. Phytochemistry of The Genus *Piper*. *Phytochemistry*, Vol. 46, No. 4. Dinamarca. Pp. 591-673.

Patil, D.; Mhaske, D.; Wadhawa, G. 2011. Antibacterial and Antioxidant study of *Ocimum basilicum* Labiatae (sweet basil). *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research* 2. India. Pp.: 104-112.

Pinto, F. 2008. Bases de Fitoterapia. Consultado en: [www.drpintofloril.com/downloads/5BASES%20DE%20FITOTERAPIA%205.pdf](http://www.drpintofloril.com/downloads/5BASES%20DE%20FITOTERAPIA%205.pdf) (20/02/2013).

Prescott, L.; Harley, J.; Klein, D. 2004. Microbiología. Quinta Edición. McGraw-Hill-Interamericana de España. España. Pp.: 114.

Primo, E. 1995. Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria. Reverte. España. Pp.: 947-948.

Proaño, A.; Haro, L. 2010. Uso de la medicina ancestral por las madres indígenas en niños menores de cinco años frente a infecciones respiratorias agudas en el hospital "Asdrubal de la Torre". Tesis licenciatura en enfermería. Universidad Técnica del Norte. Pp.: 27-28.

Rahimifard, N.; Shoeibi, S.; Sabzevari, O.; Pakzad, S.; Ajdary, S.; Pirali, M.; Hajimehdipoor, H.; Bagheri, F.; Esmaeli, B. 2008. Antifungal Activity of the Native Essential oil of *Thymus vulgaris* on *Candida albicans*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* from Iran. *Journal of pure and applied microbiology* 2(2). Irán. Pp.: 343-343.

Ríos, E. 2010. Evaluación del aceite esencial y estudio de conservación en frío del *Cymbopogon citratus* cultivado en la región del Quindío. *Revista de Investigación de la Universidad del Quindío*. Colombia. Pp.: 24-28.

Ripa, M. 2006. Marco legal internacional para la conservación y uso sostenible de plantas. *Botánica Económica de los Andes Centrales*. Bolivia. Pp.: 509-520.

Roberts, M.; Wink, M. 1998. *Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*. Springer. Estados Unidos. Pp.: 1 – 2.

Roopashree, T.; Raman, D.; Shobha, R.; Narendra, C. 2008. Antibacterial activity of antipsoriatic herbs: *Cassia tora*, *Momordica charantia* and *Calendula officinalis*. *International Journal of Applied Research in Natural Products* Vol. 1(3). India. Pp.: 20-28.

Ruiz, J.; Huamaní, M. 2005. Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú. Tesis Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú.

Salah, H.; Ahmed, Z. 2013. Evaluation of the antibacterial efficacy and the phytochemical analysis of some plant extracts against human pathogenic bacteria. *Journal of Pharmacy and clinical Sciences* 7. Irak. Pp.: 29-39.

Sánchez, E.; Leal, I.; Fuentes, L.; Rodríguez, C. 2000. Estudio farmacognóstico de *Ocimum basilicum* L. (Albahaca blanca). *Revista Cubana de Farmacia* 34(3). Cuba. Pp.: 187-95.

Sánchez, Y.; Pino, O.; Correa, T.; Naranjo, E.; Iglesia, A. 2009. Estudio químico y microbiológico del aceite esencial de *Piper auritum* kunth (caisimón de anís). *Revista de Protección Vegetal*. Cuba. Pp.: 39-46.

Santacoloma, L.; Granados, J. 2012. Interrelación entre el contenido de metabolitos secundarios de las especies *Gliricidia sepium* y *Tithonia diversifolia* y algunas propiedades físicoquímicas del suelo. Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD); Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente (ECAPMA). Colombia. Pp.: 53-62.

Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo (SENPLADES). 2009. Plan Nacional para el Buen Vivir 2009-2013: Construyendo un Estado Plurinacional e Intercultural. Ecuador. Pp.: 203.

Sharapin, N. 2000. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Roberto Pinzón. Colombia. Pp.: 41 – 42.

Shinshal, R.; Mohamad, R.; Hasoon, R. 2008. Antibacterial inhibition of three medical herbal extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *College of Basic Education Researchers Journal* 8(1). Universidad de Mosul. Irak. Pp.: 341-352.

Sigma Aldrich. 2010. Lemongrass (*Cymbopogon*). Consultado en: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/nutrition-research/learning-center/plant-profiler/cymbopogon.html> (13/01/2014).

Singh, G. 2007. Chemistry Of Terpenoids And Carotenoids. Volume 3. Discovery Publishing House. Pp.: 1 – 2.

Sousa, Z.; Oliveira, F.; Conceição, A.; Mattos, L.; Rossi, M.; Santos, J.; Andrioli, J. 2012. Biological activities of extracts from *Chenopodium ambrosioides* Lineu and *Kielmeyera neglecta* Saddi. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 11:20. Pp.: 1-7.

Stewart, D. 2005. The Chemistry Of Essential Oils Made Simple: God's Love Manifest In Molecules. Care Publications. Estados Unidos. Pp.: 260.

Sussman, M. 1997. Escherichia Coli: Mechanisms of Virulence. Cambridge University Press. Estados Unidos. Pp.: 4.

Taiz, L.; Zeiger, E. 2006. Fisiología Vegetal. Universitat Jaume I. España. Pp.: 553-557.

Universidad Andina Simón Bolívar Ecuador (USAB). 2009. Etnomedicina en el Ecuador. Consultado en: [www.uasb.edu.ec/public/salud/pnaranjo.htm](http://www.uasb.edu.ec/public/salud/pnaranjo.htm) (27/01/2013).

Universidad Nacional de La Pampa (UNLPAM). s/f. Sustancias fenólicas. Consultado en: [http://www.agro.unlpam.edu.ar/catedras-pdf/sustancias\\_fenolicas.pdf](http://www.agro.unlpam.edu.ar/catedras-pdf/sustancias_fenolicas.pdf) (21/02/2013).

Vallejo, L. 2010. Determinación de la actividad antibacteriana y antimicótica de los extractos de *Solanum nigrescens* (hierba mora), *Nicandra physalodes* (ambo) y *Sida poeppigiana* (escobillo), plantas registradas en el Chota-Imbabura sobre *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* y *Candida albicans* causantes de enfermedades bucofaríngeas. Tesis Ingeniería en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejército. Ecuador. Pp.: XXII.

Vargas, S. 2012. Evaluación del comportamiento de combinaciones de extractos vegetales para el control de mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum*) en el cultivo de frejol (*Phaseolus vulgaris*, L.). Tesis Ingeniería Bioquímica. Universidad Técnica de Ambato. Ecuador.

Velasteguí, J.R. 2005. Alternativas ecológicas para el manejo integrado fitosanitario en los cultivos. AgroExpress Editorial. Ecuador. Pp.: 134; 153.

Velasteguí, J.R. 2012. Módulo Formativo de Producción de Metabolitos. Terpenos y Terpenoides. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Universidad Técnica de Ambato. Ecuador. v/p.

Vieira, R.; Rodrigues, D.; Gonçalves, F.; Menezes, F.; Aragão, J.; Sousa, O. 2001. Microbicidal effect of medicinal plant extracts (*Psidium guajava* Linn. and *Carica papaya* Linn.) upon bacteria isolated from fish muscle and known to induce diarrhea in children. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 43(3). Brasil. Pp.: 145-148.

Villacís, J. 2009. Temas de Medicina Natural: Fitomedicina. Universidad Técnica de Ambato. Ecuador.

Vivanco, J.; Cosio, E.; Loyola, V.; Flores, H. 2005. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. Investigación y ciencia. Presa Científica S.A. Pp.: 60-75.

Zabaleta, E. 1999. Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. Revista Terra Latinoamericana. México. Pp.: 201-207.

## **2. Anexos**

### **ANEXO A**

#### **Respuestas Experimentales**



**Tabla A-1. Valores de humedad de las especies vegetales después del proceso de secado.**

Especie Vegetal	Humedad (%)					
	Réplica 1			Réplica 2		
	Lectura 1	Lectura 2	Promedio	Lectura 1	Lectura 2	Promedio
<b>Albahaca</b>	14,388	15,089	14,739	15,378	15,913	15,646
<b>Ambo</b>	15,857	16,031	15,944	13,205	13,379	13,292
<b>Guayaba</b>	14,576	14,741	14,659	15,906	16,071	15,989
<b>Hierba luisa</b>	15,093	15,873	15,483	15,653	15,337	15,495
<b>Matico</b>	13,666	14,054	13,860	14,414	14,288	14,351
<b>Ortiga</b>	15,023	15,983	15,503	15,143	15,303	15,223
<b>Paico</b>	15,243	16,088	15,666	14,933	15,278	15,106
<b>Tomillo</b>	16,003	15,955	15,979	16,507	16,959	16,733

Elaborado por: Gabriela Yáñez

**Factores y niveles de estudio para la selección de extractos vegetales con actividad antimicrobiana más promisorios.**

<b>Factor</b>	<b>Niveles</b>
<b>A. Metodología de obtención de extractos</b>	a0 Maceración en etanol
	a1 Maceración en hexano
	a2 Decocción a fuego lento
	a3 Infusión
<b>B. Especie vegetal</b>	b0 Albahaca
	b1 Ambo
	b2 Guayaba
	b3 Hierba luisa
	b4 Matico
	b5 Ortiga negra
	b6 Paico
	b7 Tomillo

Elaborado por: Gabriela Yáñez

**Tabla A-2. Valores de pH de los extractos vegetales**

	Réplica 1			Réplica 2		
	Lectura 1	Lectura 2	Promedio	Lectura 1	Lectura 2	Promedio
<b>Agua potable</b>	7,41	7,43	7,42	7,54	7,55	7,55
<b>Agua destilada</b>	6,99	7,00	7,00	7,07	7,10	7,09
<b>Etanol</b>	8,65	8,61	8,63	8,58	8,60	8,59
<b>Hexano</b>	6,7	6,65	6,68	6,6	6,62	6,61
<b>a0b0</b>	5,89	5,96	5,93	5,50	5,52	5,51
<b>a0b1</b>	5,90	5,95	5,93	5,72	5,73	5,73
<b>a0b2</b>	5,11	5,10	5,11	5,17	5,17	5,17
<b>a0b3</b>	4,99	5,01	5,00	5,12	5,14	5,13
<b>a0b4</b>	5,74	5,76	5,75	6,41	6,39	6,40
<b>a0b5</b>	7,29	7,31	7,30	7,12	7,10	7,11
<b>a0b6</b>	6,20	6,22	6,21	6,38	6,39	6,39
<b>a0b7</b>	5,56	5,58	5,57	5,34	5,35	5,35
<b>a1b0</b>	8,18	8,21	8,20	7,52	7,53	7,53
<b>a1b1</b>	6,70	6,72	6,71	7,06	7,07	7,07
<b>a1b2</b>	6,64	6,67	6,66	5,99	6,04	6,02
<b>a1b3</b>	7,68	7,67	7,68	7,95	7,96	7,96
<b>a1b4</b>	6,45	6,46	6,46	6,15	6,10	6,13
<b>a1b5</b>	6,16	6,21	6,19	7,66	7,65	7,66
<b>a1b6</b>	6,64	6,64	6,64	7,17	7,18	7,18
<b>a1b7</b>	7,61	7,62	7,62	7,72	7,74	7,73
<b>a2b0</b>	7,50	7,52	7,51	7,48	7,48	7,48
<b>a2b1</b>	6,52	6,54	6,53	6,74	6,77	6,76
<b>a2b2</b>	6,74	6,73	6,74	6,23	6,24	6,24
<b>a2b3</b>	6,10	6,10	6,10	6,43	6,42	6,43
<b>a2b4</b>	6,45	6,46	6,46	6,53	6,53	6,53
<b>a2b5</b>	8,83	8,82	8,83	8,53	8,50	8,52
<b>a2b6</b>	7,76	7,75	7,76	7,83	7,84	7,84
<b>a2b7</b>	5,67	5,66	5,67	5,78	5,76	5,77
<b>a3b0</b>	7,34	7,35	7,35	7,41	7,41	7,41
<b>a3b1</b>	6,26	6,25	6,26	6,46	6,48	6,47
<b>a3b2</b>	7,05	7,06	7,06	6,95	6,96	6,96
<b>a3b3</b>	6,22	6,22	6,22	6,39	6,37	6,38
<b>a3b4</b>	6,98	6,99	6,99	6,51	6,52	6,52
<b>a3b5</b>	8,89	8,92	8,91	8,62	8,67	8,65
<b>a3b6</b>	7,78	7,77	7,78	7,89	7,85	7,87
<b>a3b7</b>	5,82	5,81	5,82	6,23	6,22	6,23

Elaborado por: Gabriela Yáñez

**Tabla A-3. Valores conductividad eléctrica de los extractos vegetales**

	Réplica 1			Réplica 2		
	Lectura 1	Lectura 2	Promedio	Lectura 1	Lectura 2	Promedio
<b>Agua potable</b>	132,10	132,40	132,25	147,32	147,35	147,34
<b>Agua destilada</b>	10,01	9,50	9,76	7,23	7,25	7,24
<b>Etanol</b>	0,56	0,60	0,58	0,61	0,60	0,61
<b>Hexano</b>	0,12	0,13	0,13	0,10	0,12	0,11
<b>a0b0</b>	313,00	310,00	312,00	530,00	534,00	532,00
<b>a0b1</b>	226,00	225,00	226,00	230,00	226,00	228,00
<b>a0b2</b>	216,00	217,00	217,00	158,80	158,90	159,00
<b>a0b3</b>	141,80	142,50	142,00	210,00	209,00	210,00
<b>a0b4</b>	143,10	141,50	142,00	45,50	46,30	46,00
<b>a0b5</b>	305,00	305,00	305,00	185,00	181,00	183,00
<b>a0b6</b>	251,00	255,00	253,00	295,00	307,00	301,00
<b>a0b7</b>	52,00	51,70	52,00	96,30	95,80	96,00
<b>a1b0</b>	0,20	0,24	0,22	0,14	0,20	0,17
<b>a1b1</b>	0,16	0,18	0,17	0,14	0,16	0,15
<b>a1b2</b>	0,23	0,25	0,24	0,14	0,15	0,15
<b>a1b3</b>	0,14	0,17	0,16	0,16	0,17	0,17
<b>a1b4</b>	0,28	0,22	0,25	0,82	0,85	0,84
<b>a1b5</b>	0,17	0,16	0,17	0,17	0,18	0,18
<b>a1b6</b>	0,20	0,22	0,21	0,18	0,19	0,19
<b>a1b7</b>	0,15	0,18	0,17	0,19	0,22	0,21
<b>a2b0</b>	6890,00	6910,00	6900,00	7280,00	7310,00	7295,00
<b>a2b1</b>	13430,00	13460,00	13445,00	10520,00	10540,00	10530,00
<b>a2b2</b>	1642,00	1641,00	1642,00	2210,00	2250,00	2230,00
<b>a2b3</b>	3910,00	3920,00	3915,00	3670,00	3660,00	3665,00
<b>a2b4</b>	4880,00	4780,00	4830,00	5260,00	5280,00	5270,00
<b>a2b5</b>	7300,00	7310,00	7305,00	6460,00	6450,00	6455,00
<b>a2b6</b>	7740,00	7760,00	7750,00	6880,00	6860,00	6870,00
<b>a2b7</b>	2400,00	2390,00	2395,00	3490,00	3510,00	3500,00
<b>a3b0</b>	6990,00	6980,00	6985,00	5670,00	5690,00	5680,00
<b>a3b1</b>	10590,00	10610,00	10600,00	12430,00	12440,00	12435,00
<b>a3b2</b>	1277,00	1278,00	1278,00	2460,00	2470,00	2465,00
<b>a3b3</b>	2610,00	2590,00	2600,00	4100,00	4120,00	4110,00
<b>a3b4</b>	3820,00	3830,00	3825,00	3510,00	3550,00	3530,00
<b>a3b5</b>	6100,00	6070,00	6085,00	5340,00	5350,00	5345,00
<b>a3b6</b>	6600,00	6580,00	6590,00	8160,00	8170,00	8165,00
<b>a3b7</b>	1275,00	1472,00	1374,00	3430,00	3410,00	3420,00

































































Elaborado por: Gabriela Yáñez

**Tabla A-4. Valores de concentración de los extractos vegetales**

	<b>Concentración (mg/l)</b>					
	<b>Réplica 1</b>			<b>Réplica 2</b>		
	<b>Lectura 1</b>	<b>Lectura 2</b>	<b>Promedio</b>	<b>Lectura 1</b>	<b>Lectura 2</b>	<b>Promedio</b>
<b>a0b0</b>	31900	32500	32200	36600	35900	36250
<b>a0b1</b>	31100	30900	31000	35200	34500	34850
<b>a0b2</b>	17600	18300	17950	28600	27400	28000
<b>a0b3</b>	61000	61500	61250	56100	55300	55700
<b>a0b4</b>	78200	79100	78650	54700	54600	54650
<b>a0b5</b>	9500	9200	9350	12600	12200	12400
<b>a0b6</b>	22600	21900	22250	14800	15700	15250
<b>a0b7</b>	28200	28900	28550	63700	64800	64250
<b>a1b0</b>	38900	37900	38400	18700	19600	19150
<b>a1b1</b>	16800	17200	17000	19300	20100	19700
<b>a1b2</b>	32200	31600	31900	11900	12500	12200
<b>a1b3</b>	11300	10400	10850	9100	8900	9000
<b>a1b4</b>	520900	521700	521300	125300	125500	125400
<b>a1b5</b>	13900	14600	14250	30400	31100	30750
<b>a1b6</b>	133200	132300	132750	27600	28300	27950
<b>a1b7</b>	8900	9400	9150	58500	56400	57450
<b>a2b0</b>	15100	15300	15200	15800	15200	15500
<b>a2b1</b>	28700	30800	29750	32800	30300	31550
<b>a2b2</b>	8000	8400	8200	7600	8100	7850
<b>a2b3</b>	9700	8900	9300	11200	11500	11350
<b>a2b4</b>	21100	21100	21100	27400	25800	26600
<b>a2b5</b>	18500	17600	18050	22200	23400	22800
<b>a2b6</b>	20500	21500	21000	25000	24300	24650
<b>a2b7</b>	22100	22300	22200	23900	24200	24050
<b>a3b0</b>	16200	15800	16000	15200	16900	16050
<b>a3b1</b>	22900	22700	22800	24900	26000	25450
<b>a3b2</b>	5300	6100	5700	4600	5600	5100
<b>a3b3</b>	5500	6200	5850	6800	6800	6800
<b>a3b4</b>	11700	12200	11950	12400	13200	12800
<b>a3b5</b>	13800	14100	13950	17500	19100	18300
<b>a3b6</b>	18700	19000	18850	19800	20400	20100
<b>a3b7</b>	9500	8700	9100	10200	10400	10300

Elaborado por: Gabriela Yáñez

Tabla A-5. Colores de los extractos vegetales.

	Color	
	Réplica 1 Color/código-nombre	Réplica 2 Color/código-nombre
a0b0	 224 Deep Bronze Green	 223 Middle Bronze Green
a0b1	 224 Deep Bronze Green	 225 Light Brunswick Green
a0b2	 225 Light Brunswick Green	 225 Light Brunswick Green
a0b3	 220 Olive Green	 222 Light Bronze Green
a0b4	 224 Deep Bronze Green	 225 Light Brunswick Green
a0b5	 224 Deep Bronze Green	 224 Deep Bronze Green
a0b6	 278 Light Olive Green	 278 Light Olive Green
a0b7	 489 Leaf Brown	 446 Red Oxide
a1b0	 222 Light Bronze Green	 222 Light Bronze Green
a1b1	 222 Light Bronze Green	 222 Light Bronze Green
a1b2	 278 Light Olive Green	 278 Light Olive Green
a1b3	 222 Light Bronze Green	 355 Lemon
a1b4	 222 Light Bronze Green	 222 Light Bronze Green
a1b5	 222 Light Bronze Green	 278 Light Olive Green
a1b6	 359 Middle Buff	 568 Apricot
a1b7	 356 Golden Yellow	 355 Lemon
a2b0	 489 Leaf Brown	 446 Red Oxide
a2b1	 241 Dark Green	 241 Dark Green
a2b2	 436 Dark Camouflage Brown	 489 Leaf Brown
a2b3	 420 Dark Camouflage Desert Sand	 436 Dark Camouflage Brown
a2b4	 210 Sky	 363 Bold Yellow
a2b5	 227 Deep Brunswick Green	 227 Deep Brunswick Green
a2b6	 538 Cherry	 538 Cherry
a2b7	 568 Apricot	 568 Apricot
a3b0	 557 Light Orange	 557 Light Orange
a3b1	 540 Crimson	 540 Crimson
a3b2	 365 Vellum	 365 Vellum
a3b3	 210 Sky	 363 Bold Yellow
a3b4	 320 Light Brown	 489 Leaf Brown
a3b5	 224 Deep Bronze Green	 224 Deep Bronze Green
a3b6	 557 Light Orange	 568 Apricot
a3b7	 356 Golden Yellow	 356 Golden Yellow

Elaborado por: Gabriela Yáñez

Tabla A-6. Crecimiento de *Escherichia coli* con los diferentes tratamientos.

	Crecimiento <i>Escherichia coli</i>			
	24 h		48 h	
	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 1	Lectura 2
<b>a0b0</b>				
R1	++++	++++	++++	++++
R2	++++	++++	++++	++++
<b>a0b1</b>				
R1	+++	+++	++++	++++
R2	+++	+++	++++	++++
<b>a0b2</b>				
R1	++++	++++	++++	++++
R2	++++	++++	++++	++++
<b>a0b3</b>				
R1	+++	+++	+++	+++
R2	++	++	++	++
<b>a0b4</b>				
R1	+	+	++	++
R2	++	++	+++	+++
<b>a0b5</b>				
R1	++	++	+++	+++
R2	++	++	+++	+++
<b>a0b6</b>				
R1	-	-	-	-
R2	-	-	-	-
<b>a0b7</b>				
R1	-	-	-	-
R2	-	-	-	-
<b>a1b0</b>				
R1	+++	+++	++++	++++
R2	+++	+++	++++	++++
<b>a1b1</b>				
R1	+++	+++	++++	++++
R2	+++	+++	++++	++++
<b>a1b2</b>				
R1	++++	++++	++++	++++
R2	+++	+++	++++	++++
<b>a1b3</b>				
R1	+++	+++	++++	++++
R2	+++	+++	++++	++++
<b>a1b4</b>				
R1	+	+	++	++

R2	++	++	++	++
a1b5				
R1	+++	+++	++++	++++
R2	++++	++++	++++	++++
a1b6				
R1	-	-	+	+
R2	-	-	+	+
a1b7				
R1	+	+	+	+
R2	+	+	++	++
a2b0				
R1	++++	++++	++++	++++
R2	++++	++++	++++	++++
a2b1				
R1	++++	++++	++++	++++
R2	++++	++++	++++	++++
a2b2				
R1	+++	+++	+++	+++
R2	+++	+++	+++	+++
a2b3				
R1	++++	++++	++++	++++
R2	++++	++++	++++	++++
a2b4				
R1	++++	++++	++++	++++
R2	++++	++++	++++	++++
a2b5				
R1	++++	++++	++++	++++
R2	++++	++++	++++	++++
a2b6				
R1	++++	++++	++++	++++
R2	++++	++++	++++	++++
a2b7				
R1	++++	++++	++++	++++
R2	++++	++++	++++	++++
a3b0				
R1	+++	+++	+++	+++
R2	+++	+++	+++	+++
a3b1				
R1	++++	++++	++++	++++
R2	++++	++++	++++	++++
a3b2				
R1	++++	++++	++++	++++
R2	++++	++++	++++	++++
a3b3				

R1	++++	++++	++++	++++
R2	++++	++++	++++	++++
a3b4				
R1	++++	++++	++++	++++
R2	++++	++++	++++	++++
a3b5				
R1	+++	+++	+++	+++
R2	+++	+++	+++	+++
a3b6				
R1	++++	++++	++++	++++
R2	++++	++++	++++	++++
a3b7				
R1	+	+	+	+
R2	+	+	+	+

Elaborado por: Gabriela Yáñez

Tabla A-7. Porcentajes de inhibición de *Escherichia coli* con los diferentes tratamientos.

	Porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>Escherichia coli</i> (%)					
	24 h			48 h		
	Lectura 1	Lectura 2	Promedio	Lectura 1	Lectura 2	Promedio
a0b0						
R1	0	0	0	0	0	0
R2	0	0	0	0	0	0
a0b1						
R1	25	25	25	0	0	0
R2	25	25	25	0	0	0
a0b2						
R1	0	0	0	0	0	0
R2	0	0	0	0	0	0
a0b3						
R1	25	25	25	25	25	25
R2	50	50	50	50	50	50
a0b4						
R1	75	75	75	50	50	50
R2	50	50	50	25	25	25
a0b5						
R1	50	50	50	25	25	25
R2	50	50	50	25	25	25
a0b6						
R1	100	100	100	100	100	100
R2	100	100	100	100	100	100



<b>a0b7</b>						
R1	100	100	100	100	100	100
R2	100	100	100	100	100	100
<b>a1b0</b>						
R1	25	25	25	0	0	0
R2	25	25	25	0	0	0
<b>a1b1</b>						
R1	25	25	25	0	0	0
R2	25	25	25	0	0	0
<b>a1b2</b>						
R1	0	0	0	0	0	0
R2	25	25	25	0	0	0
<b>a1b3</b>						
R1	25	25	25	0	0	0
R2	25	25	25	0	0	0
<b>a1b4</b>						
R1	75	75	75	50	50	50
R2	50	50	50	50	50	50
<b>a1b5</b>						
R1	25	25	25	0	0	0
R2	0	0	0	0	0	0
<b>a1b6</b>						
R1	100	100	100	75	75	75
R2	100	100	100	75	75	75
<b>a1b7</b>						
R1	75	75	75	75	75	75
R2	75	75	75	50	50	50
<b>a2b0</b>						
R1	0	0	0	0	0	0
R2	0	0	0	0	0	0
<b>a2b1</b>						
R1	0	0	0	0	0	0
R2	0	0	0	0	0	0
<b>a2b2</b>						
R1	25	25	25	25	25	25
R2	25	25	25	25	25	25
<b>a2b3</b>						
R1	0	0	0	0	0	0
R2	0	0	0	0	0	0
<b>a2b4</b>						
R1	0	0	0	0	0	0
R2	0	0	0	0	0	0
<b>a2b5</b>						
R1	0	0	0	0	0	0

<b>R2</b>	0	0	0	0	0	0
<b>a2b6</b>						
<b>R1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>R2</b>	0	0	0	0	0	0
<b>a2b7</b>						
<b>R1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>R2</b>	0	0	0	0	0	0
<b>a3b0</b>						
<b>R1</b>	25	25	25	25	25	25
<b>R2</b>	25	25	25	25	25	25
<b>a3b1</b>						
<b>R1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>R2</b>	0	0	0	0	0	0
<b>a3b2</b>						
<b>R1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>R2</b>	0	0	0	0	0	0
<b>a3b3</b>						
<b>R1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>R2</b>	0	0	0	0	0	0
<b>a3b4</b>						
<b>R1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>R2</b>	0	0	0	0	0	0
<b>a3b5</b>						
<b>R1</b>	25	25	25	25	25	25
<b>R2</b>	25	25	25	25	25	25
<b>a3b6</b>						
<b>R1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>R2</b>	0	0	0	0	0	0
<b>a3b7</b>						
<b>R1</b>	75	75	75	75	75	75
<b>R2</b>	75	75	75	75	75	75

Elaborado por: Gabriela Yáñez

Tabla A-8. Crecimiento de *Candida albicans* con los diferentes tratamientos.

<b>Crecimiento <i>Candida albicans</i></b>					
		<b>48 h</b>		<b>72 h</b>	
		<b>Lectura 1</b>	<b>Lectura 2</b>	<b>Lectura 1</b>	<b>Lectura 2</b>
<b>a0b0</b>					
	<b>R1</b>	+++	+++	+++	+++
	<b>R2</b>	+++	+++	+++	+++
<b>a0b1</b>					
	<b>R1</b>	+++	+++	+++	+++
	<b>R2</b>	+++	+++	+++	+++
<b>a0b2</b>					
	<b>R1</b>	++	++	++	++
	<b>R2</b>	++	++	++	++
<b>a0b3</b>					
	<b>R1</b>	++	+++	+++	+++
	<b>R2</b>	+++	+++	+++	+++
<b>a0b4</b>					
	<b>R1</b>	-	-	++	++
	<b>R2</b>	-	-	++	++
<b>a0b5</b>					
	<b>R1</b>	++	++	+++	+++
	<b>R2</b>	+++	+++	+++	+++
<b>a0b6</b>					
	<b>R1</b>	-	-	-	-
	<b>R2</b>	-	-	-	-
<b>a0b7</b>					
	<b>R1</b>	-	-	-	-
	<b>R2</b>	-	-	-	-
<b>a1b0</b>					
	<b>R1</b>	+++	+++	+++	+++
	<b>R2</b>	+++	+++	+++	+++
<b>a1b1</b>					
	<b>R1</b>	+++	+++	+++	+++
	<b>R2</b>	+++	+++	+++	+++
<b>a1b2</b>					
	<b>R1</b>	+++	+++	+++	+++
	<b>R2</b>	+++	+++	+++	+++
<b>a1b3</b>					
	<b>R1</b>	+++	+++	+++	+++
	<b>R2</b>	+++	+++	+++	+++
<b>a1b4</b>					

R1	++	++	+++	+++
R2	++	++	+++	+++
a1b5				
R1	+++	+++	+++	+++
R2	+++	+++	+++	+++
a1b6				
R1	++++	++++	++++	++++
R2	+++	+++	++++	++++
a1b7				
R1	++	++	+++	+++
R2	++	++	+++	+++
a2b0				
R1	++++	++++	++++	++++
R2	++++	++++	++++	++++
a2b1				
R1	++++	++++	++++	++++
R2	++++	++++	++++	++++
a2b2				
R1	++++	++++	++++	++++
R2	++++	++++	++++	++++
a2b3				
R1	++++	++++	++++	++++
R2	++++	++++	++++	++++
a2b4				
R1	++++	++++	++++	++++
R2	++++	++++	++++	++++
a2b5				
R1	++++	++++	++++	++++
R2	++++	++++	++++	++++
a2b6				
R1	+++	+++	++++	++++
R2	++++	++++	++++	++++
a2b7				
R1	++++	++++	++++	++++
R2	++++	++++	++++	++++
a3b0				
R1	++++	++++	++++	++++
R2	++++	++++	++++	++++
a3b1				
R1	++++	++++	++++	++++
R2	++++	++++	++++	++++
a3b2				
R1	++++	++++	++++	++++
R2	++++	++++	++++	++++

<b>a3b3</b>				
R1	++++	++++	++++	++++
R2	++++	++++	++++	++++
<b>a3b4</b>				
R1	++++	++++	++++	++++
R2	++++	++++	++++	++++
<b>a3b5</b>				
R1	++++	++++	++++	++++
R2	++++	++++	++++	++++
<b>a3b6</b>				
R1	++++	++++	++++	++++
R2	++++	++++	++++	++++
<b>a3b7</b>				
R1	++++	++++	++++	++++
R2	++++	++++	++++	++++

Elaborado por: Gabriela Yáñez

Tabla A-9. Porcentajes de inhibición de *Candida albicans* con los diferentes tratamientos.

	Porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>Candida albicans</i> (%)					
	48 h			72 h		
	Lectura 1	Lectura 2	Promedio	Lectura 1	Lectura 2	Promedio
<b>a0b0</b>						
R1	25	25	25	25	25	25
R2	25	25	25	25	25	25
<b>a0b1</b>						
R1	25	25	25	25	25	25
R2	25	25	25	25	25	25
<b>a0b2</b>						
R1	50	50	50	50	50	50
R2	50	50	50	50	50	50
<b>a0b3</b>						
R1	50	25	37,5	25	25	25
R2	25	25	25	25	25	25
<b>a0b4</b>						
R1	100	100	100	50	50	50
R2	100	100	100	50	50	50
<b>a0b5</b>						
R1	50	50	50	25	25	25
R2	25	25	25	25	25	25

<b>a0b6</b>						
R1	100	100	100	100	100	100
R2	100	100	100	100	100	100
<b>a0b7</b>						
R1	100	100	100	100	100	100
R2	100	100	100	100	100	100
<b>a1b0</b>						
R1	25	25	25	25	25	25
R2	25	25	25	25	25	25
<b>a1b1</b>						
R1	25	25	25	25	25	25
R2	25	25	25	25	25	25
<b>a1b2</b>						
R1	25	25	25	25	25	25
R2	25	25	25	25	25	25
<b>a1b3</b>						
R1	25	25	25	25	25	25
R2	25	25	25	25	25	25
<b>a1b4</b>						
R1	50	50	50	25	25	25
R2	50	50	50	25	25	25
<b>a1b5</b>						
R1	25	25	25	25	25	25
R2	25	25	25	25	25	25
<b>a1b6</b>						
R1	0	0	0	0	0	0
R2	25	25	25	0	0	0
<b>a1b7</b>						
R1	50	50	50	25	25	25
R2	50	50	50	25	25	25
<b>a2b0</b>						
R1	0	0	0	0	0	0
R2	0	0	0	0	0	0
<b>a2b1</b>						
R1	0	0	0	0	0	0
R2	0	0	0	0	0	0
<b>a2b2</b>						
R1	0	0	0	0	0	0
R2	0	0	0	0	0	0
<b>a2b3</b>						
R1	0	0	0	0	0	0
R2	0	0	0	0	0	0
<b>a2b4</b>						
R1	0	0	0	0	0	0

<b>R2</b>	0	0	0	0	0	0
<b>a2b5</b>						
<b>R1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>R2</b>	0	0	0	0	0	0
<b>a2b6</b>						
<b>R1</b>	25	25	25	0	0	0
<b>R2</b>	0	0	0	0	0	0
<b>a2b7</b>						
<b>R1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>R2</b>	0	0	0	0	0	0
<b>a3b0</b>						
<b>R1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>R2</b>	0	0	0	0	0	0
<b>a3b1</b>						
<b>R1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>R2</b>	0	0	0	0	0	0
<b>a3b2</b>						
<b>R1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>R2</b>	0	0	0	0	0	0
<b>a3b3</b>						
<b>R1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>R2</b>	0	0	0	0	0	0
<b>a3b4</b>						
<b>R1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>R2</b>	0	0	0	0	0	0
<b>a3b5</b>						
<b>R1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>R2</b>	0	0	0	0	0	0
<b>a3b6</b>						
<b>R1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>R2</b>	0	0	0	0	0	0
<b>a3b7</b>						
<b>R1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>R2</b>	0	0	0	0	0	0

Elaborado por: Gabriela Yáñez

**Tabla A-10. Promedios de los porcentajes de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* frente a cada tratamiento a las 24 y 48 horas de incubación (%).**

	24 h		48 h	
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
<b>a0b0</b>	0	0	0	0
<b>a0b1</b>	25	25	0	0
<b>a0b2</b>	0	0	0	0
<b>a0b3</b>	25	50	25	50
<b>a0b4</b>	75	50	50	25
<b>a0b5</b>	50	50	25	25
<b>a0b6</b>	100	100	100	100
<b>a0b7</b>	100	100	100	100
<b>a1b0</b>	25	25	0	0
<b>a1b1</b>	25	25	0	0
<b>a1b2</b>	0	25	0	0
<b>a1b3</b>	25	25	0	0
<b>a1b4</b>	75	50	50	50
<b>a1b5</b>	25	0	0	0
<b>a1b6</b>	100	100	75	75
<b>a1b7</b>	75	75	75	50
<b>a2b0</b>	0	0	0	0
<b>a2b1</b>	0	0	0	0
<b>a2b2</b>	25	25	25	25
<b>a2b3</b>	0	0	0	0
<b>a2b4</b>	0	0	0	0
<b>a2b5</b>	0	0	0	0
<b>a2b6</b>	0	0	0	0
<b>a2b7</b>	0	0	0	0
<b>a3b0</b>	25	25	25	25
<b>a3b1</b>	0	0	0	0
<b>a3b2</b>	0	0	0	0
<b>a3b3</b>	0	0	0	0
<b>a3b4</b>	0	0	0	0
<b>a3b5</b>	25	25	25	25
<b>a3b6</b>	0	0	0	0
<b>a3b7</b>	75	75	75	75

Elaborado por: Gabriela Yáñez



**Tabla A-11. Promedios de los porcentajes de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* frente a cada tratamiento a las 48 y 72 horas de incubación (%).**

	48 h		72 h	
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
<b>a0b0</b>	25	25	25	25
<b>a0b1</b>	25	25	25	25
<b>a0b2</b>	50	50	50	50
<b>a0b3</b>	37,5	25	25	25
<b>a0b4</b>	75	75	50	50
<b>a0b5</b>	50	25	25	25
<b>a0b6</b>	100	100	100	100
<b>a0b7</b>	100	100	100	100
<b>a1b0</b>	25	25	25	25
<b>a1b1</b>	25	25	25	25
<b>a1b2</b>	25	25	25	25
<b>a1b3</b>	25	25	25	25
<b>a1b4</b>	50	50	25	25
<b>a1b5</b>	25	25	25	25
<b>a1b6</b>	0	25	0	0
<b>a1b7</b>	50	50	25	25
<b>a2b0</b>	0	0	0	0
<b>a2b1</b>	0	0	0	0
<b>a2b2</b>	0	0	0	0
<b>a2b3</b>	0	0	0	0
<b>a2b4</b>	0	0	0	0
<b>a2b5</b>	0	0	0	0
<b>a2b6</b>	25	0	0	0
<b>a2b7</b>	0	0	0	0
<b>a3b0</b>	0	0	0	0
<b>a3b1</b>	0	0	0	0
<b>a3b2</b>	0	0	0	0
<b>a3b3</b>	0	0	0	0
<b>a3b4</b>	0	0	0	0
<b>a3b5</b>	0	0	0	0
<b>a3b6</b>	0	0	0	0
<b>a3b7</b>	0	0	0	0

Elaborado por: Gabriela Yáñez

**Tabla A-12. Conteo de las siembras de *Escherichia coli* en medio Chromocult y Petrifilm para las diluciones 1/10<sup>3</sup> y 1/10<sup>2</sup>.**

	Dilución 10 <sup>-3</sup> (UFC)			Dilución 10 <sup>-2</sup> (UFC)		
	Siembra 1	Siembra 2	Promedio	Siembra 1	Siembra 2	Promedio
Chromocult	82	68	75	11	5	8
Petrifilm	45	45	45	8	8	8

Elaborado por: Gabriela Yáñez

**Tabla A-13. Conteo de las siembras de *Candida albicans* en medio PDA y Agar Sabouraud para las diluciones 1/10<sup>3</sup> y 1/10<sup>2</sup>.**

	Dilución 10 <sup>-3</sup> (UFC)			Dilución 10 <sup>-2</sup> (UFC)		
	Siembra 1	Siembra 2	Promedio	Siembra 1	Siembra 2	Promedio
PDA	9	19	14	1	2	1,5
Agar Sabouraud	14	14	14	0	0	0

Elaborado por: Gabriela Yáñez

**Tabla A-14. Valores de humedad de las especies vegetales después del proceso de secado para la segunda etapa.**

Especie Vegetal	Humedad (%)					
	Réplica 1			Réplica 2		
	Lectura 1	Lectura 2	Promedio	Lectura 1	Lectura 2	Promedio
Paico	12,402	13,004	12,703	13,349	13,872	13,611
Tomillo	15,392	15,529	15,461	14,284	13,92	14,102

Elaborado por: Gabriela Yáñez

**Tabla A-15. Valores de pH de los extractos vegetales para la segunda etapa.**

	Réplica 1			Réplica 2		
	Lectura 1	Lectura 2	Promedio	Lectura 1	Lectura 2	Promedio
Agua potable	7,59	7,6	7,60	7,41	7,39	7,40
Agua destilada	7,05	7,06	7,06	6,98	7,01	7,00
Etanol	7,8	7,82	7,81	7,85	7,84	7,85
a0	5,92	5,94	5,93	6,15	6,17	6,16
a1	5,27	5,25	5,26	5,09	5,05	5,07

Elaborado por: Gabriela Yáñez

**Tabla A-16. Valores de conductividad eléctrica de los extractos vegetales para la segunda etapa.**

	Conductividad eléctrica ( $\mu\text{S/cm}$ )					
	Réplica 1			Réplica 2		
	Lectura 1	Lectura 2	Promedio	Lectura 1	Lectura 2	Promedio
<b>Agua potable</b>	172,40	172,00	172,20	182,30	179,90	181,10
<b>Agua destilada</b>	8,61	8,60	8,61	7,55	7,65	7,60
<b>Etanol</b>	0,62	0,65	0,64	0,59	0,63	0,61
<b>a0</b>	298,00	299,00	299,00	288,00	287,00	288,00
<b>a1</b>	90,90	91,10	91,00	87,70	85,50	87,00





Elaborado por: Gabriela Yáñez

**Tabla A-17. Valores de concentración de los extractos vegetales para la segunda etapa.**

	Concentración (mg/l)					
	Replica 1			Replica 2		
	Lectura 1	Lectura 2	Promedio	Lectura 1	Lectura 2	Promedio
<b>a0</b>	28100	28800	28450	30900	30200	30550
<b>a1</b>	56100	55700	55900	76500	75800	76150

Elaborado por: Gabriela Yáñez

**Tabla A-18. Colores de los extractos vegetales para la segunda etapa.**

	Color	
	Réplica 1	Réplica 2
<b>a0</b>	 473 Gulf Red	 489 Leaf Brown
<b>a1</b>	 241 Dark Green	 224 Deep Bronze Green

Elaborado por: Gabriela Yáñez

#### **Factores y niveles de estudio**

<b>Factor</b>	<b>Niveles</b>
<b>A. Tratamiento</b>	a0 Tratamiento 1
	a1 Tratamiento 2
<b>B. Concentración</b>	c0 100 mg/l
	c1 250 mg/l
	c2 500 mg/l
	c3 1000 mg/l
	c4 2500 mg/l
	c5 5000 mg/l

Elaborado por: Gabriela Yáñez

Tabla A-19. Crecimiento de *Escherichia coli* frente a los diferentes tratamientos más eficaces a diferentes concentraciones.

	24 h		48 h	
	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 1	Lectura 2
<b>a0b0 R1</b>	++++	++++	++++	++++
<b>R2</b>	++++	++++	++++	++++
<b>a0b1</b>				
<b>R1</b>	++++	++++	++++	++++
<b>R2</b>	++++	++++	++++	++++
<b>a0b2</b>				
<b>R1</b>	++++	++++	++++	++++
<b>R2</b>	++++	++++	++++	++++
<b>a0b3</b>				
<b>R1</b>	++++	++++	++++	++++
<b>R2</b>	++++	++++	++++	++++
<b>a0b4</b>				
<b>R1</b>	-	-	-	-
<b>R2</b>	-	-	-	-
<b>a0b5</b>				
<b>R1</b>	-	-	-	-
<b>R2</b>	-	-	-	-
<b>a1b0</b>				
<b>R1</b>	++++	++++	++++	++++
<b>R2</b>	++++	++++	++++	++++
<b>a1b1</b>				
<b>R1</b>	++++	++++	++++	++++
<b>R2</b>	++++	++++	++++	++++
<b>a1b2</b>				
<b>R1</b>	++++	++++	++++	++++
<b>R2</b>	++++	++++	++++	++++
<b>a1b3</b>				
<b>R1</b>	++++	++++	++++	++++
<b>R2</b>	++++	++++	++++	++++
<b>a1b4</b>				
<b>R1</b>	+++	+++	+++	+++
<b>R2</b>	+++	+++	+++	+++
<b>a1b5</b>				
<b>R1</b>	-	-	+	+
<b>R2</b>	+	-	+	+

Elaborado por: Gabriela Yáñez

**Tabla A-20. Porcentajes de inhibición de *Escherichia coli* frente a los diferentes tratamientos más eficaces a diferentes concentraciones.**

	24 h			48 h		
	Lectura 1	Lectura 2	Promedio	Lectura 1	Lectura 2	Promedio
<b>a0b0 R1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>R2</b>	0	0	0	0	0	0
<b>a0b1</b>						
<b>R1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>R2</b>	0	0	0	0	0	0
<b>a0b2</b>						
<b>R1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>R2</b>	0	0	0	0	0	0
<b>a0b3</b>						
<b>R1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>R2</b>	0	0	0	0	0	0
<b>a0b4</b>						
<b>R1</b>	100	100	100	100	100	100
<b>R2</b>	100	100	100	100	100	100
<b>a0b5</b>						
<b>R1</b>	100	100	100	100	100	100
<b>R2</b>	100	100	100	100	100	100
<b>a1b0</b>						
<b>R1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>R2</b>	0	0	0	0	0	0
<b>a1b1</b>						
<b>R1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>R2</b>	0	0	0	0	0	0
<b>a1b2</b>						
<b>R1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>R2</b>	0	0	0	0	0	0
<b>a1b3</b>						
<b>R1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>R2</b>	0	0	0	0	0	0
<b>a1b4</b>						
<b>R1</b>	25	25	25	25	25	25
<b>R2</b>	25	25	25	25	25	25
<b>a1b5</b>						
<b>R1</b>	100	100	100	75	75	75
<b>R2</b>	75	100	87,5	75	75	75

Elaborado por: Gabriela Yáñez

Tabla A-21. Crecimiento de *Candida albicans* *Escherichia coli* frente a los diferentes tratamientos más eficaces a diferentes concentraciones.

	48 h		72 h	
	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 1	Lectura 2
<b>a0b0 R1</b>	++++	++++	++++	++++
<b>R2</b>	++++	++++	++++	++++
<b>a0b1</b>				
<b>R1</b>	++++	++++	++++	++++
<b>R2</b>	++++	++++	++++	++++
<b>a0b2</b>				
<b>R1</b>	+++	+++	+++	+++
<b>R2</b>	+++	+++	+++	+++
<b>a0b3</b>				
<b>R1</b>	+++	+++	+++	+++
<b>R2</b>	+++	+++	+++	+++
<b>a0b4</b>				
<b>R1</b>	-	-	-	-
<b>R2</b>	-	-	-	-
<b>a0b5</b>				
<b>R1</b>	-	-	-	-
<b>R2</b>	-	-	-	-
<b>a1b0</b>				
<b>R1</b>	++++	++++	++++	++++
<b>R2</b>	++++	++++	++++	++++
<b>a1b1</b>				
<b>R1</b>	++++	++++	++++	++++
<b>R2</b>	++++	++++	++++	++++
<b>a1b2</b>				
<b>R1</b>	++	++	+++	+++
<b>R2</b>	+++	+++	+++	+++
<b>a1b3</b>				
<b>R1</b>	++	++	++	++
<b>R2</b>	++	++	++	++
<b>a1b4</b>				
<b>R1</b>	-	-	+	+
<b>R2</b>	+	+	+	+
<b>a1b5</b>				
<b>R1</b>	-	-	+	+
<b>R2</b>	-	-	+	+

Elaborado por: Gabriela Yáñez

**Tabla A-22. Porcentajes de inhibición de *Candida albicans* frente a los diferentes tratamientos más eficaces a diferentes concentraciones.**

	48 h			72 h		
	Lectura 1	Lectura 2	Promedio	Lectura 1	Lectura 2	Promedio
<b>a0b0 R1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>R2</b>	0	0	0	0	0	0
<b>a0b1</b>						
<b>R1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>R2</b>	0	0	0	0	0	0
<b>a0b2</b>						
<b>R1</b>	25	25	25	25	25	25
<b>R2</b>	25	25	25	25	25	25
<b>a0b3</b>						
<b>R1</b>	25	25	25	25	25	25
<b>R2</b>	25	25	25	25	25	25
<b>a0b4</b>						
<b>R1</b>	100	100	100	100	100	100
<b>R2</b>	100	100	100	100	100	100
<b>a0b5</b>						
<b>R1</b>	100	100	100	100	100	100
<b>R2</b>	100	100	100	100	100	100
<b>a1b0</b>						
<b>R1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>R2</b>	0	0	0	0	0	0
<b>a1b1</b>						
<b>R1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>R2</b>	0	0	0	0	0	0
<b>a1b2</b>						
<b>R1</b>	50	50	50	25	25	25
<b>R2</b>	25	25	25	25	25	25
<b>a1b3</b>						
<b>R1</b>	50	50	50	50	50	50
<b>R2</b>	50	50	50	50	50	50
<b>a1b4</b>						
<b>R1</b>	100	100	100	75	75	75
<b>R2</b>	75	75	75	75	75	75
<b>a1b5</b>						
<b>R1</b>	100	100	100	75	75	75
<b>R2</b>	100	100	100	75	75	75

Elaborado por: Gabriela Yáñez

**Tabla A-23. Promedio de los porcentajes de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* frente a cada tratamiento a las 24 y 48 horas de incubación (%).**

	24 h		48 h	
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
a0b0	0	0	0	0
a0b1	0	0	0	0
a0b2	0	0	0	0
a0b3	0	0	0	0
a0b4	100	100	100	100
a0b5	100	100	100	100
a1b0	0	0	0	0
a1b1	0	0	0	0
a1b2	0	0	0	0
a1b3	0	0	0	0
a1b4	25	25	25	25
a1b5	100	87,5	75	75

Elaborado por: Gabriela Yáñez

**Tabla A-24. Promedio de los porcentajes de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* frente a cada tratamiento a las 24 y 48 horas de incubación (%).**

	48 h		72 h	
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
a0b0	0	0	0	0
a0b1	0	0	0	0
a0b2	25	25	25	25
a0b3	25	25	25	25
a0b4	100	100	100	100
a0b5	100	100	100	100
a1b0	0	0	0	0
a1b1	0	0	0	0
a1b2	50	25	25	25
a1b3	50	50	50	50
a1b4	100	75	75	75
a1b5	100	75	75	75

Elaborado por: Gabriela Yáñez



Tabla A-25. Caracterización morfológica de los microorganismos

Microorganismo	Macroscópica				Microscópica	
	Color	Forma	Elevación	Margen	Gram	Forma
<i>Eacherichia coli</i>	694 Dove Grey	Circular	Convexa	Entero	-	Bacilos
<i>Candida albicans</i>	352 Pale Cream	Circular	Pulvinada	Entero	+	Ovoidales

Elaborado por: Gabriela Yáñez

Tabla A-26. Caracterización bioquímica de los microorganismos

M.O.	Lisina	Ornitina	H <sub>2</sub> S	Glucosa	Manitol	Xilosa	ONPG	Indol	Uresasa	V.P.	Citrato	TDA	Gelatina	Malonato	Inositol	Sorbitol	Ramnosa	Sucrosa	Lactosa	Arabinosa	Adonitol	Rafinosa	Salicina	Arginina
<i>E. coli</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-
<i>C. albicans</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Elaborado por: Gabriela Yáñez

**ANEXO B**  
**ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

**A) Identificación del mejor tratamiento por medio de un estudio exploratorio tipo “screening”**

**Tabla B-1. Análisis de Varianza para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales.**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
COVARIABLES					
Replica	9,77	1	9,77	0,19	0,66
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Metodologia	21201,20	3	7067,06	141,09	0,00*
B:Planta	21552,70	7	3078,96	61,47	0,00*
INTERACCIONES					
AB	26064,50	21	1241,16	24,78	0,00*
RESIDUOS	1552,73	31	50,09		
TOTAL (CORREGIDO)	70380,90	63			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual.

\*Diferencia estadísticamente significativa.

**Tabla B-2. Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con intervalos de confianza del 95,0%.**

			<i>Error</i>	<i>Límite</i>	<i>Límite</i>
<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Est.</i>	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>
MEDIA GLOBAL	64	26,95			
Metodologia					
Decoccion	16	15,63	1,77	12,02	19,23
Infusion	16	3,13	1,77	-0,48	6,73
Mac. Alcohol	16	46,88	1,77	43,27	50,48
Mac. hexano	16	42,19	1,77	38,58	45,80
Planta					
Albahaca	8	12,50	2,50	7,40	17,60
Ambo	8	12,50	2,50	7,40	17,60
Guayaba	8	9,38	2,50	4,27	14,48

Hierba luisa	8	15,63	2,50	10,52	20,73
Matico	8	31,25	2,50	26,15	36,35
Ortiga	8	21,88	2,50	16,77	26,98
Paico	8	50,00	2,50	44,90	55,10
Tomillo	8	62,50	2,50	57,40	67,60
Metodologia por Planta					
Decoccion,Albahaca	2	25,00	5,00	14,79	35,21
Decoccion,Ambo	2	0,00	5,00	-10,21	10,21
Decoccion,Guayaba	2	0,00	5,00	-10,21	10,21
Decoccion,Hierba luisa	2	0,00	5,00	-10,21	10,21
Decoccion,Matico	2	0,00	5,00	-10,21	10,21
Decoccion,Ortiga	2	25,00	5,00	14,79	35,21
Decoccion,Paico	2	0,00	5,00	-10,21	10,21
Decoccion,Tomillo	2	75,00	5,00	64,79	85,21
Infusion,Albahaca	2	0,00	5,00	-10,21	10,21
Infusion,Ambo	2	0,00	5,00	-10,21	10,21
Infusion,Guayaba	2	25,00	5,00	14,79	35,21
Infusion,Hierba luisa	2	0,00	5,00	-10,21	10,21
Infusion,Matico	2	0,00	5,00	-10,21	10,21
Infusion,Ortiga	2	0,00	5,00	-10,21	10,21
Infusion,Paico	2	0,00	5,00	-10,21	10,21
Infusion,Tomillo	2	0,00	5,00	-10,21	10,21
Mac. Alcohol,Albahaca	2	0,00	5,00	-10,21	10,21
Mac. Alcohol,Ambo	2	25,00	5,00	14,79	35,21
Mac. Alcohol,Guayaba	2	0,00	5,00	-10,21	10,21
Mac. Alcohol,Hierba luisa	2	37,50	5,00	27,29	47,71
Mac. Alcohol,Matico	2	62,50	5,00	52,29	72,71
Mac. Alcohol,Ortiga	2	50,00	5,00	39,79	60,21
Mac. Alcohol,Paico	2	100,00	5,00	89,79	110,21
Mac. Alcohol,Tomillo	2	100,00	5,00	89,79	110,21
Mac. hexano,Albahaca	2	25,00	5,00	14,79	35,21
Mac. hexano,Ambo	2	25,00	5,00	14,79	35,21
Mac. hexano,Guayaba	2	12,50	5,00	2,29	22,71
Mac. hexano,Hierba luisa	2	25,00	5,00	14,79	35,21
Mac. hexano,Matico	2	62,50	5,00	52,29	72,71
Mac. hexano,Ortiga	2	12,50	5,00	2,29	22,71
Mac. hexano,Paico	2	100,00	5,00	89,79	110,21
Mac. hexano,Tomillo	2	75,00	5,00	64,79	85,21

**Tabla B-3. Prueba de Tukey – para el Factor A (Factor A: metodología de obtención de los extractos vegetales) para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.**

<i>Metodología</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Infusion	16	3,13	1,77	A
Decoccion	16	15,63	1,77	B
Mac. hexano	16	42,19	1,77	C
Mac. Alcohol	16	46,88	1,77	C

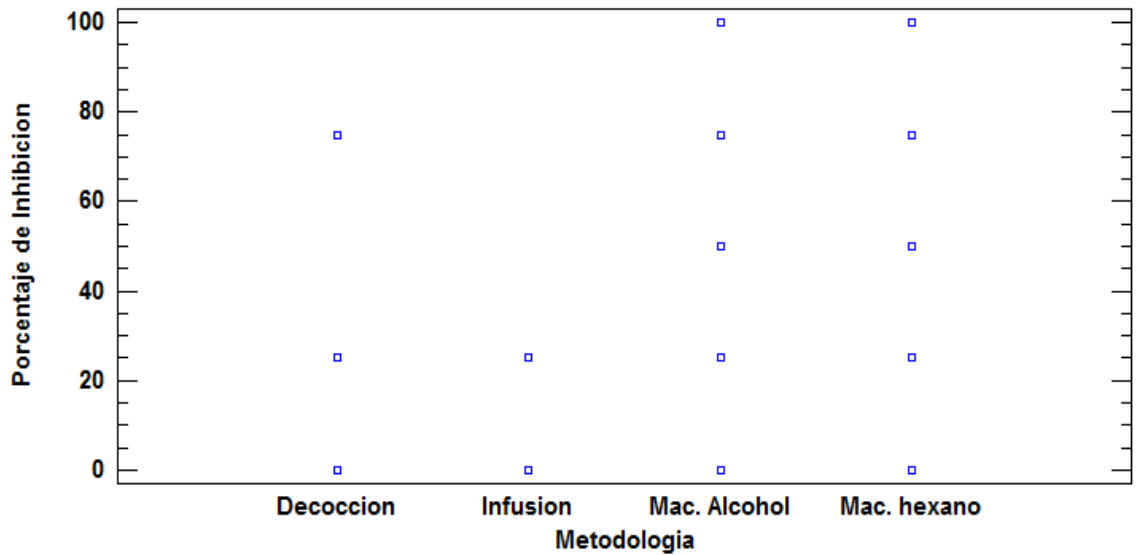
**Tabla B-4. Prueba de Tukey – para el Factor B (Factor B: Especie vegetal) para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.**

<i>Planta</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Guayaba	8	9,38	2,50	A
Ambo	8	12,50	2,50	AB
Albahaca	8	12,50	2,50	AB
Hierba luisa	8	15,63	2,50	AB
Ortiga	8	21,88	2,50	BC
Matico	8	31,25	2,50	C
Paico	8	50,00	2,50	D
Tomillo	8	62,50	2,50	E

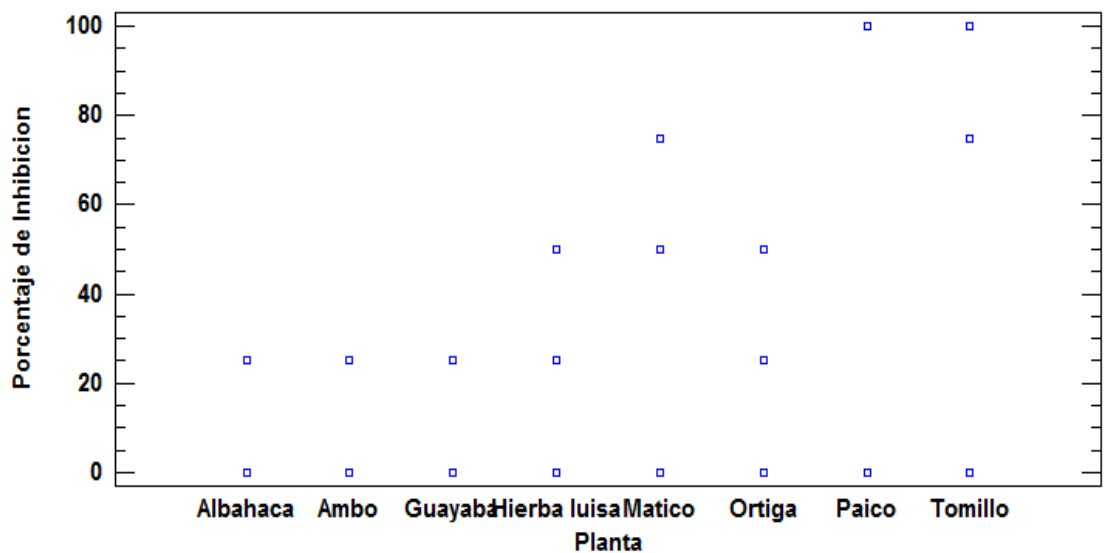
**Tabla B-5. Prueba de Tukey – para la interacción AXB para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.**

Metodología	Planta	Media LS	Casos	Sigma LS	Grupos Homogéneos
MacAlcohol	Albahaca	-3,41	2	5,79	A
MacAlcohol	Guayaba	-2,97	2	5,77	A
MacHexano	Ortiga	-0,55	2	5,71	A
Decoccion	Albahaca	0,11	2	5,71	A
Decoccion	Ambo	0,33	2	5,71	A
Decoccion	HierbaLuisa	0,77	2	5,71	A
Decoccion	Matico	0,99	2	5,72	A
Decoccion	Ortiga	1,21	2	5,72	A
Decoccion	Paico	1,43	2	5,72	A
Decoccion	Tomillo	1,65	2	5,73	A B
Infusion	Ambo	2,09	2	5,74	A B C
Infusion	Guayaba	2,31	2	5,75	A B C
Infusion	HierbaLuisa	2,53	2	5,76	A B C
Infusion	Matico	2,75	2	5,76	A B C
Infusion	Paico	3,19	2	5,78	A B C
MacAlcohol	Ambo	9,31	2	5,78	A B C
MacHexano	Albahaca	10,85	2	5,73	A B C
MacHexano	Ambo	11,07	2	5,72	A B C
MacHexano	Guayaba	11,29	2	5,72	A B C
MacHexano	HierbaLuisa	11,51	2	5,72	A B C
Decoccion	Guayaba	25,55	2	5,71	A B C D
Infusion	Albahaca	26,87	2	5,74	A B C D
Infusion	Ortiga	27,97	2	5,77	A B C D
MacAlcohol	Matico	34,97	2	5,76	B C D E
MacAlcohol	Ortiga	35,19	2	5,75	C D E
MacAlcohol	HierbaLuisa	47,25	2	5,76	D E F
MacHexano	Matico	49,23	2	5,71	D E F
MacHexano	Tomillo	62,39	2	5,71	E F G
Infusion	Tomillo	78,41	2	5,79	F G H
MacHexano	Paico	87,17	2	5,71	G H
MacAlcohol	Paico	97,91	2	5,74	I
MacAlcohol	Tomillo	98,13	2	5,74	I

**Gráfico B-1. Dispersión entre la metodología y el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.**



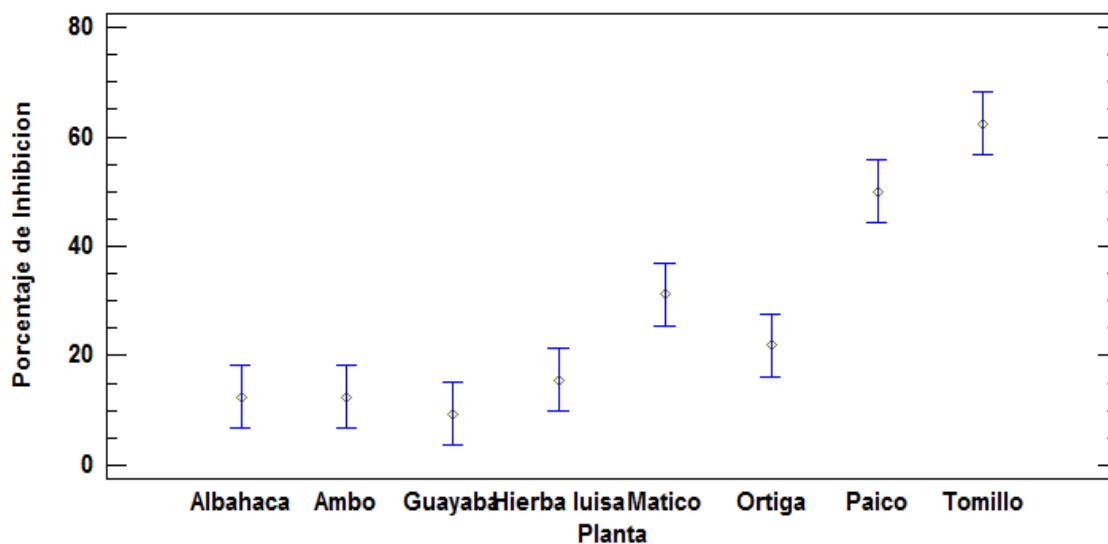
**Gráfico B-2. Dispersión entre la planta medicinal y el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.**



**Gráfico B-3. Medias de la metodología para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.**

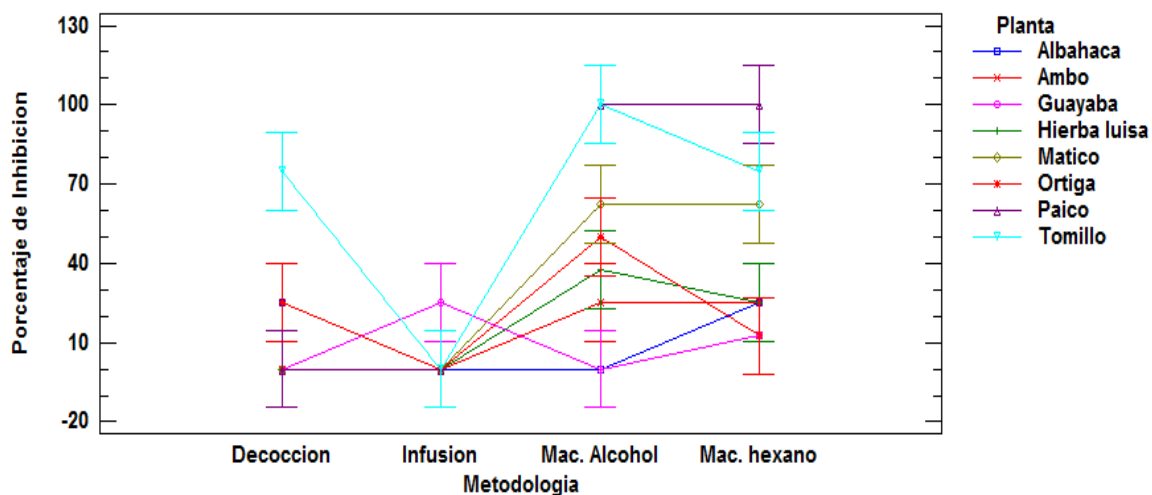


**Gráfico B-4. Medias de las plantas medicinales para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.**





**Gráfico B-5. Interacción entre los factores para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0% de Tuckey.**



**Tabla B-6. Análisis de Varianza para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
COVARIABLES					
Replica	9,77	1	9,77	0,33	0,57
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Planta	24521,50	7	3503,07	117,05	0,00*
B:Metodologia	9951,17	3	3317,06	110,84	0,00*
INTERACCIONES					
AB	26064,50	21	1241,16	41,47	0,00*
RESIDUOS	927,73	31	29,93		
TOTAL (CORREGIDO)	61474,60	63			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual.

**\*Diferencia estadísticamente significativa.**

**Tabla B-7. Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con intervalos de confianza del 95,0%.**

			<i>Error</i>	<i>Límite</i>	<i>Límite</i>
<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Est.</i>	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>
MEDIA GLOBAL	64	19,92			
Planta					
Albahaca	8	6,25	1,93	2,31	10,19
Ambo	8	0,00	1,93	-3,94	3,94
Guayaba	8	6,25	1,93	2,31	10,19
Hierba luisa	8	9,38	1,93	5,43	13,32
Matico	8	21,88	1,93	17,93	25,82
Ortiga	8	12,50	1,93	8,56	16,44
Paico	8	43,75	1,93	39,81	47,69
Tomillo	8	59,38	1,93	55,43	63,32
Metodologia					
Decoccion	16	15,63	1,37	12,84	18,41
Infusion	16	3,13	1,37	0,34	5,91
Mac. Alcohol	16	37,50	1,37	34,71	40,29
Mac. hexano	16	23,44	1,37	20,65	26,23
Planta por Metodologia					
Albahaca,Decoccion	2	25,00	3,87	17,11	32,89
Albahaca,Infusion	2	0,00	3,87	-7,89	7,89
Albahaca,Mac. Alcohol	2	0,00	3,87	-7,89	7,89
Albahaca,Mac. hexano	2	0,00	3,87	-7,89	7,89
Ambo,Decoccion	2	0,00	3,87	-7,89	7,89
Ambo,Infusion	2	0,00	3,87	-7,89	7,89
Ambo,Mac. Alcohol	2	0,00	3,87	-7,89	7,89
Ambo,Mac. hexano	2	0,00	3,87	-7,89	7,89
Guayaba,Decoccion	2	0,00	3,87	-7,89	7,89
Guayaba,Infusion	2	25,00	3,87	17,11	32,89
Guayaba,Mac. Alcohol	2	0,00	3,87	-7,89	7,89
Guayaba,Mac. hexano	2	0,00	3,87	-7,89	7,89
Hierba luisa,Decoccion	2	0,00	3,87	-7,89	7,89
Hierba luisa,Infusion	2	0,00	3,87	-7,89	7,89
Hierba luisa,Mac. Alcohol	2	37,50	3,87	29,61	45,39
Hierba luisa,Mac. hexano	2	0,00	3,87	-7,89	7,89
Matico,Decoccion	2	0,00	3,87	-7,89	7,89
Matico,Infusion	2	0,00	3,87	-7,89	7,89
Matico,Mac. Alcohol	2	37,50	3,87	29,61	45,39
Matico,Mac. hexano	2	50,00	3,87	42,11	57,89
Ortiga,Decoccion	2	25,00	3,87	17,11	32,89
Ortiga,Infusion	2	0,00	3,87	-7,89	7,89

Ortiga,Mac. Alcohol	2	25,00	3,87	17,11	32,89
Ortiga,Mac. hexano	2	0,00	3,87	-7,89	7,89
Paico,Decoccion	2	0,00	3,87	-7,89	7,89
Paico,Infusion	2	0,00	3,87	-7,89	7,89
Paico,Mac. Alcohol	2	100,00	3,87	92,11	107,89
Paico,Mac. hexano	2	75,00	3,87	67,11	82,89
Tomillo,Decoccion	2	75,00	3,87	67,11	82,89
Tomillo,Infusion	2	0,00	3,87	-7,89	7,89
Tomillo,Mac. Alcohol	2	100,00	3,87	92,11	107,89
Tomillo,Mac. hexano	2	62,50	3,87	54,61	70,39

**Tabla B-8. Prueba de Tukey – para el Factor A (Factor A: metodología de obtención de los extractos vegetales) para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.**

<i>Metodologia</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Infusion	16	3,13	1,37	A
Decoccion	16	15,63	1,37	B
Mac. hexano	16	23,44	1,37	C
Mac. Alcohol	16	37,50	1,37	D

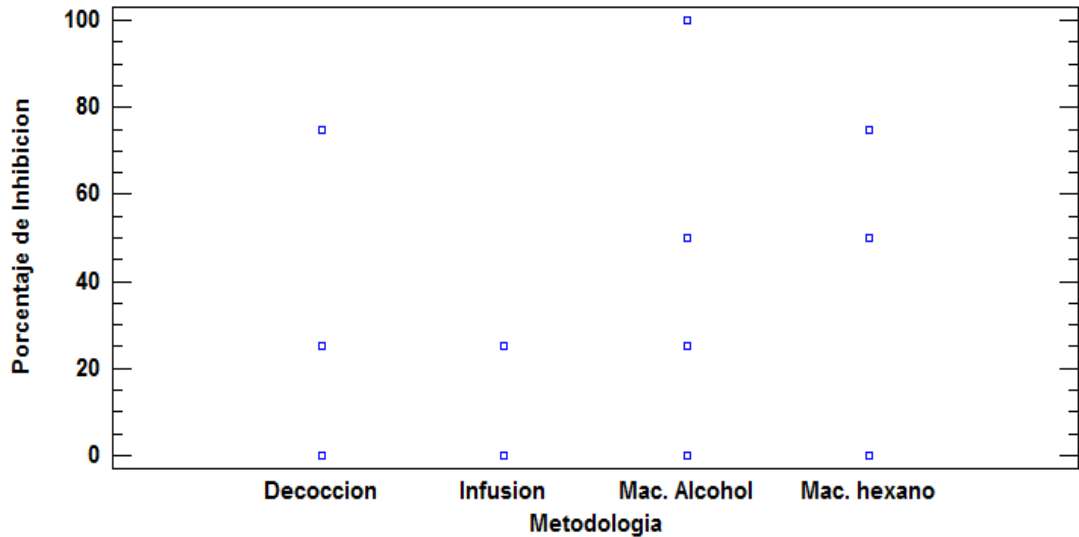
**Tabla B-9. Prueba de Tukey – para el Factor B (Factor B: Especie vegetal) para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.**

<i>Planta</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Ambo	8	0,00	1,93	A
Guayaba	8	6,25	1,93	AB
Albahaca	8	6,25	1,93	AB
Hierba luisa	8	9,38	1,93	B
Ortiga	8	12,50	1,93	B
Matico	8	21,88	1,93	C
Paico	8	43,75	1,93	D
Tomillo	8	59,38	1,93	E

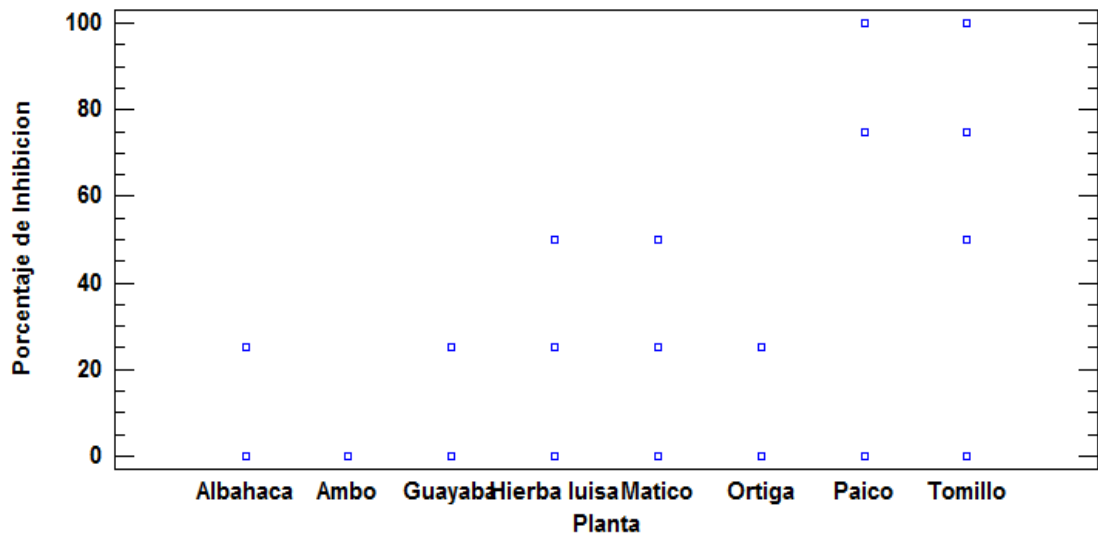
**Tabla B-10. Prueba de Tukey – para la interacción AXB para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.**

<i>Metodología</i>	<i>Planta</i>	<i>Media LS</i>	<i>Casos</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
MacAlcohol	Albahaca	-0,39	2	3,93	A
MacAlcohol	Ambo	-0,37	2	3,92	A
MacAlcohol	Guayaba	-0,34	2	3,91	A
MacHexano	Albahaca	-0,20	2	3,88	A
MacHexano	Ambo	-0,17	2	3,88	A
MacHexano	Guayaba	-0,15	2	3,88	A
MacHexano	HierbaLuisa	-0,12	2	3,87	A
MacHexano	Ortiga	-0,07	2	3,87	A
Decoccion	Albahaca	0,00	2	3,87	A
Decoccion	Ambo	0,02	2	3,87	A
Decoccion	HierbaLuisa	0,07	2	3,87	A
Decoccion	Matico	0,10	2	3,87	A
Decoccion	Ortiga	0,12	2	3,87	A
Decoccion	Paico	0,15	2	3,88	A
Infusion	Tomillo	0,17	2	3,88	A
Infusion	Ambo	0,22	2	3,89	A
Infusion	Guayaba	0,24	2	3,89	A
Infusion	HierbaLuisa	0,27	2	3,90	A
Infusion	Matico	0,29	2	3,90	A
Infusion	Paico	0,34	2	3,91	A
MacAlcohol	Ortiga	24,73	2	3,90	B
Decoccion	Guayaba	25,05	2	3,87	B
Infusion	Albahaca	25,20	2	3,88	B
Infusion	Ortiga	25,32	2	3,91	B
MacAlcohol	HierbaLuisa	37,18	2	3,91	B C
MacAlcohol	Matico	37,21	2	3,90	B C
MacHexano	Matico	49,90	2	3,87	C D
MacHexano	Tomillo	62,48	2	3,87	D E
MacHexano	Paico	74,95	2	3,87	E
Decoccion	Tomillo	75,37	2	3,92	E
MacAlcohol	Paico	99,76	2	3,89	F
MacAlcohol	Tomillo	99,78	2	3,89	F

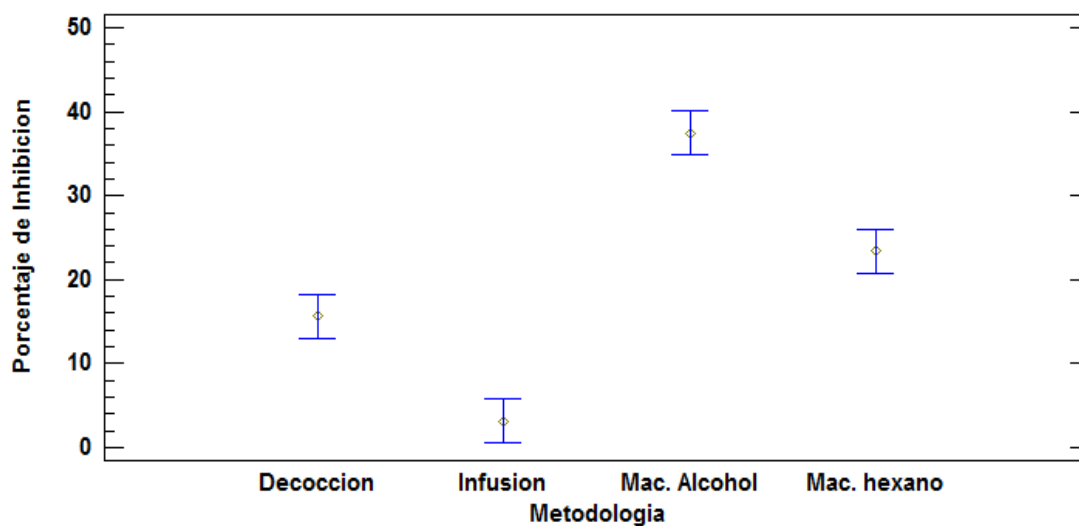
**Gráfico B-6.** Dispersión entre la metodología y el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.



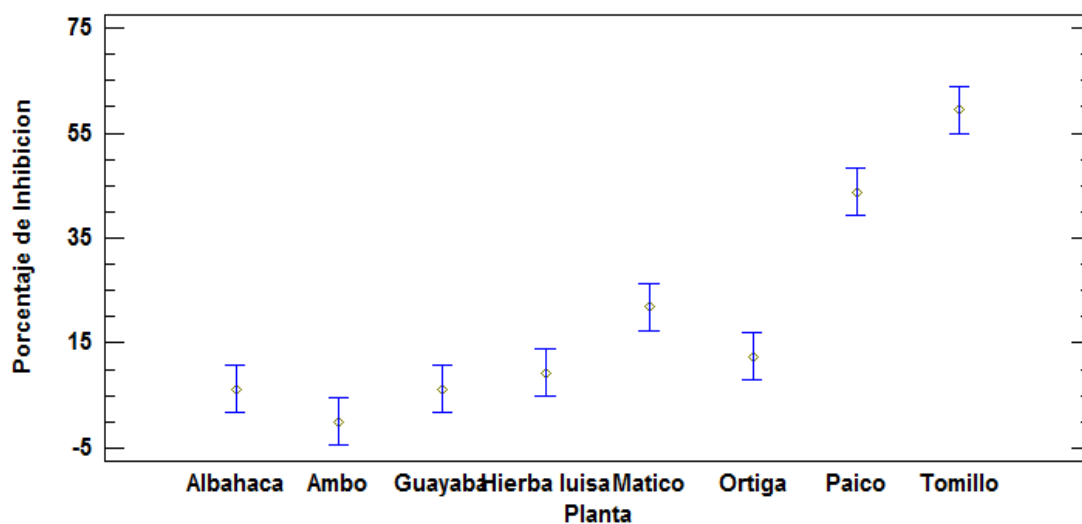
**Gráfico B-7.** Dispersión entre la planta medicinal y el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.



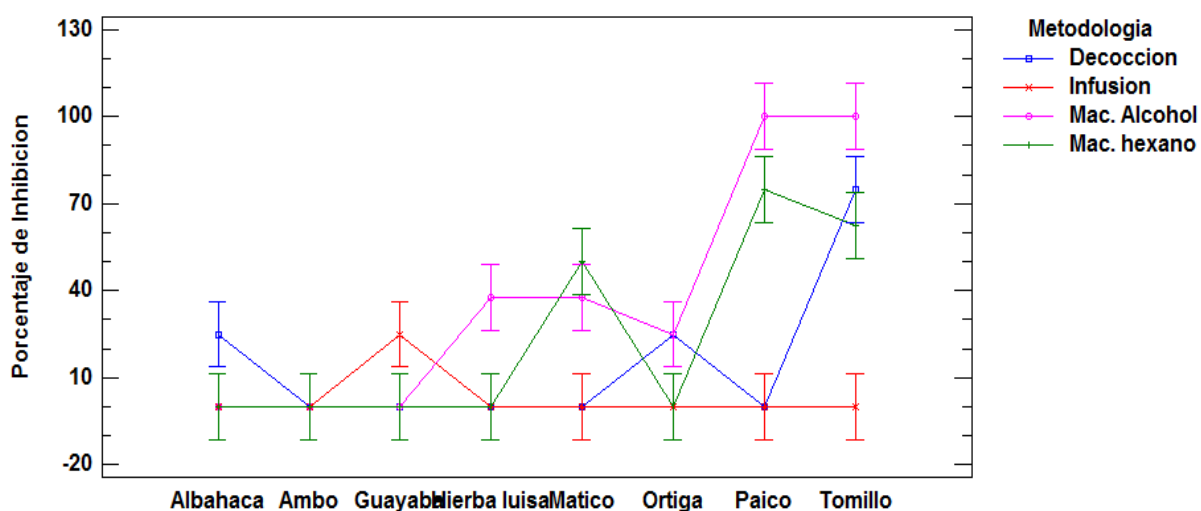
**Gráfico B-8. Medias de la metodología para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.**



**Gráfico B-9. Medias de las plantas medicinales para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.**



**Gráfico B-10. Interacción entre los factores para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0% de Tuckey.**



**Tabla B-11. Análisis de Varianza para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>COVARIABLES</b>					
Replica	21,97	1	21,97	1,85	0,18
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Metodologia	32077,60	3	10692,50	899,14	0,00*
B:Planta	9392,09	7	1341,73	112,83	0,00*
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	10715,30	21	510,25	42,91	0,00*
RESIDUOS	368,65	31	11,89		
TOTAL (CORREGIDO)	52575,70	63			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual.

\*Diferencia estadísticamente significativa.

**Tabla B-12. Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con intervalos de confianza del 95,0%.**

			<i>Error</i>	<i>Límite</i>	<i>Límite</i>
<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Est.</i>	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>
MEDIA GLOBAL	64	21,68			
Metodología					
Decoccion	16	0,00	0,86	-1,76	1,76
Infusion	16	1,56	0,86	-0,20	3,32
Mac. Alcohol	16	53,91	0,86	52,15	55,66
Mac. hexano	16	31,25	0,86	29,49	33,01
Planta					
Albahaca	8	12,50	1,22	10,01	14,99
Ambo	8	12,50	1,22	10,01	14,99
Guayaba	8	18,75	1,22	16,26	21,24
Hierba luisa	8	14,06	1,22	11,58	16,55
Matico	8	31,25	1,22	28,76	33,74
Ortiga	8	6,25	1,22	3,76	8,74
Paico	8	40,63	1,22	38,14	43,11
Tomillo	8	37,50	1,22	35,01	39,99
Metodología por Planta					
Decoccion,Albahaca	2	0,00	2,44	-4,97	4,97
Decoccion,Ambo	2	0,00	2,44	-4,97	4,97
Decoccion,Guayaba	2	0,00	2,44	-4,97	4,97
Decoccion,Hierba luisa	2	0,00	2,44	-4,97	4,97
Decoccion,Matico	2	0,00	2,44	-4,97	4,97
Decoccion,Ortiga	2	0,00	2,44	-4,97	4,97
Decoccion,Paico	2	0,00	2,44	-4,97	4,97
Decoccion,Tomillo	2	0,00	2,44	-4,97	4,97
Infusion,Albahaca	2	0,00	2,44	-4,97	4,97
Infusion,Ambo	2	0,00	2,44	-4,97	4,97
Infusion,Guayaba	2	0,00	2,44	-4,97	4,97
Infusion,Hierba luisa	2	0,00	2,44	-4,97	4,97
Infusion,Matico	2	0,00	2,44	-4,97	4,97
Infusion,Ortiga	2	0,00	2,44	-4,97	4,97
Infusion,Paico	2	12,50	2,44	7,53	17,47
Infusion,Tomillo	2	0,00	2,44	-4,97	4,97
Mac. Alcohol,Albahaca	2	25,00	2,44	20,03	29,97
Mac. Alcohol,Ambo	2	25,00	2,44	20,03	29,97
Mac. Alcohol,Guayaba	2	50,00	2,44	45,03	54,97
Mac. Alcohol,Hierba luisa	2	31,25	2,44	26,28	36,22
Mac. Alcohol,Matico	2	75,00	2,44	70,03	79,97
Mac. Alcohol,Ortiga	2	25,00	2,44	20,03	29,97



Mac. Alcohol,Paico	2	100,00	2,44	95,03	104,97
Mac. Alcohol,Tomillo	2	100,00	2,44	95,03	104,97
Mac. hexano,Albahaca	2	25,00	2,44	20,03	29,97
Mac. hexano,Ambo	2	25,00	2,44	20,03	29,97
Mac. hexano,Guayaba	2	25,00	2,44	20,03	29,97
Mac. hexano,Hierba luisa	2	25,00	2,44	20,03	29,97
Mac. hexano,Matico	2	50,00	2,44	45,03	54,97
Mac. hexano,Ortiga	2	0,00	2,44	-4,97	4,97
Mac. hexano,Paico	2	50,00	2,44	45,03	54,97
Mac. hexano,Tomillo	2	50,00	2,44	45,03	54,97

**Tabla B-13. Prueba de Tukey – para el Factor A (Factor A: metodología de obtención de los extractos vegetales) para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.**

<i>Metodologia</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Decoccion	16	0,00	0,86	A
Infusion	16	1,56	0,86	A
Mac. hexano	16	31,25	0,86	B
Mac. Alcohol	16	53,91	0,86	C

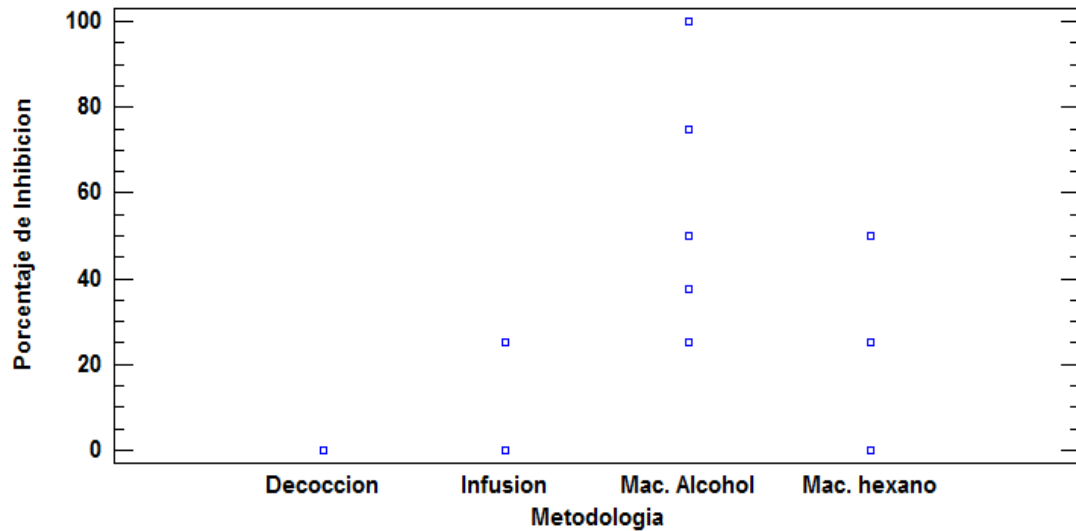
**Tabla B-14. Prueba de Tukey – para el Factor B (Factor B: Especie vegetal) para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.**

<i>Planta</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Ortiga	8	6,25	1,22	A
Ambo	8	12,50	1,22	B
Albahaca	8	12,50	1,22	B
Hierba luisa	8	14,06	1,22	BC
Guayaba	8	18,75	1,22	C
Matico	8	31,25	1,22	D
Tomillo	8	37,50	1,22	E
Paico	8	40,63	1,22	F

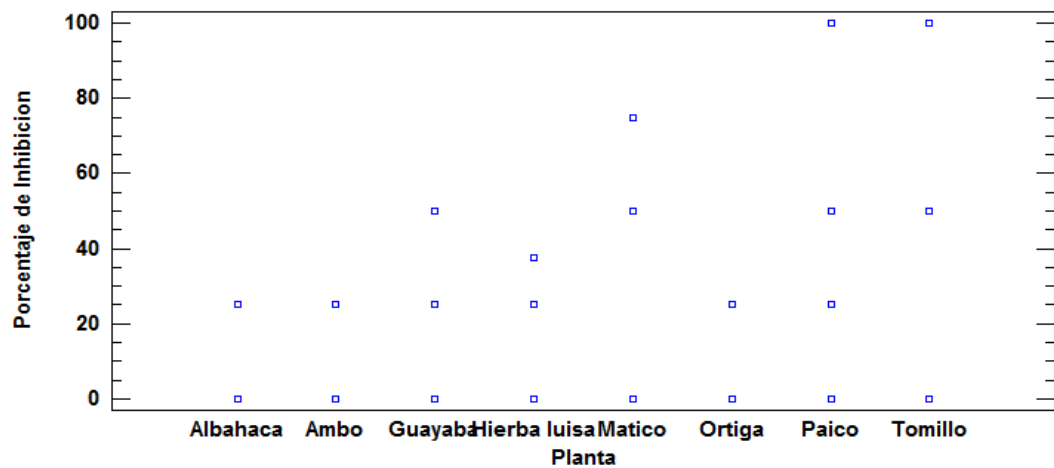
**Tabla B-15. Prueba de Tukey – para la interacción AXB para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.**

<i>Metodología</i>	<i>Planta</i>	<i>Media LS</i>	<i>Casos</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Infusion	Tomillo	-2,95	2	14,10	A
Infusion	Paico	-2,69	2	14,08	A
Infusion	Ortiga	-2,44	2	14,06	A
Infusion	Matico	-2,18	2	14,05	A
Infusion	HierbaLuisa	-1,92	2	14,03	A
Infusion	Guayaba	-1,67	2	14,02	A
Infusion	Ambo	-1,41	2	14,01	A
Infusion	Albahaca	-1,15	2	14,00	A
Decoccion	Ortiga	12,12	2	13,99	A
Decoccion	HierbaLuisa	12,63	2	13,99	A
Decoccion	Guayaba	12,88	2	13,99	A
Decoccion	Ambo	13,14	2	13,99	A
Decoccion	Albahaca	13,40	2	14,00	A
MacAlcohol	Ambo	17,24	2	14,27	A
MacAlcohol	Albahaca	17,50	2	14,31	A
Decoccion	Tomillo	24,10	2	14,00	A B
Decoccion	Matico	24,87	2	13,99	A B
MacHexano	Ortiga	26,67	2	14,02	A B
MacHexano	HierbaLuisa	27,18	2	14,05	A B
MacHexano	Ambo	27,69	2	14,08	A B
MacHexano	Albahaca	27,95	2	14,10	A B
MacAlcohol	Ortiga	28,72	2	14,16	A B
MacAlcohol	Guayaba	29,49	2	14,24	A B
Decoccion	Paico	36,86	2	13,99	A B
MacHexano	Guayaba	39,94	2	14,06	A B
MacAlcohol	HierbaLuisa	47,98	2	14,22	A B
MacAlcohol	Matico	66,47	2	14,19	A B
MacHexano	Tomillo	76,15	2	14,00	A B
MacHexano	Paico	76,41	2	14,01	A B
MacHexano	Matico	76,92	2	14,03	A B
MacAlcohol	Tomillo	103,20	2	14,12	C
MacAlcohol	Paico	103,46	2	14,14	C

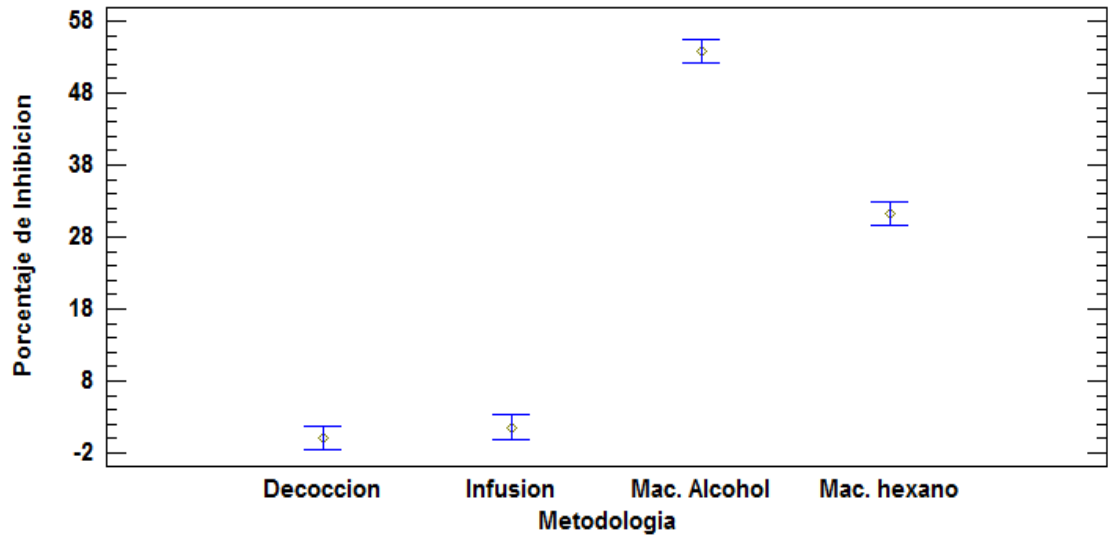
**Gráfico B-11. Dispersión entre la metodología y el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.**



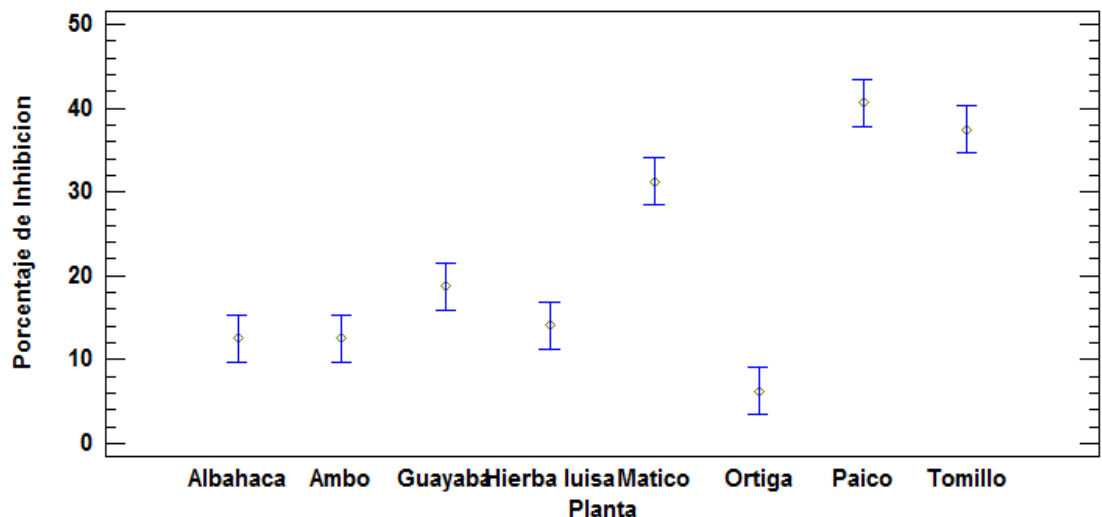
**Gráfico B-12. Dispersión entre la planta medicinal y el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.**



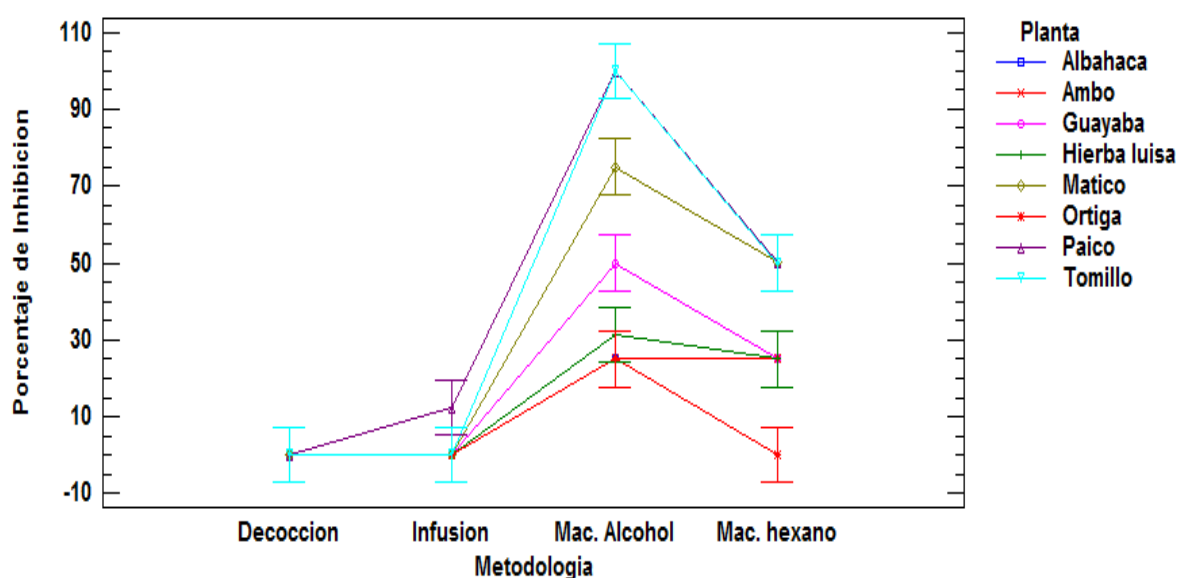
**Gráfico B-13. Medias de la metodología para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.**



**Gráfico B-14. Medias de las plantas medicinales para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.**



**Gráfico B-15. Interacción entre los factores para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0% de Tuckey.**



**Tabla B-16. Análisis de Varianza para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-F
<b>COVARIABLES</b>					
Replica	9,77	1	9,77	1,00	0,33
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Metodologia	28701,20	3	9567,06	979,67	0,00*
B:Planta	5927,73	7	846,82	86,71	0,00*
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	10283,20	21	489,67	50,14	0,00*
<b>RESIDUOS</b>					
TOTAL (CORREGIDO)	45224,60	63			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual.

\*Diferencia estadísticamente significativa.

**Tabla B-17. Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con intervalos de confianza del 95,0%.**

			<i>Error</i>	<i>Límite</i>	<i>Límite</i>
<i>Nivel</i>	<i>Caso</i>	<i>Media</i>	<i>Est.</i>	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>
MEDIA GLOBAL	64	19,92			
Metodología					
Decoccion	16	0,00	0,78	-1,59	1,59
Infusion	16	0,00	0,78	-1,59	1,59
Mac. Alcohol	16	50,00	0,78	48,41	51,59
Mac. hexano	16	29,69	0,78	28,09	31,28
Planta					
Albahaca	8	12,50	1,10	10,25	14,75
Ambo	8	12,50	1,10	10,25	14,75
Guayaba	8	18,75	1,10	16,50	21,00
Hierba luisa	8	12,50	1,10	10,25	14,75
Matico	8	18,75	1,10	16,50	21,00
Ortiga	8	12,50	1,10	10,25	14,75
Paico	8	37,50	1,10	35,25	39,75
Tomillo	8	34,38	1,10	32,12	36,63
Metodología por Planta					
Decoccion,Albahaca	2	0,00	2,21	-4,51	4,51
Decoccion,Ambo	2	0,00	2,21	-4,51	4,51
Decoccion,Guayaba	2	0,00	2,21	-4,51	4,51
Decoccion,Hierba luisa	2	0,00	2,21	-4,51	4,51
Decoccion,Matico	2	0,00	2,21	-4,51	4,51
Decoccion,Ortiga	2	0,00	2,21	-4,51	4,51
Decoccion,Paico	2	0,00	2,21	-4,51	4,51
Decoccion,Tomillo	2	0,00	2,21	-4,51	4,51
Infusion,Albahaca	2	0,00	2,21	-4,51	4,51
Infusion,Ambo	2	0,00	2,21	-4,51	4,51
Infusion,Guayaba	2	0,00	2,21	-4,51	4,51
Infusion,Hierba luisa	2	0,00	2,21	-4,51	4,51
Infusion,Matico	2	0,00	2,21	-4,51	4,51
Infusion,Ortiga	2	0,00	2,21	-4,51	4,51
Infusion,Paico	2	0,00	2,21	-4,51	4,51
Infusion,Tomillo	2	0,00	2,21	-4,51	4,51
Mac. Alcohol,Albahaca	2	25,00	2,21	20,49	29,51
Mac. Alcohol,Ambo	2	25,00	2,21	20,49	29,51
Mac. Alcohol,Guayaba	2	50,00	2,21	45,49	54,51
Mac. Alcohol,Hierba luisa	2	25,00	2,21	20,49	29,51
Mac. Alcohol,Matico	2	50,00	2,21	45,49	54,51

Mac. Alcohol,Ortiga	2	25,00	2,21	20,49	29,51
Mac. Alcohol,Paico	2	100,00	2,21	95,49	104,51
Mac. Alcohol,Tomillo	2	100,00	2,21	95,49	104,51
Mac. hexano,Albahaca	2	25,00	2,21	20,49	29,51
Mac. hexano,Ambo	2	25,00	2,21	20,49	29,51
Mac. hexano,Guayaba	2	25,00	2,21	20,49	29,51
Mac. hexano,Hierba luisa	2	25,00	2,21	20,49	29,51
Mac. hexano,Matico	2	25,00	2,21	20,49	29,51
Mac. hexano,Ortiga	2	25,00	2,21	20,49	29,51
Mac. hexano,Paico	2	50,00	2,21	45,49	54,51
Mac. hexano,Tomillo	2	37,50	2,21	32,99	42,01

**Tabla B-18. Prueba de Tukey – para el Factor A (Factor A: metodología de obtención de los extractos vegetales) para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.**

<i>Metodologia</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Decoccion	16	0,00	0,78	A
Infusion	16	0,00	0,78	A
Mac. hexano	16	29,69	0,78	B
Mac. Alcohol	16	50,00	0,78	C

**Tabla B-19. Prueba de Tukey – para el Factor B (Factor B: Especie vegetal) para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.**

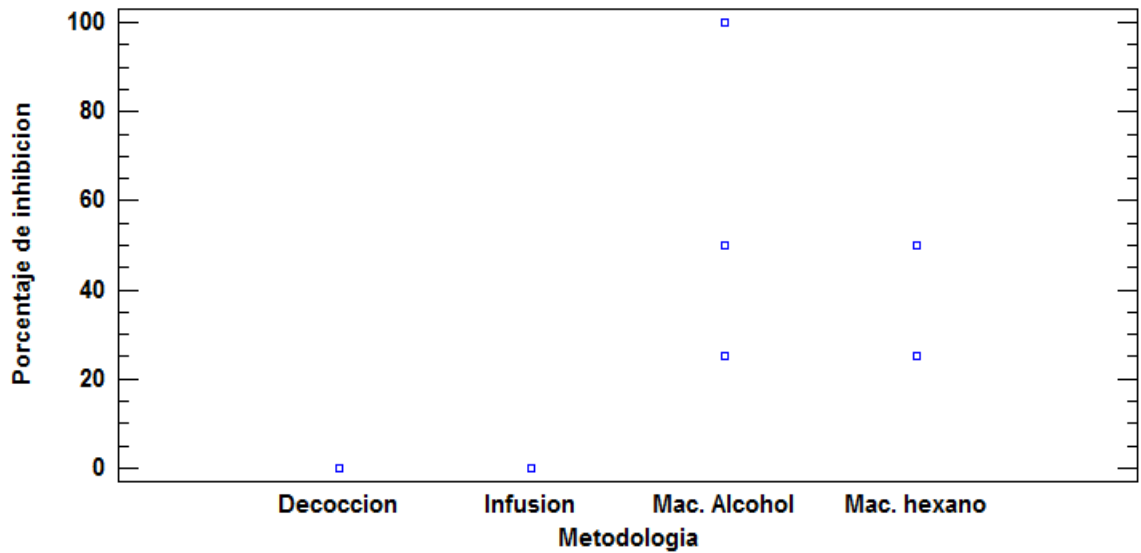
<i>Planta</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Ambo	8	12,50	1,10	A
Hierba luisa	8	12,50	1,10	A
Ortiga	8	12,50	1,10	A
Albahaca	8	12,50	1,10	A
Matico	8	18,75	1,10	B
Guayaba	8	18,75	1,10	B
Tomillo	8	34,38	1,10	C
Paico	8	37,50	1,10	C

**Tabla B-20. Prueba de Tukey – para la interacción AXB para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.**

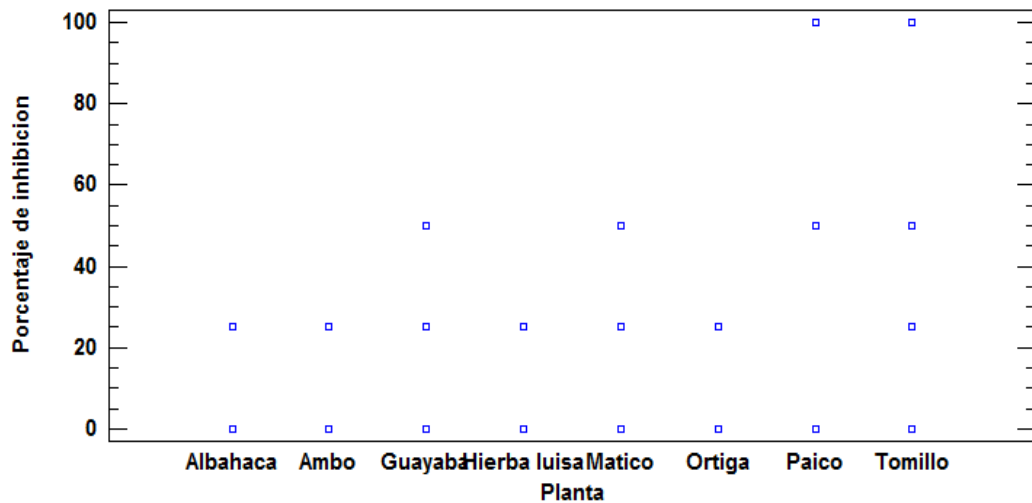
<i>Metodología</i>	<i>Planta</i>	<i>Media LS</i>	<i>Casos</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Infusion	Tomillo	-0,28	2	2,23	A
Infusion	Paico	-0,26	2	2,22	A
Infusion	Ortiga	-0,23	2	2,22	A
Infusion	Matico	-0,21	2	2,22	A
Infusion	HierbaLuisa	-0,18	2	2,22	A
Infusion	Guayaba	-0,16	2	2,22	A
Infusion	Ambo	-0,13	2	2,21	A
Infusion	Albahaca	-0,11	2	2,21	A
Decoccion	Tomillo	-0,09	2	2,21	A
Decoccion	Paico	-0,06	2	2,21	A
Decoccion	Ortiga	-0,04	2	2,21	A
Decoccion	Matico	-0,01	2	2,21	A
Decoccion	HierbaLuisa	0,01	2	2,21	A
Decoccion	Guayaba	0,04	2	2,21	A
Decoccion	Ambo	0,06	2	2,21	A
Decoccion	Albahaca	0,09	2	2,21	A
MacHexano	Ortiga	25,16	2	2,22	B
MacHexano	Matico	25,18	2	2,22	B
MacHexano	HierbaLuisa	25,21	2	2,22	B
MacHexano	Guayaba	25,23	2	2,22	B
MacHexano	Ambo	25,26	2	2,22	B
MacHexano	Albahaca	25,28	2	2,23	B
MacAlcohol	Ortiga	25,35	2	2,24	B
MacAlcohol	HierbaLuisa	25,40	2	2,25	B
MacAlcohol	Ambo	25,45	2	2,26	B
MacAlcohol	Albahaca	25,48	2	2,26	B
MacHexano	Tomillo	37,61	2	2,21	B C
MacHexano	Paico	50,13	2	2,21	C
MacAlcohol	Matico	50,38	2	2,24	C
MacAlcohol	Guayaba	50,43	2	2,25	C
MacAlcohol	Tomillo	100,31	2	2,23	D
MacAlcohol	Paico	100,33	2	2,23	D



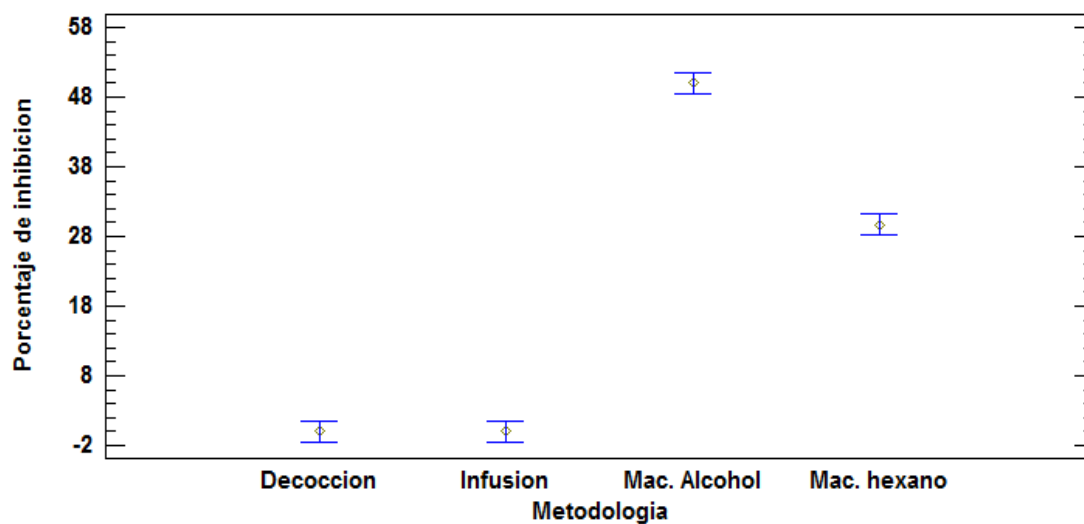
**Gráfico B-16. Dispersión entre la metodología y el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.**



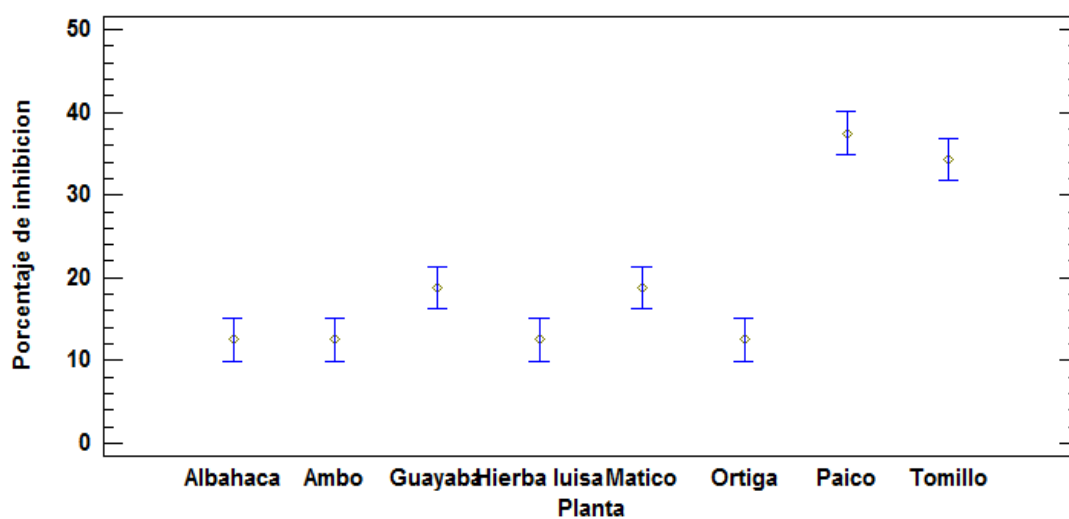
**Gráfico B-17. Dispersión entre la planta medicinal y el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.**



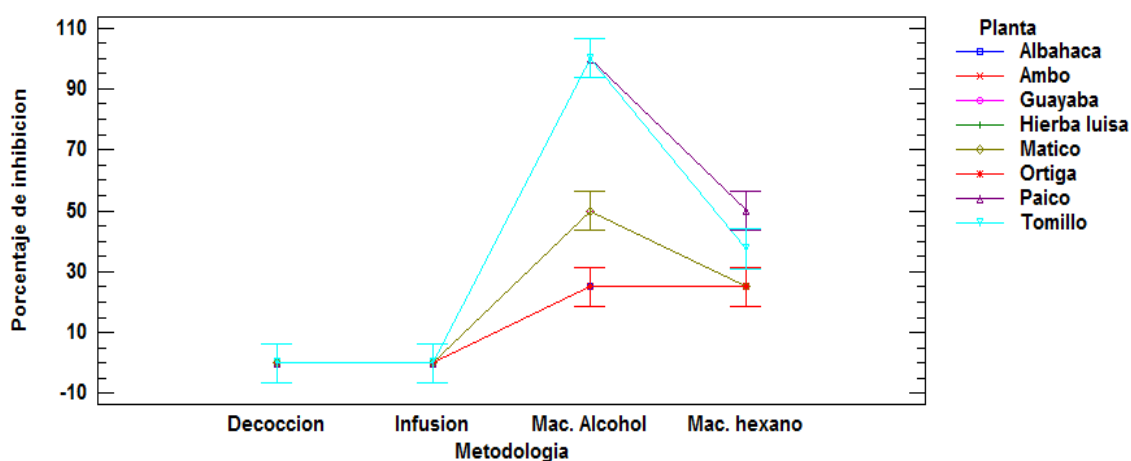
**Gráfico B-18. Medias de la metodología para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.**



**Gráfico B-19. Medias de las plantas medicinales para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0%.**



**Gráfico B-20. Interacción entre los factores para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 32 extractos vegetales con un nivel de confianza del 95,0% de Tuckey.**



### B) Determinación de las concentraciones más adecuadas para cada tratamiento

**Tabla B-21. Análisis de Varianza para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 24 tratamientos.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>COVARIABLES</b>					
Replica	6,51	1	6,51	1,00	0,34
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Tratamiento	1100,26	1	1100,26	169,00	0,00
B: Concentracion	36230,50	5	7246,09	1113,00	0,00
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	4563,80	5	912,76	140,20	0,00
RESIDUOS	71,61	11	6,51		
TOTAL (CORREGIDO)	41972,70	23			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual.

**\*Diferencia estadísticamente significativa.**

**Tabla B-22. Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 24 tratamientos con intervalos de confianza del 95,0%.**

			<i>Error</i>	<i>Límite</i>	<i>Límite</i>
<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Est.</i>	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>
MEDIA GLOBAL	24	26,56			
Tratamiento					
Mac. Alcohol Paico	12	33,33	0,74	31,71	34,95
Mac. Alcohol Tomillo	12	19,79	0,74	18,17	21,41
Concentracion					
100 ppm	4	0,00	1,28	-2,81	2,81
1000 ppm	4	0,00	1,28	-2,81	2,81
250 ppm	4	0,00	1,28	-2,81	2,81
2500 ppm	4	62,50	1,28	59,69	65,31
500 ppm	4	0,00	1,28	-2,81	2,81
5000 ppm	4	96,88	1,28	94,07	99,68
Tratamiento por Concentracion					
Mac. Alcohol Paico,100 ppm	2	0,00	1,80	-3,97	3,97
Mac. Alcohol Paico,1000 ppm	2	0,00	1,80	-3,97	3,97
Mac. Alcohol Paico,250 ppm	2	0,00	1,80	-3,97	3,97
Mac. Alcohol Paico,2500 ppm	2	100,00	1,80	96,03	103,97
Mac. Alcohol Paico,500 ppm	2	0,00	1,80	-3,97	3,97
Mac. Alcohol Paico,5000 ppm	2	100,00	1,80	96,03	103,97
Mac. Alcohol Tomillo,100 ppm	2	0,00	1,80	-3,97	3,97
Mac. Alcohol Tomillo,1000 ppm	2	0,00	1,80	-3,97	3,97
Mac. Alcohol Tomillo,250 ppm	2	0,00	1,80	-3,97	3,97
Mac. Alcohol Tomillo,2500 ppm	2	25,00	1,80	21,03	28,97
Mac. Alcohol Tomillo,500 ppm	2	0,00	1,80	-3,97	3,97
Mac. Alcohol Tomillo,5000 ppm	2	93,75	1,80	89,78	97,72

**Tabla B-23. Prueba de Tukey – para el Factor A (Factor A: Tratamientos más eficaces) para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.**

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Mac. Alcohol Tomillo	12	19,79	0,74	A
Mac. Alcohol Paico	12	33,33	0,74	B

**Tabla B-24. Prueba de Tukey – para el Factor B (Factor B: concentraciones) para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.**

<i>Concentracion</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
250 ppm	4	0,00	1,28	A
500 ppm	4	0,00	1,28	A
100 ppm	4	0,00	1,28	A
1000 ppm	4	0,00	1,28	A
2500 ppm	4	62,50	1,28	B
5000 ppm	4	96,88	1,28	C

**Tabla B-25. Prueba de Tukey – para la interacción AXB para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.**

<i>Tratamiento</i>	<i>Concentración</i>	<i>Media LS</i>	<i>Casos</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
MacEtanolPaico	100mg/l	-2,56	2	3,13	A
MacEtanolPaico	250mg/l	-2,47	2	3,06	A
MacEtanolPaico	500mg/l	-2,39	2	2,99	A
MacEtanolPaico	1000mg/l	-2,30	2	2,92	A
MacEtanolTomillo	100mg/l	-2,04	2	2,72	A
MacEtanolTomillo	250mg/l	-1,95	2	2,66	A
MacEtanolTomillo	500mg/l	-1,87	2	2,60	A
MacEtanolTomillo	1000mg/l	-1,78	2	2,53	A
MacEtanolTomillo	2500mg/l	23,31	2	2,47	B
MacEtanolTomillo	5000mg/l	92,14	2	2,42	C
MacEtanolPaico	2500mg/l	97,79	2	2,86	C
MacEtanolPaico	5000mg/l	97,87	2	2,79	C

Gráfico B-21. Dispersión entre el tratamiento y el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.

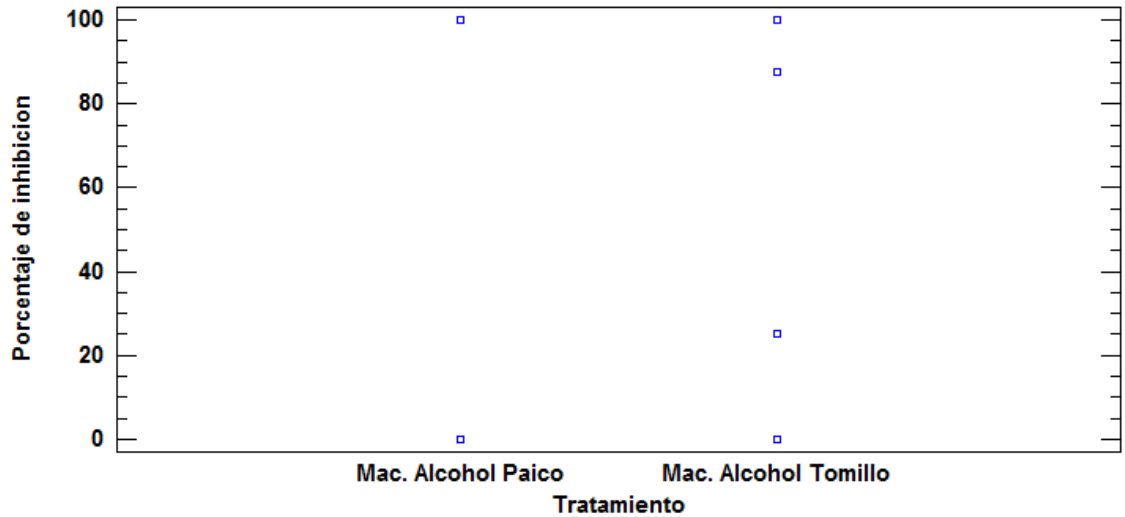
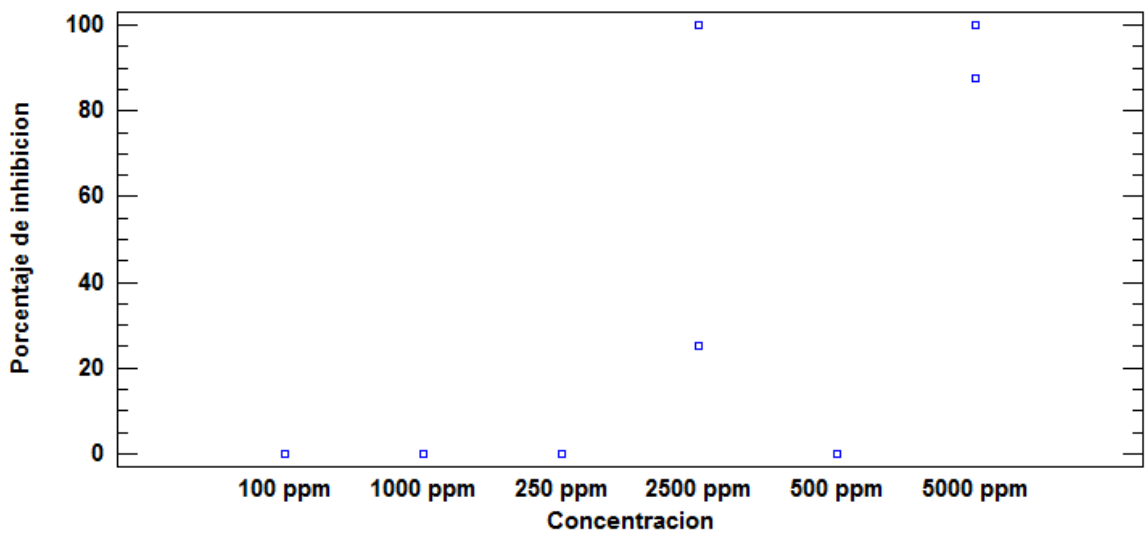
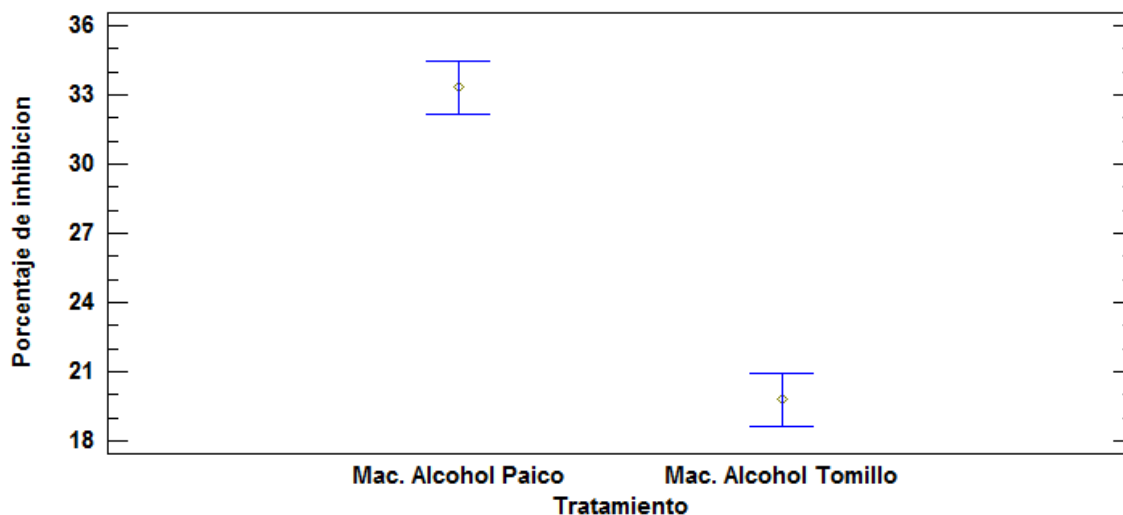


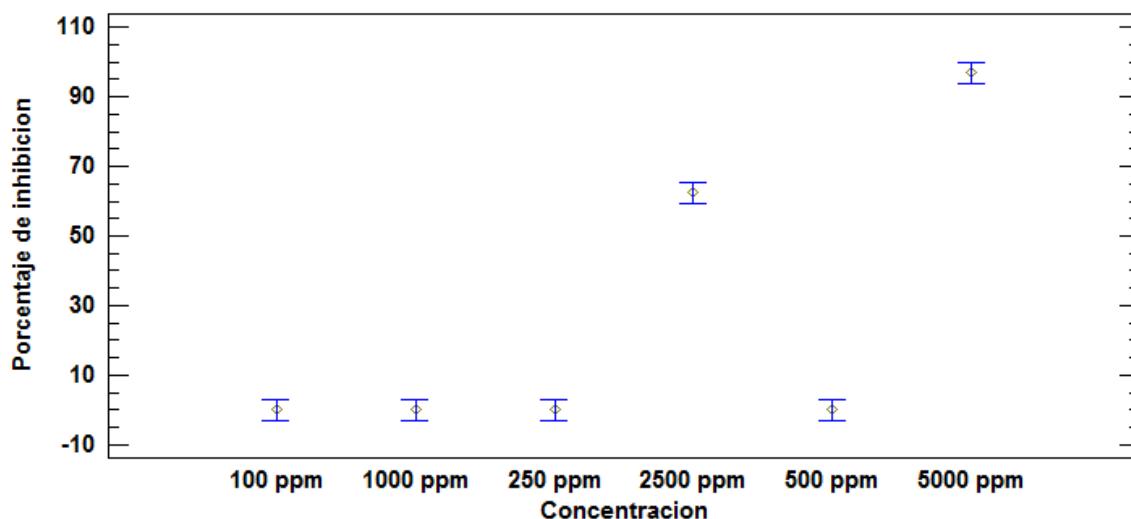
Gráfico B-22. Dispersión entre la concentración y el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.



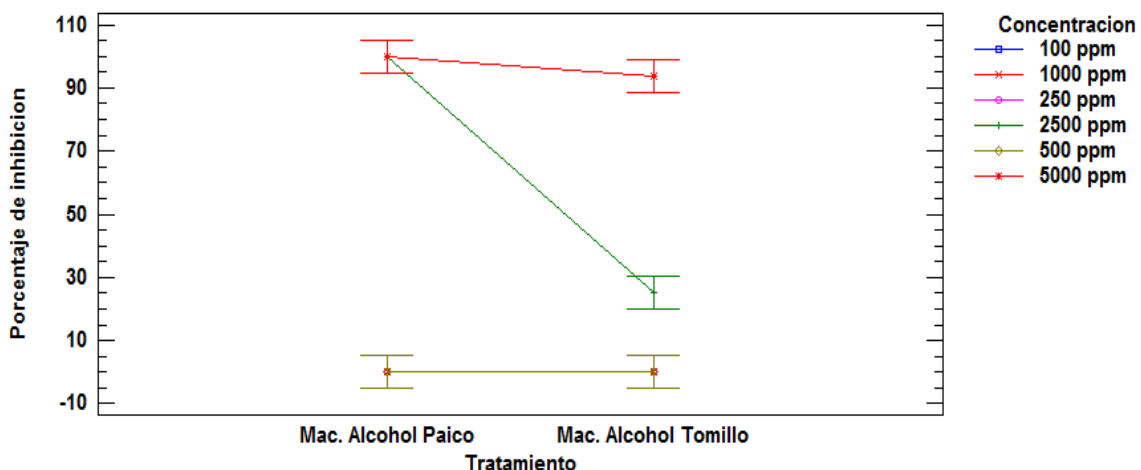
**Gráfico B-23. Medias del tratamiento para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.**



**Gráfico B-24. Medias de las concentraciones para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.**



**Gráfico B-25. Interacción entre los factores para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 24 h de incubación frente a 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0% de Tuckey.**



**Tabla B-26. Análisis de Varianza para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>COVARIABLES</b>					
Replica	0,00	1	0	0,00	1,00
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Tratamiento	1666,67	1	1666,67	****	0,00
B: Concentración	31250,00	5	6250,00	****	0,00
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	4583,33	5	916,67	****	0,00
RESIDUOS	2,37E-12	11	0,00		
TOTAL (CORREGIDO)	37500,00	23			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual.

**\*Diferencia estadísticamente significativa.**



**Tabla B-27. Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con intervalos de confianza del 95,0%.**

			<i>Error</i>	<i>Límite</i>	<i>Límite</i>
<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Est.</i>	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>
MEDIA GLOBAL	24	25,00			
Tratamiento					
Mac. Alcohol Paico	12	33,33	1,345E-7	33,33	33,33
Mac. Alcohol Tomillo	12	16,67	1,345E-7	16,67	16,67
Concentracion					
100 ppm	4	0,00	2,32E-7	-5,11E-7	5,11E-7
1000 ppm	4	0,00	2,32E-7	-5,11E-7	5,11E-7
250 ppm	4	0,00	2,32E-7	-5,11E-7	5,11E-7
2500 ppm	4	62,50	2,32E-7	62,50	62,50
500 ppm	4	0,00	2,32E-7	-5,11E-7	5,11E-7
5000 ppm	4	87,50	2,32E-7	87,50	87,50
Tratamiento por Concentracion					
Mac. Alcohol Paico,100 ppm	2	0,00	3,28E-7	-7,23E-7	-7,23E-7
Mac. Alcohol Paico,1000 ppm	2	0,00	3,28E-7	-7,23E-7	-7,23E-7
Mac. Alcohol Paico,250 ppm	2	0,00	3,284E-7	-7,23E-7	-7,23E-7
Mac. Alcohol Paico,2500 ppm	2	100,00	3,284E-7	100,00	100,00
Mac. Alcohol Paico,500 ppm	2	0,00	3,284E-7	-7,23E-7	-7,23E-7
Mac. Alcohol Paico,5000 ppm	2	100,00	3,284E-7	100,00	100,00
Mac. Alcohol Tomillo,100 ppm	2	0,00	3,284E-7	-7,23E-7	-7,23E-7
Mac. Alcohol Tomillo,1000 ppm	2	0,00	3,284E-7	-7,23E-7	-7,23E-7
Mac. Alcohol Tomillo,250 ppm	2	0,00	3,284E-7	-7,23E-7	-7,23E-7
Mac. Alcohol Tomillo,2500 ppm	2	25,00	3,284E-7	25,00	25,00
Mac. Alcohol Tomillo,500 ppm	2	0,00	3,284E-7	-7,23E-7	-7,23E-7
Mac. Alcohol Tomillo,5000 ppm	2	75,00	3,284E-7	75,00	75,00

**Tabla B-28. Prueba de Tukey – para el Factor A (Factor A: Tratamientos más eficaces) para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.**

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Mac. Alcohol Tomillo	12	16,67	1,34E-7	A
Mac. Alcohol Paico	12	33,33	1,34E-7	B

**Tabla B-29. Prueba de Tukey – para el Factor B (Factor B: concentraciones) para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.**

<i>Concentracion</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
500 ppm	4	0,00	2,32E-7	A
250 ppm	4	0,00	2,32E-7	A
1000 ppm	4	0,00	2,32E-7	A
100 ppm	4	0,00	2,32E-7	A
2500 ppm	4	62,50	2,32E-7	B
5000 ppm	4	87,50	2,32E-7	C

**Tabla B-30. Prueba de Tukey – para la interacción AXB para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.**

<i>Tratamiento</i>	<i>Concentración</i>	<i>Media LS</i>	<i>Casos</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
MacEtanolPaico	500mg/l	0,00	2	0,00	A
MacEtanolTomillo	1000mg/l	0,00	2	0,00	A
MacEtanolTomillo	100mg/l	0,00	2	0,00	A
MacEtanolTomillo	250mg/l	0,00	2	0,00	A
MacEtanolTomillo	500mg/l	0,00	2	0,00	A
MacEtanolPaico	100mg/l	0,00	2	0,00	A
MacEtanolPaico	250mg/l	0,00	2	0,00	A
MacEtanolPaico	1000mg/l	0,00	2	0,00	A
MacEtanolTomillo	2500mg/l	25,00	2	0,00	B
MacEtanolTomillo	5000mg/l	75,00	2	0,00	C
MacEtanolPaico	2500mg/l	100,00	2	0,00	D
MacEtanolPaico	5000mg/l	100,00	2	0,00	D

Gráfico B-26. Dispersión entre el tratamiento y el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.

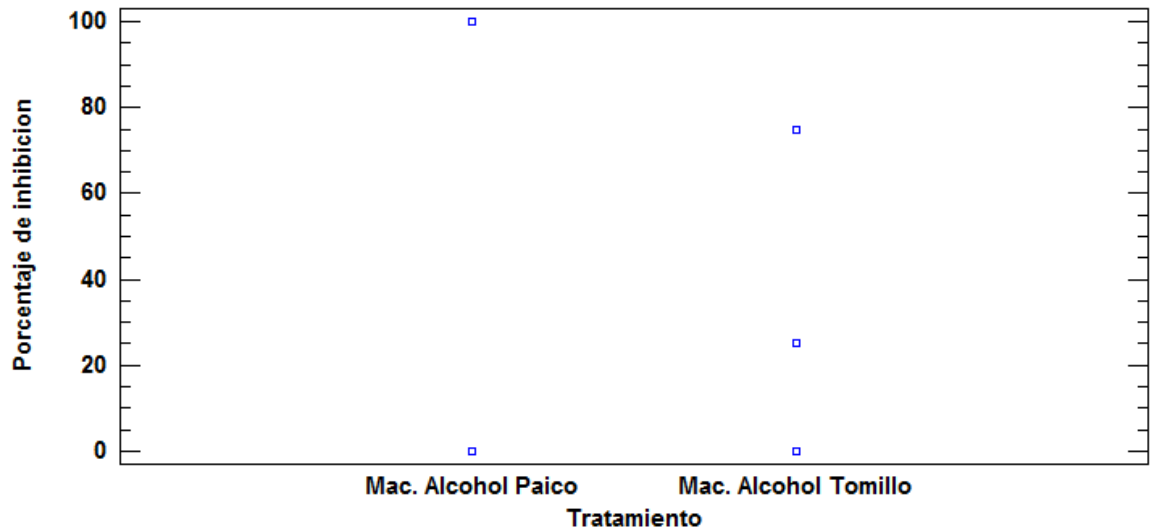
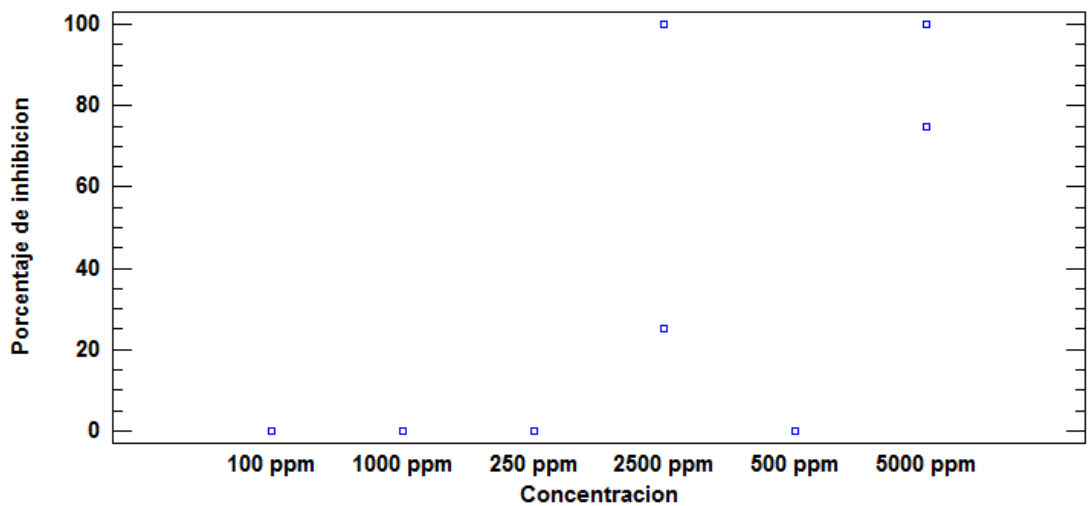
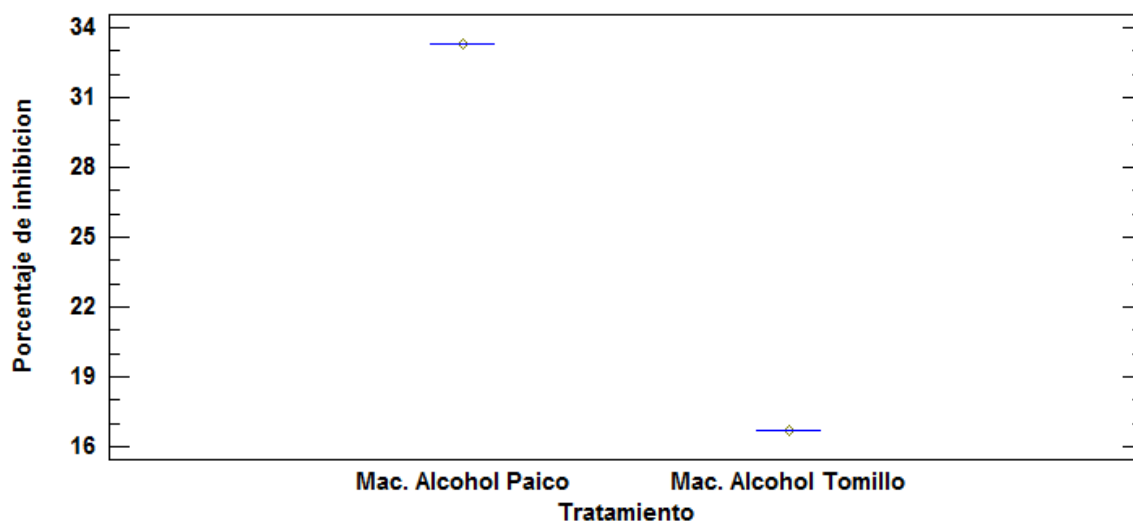


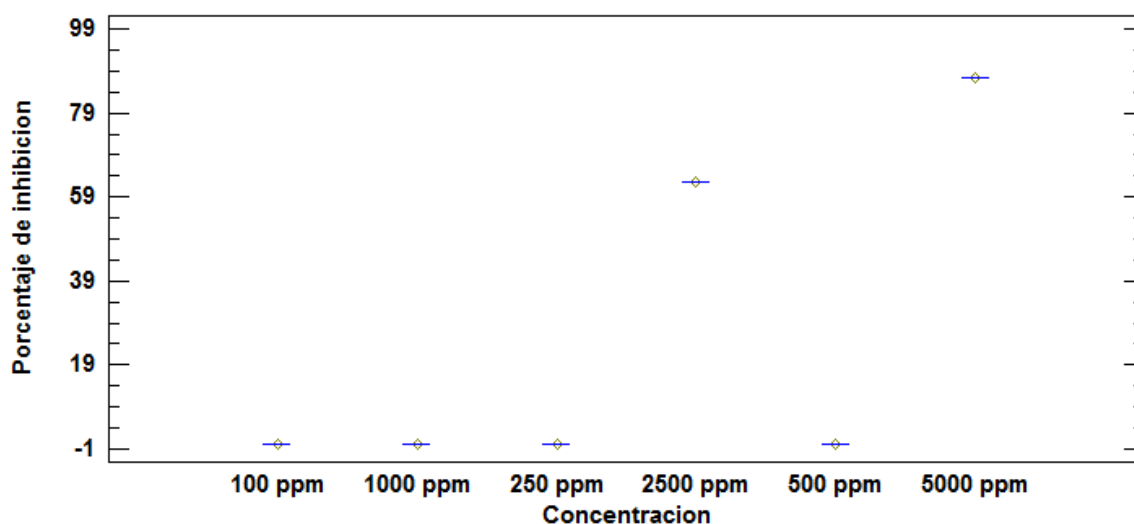
Gráfico B-27. Dispersión entre la concentración y el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.



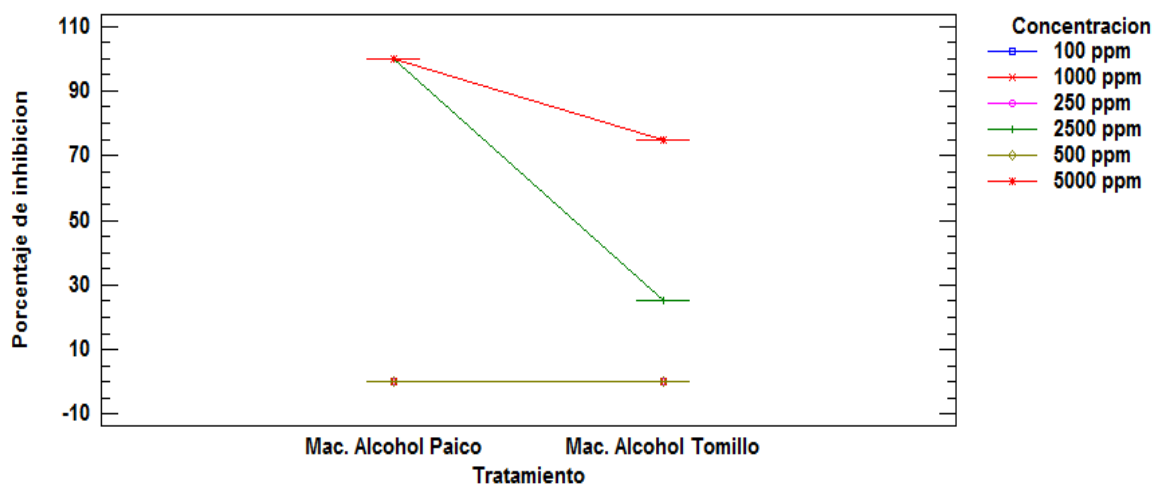
**Gráfico B-28. Medias del tratamiento para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.**



**Gráfico B-29. Medias de las concentraciones para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.**



**Gráfico B-30. Interacción entre los factores para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0% de Tuckey.**



**Tabla B-31. Análisis de Varianza para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a 24 tratamientos.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
COVARIABLES					
Replica	234,38	1	234,38	3,67	0,08
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tratamiento	26,04	1	26,04	0,41	0,54
B:Concentracion	36067,70	5	7213,54	112,85	0,00
INTERACCIONES					
AB	1067,71	5	213,54	3,34	0,04
RESIDUOS	703,13	11	63,92		
TOTAL (CORREGIDO)	38099,00	23			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual.

**\*Diferencia estadísticamente significativa.**

**Tabla B-32. Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con intervalos de confianza del 95,0%.**

			<i>Error</i>	<i>Límite</i>	<i>Límite</i>
<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Est.</i>	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>
MEDIA GLOBAL	24	42,71			
Tratamiento					
Mac. Alcohol Paico	12	41,67	2,31	36,59	46,75
Mac. Alcohol Tomillo	12	43,75	2,31	38,67	48,83
Concentracion					
100 ppm	4	0,00	4,00	-8,80	8,80
1000 ppm	4	37,50	4,00	28,70	46,30
250 ppm	4	0,00	4,00	-8,80	8,80
2500 ppm	4	93,75	4,00	84,95	102,55
500 ppm	4	31,25	4,00	22,45	40,05
5000 ppm	4	93,75	4,00	84,95	102,55
Tratamiento por Concentracion					
Mac. Alcohol Paico,100 ppm	2	0,00	5,65	-12,44	12,44
Mac. Alcohol Paico,1000 ppm	2	25,00	5,65	12,56	37,44
Mac. Alcohol Paico,250 ppm	2	0,00	5,65	-12,44	12,44
Mac. Alcohol Paico,2500 ppm	2	100,00	5,65	87,56	112,44
Mac. Alcohol Paico,500 ppm	2	25,00	5,65	12,56	37,44
Mac. Alcohol Paico,5000 ppm	2	100,00	5,65	87,56	112,44
Mac. Alcohol Tomillo,100 ppm	2	0,00	5,65	-12,44	12,44
Mac. Alcohol Tomillo,1000 ppm	2	50,00	5,65	37,56	62,44
Mac. Alcohol Tomillo,250 ppm	2	0,00	5,65	-12,44	12,44
Mac. Alcohol Tomillo,2500 ppm	2	87,50	5,65	75,06	99,94
Mac. Alcohol Tomillo,500 ppm	2	37,50	5,65	25,06	49,94
Mac. Alcohol Tomillo,5000 ppm	2	87,50	5,65	75,06	99,94

**Tabla B-33. Prueba de Tukey – para el Factor A (Factor A: Tratamientos más eficaces) para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.**

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Mac. Alcohol Paico	12	41,67	2,31	A
Mac. Alcohol Tomillo	12	43,75	2,31	A

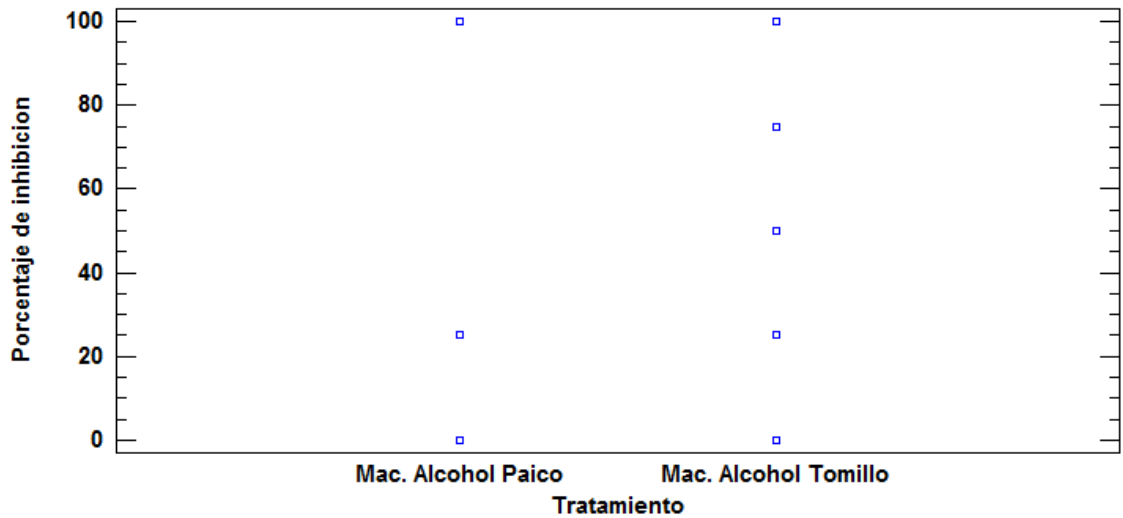
**Tabla B-34. Prueba de Tukey – para el Factor B (Factor B: concentraciones) para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.**

<i>Concentracion</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
250 ppm	4	0,00	3,99	A
100 ppm	4	0,00	3,99	A
500 ppm	4	31,25	3,99	B
1000 ppm	4	37,50	3,99	B
2500 ppm	4	93,75	3,99	C
5000 ppm	4	93,75	3,99	C

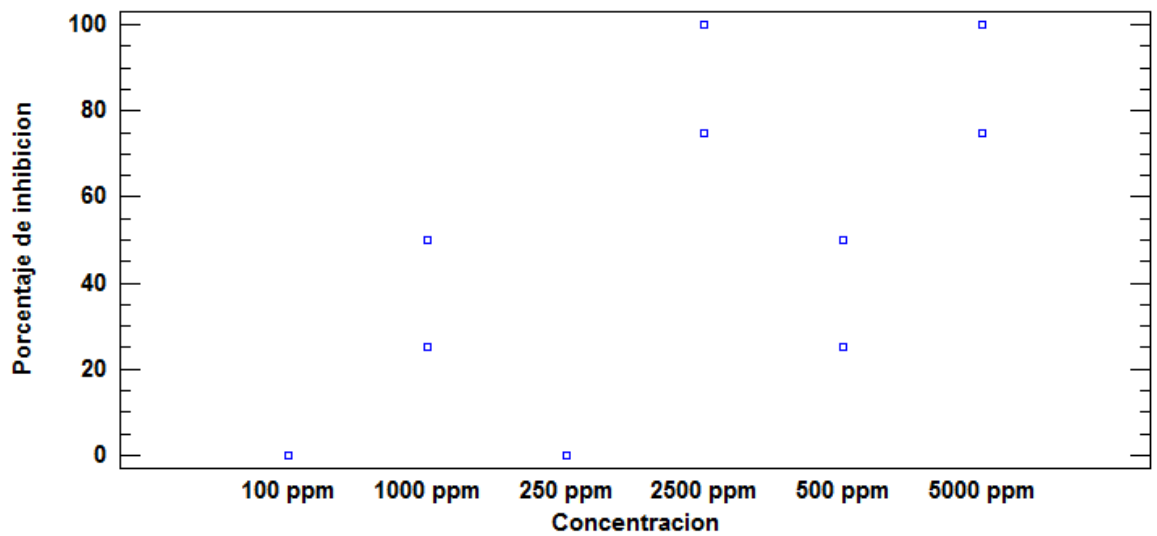
**Tabla B-35. Prueba de Tukey – para la interacción AXB para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.**

<i>Tratamiento</i>	<i>Concentración</i>	<i>Media LS</i>	<i>Casos</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
MacEtanolPaico	100mg/l	-15,36	2	9,82	A
MacEtanolPaico	250mg/l	-14,84	2	9,59	A
MacEtanolTomillo	100mg/l	-12,24	2	8,53	A
MacEtanolTomillo	250mg/l	-11,72	2	8,33	A
MacEtanolPaico	500mg/l	10,68	2	9,38	A B
MacEtanolPaico	1000mg/l	11,20	2	9,16	A B
MacEtanolTomillo	500mg/l	26,30	2	8,13	B
MacEtanolTomillo	1000mg/l	39,32	2	7,94	B
MacEtanolTomillo	2500mg/l	77,34	2	7,75	C
MacEtanolTomillo	5000mg/l	77,86	2	7,57	C
MacEtanolPaico	2500mg/l	86,72	2	8,95	C
MacEtanolPaico	5000mg/l	87,24	2	8,74	C

**Gráfico B-31.** Dispersión entre el tratamiento y el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.

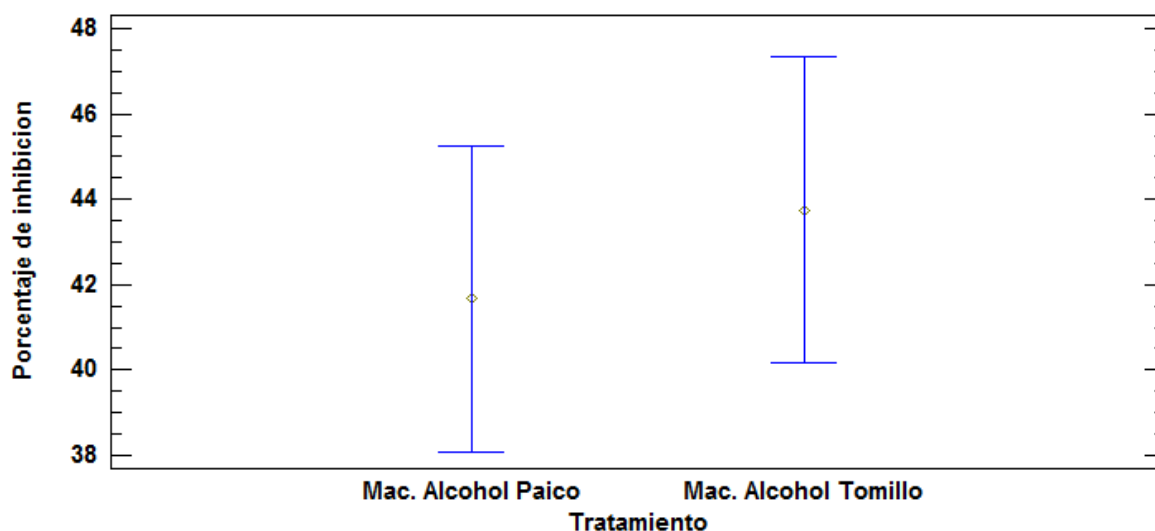


**Gráfico B-32.** Dispersión entre la concentración y el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.

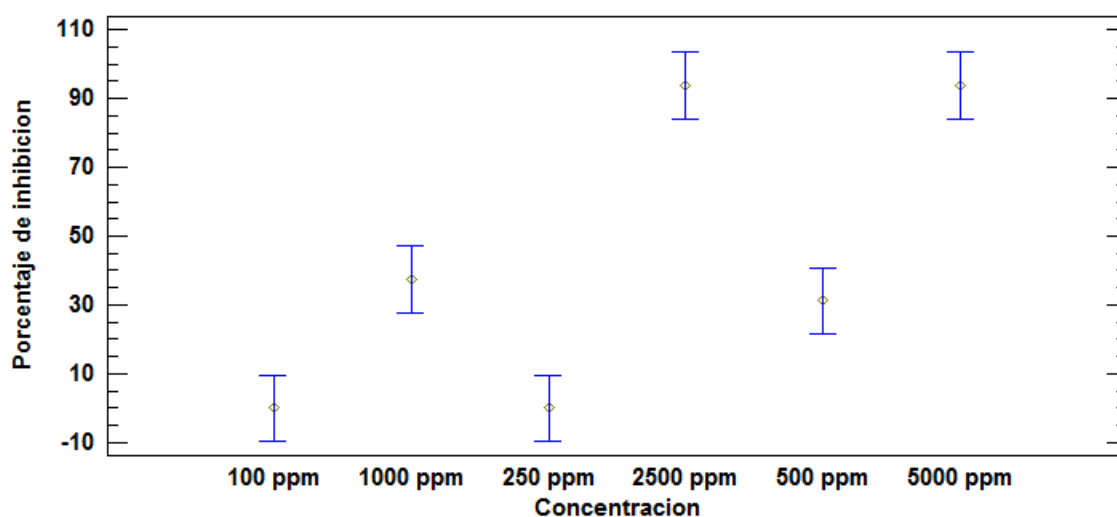




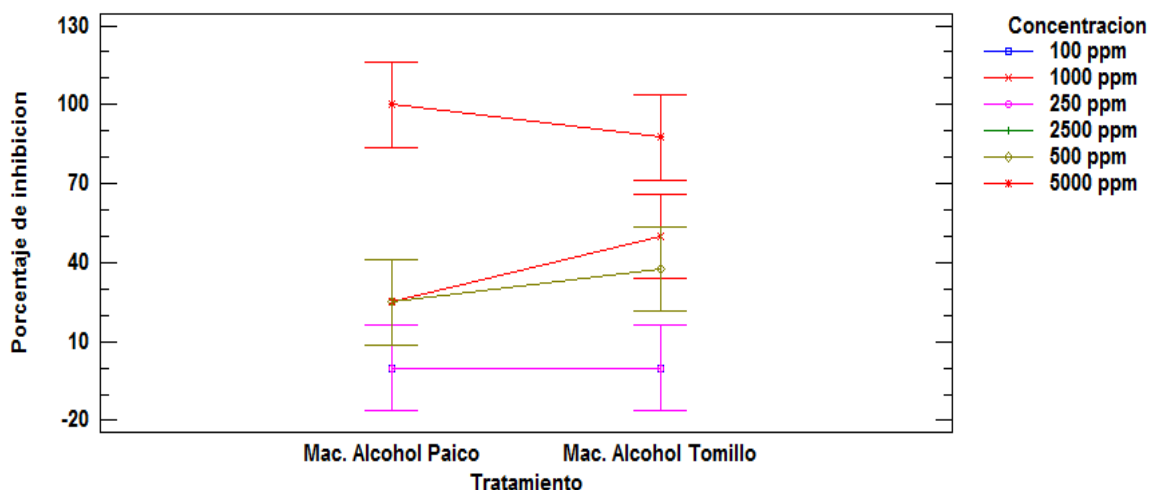
**Gráfico B-33. Medias del tratamiento para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.**



**Gráfico B-34. Medias de las concentraciones para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.**



**Gráfico B-35. Interacción entre los factores para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 48 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0% de Tuckey.**



**Tabla B-36. Análisis de Varianza para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 24 tratamientos.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>COVARIABLES</b>					
Replica	104,17	1	104,17	2,20	0,17
<b>EFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Tratamiento	104,17	1	104,17	2,20	0,17
B: Concentración	38750,00	5	7750,00	163,68	0,00
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	833,33	5	166,67	3,52	0,04
RESIDUOS	520,83	11	47,35		
TOTAL (CORREGIDO)	40312,50	23			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual.

**\*Diferencia estadísticamente significativa.**

**Tabla B-37. Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 24 tratamientos con intervalos de confianza del 95,0%.**

			<i>Error</i>	<i>Límite</i>	<i>Límite</i>
<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Est.</i>	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>
MEDIA GLOBAL	24	43,75			
Tratamiento					
Mac. Alcohol Paico	12	41,67	1,99	37,29	46,04
Mac. Alcohol Tomillo	12	45,83	1,99	41,46	50,21
Concentracion					
100 ppm	4	0,00	3,44	-7,57	7,57
1000 ppm	4	37,50	3,44	29,93	45,07
250 ppm	4	0,00	3,44	-7,57	7,57
2500 ppm	4	100,00	3,44	92,43	107,57
500 ppm	4	31,25	3,44	23,68	38,82
5000 ppm	4	93,75	3,44	86,18	101,32
Tratamiento por Concentracion					
Mac. Alcohol Paico,100 ppm	2	0,00	4,87	-10,71	10,71
Mac. Alcohol Paico,1000 ppm	2	25,00	4,87	14,29	35,71
Mac. Alcohol Paico,250 ppm	2	0,00	4,87	-10,71	10,71
Mac. Alcohol Paico,2500 ppm	2	100,00	4,87	89,29	110,71
Mac. Alcohol Paico,500 ppm	2	25,00	4,87	14,29	35,71
Mac. Alcohol Paico,5000 ppm	2	100,00	4,87	89,29	110,71
Mac. Alcohol Tomillo,100 ppm	2	0,00	4,87	-10,71	10,71
Mac. Alcohol Tomillo,1000 ppm	2	50,00	4,87	39,29	60,71
Mac. Alcohol Tomillo,250 ppm	2	0,00	4,87	-10,71	10,71
Mac. Alcohol Tomillo,2500 ppm	2	100,00	4,87	89,29	110,71
Mac. Alcohol Tomillo,500 ppm	2	37,50	4,87	26,79	48,21
Mac. Alcohol Tomillo,5000 ppm	2	87,50	4,87	76,79	98,21

**Tabla B-38. Prueba de Tukey – para el Factor A (Factor A: Tratamientos más eficaces) para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.**

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Mac. Alcohol Paico	12	41,67	1,99	A
Mac. Alcohol Tomillo	12	45,83	1,99	A

**Tabla B-39. Prueba de Tukey – para el Factor B (Factor B: concentraciones) para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.**

Concentracion	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
250 ppm	4	0,00	3,44	A
100 ppm	4	0,00	3,44	A
500 ppm	4	31,25	3,44	B
1000 ppm	4	37,50	3,44	B
5000 ppm	4	93,75	3,44	C
2500 ppm	4	100,00	3,44	C

**Tabla B-40. Prueba de Tukey – para la interacción AXB para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.**

Tratamiento	Concentración	Media LS	Casos	Sigma LS	Grupos Homogéneos
MacEtanolPaico	100mg/l	-10,24	2	8,45	A
MacEtanolPaico	250mg/l	-9,90	2	8,26	A
MacEtanolTomillo	100mg/l	-8,16	2	7,34	A
MacEtanolTomillo	250mg/l	-7,81	2	7,17	A
MacEtanolPaico	500mg/l	15,45	2	8,07	A B
MacEtanolPaico	1000mg/l	30,03	2	7,88	A B
MacEtanolTomillo	500mg/l	42,88	2	7,00	B
MacEtanolTomillo	1000mg/l	81,08	2	6,83	B
MacEtanolTomillo	5000mg/l	42,88	2	6,51	C
MacEtanolPaico	2500mg/l	81,08	2	7,70	C
MacEtanolPaico	5000mg/l	91,49	2	7,52	C
MacEtanolTomillo	2500mg/l	93,23	2	6,67	C

Gráfico B-36. Dispersión entre el tratamiento y el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.

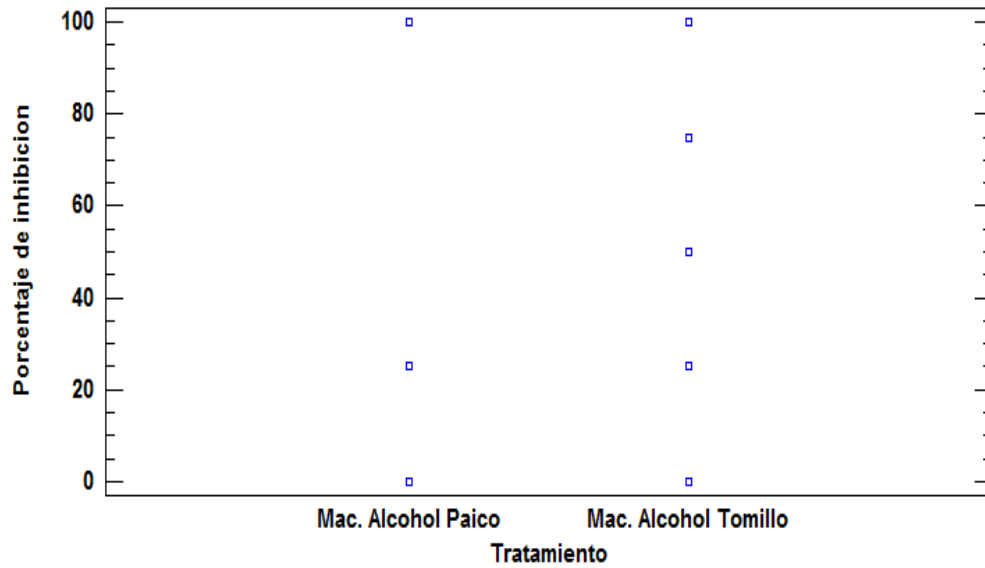
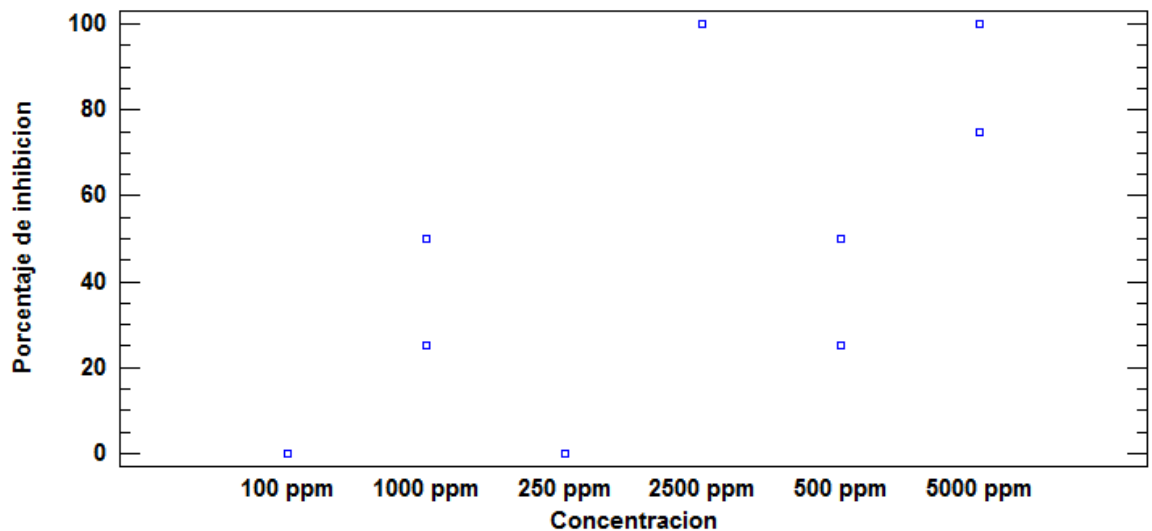
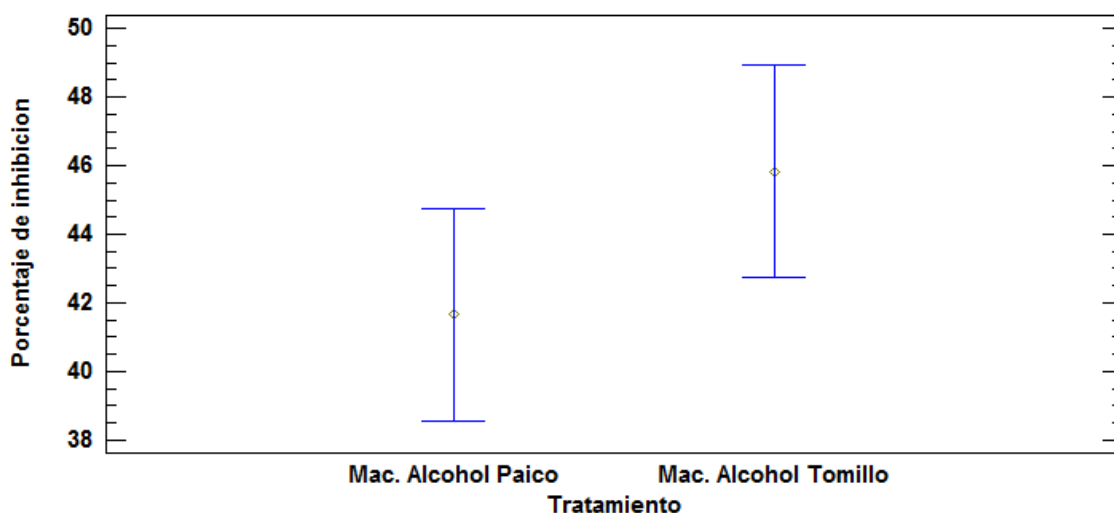


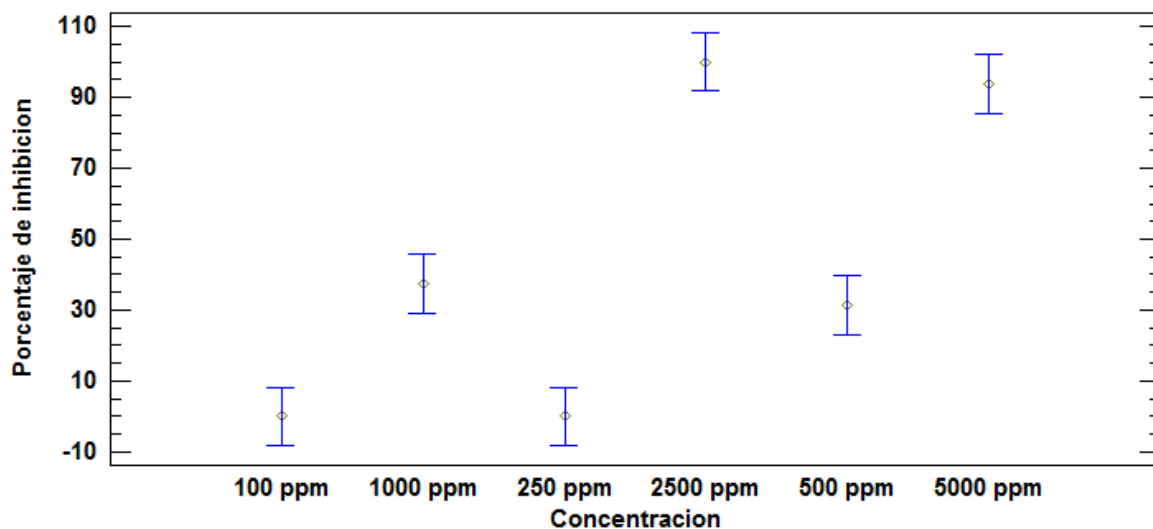
Gráfico B-37. Dispersión entre la concentración y el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.



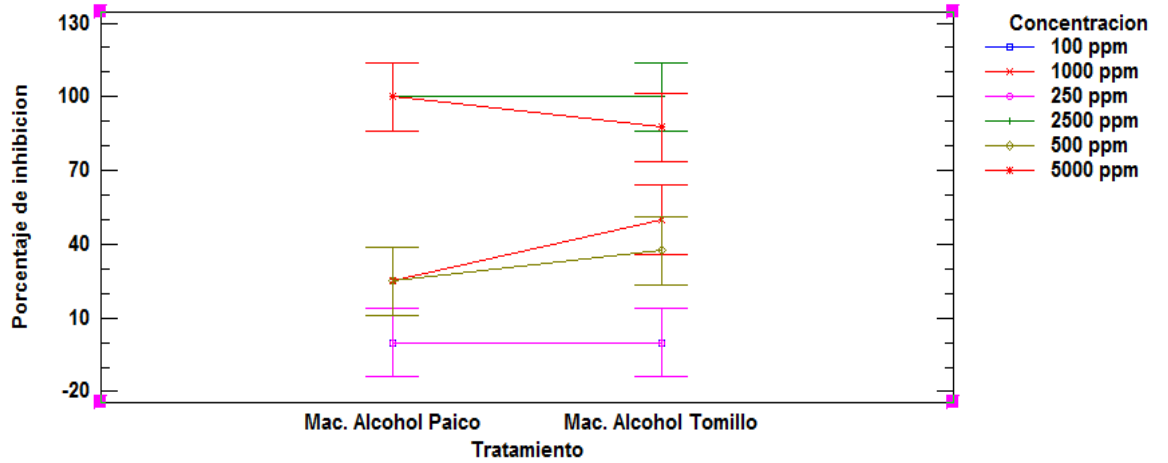
**Gráfico B-38. Medias del tratamiento para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.**



**Gráfico B-39. Medias de las concentraciones para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0%.**



**Gráfico B-40. Interacción entre los factores para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* a las 72 h de incubación frente a los 24 tratamientos con un nivel de confianza del 95,0% de Tuckey.**



**ANEXO C**  
**FOTOGRAFÍAS**

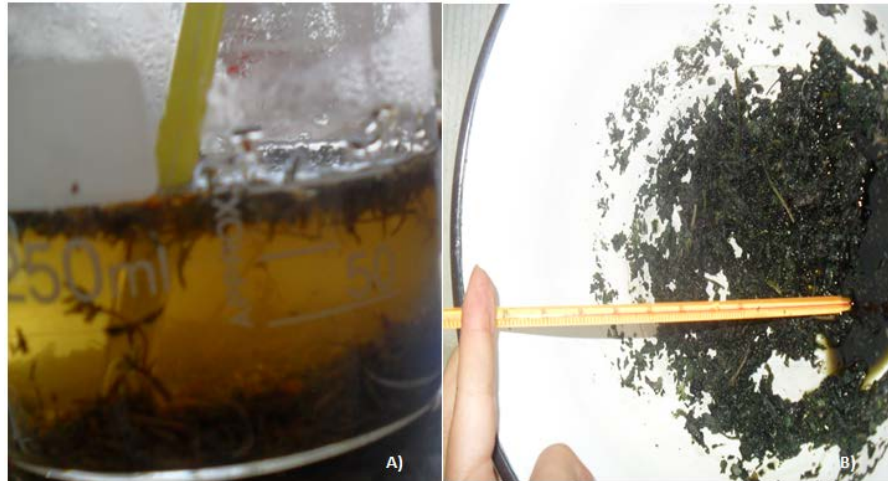




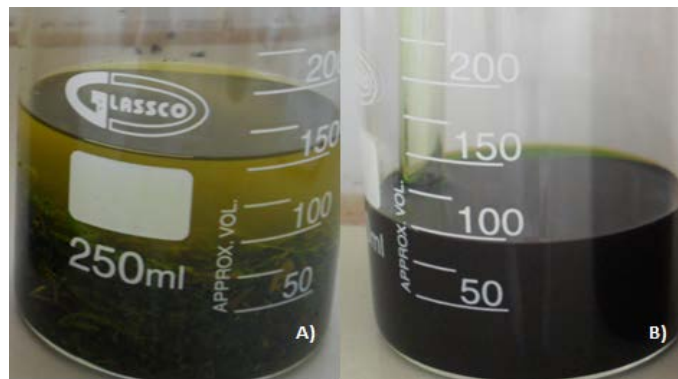
**Gráfico C-1. Especies vegetales en estudio. A) Albahaca, B) Ambo, C) Guayaba, D) Hierba luisa, E) Tomillo, F) Matico, G) Ortiga, H) Paico.**



**Gráfico C-2. Secado del material vegetal**



**Gráfico C-3. Obtención de los extractos vegetales por infusión y decocción. A) Infusión, B) Decocción.**



**Gráfico C-4. Obtención de los extractos vegetales por maceración en hexano y etanol. A) Maceración en hexano, B) Maceración en etanol.**



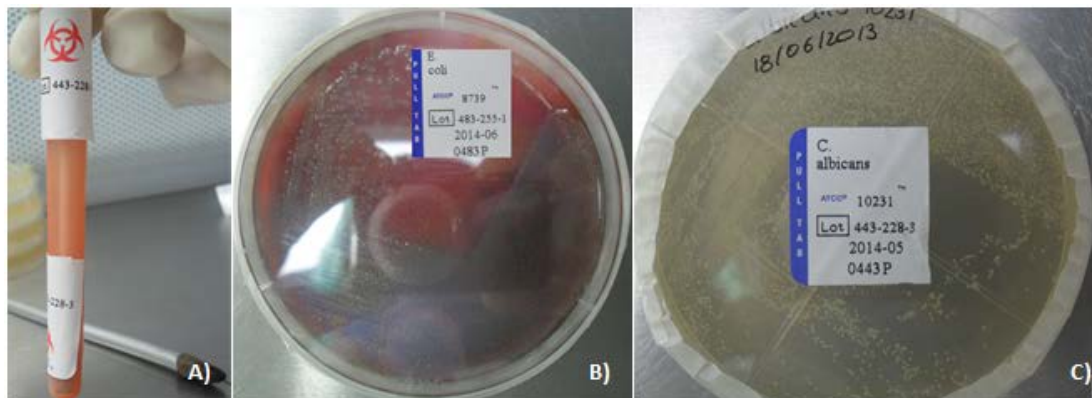
**Gráfico C-5. Concentración en rota-vapor de los extractos vegetales por maceración en hexano y etanol.**



**Gráfico C-6. Determinación de la concentración de los extractos vegetales.**



**Gráfico C-7. Esterilización de los extractos vegetales.**



**Gráfico C-8. Activación de las cepas microbianas. A) Kwik-Stick con la cepa microbiana liofilizada, B) Activación de *Escherichia coli*, C) Activación de *Candida albicans*.**



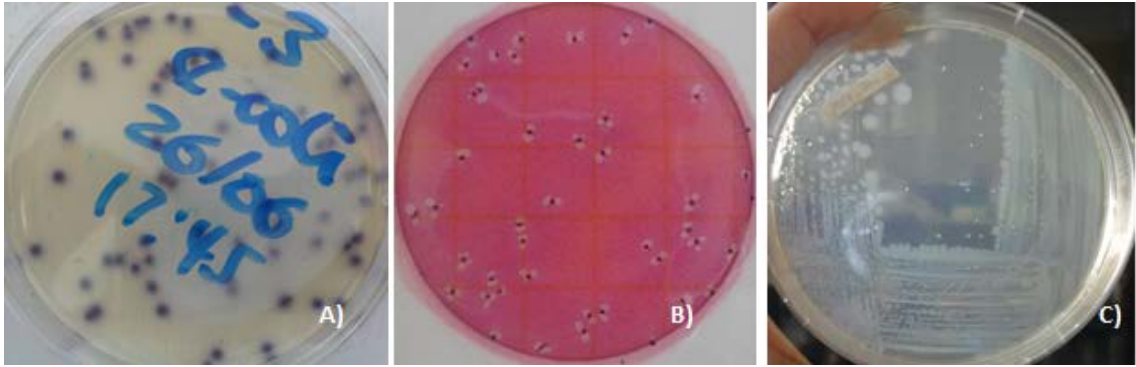


Gráfico C-9. Crecimiento de *Escherichia coli*. Crecimiento en: A) Medio Chomocult, B) Petrifilm, C) Agar Nutritivo.

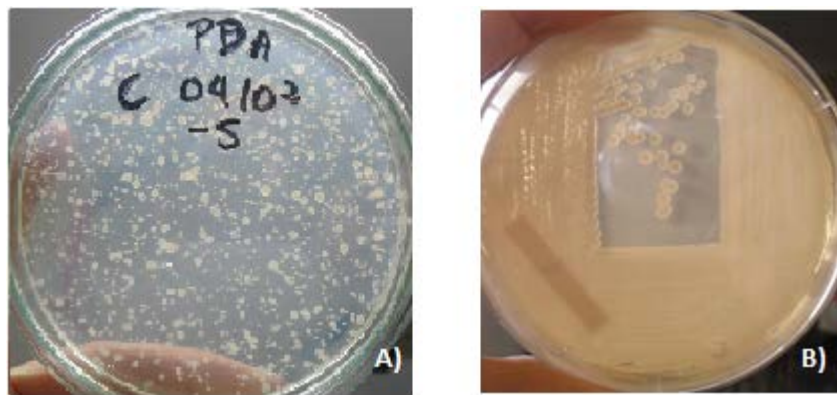


Gráfico C-10. Crecimiento de *Candida albicans*. Crecimiento en: A) Medio PDA, B) Agar Saboraud.

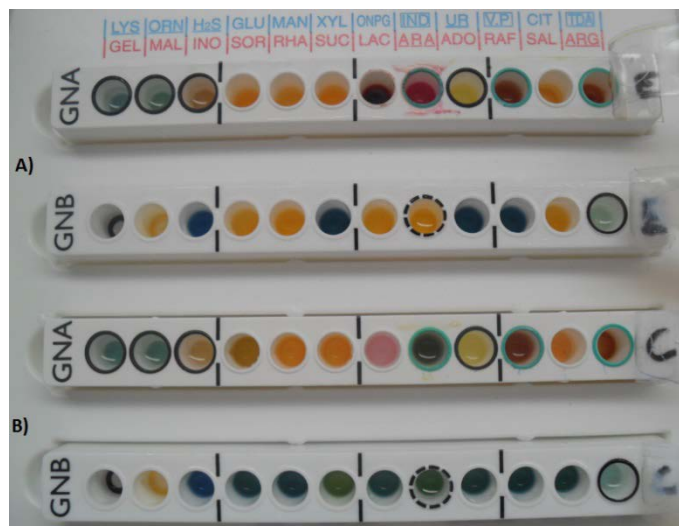
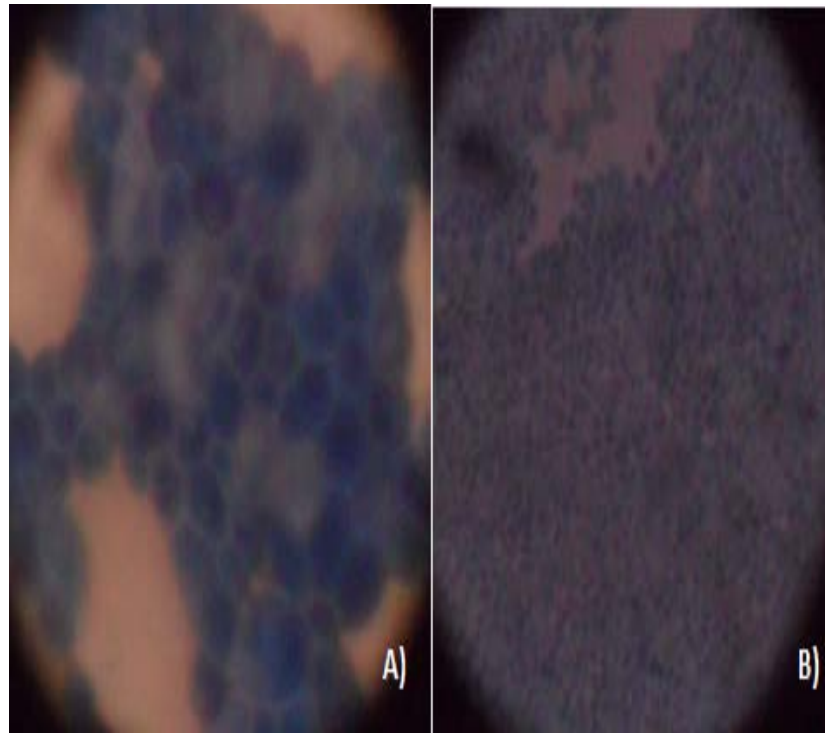
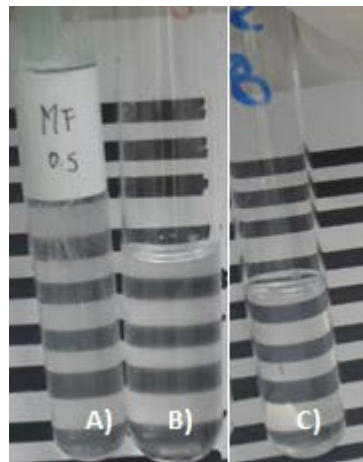


Gráfico C-11. Caracterización bioquímica de las cepas microbianas. Paneles GNA y GNB para A) *Escherichia coli*, B) *Candida albicans*.



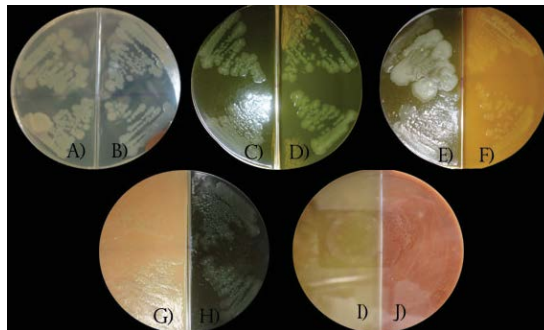
**Gráfico C-12. Caracterización microscópica de las cepas microbianas. A) *Candida albicans*, B) *Escherichia coli*.**



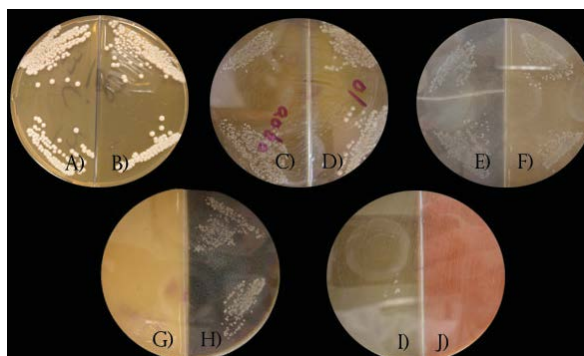
**Gráfico C-13. Estandarización de las suspensiones microbianas. A) Estándar 0.5 McFarland, B) Suspensión de *Candida albicans*, C) Suspensión de *Escherichia coli*.**



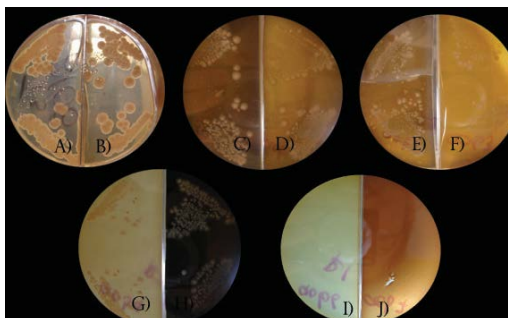
**Gráfico C-14. Almacenamiento de las cepas microbianas en crioviales.**



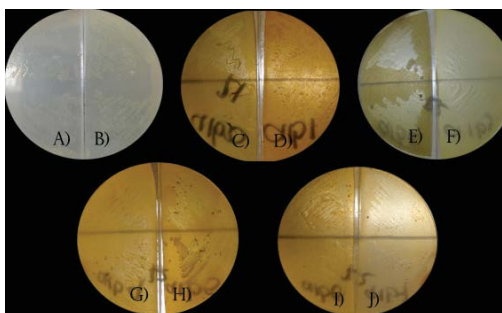
**Gráfico C-15. Actividad antimicrobiana de los extractos por maceración en etanol frente a *Escherichia coli* después de 48h de incubación. Extractos por maceración en etanol de: A), B) Testigo, C) Albahaca, D) Ambo, E) Guayaba, F) Hierba Luisa, G) Matico, H) Ortiga negra, I) Paico, J) Tomillo.**



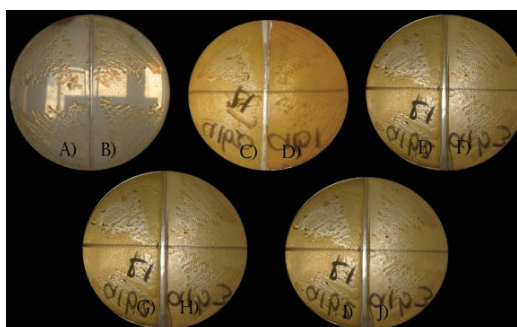
**Gráfico C-16. Actividad antimicrobiana de los extractos por maceración en etanol frente a *Candida albicans* después de 48h de incubación. Extractos por maceración en etanol de: A), B) Testigo, C) Albahaca, D) Ambo, E) Guayaba, F) Hierba Luisa, G) Matico, H) Ortiga negra, I) Paico, J) Tomillo.**



**Gráfico C-17. Actividad antimicrobiana de los extractos por maceración en etanol frente a *Candida albicans* después de 72h de incubación. Extractos por maceración en etanol de: A), B) Testigo, C) Albahaca, D) Ambo, E) Guayaba, F) Hierba Luisa, G) Matico, H) Ortiga negra, I) Paico, J) Tomillo.**

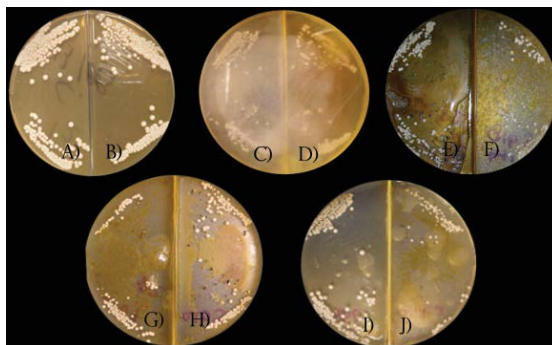


**Gráfico C-18. Actividad antimicrobiana de los extractos por maceración en hexano frente a *Escherichia coli* después de 24h de incubación. Extractos por maceración en hexano de: A), B) Testigo, C) Albahaca, D) Ambo, E) Guayaba, F) Hierba Luisa, G) Matico, H) Ortiga negra, I) Paico, J) Tomillo.**

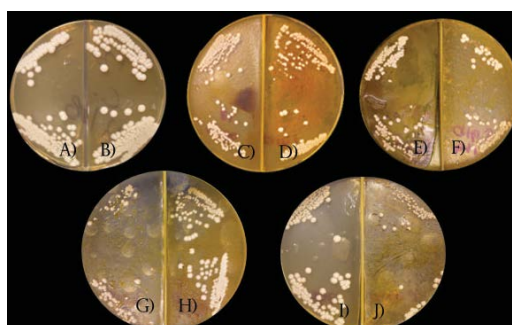


**Gráfico C-19. Actividad antimicrobiana de los extractos por maceración en hexano frente a *Escherichia coli* después de 48h de incubación. Extractos por maceración en hexano de: A), B) Testigo, C) Albahaca, D) Ambo, E) Guayaba, F) Hierba Luisa, G) Matico, H) Ortiga negra, I) Paico, J) Tomillo.**

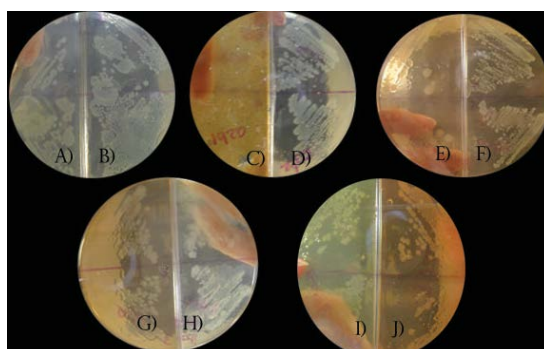




**Gráfico C-20. Actividad antimicrobiana de los extractos por maceración en hexano frente a *Candida albicans* después de 48h de incubación. Extractos por maceración en hexano de: A), B) Testigo, C) Albahaca, D) Ambo, E) Guayaba, F) Hierba Luisa, G) Matico, H) Ortiga negra, I) Paico, J) Tomillo.**

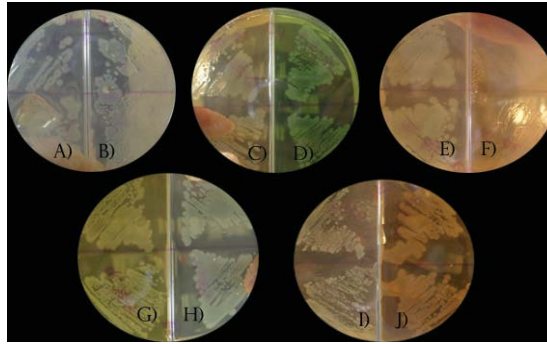


**Gráfico C-21. Actividad antimicrobiana de los extractos por maceración en hexano frente a *Candida albicans* después de 72h de incubación. Extractos por maceración en hexano de: A), B) Testigo, C) Albahaca, D) Ambo, E) Guayaba, F) Hierba Luisa, G) Matico, H) Ortiga negra, I) Paico, J) Tomillo.**

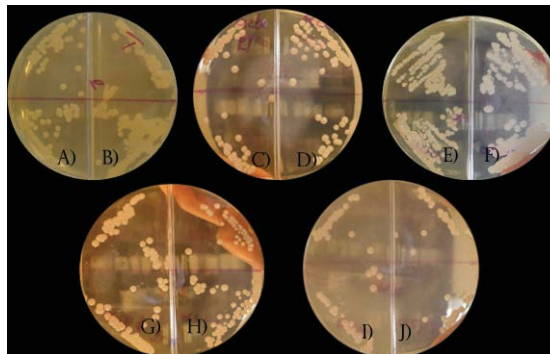


**Gráfico C-22. Actividad antimicrobiana de los extractos por decocción frente a *Escherichia coli* después de 24 h de incubación. Extractos por decocción de: A), B) Testigo, C) Ambo, D) Guayaba, E) Matico, F) Ortiga negra, G) Albahaca, H) Hierba Luisa, I) Paico, J) Tomillo.**

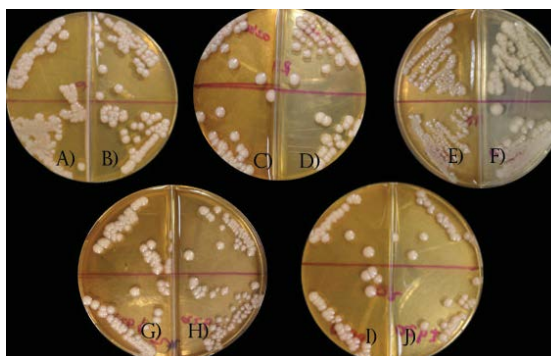




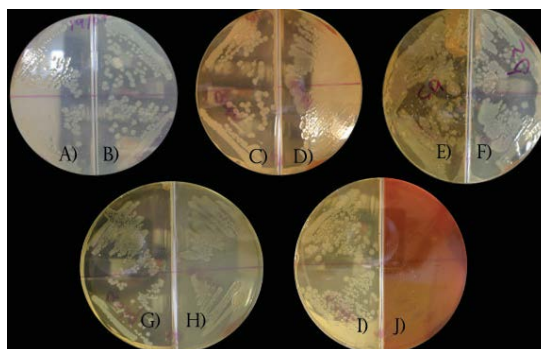
**Gráfico C-23. Actividad antimicrobiana de los extractos por decocción frente a *Escherichia coli* después de 48 h de incubación. Extractos por decocción de: A), B) Testigo, C) Albahaca, D) Matico, E) Ambo, F) Guayaba, G) Hierba Luisa, H) Paico, I) Ortiga negra, J) Tomillo.**



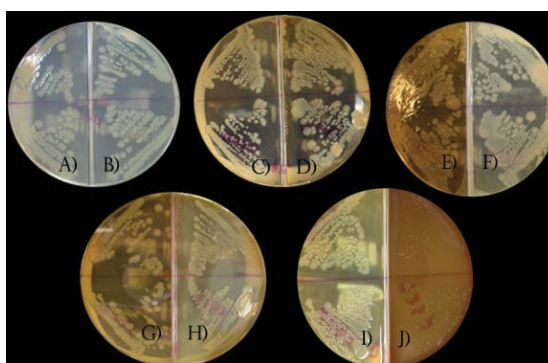
**Gráfico C-24. Actividad antimicrobiana de los extractos por decocción frente a *Candida albicans* después de 48 h de incubación. Extractos por decocción de: A), B) Testigo, C) Albahaca, D) Ambo, E) Guayaba, F) Hierba Luisa, G) Matico, H) Ortiga negra, I) Paico, J) Tomillo.**



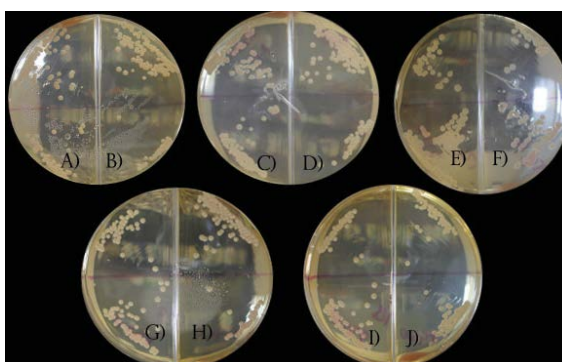
**Gráfico C-25. Actividad antimicrobiana de los extractos por decocción frente a *Candida albicans* después de 72 h de incubación. Extractos por decocción de: A), B) Testigo, C) Albahaca, D) Ambo, E) Guayaba, F) Hierba Luisa, G) Matico, H) Ortiga negra, I) Paico, J) Tomillo.**



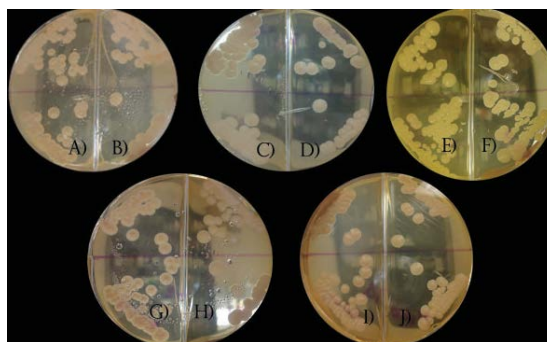
**Gráfico C-26.** Actividad antimicrobiana de los extractos por infusión frente a *Escherichia coli* después de 24 h de incubación. Extractos por infusión de: A), B) Testigo, C) Albahaca, D) Ambo, E) Guayaba, F) Hierba Luisa, G) Matico, H) Ortiga negra, I) Paico, J) Tomillo.



**Gráfico C-27.** Actividad antimicrobiana de los extractos por infusión frente a *Escherichia coli* después de 48 h de incubación. Extractos por infusión de: A), B) Testigo, C) Albahaca, D) Ambo, E) Guayaba, F) Hierba Luisa, G) Matico, H) Ortiga negra, I) Paico, J) Tomillo.



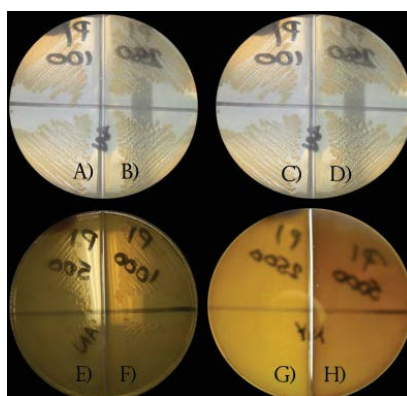
**Gráfico C-28.** Actividad antimicrobiana de los extractos por infusión frente a *Candida albicans* después de 48 h de incubación. Extractos por infusión de: A), B) Testigo, C) Albahaca, D) Ambo, E) Guayaba, F) Hierba Luisa, G) Matico, H) Ortiga negra, I) Paico, J) Tomillo.



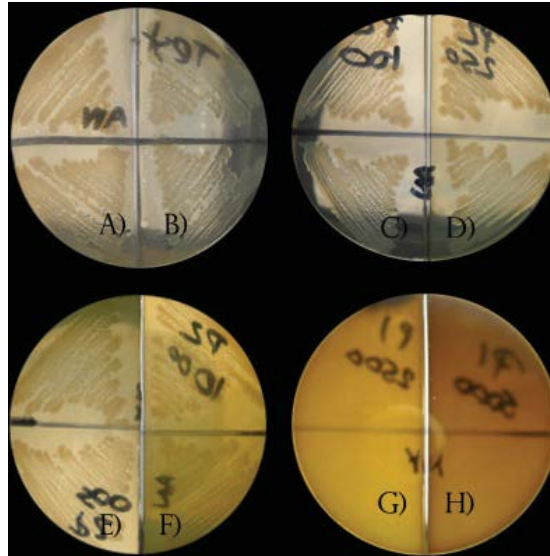
**Gráfico C-29.** Actividad antimicrobiana de los extractos por infusión frente a *Candida albicans* después de 72 h de incubación. Extractos por infusión de: A), B) Testigo, C) Albahaca, D) Ambo, E) Guayaba, F) Hierba Luisa, G) Matico, H) Ortiga negra, I) Paico, J) Tomillo.



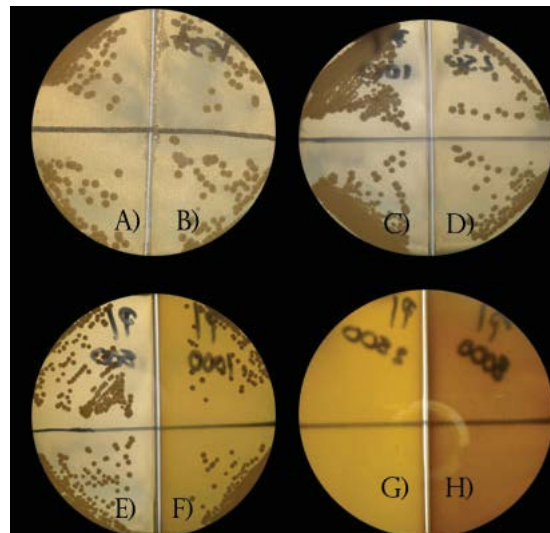
**Gráfico C-30.** Especies vegetales más promisorias. A) Paico, B) Tomillo.



**Gráfico C-31.** Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de paico a diferentes concentraciones frente a *Escherichia coli* después de 24 h de incubación. Concentraciones de: A), B) Testigo, C) 100 mg/l, D) 250 mg/l, E) 500mg/l, F) 1000 mg/l, G) 2500 mg/l, H) 5000 mg/l.

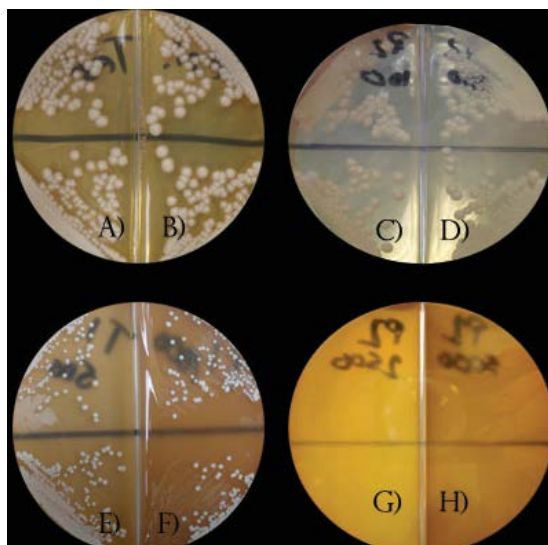


**Gráfico C-32. Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de paico a diferentes concentraciones frente a *Escherichia coli* después de 48 h de incubación. Concentraciones de: A), B) Testigo, C) 100 mg/l, D) 250 mg/l, E) 500mg/l, F) 1000 mg/l, G) 2500 mg/l, H) 5000 mg/l.**

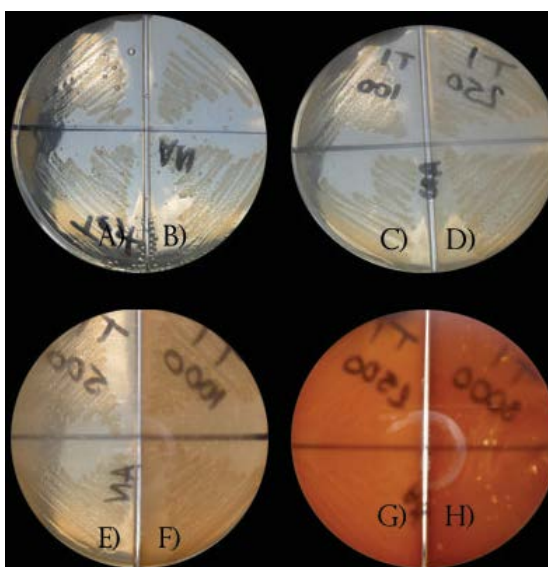


**Gráfico C-33. Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de paico a diferentes concentraciones frente a *Candida albicans* después de 48 h de incubación. Concentraciones de: A), B) Testigo, C) 100 mg/l, D) 250 mg/l, E) 500mg/l, F) 1000 mg/l, G) 2500 mg/l, H) 5000 mg/l.**

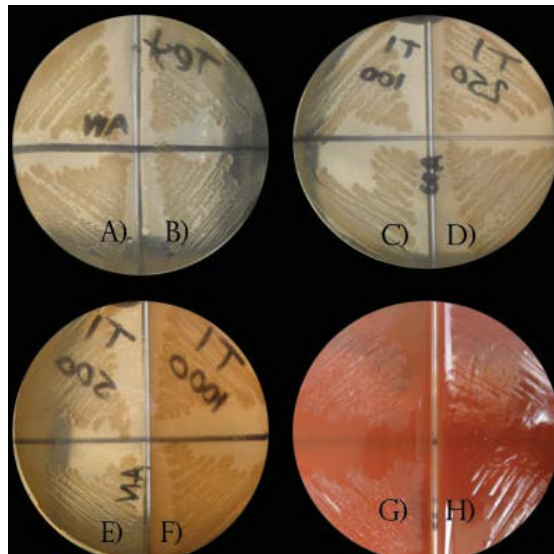




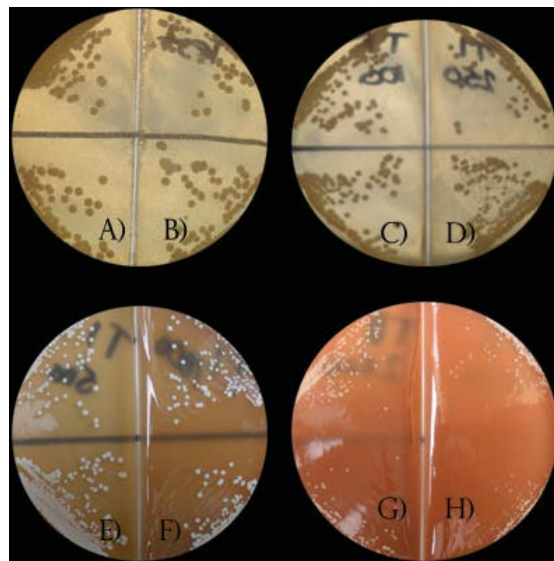
**Gráfico C-34. Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de paico a diferentes concentraciones frente a *Candida albicans* después de 72 h de incubación. Concentraciones de: A), B) Testigo, C) 100 mg/l, D) 250 mg/l, E) 500mg/l, F) 1000 mg/l, G) 2500 mg/l, H) 5000 mg/l.**



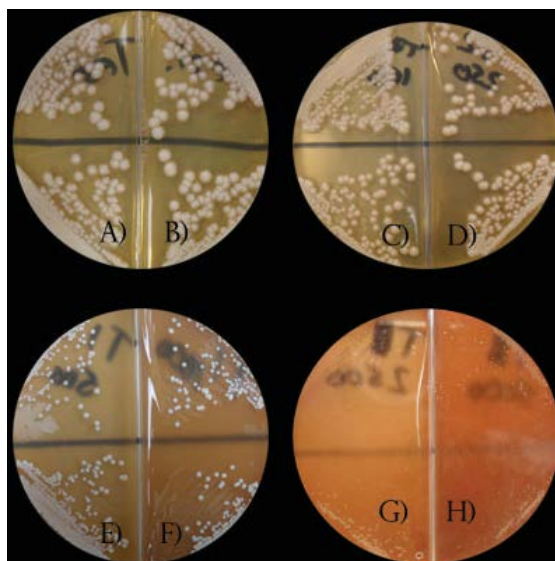
**Gráfico C-35. Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de tomillo a diferentes concentraciones frente a *Escherichia coli* después de 24 h de incubación. Concentraciones de: A), B) Testigo, C) 100 mg/l, D) 250 mg/l, E) 500mg/l, F) 1000 mg/l, G) 2500 mg/l, H) 5000 mg/l.**



**Gráfico C-36. Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de tomillo a diferentes concentraciones frente a *Escherichia coli* después de 48 h de incubación. Concentraciones de: A), B) Testigo, C) 100 mg/l, D) 250 mg/l, E) 500mg/l, F) 1000 mg/l, G) 2500 mg/l, H) 5000 mg/l.**



**Gráfico C-37. Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de tomillo a diferentes concentraciones frente a *Candida albicans* después de 48 h de incubación. Concentraciones de: A), B) Testigo, C) 100 mg/l, D) 250 mg/l, E) 500mg/l, F) 1000 mg/l, G) 2500 mg/l, H) 5000 mg/l.**



**Gráfico C-38. Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de tomillo a diferentes concentraciones frente a *Candida albicans* después de 72 h de incubación. Concentraciones de: A), B) Testigo, C) 100 mg/l, D) 250 mg/l, E) 500mg/l, F) 1000 mg/l, G) 2500 mg/l, H) 5000 mg/l.**

**ANEXO D**

**CERTIFICADOS DE CALIDAD Y REFERENCIA PARA LA  
ACTIVACIÓN DE LAS CEPAS MICROBIANAS**



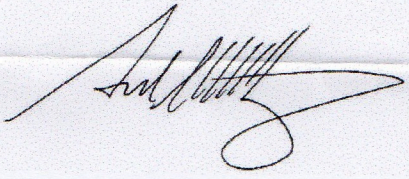
Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<b>Specifications</b> <b>Microorganism Name:</b> Escherichia coli <b>Catalog Number:</b> 0483 <b>Lot Number:</b> 483-255 <b>Reference Number:</b> ATCC® 8739™* <b>Purity:</b> < 0.1% Total Pellet CFU <b>Recovery:</b> > 1000 CFUs per Pellet <b>Passage from Reference:</b> 4	<b>Expiration Date:</b> 2014/06 <b>Release Information:</b> <b>Quality Control Technologist:</b> Christine Condon <b>Release Date:</b> 2012/8/9
---	--

<b>Performance</b>	
<b>Macroscopic Features:</b> Medium to large, gray, mucoid, convex. <b>Microscopic Features:</b> Gram negative straight rod.	<b>Medium:</b> SBAP <b>Method:</b> Gram Stain (1)

<b>Vitek GN (1)</b>		<b>Other Features/ Challenges: Results</b>
<b>Phenotypic Features</b>	<b>Results</b>	(1) Oxidase (Kovacs): negative Beta-glucuronidase (E. coli Broth w/MUG): positive
Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	-	
ADONITOL	-	
L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	-	
L-ARABITOL	-	
D-CELLOBIOSE	-	
BETA-GALACTOSIDASE	+	
H2S PRODUCTION	-	
BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	-	
Glutamyl Arylamidase pNA	-	
D-GLUCOSE	+	
GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE	-	
FERMENTATION/GLUCOSE	+	
BETA-GLUCOSIDASE	-	
D-MALTOSE	+	
D-MANNITOL	+	
D-MANNOSE	+	
BETA-XYLOSIDASE	-	
BETA-Alanine arylamidase pNA	-	
L-Proline ARYLAMIDASE	-	
LIPASE	-	
PALATINOSE	-	
Tyrosine ARYLAMIDASE	+	
UREASE	-	
D-SORBITOL	+	
SACCHAROSE/SUCROSE	-	
D-TAGATOSE	-	
D-TREHALOSE	+	
CITRATE (SODIUM)	-	
MALONATE	-	
5-KETO-D-GLUCONATE	-	
L-LACTATE alkalization	+	
ALPHA-GLUCOSIDASE	-	
SUCCINATE alkalization	+	
BETA-N-ACETYL-GALACTOSAMINIDASE	-	
ALPHA-GALACTOSIDASE	+	
PHOSPHATASE	+	
Glycine ARYLAMIDASE	-	
ORNITHINE DECARBOXYLASE	-	
LYSINE DECARBOXYLASE	+	
L-HISTIDINE assimilation	-	
COURMARATE	+	
BETA-GLUCORONIDASE	+	
O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)	+	
Glu-Gly-Arg-ARYLAMIDASE	-	
L-MALATE assimilation	+	
ELLMAN	+	
L-LACTATE assimilation	-	

**MEDIBAC-INC S.A.**  
 Distribuidor para el Ecuador de  
**MICROBIOLOGICS**  
 (Registro Sanitario AD-541-04-13)



Brad Goskowicz, President  
 AUTHORIZED SIGNATURE



## Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

**Specifications**


**Microorganism Name:** Escherichia coli  
**Catalog Number:** 0483  
**Lot Number:** 483-255  
**Reference Number:** ATCC® 8739™\*  
**Purity:** < 0.1% Total Pellet CFU  
**Recovery:** > 1000 CFUs per Pellet  
**Passage from Reference:** 4

**Expiration Date:** 2014/06**Release Information:**

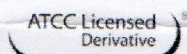
**Quality Control Technologist:** Christine Condon  
**Release Date:** 2012/8/9

Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

 Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(\*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.



(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.

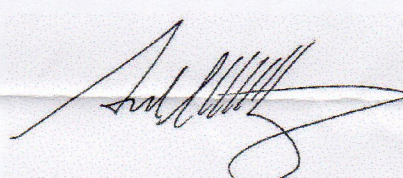
TESTING CERT #2655.01



**Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release**

<b>Specifications</b> <b>Microorganism Name:</b> Candida albicans <b>Catalog Number:</b> 0443 <b>Lot Number:</b> 443-228 <b>Reference Number:</b> ATCC® 10231™* <b>Purity:</b> < 0.1% Total Pellet CFU <b>Recovery:</b> > 1000 CFUs per Pellet <b>Passage from Reference:</b> 4	<b>Expiration Date:</b> 2014/05 <b>Release Information:</b> <b>Quality Control Technologist:</b> Christine Condon <b>Release Date:</b> 2012/7/13
--	---

Performance	
<b>Macroscopic Features:</b> Small to medium, white, circular, convex, dull colonies. <b>Microscopic Features:</b> Gram positive, ovoidal, budding yeast cells.	<b>Medium:</b> Nutrient <b>Method:</b> Gram Stain (1)

<b>Vitek YST (1)</b> <b>Phenotypic Features</b>		<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Germ Tube Test: positive (1) Chlamydospore production: positive																																																																																													
<table border="1"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Phenotypic Features</th> <th style="text-align: center;">Results</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>L-Lysine-ARYLAMIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>L-MALATE assimilation</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>Leucine ARYLAMIDASE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>ARGININE GP</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>ERYTHRITOL assimilation</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>GLYCEROL assimilation</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>Tyrosine ARYLAMIDASE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>ARBUTINE assimilation</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>AMYGDALINE assimilation</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>D-GALACTOSE assimilation</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>GENTIOBIOSE assimilation</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>D-GLUCOSE assimilation</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>LACTOSE assimilation</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>METHYL-A-D-GLUCOPYRANOSIDE assimilation</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>D-CELLOBIOSE assimilation</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>D-MALTOSE assimilation</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>D-RAFFINOSE assimilation</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>PNP-N-acetyl-BD-galactosaminidase 1</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>D-MANNOSE assimilation</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>D-MELIBIOSE assimilation</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>D-MELEZITOSE assimilation</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>L-SORBOSE assimilation</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>L-RHAMNOSE assimilation</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>XYLITOL assimilation</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>D-SORBITOL assimilation</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>SACCHAROSE/SUCROSE assimilation</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>UREASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>ALPHA-GLUCOSIDASE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>D-TURANOSE assimilation</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>D-TREHALOSE assimilation</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>NITRATE assimilation</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>L-ARABINOSE assimilation</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>D-GALACTURONATE assimilation</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>ESCULIN hydrolyse</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>L-GLUTAMATE assimilation</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>D-XYLOSE assimilation</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>DL-LACTATE assimilation</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>ACETATE assimilation</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>CITRATE (SODIUM) assimilation</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>GLUCURONATE assimilation</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>L-PROLINE assimilation</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>2-KETO-D-GLUCONATE assimilation</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>N-ACETYL-GLUCOSAMINE assimilation</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>D-GLUCONATE assimilation</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> </tbody> </table>	Phenotypic Features	Results	L-Lysine-ARYLAMIDASE	-	L-MALATE assimilation	+	Leucine ARYLAMIDASE	+	ARGININE GP	+	ERYTHRITOL assimilation	-	GLYCEROL assimilation	+	Tyrosine ARYLAMIDASE	+	BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	+	ARBUTINE assimilation	-	AMYGDALINE assimilation	-	D-GALACTOSE assimilation	+	GENTIOBIOSE assimilation	-	D-GLUCOSE assimilation	+	LACTOSE assimilation	-	METHYL-A-D-GLUCOPYRANOSIDE assimilation	+	D-CELLOBIOSE assimilation	-	GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE	-	D-MALTOSE assimilation	+	D-RAFFINOSE assimilation	-	PNP-N-acetyl-BD-galactosaminidase 1	+	D-MANNOSE assimilation	+	D-MELIBIOSE assimilation	-	D-MELEZITOSE assimilation	-	L-SORBOSE assimilation	-	L-RHAMNOSE assimilation	-	XYLITOL assimilation	+	D-SORBITOL assimilation	+	SACCHAROSE/SUCROSE assimilation	+	UREASE	-	ALPHA-GLUCOSIDASE	+	D-TURANOSE assimilation	+	D-TREHALOSE assimilation	+	NITRATE assimilation	-	L-ARABINOSE assimilation	-	D-GALACTURONATE assimilation	+	ESCULIN hydrolyse	-	L-GLUTAMATE assimilation	+	D-XYLOSE assimilation	+	DL-LACTATE assimilation	+	ACETATE assimilation	+	CITRATE (SODIUM) assimilation	+	GLUCURONATE assimilation	-	L-PROLINE assimilation	+	2-KETO-D-GLUCONATE assimilation	+	N-ACETYL-GLUCOSAMINE assimilation	+	D-GLUCONATE assimilation	+	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> <b>MEDIBAC-INC S.A.</b>          Distribuidor para el Ecuador de  <b>MICROBIOLOGICS</b>          (Registro Sanitario AD-541.04-13)       </div>   Brad Goskowicz, President AUTHORIZED SIGNATURE
Phenotypic Features	Results																																																																																														
L-Lysine-ARYLAMIDASE	-																																																																																														
L-MALATE assimilation	+																																																																																														
Leucine ARYLAMIDASE	+																																																																																														
ARGININE GP	+																																																																																														
ERYTHRITOL assimilation	-																																																																																														
GLYCEROL assimilation	+																																																																																														
Tyrosine ARYLAMIDASE	+																																																																																														
BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	+																																																																																														
ARBUTINE assimilation	-																																																																																														
AMYGDALINE assimilation	-																																																																																														
D-GALACTOSE assimilation	+																																																																																														
GENTIOBIOSE assimilation	-																																																																																														
D-GLUCOSE assimilation	+																																																																																														
LACTOSE assimilation	-																																																																																														
METHYL-A-D-GLUCOPYRANOSIDE assimilation	+																																																																																														
D-CELLOBIOSE assimilation	-																																																																																														
GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE	-																																																																																														
D-MALTOSE assimilation	+																																																																																														
D-RAFFINOSE assimilation	-																																																																																														
PNP-N-acetyl-BD-galactosaminidase 1	+																																																																																														
D-MANNOSE assimilation	+																																																																																														
D-MELIBIOSE assimilation	-																																																																																														
D-MELEZITOSE assimilation	-																																																																																														
L-SORBOSE assimilation	-																																																																																														
L-RHAMNOSE assimilation	-																																																																																														
XYLITOL assimilation	+																																																																																														
D-SORBITOL assimilation	+																																																																																														
SACCHAROSE/SUCROSE assimilation	+																																																																																														
UREASE	-																																																																																														
ALPHA-GLUCOSIDASE	+																																																																																														
D-TURANOSE assimilation	+																																																																																														
D-TREHALOSE assimilation	+																																																																																														
NITRATE assimilation	-																																																																																														
L-ARABINOSE assimilation	-																																																																																														
D-GALACTURONATE assimilation	+																																																																																														
ESCULIN hydrolyse	-																																																																																														
L-GLUTAMATE assimilation	+																																																																																														
D-XYLOSE assimilation	+																																																																																														
DL-LACTATE assimilation	+																																																																																														
ACETATE assimilation	+																																																																																														
CITRATE (SODIUM) assimilation	+																																																																																														
GLUCURONATE assimilation	-																																																																																														
L-PROLINE assimilation	+																																																																																														
2-KETO-D-GLUCONATE assimilation	+																																																																																														
N-ACETYL-GLUCOSAMINE assimilation	+																																																																																														
D-GLUCONATE assimilation	+																																																																																														



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

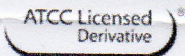
<b>Specifications</b> <b>Microorganism Name:</b> Candida albicans <b>Catalog Number:</b> 0443 <b>Lot Number:</b> 443-228 <b>Reference Number:</b> ATCC® 10231™* <b>Purity:</b> < 0.1% Total Pellet CFU <b>Recovery:</b> > 1000 CFUs per Pellet <b>Passage from Reference:</b> 4	<b>Expiration Date:</b> 2014/05 <b>Release Information:</b> <b>Quality Control Technologist:</b> Christine Condon <b>Release Date:</b> 2012/7/13
--	---

Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(\*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.



(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.

TESTING CERT #2655.01

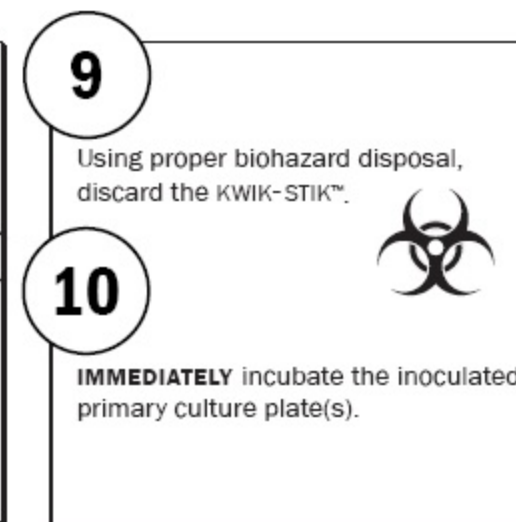
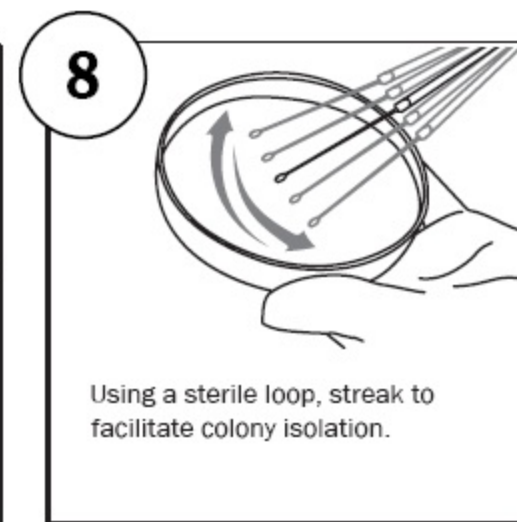
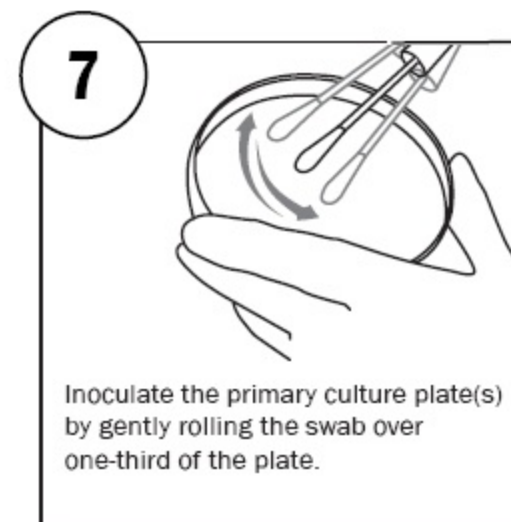
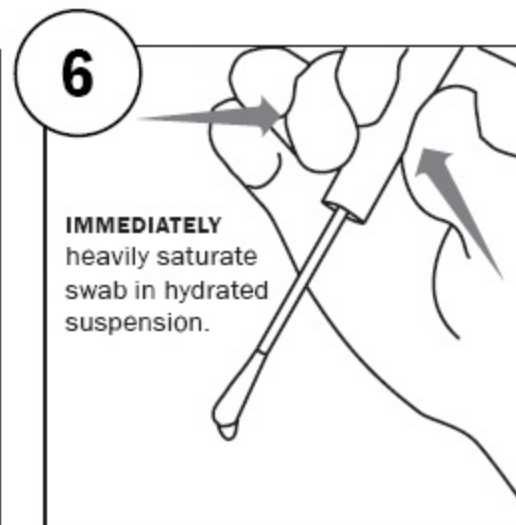
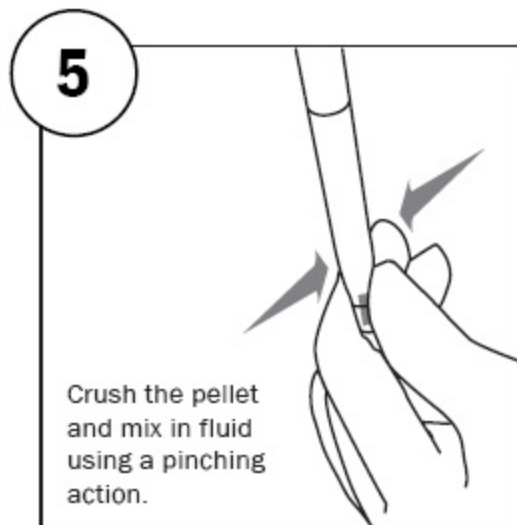
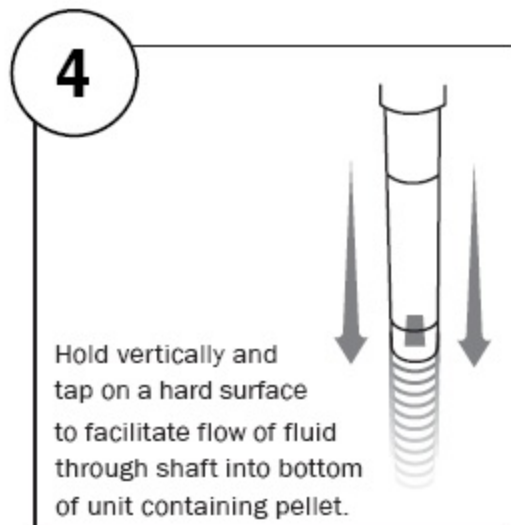
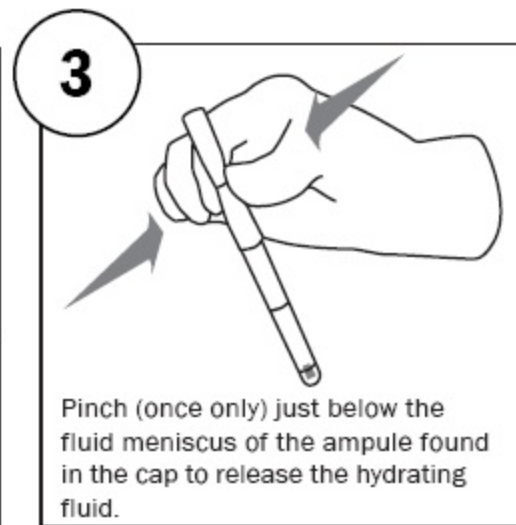
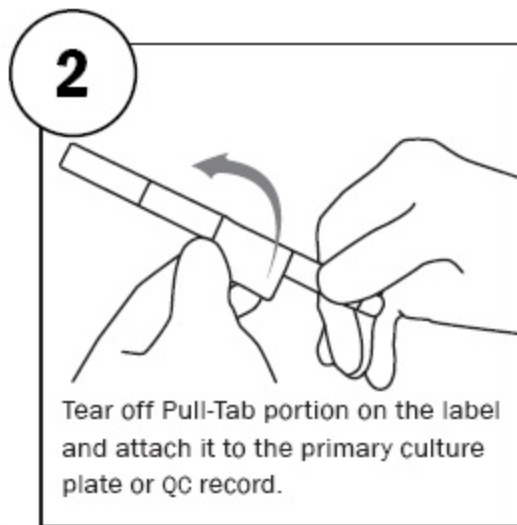


KWIK-STIK™ and KWIK-STIK™ Plus microorganism preparations contain a lyophilized pellet of a single strain of microorganism. EZ-COMP™ microorganism preparations contain a defined mixed population of microorganisms.

# KWIK-STIK™

## Illustrated Instructions










Also for KWIK-STIK™ Plus & EZ-COMP™



## **ANEXO E**

### **TABLA INTERNACIONAL DE COLORES (BRITISH STANDARD SPECIFICATION FOR COLOURS FOR IDENTIFICATION, CODING AND SPECIAL PURPOSES)**

# BS381C COLOUR CHART















					
101 Sky Blue	102 Turquoise Blue	103 Peacock Blue	104 Azure Blue	105 Oxford Blue	106 Royal Blue
					
107 Strong Blue	108 Aircraft Blue	109 Middle Blue	110 Roundel Blue	111 Pale Blue	112 Arctic Blue
					
113 Deep Saxe Blue	114 Rail Blue	115 Cobalt Blue	166 French Blue	172 Pale Roundel Blue	174 Oriental Blue
					
175 Light French Blue	210 Sky	216 Eau-De-Nil	217 Sea Green	218 Grass Green	220 Olive Green
					
221 Brilliant Green	222 Light Bronze Green	223 Middle Bronze Green	224 Deep Bronze Green	225 Light Brunswick Green	226 Middle Brunswick Green
					
227 Deep Brunswick Green	228 Emerald Green	241 Dark Green	262 Bold Green	267 Deep Chrome Green	275 Opaline Green
					
278 Light Olive Green	280 Verdigris Green	283 Forest Green	284 Spruce Green	285 NATO Green	298 Olive Drab
					
309 Canary Yellow	310 Primrose	315 Grapefruit	320 Light Brown	337 Very Dark Drab	350 Dark Earth

# BS381C COLOUR CHART

					
352 Pale Cream	353 Deep Cream	355 Lemon	356 Golden Yellow	358 Light Buff	359 Middle Buff
					
361 Light Stone	363 Bold Yellow	365 Vellum	366 Light Beige	367 Manilla	369 Biscuit
					
380 Camouflage Desert Sand	384 Light Straw	388 Beige	389 Camouflage Beige	411 Middle Brown	412 Dark Brown
					
414 Golden Brown	420 Dark Camouflage Desert Sand	435 Camouflage Red	436 Dark Camouflage Brown	444 Terracotta	445 Venetian Red
					
446 Red Oxide	447 Salmon Pink	448 Deep Indian Red	449 Light Purple Brown	452 Dark Crimson	453 Shell Pink
					
454 Pale Roundel Red	460 Deep Buff	473 Gulf Red	489 Leaf Brown	499 Service Brown	537 Signal Red
					
538 Post Office Red Cherry	539 Currant Red	540 Crimson	541 Maroon	542 Ruby	557 Light Orange
					
564 Bold Red	568 Apricot	592 International Orange	593 Rail Red	626 Camouflage Grey	627 Light Aircraft Grey



# BS381C COLOUR CHART

					
629 Dark Camouflage Grey	630 French Grey	631 Light Grey	632 Dark Admiralty Grey	633 RAF Blue/Grey	634 Slate
					
635 Lead	636 PRU Blue	637 Medium Sea Grey	638 Dark Sea Grey	639 Light Slate Grey	640 Extra Dark Sea Grey
					
642 Night	671 Middle Graphite	676 Light Weatherwork Grey	677 Dark Weatherwork Grey	692 Smoke Grey	693 Aircraft Grey
					
694 Dove Grey	697 Light Admiralty Grey	796 Dark Violet	797 Light Violet		

Please note: The colours depicted on the above chart are for guidance only. The displayed colour will depend on your monitor and browser and pearl or metallic colours cannot be shown adequately.

The finished colour, therefore, may not be as shown here.

**ANEXO F**  
**MICROGEN™ GN-ID IDENTIFICACIÓN. INSTRUCCIONES DE**  
**USO**



# Microgen™ GN-ID Identificación

## Instrucciones de Uso

<b>REF</b>	<b>MID-64 A Panel</b>	<b>60</b>
<b>REF</b>	<b>MID-65 B Panel</b>	<b>24</b>

**CE**

**IVD**

# MICROGEN GN ID

## Guía Rápida

	GN A	GN A+B	GN A+B
OXIDASA	NEGATIVA	NEGATIVA	<b>POSITIVA</b> 1 colonia en 5ml salina Añadir 1gota de suero de caballo estéril /ml salina si se sospecha de <i>Actinobacillus</i> o <i>Pasteurella spp.</i>
INÓCULO	1 colonia en 3ml salina	1 colonia en 5ml salina	3-4 gotas (100µl) por pocillo
INOCULACIÓN	3-4 gotas (100µl) por pocillo	3-4 gotas (100µl) por pocillo	Pocillo 1, 2, y 3 más
REVESTIMIENTO CON ACEITE	Pocillo 1 – Lisina Pocillo 2 – Ornitina Pocillo 3 – H <sub>2</sub> S	<b>Pocillo 20 – Arabinosa</b> Pocillo 24 – Arginina	<b>Pocillo 1, 2, y 3 más</b> Pocillo 24 – Arginina
TIEMPO DE INCUBACIÓN	18 - 24 horas	18 - 24 horas	48 horas
TEMPERATURA	35 - 37°C	35 - 37°C	35 - 37°C (25°C para <i>Ps. fluorescens</i> )
LECTURA INICIAL	Pocillo 8: Indol - Añadir 2 gotas del reactivo Kovac's. Leer en 2mins.	Igual que para GN A	Igual que para GN A
ADICIÓN DE REACTIVOS	Pocillo 10: VP – Añadir 1 gota del reactivo VPI y 1 gota del reactivo VPII . Leer tras 15-30mins  Pocillo 12: TDA – Añadir 1 gota del reactivo TDA y leer inmediatamente.	Gelatina: Interpretar a las 24 horas  Pocillo 24: Arginina - Amarillo = Negativo Verde/Azul = Positivo	Gelatina – interpretar a las 48 horas  Pocillo 24: Arginina - Amarillo = Negativo Azul = Positivo
LECTURA FINAL (Opcional Microgen Software)			

**Nota: Un círculo Negro alrededor del extremo superior del pocillo indica que el pocillo requiere la adición de aceite mineral antes de la incubación.**

**Un círculo verde alrededor del extremo superior del pocillo indica que el pocillo requiere la adición de reactivos después de la incubación.**

#### **USO**

El sistema Microgen GN-ID utiliza 12 (GN A) o 24 (GN A+B) substratos bioquímicos estandarizados en pocillos para identificar la familia *Enterobacteriaceae* y otros bacilos no-exigentes Gram. negativos (oxidasa negativos y positivos). El kit se ha diseñado solo para uso profesional.

#### **PRINCIPIO DEL TEST**

El sistema Microgen GN-ID comprende dos tiras de micropocillos por separado (GN A y GN B). Cada tira contiene 12 substratos bioquímicos estandarizados que han sido seleccionados en función de un análisis informático muy extenso (1) de las bases de datos publicadas para la identificación de la familia *Enterobacteriaceae* y los microorganismos Gram. negativos oxidasa positivos y negativos no-exigentes más comunes (2,3,4,5). Los substratos deshidratados en cada pocillo se reconstituyen con una suspensión salina del organismo a identificar. Si los substratos son metabolizados por el organismo, se observará un cambio de color durante la incubación o después de la adición de reactivos específicos (ver la Tabla de Referencia de los Substratos). La permutación de los substratos metabolizados se puede interpretar usando el Software Microgen Identification (MID-60) para identificar el organismo analizado.

Las tiras de GN A han sido diseñadas para la identificación de fermentadores de glucosa oxidasa negativos, nitrato positivas que incluyen los géneros más comunes de la familia *Enterobacteriaceae*. Las tiras GN A y GN B se utilizarán conjuntamente obteniendo un sistema con 24 substratos para identificar bacilos Gram. negativos no-exigentes (oxidasa negativos y positivos) además de todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae* (28 géneros) –ver tabla de datos.

Las tiras de GN B han sido diseñadas para ser usadas conjuntamente con las tiras GN A y no de modo individual.

<b>CONT</b>
-------------

#### **PRESENTACIÓN DEL KIT**

<b>GN</b>	<b>A</b>
-----------	----------

MID-64

Panel GN-ID A

60 A Test Tiras

Tiras de micropocillos que contienen 12 bioquímicos para la identificación de organismos GN A – ver tabla de datos

Marco soporte para las tiras  
Hoja de resultados  
Instrucciones de Uso

<b>GN</b>	<b>B</b>
-----------	----------

MID-65

Panel GN-ID B

24 B Test Tiras

Tiras de micropocillos que contienen 12 bioquímicos para usar conjuntamente con las tiras GN A para la identificación de los organismos GN B – ver tabla de datos

**Requerimientos adicionales:**

- a) Software Microgen Identification (MID-60) – Proporciona la identificación basándose en la probabilidad, el % de probabilidad y el parecido con un análisis de la calidad de la diferenciación. Puede encontrar una definición completa de estos términos en el manual de ayuda del Software.
  - b) Tiras Oxidasa (6)
  - c) Aceite Mineral
  - d) Reactivos VP I y VP II (7)
  - e) Reactivos Nitrate A&B (8)
  - f) Reactivo TDA (9)
  - g) Reactivo Kovac's (10)
  - h) Carta de color para leer los resultados – tamaño A4 disponible en su distribuidor bajo pedido.
  - i) Solución salina estéril 0.85%
  - j) Pipetas estériles y asas bacteriológicas
  - k) Incubador, sin ventilador (35-37°C)
  - l) Medio de movilidad
  - m) Suero de caballo estéril (si se sospecha de la presencia de *Actinobacillus spp.* o *Pasteurella spp.*)
  - n) Bunsen.
- (Los Items b-g se pueden comprar en varios proveedores, incluyendo Microgen Bioproducts Ltd. Alternativamente, el usuario puede hacer sus propias formulaciones)

**CONSEJOS Y PRECAUCIONES**

**Seguridad:**

1. Los reactivos proporcionados en este kit son para análisis *in vitro*
2. Se deben tomar las precauciones apropiadas cuando se manipulen o eliminen potenciales patógenos. Después de su uso, eliminar todo el material contaminado en un autoclave, por incineración o inmersión en un desinfectante apropiado como el hipocloruro sódico a concentración final del 3% durante 30 minutos. El residuo líquido ácido se debe neutralizar antes del tratamiento.

**Procedimiento:**

1. El sistema Microgen GN-ID se debe usar siguiendo las instrucciones del kit.
2. Las tiras del test **no** se deben incubar en una estufa CO<sub>2</sub>
3. Debido a su superior demanda en requerimientos nutricionales, *Actinobacillus spp.* y *Pasteurella spp.* requieren la adición de algún tipo de enriquecimiento en el inóculo. Se recomienda la adición de 1 gota de suero de caballo inactivado estéril por mL de solución salina estéril cuando se prepara el inóculo.
4. Si se sospecha de la presencia de *Pseudomonas fluorescens*, las tiras A & B se deben incubar a 25°C.
5. La incorrecta incubación, llenado inadecuado de los pocillos, o densidad inadecuada del inóculo pueden derivar en falsos resultados.

**CONSERVACIÓN Y VIDA ÚTIL**

Las tiras GN A y GN B son estables si se mantienen sin abrir a 2-8°C hasta la fecha de caducidad indicada. Los sobres abiertos y parcialmente usados se pueden conservar durante 14 días a 2-8°C comprobando que el sobre se sella de nuevo y que contiene la sustancia desecante.

**ESPECIMENES**

Siempre se debe usar un cultivo puro del organismo aislado tras 18-24 horas de incubación. Se debe hacer un test oxidasa del organismo aislado antes de la inoculación de la tira.

## PROCEDIMIENTO - INOCULACIÓN E INCUBACIONES

1. Hacer un test oxidasa del organismo aislado. Los organismos oxidasa positivos solo se pueden identificar inoculando tanto las tiras del GN A como GN B.
2. Emulsificar una única colonia obtenida de un cultivo de 18-24 horas en 3 mL de solución salina estéril 0.85% para la tira GN A. Si se van a inocular ambas tiras, GN A y GN B, la colonia se debe emulsificar en 3-5mL de solución salina estéril 0.85%. Mezclar bien.
3. Quitar la lamina adhesiva que sella los pocillos cuidadosamente. **NO tirar la tira adhesiva, que a posteriori se volverá a necesitar.**
4. Usando una pipeta pasteur estéril, añadir 3-4 gotas (aproximadamente 100µL) de la suspensión bacteriana a cada pocillo de la tira(s).
5. Para comprobar la pureza del inóculo, transferir 1 gota de la suspensión bacteriana a una placa de medio no-selectivo. Incubar la placa aeróbicamente a 35-37°C durante 18-24 horas.
6. Después de la inoculación, revestir los pocillos 1,2 y 3 (numerar la tira GN A empezando por el final de la etiqueta) y pocillos 20 y 24 (tira GN B – el pocillo 13 es al final de la etiqueta) con 3-4 gotas de aceite mineral. **(NO añadir aceite en el pocillo 20 si el organismo aislado es oxidasa positivo).** Estos pocillos están marcados con un círculo Negro alrededor para facilitar su identificación.
7. Sellar la parte superior de la tira(s) con la cinta adhesiva que se había retirado antes e incubar a 35-37°C. **Asegurarse que los “agujeros” de la cinta adhesiva estén sobre los pocillos 7, 11 y 12 en la tira GN A strip y sobre el pocillo 14 en la tira GN B.**
8. Las tiras GN A t GN B se leerán después de 18-24 horas de incubación para las *Enterobacteriaceae*, y tras 48 horas para los aislados oxidasa positivos.

## PROCEDIMIENTO – LECTURA Y ADICIÓN DE REACTIVOS

### Tira GN A

1. Quitar la cinta adhesiva y anotar todas las reacciones positivas con la ayuda de la carta de color (incluida). Anotar los resultados en la hoja de resultados proporcionada.
2. Añadir los reactivos apropiados a los siguientes micropocillos:
  - a) Añadir 2 gotas de reactivo Kovac's al pocillo 8. Leer y anotar los resultados después de 60 segundos. Formación de color rojo indica un resultado positivo.
  - b) Añadir 1 gota del reactivo VP I y 1 gota del reactivo VP II al pocillo 10 y leer y anotar los resultados tras 15-30 minutos. La formación de un color rosa / rojo indica un resultado positivo.
  - c) Añadir 1 gota del reactivo TDA al pocillo 12 y leer después de 60 segundos. La formación de un color rojo cereza indica un resultado positivo.
3. Hacer el test de reducción de nitrato al pocillo 7 después de leer y anotar el resultado del test ONPG. Añadir 1 gota del reactivo Nitrato A y una gota del reactivo Nitrato B al pocillo y leer después de 60 segundos. El desarrollo de color rojo indica que el nitrato ha sido reducido a nitrito. Si el pocillo 7 se mantiene amarillo o incoloro después de la adición de los reactivos nitrato, añadir una pequeña cantidad de polvo de zinc. Esto indicará si el nitrato ha sido completamente reducido a nitrógeno gas.

Ej. Después de la adición del Nitrato A + B:  
Rojo = Positivo  
Incoloro / amarillo = Negativo

Después de la adición de polvo de zinc:  
Incoloro / amarillo = Positivo  
Rojo = Negativo
4. Anotar estos resultados adicionales en la hoja de resultados proporcionada.

## Tira GN B

1. Quitar la cinta adhesiva y anotar todas las reacciones positivas con la ayuda de la carta de color. Anotar los resultados en la hoja de resultados proporcionada.
2. Leer los pocillos específicos según se indica:
  - a) El pocillo de gelatina (13) se debe leer tras 18-24 horas para *Enterobacteriaceae* y tras 48 horas para los aislados oxidasa positivos. Si se observan partículas negras a través del pocillo es indicativo de un resultado positivo de licuefacción de la gelatina.
  - b) El pocillo de la arginina se interpreta diferente tras 24 y 48 horas de incubación:
    - 24 horas (*Enterobacteriaceae*)  
Amarillo = Negativo  
Verde/Azul = Positivo
    - 48 horas (Organismos Oxidasa positivos)  
Amarillo / verde = Negativo  
Azul = Positivo


## IDENTIFICACIÓN

En la hoja de resultados de Microgen GN-ID A+B, los sustratos se han organizado en tripletes (sets de 3 reacciones) y se ha asignado un valor numérico a cada sustrato (1, 2 o 4). La suma de las reacciones positivas para cada triplete da lugar a un único dígito, el Perfil numérico, que se utilizará para determinar la identidad del organismo aislado. El Perfil numérico se introduce en el Software Microgen Identification System (MID-60), que genera un informe de los cinco microorganismos más parecidos en una base de datos selectiva. El software proporciona una identificación basada en probabilidad, en % de probabilidad y en el parecido con un análisis de la calidad de la diferenciación. La definición completa de estos términos y la explicación de su utilidad e interpretación la encontrará en el manual de ayuda proporcionado con el software.

Nota: Para organismos oxidasa positivos (miscelánea de bacilos Gram. negativos):

- Considerar las reacciones débiles como negativos
- Los resultados para la oxidasa, la reducción de nitrato y la movilidad se deben incluir para dar lugar a un Perfil numérico de 9 dígitos

## Ejemplo de Hoja de Resultados

MICROGEN GN-ID A+B PANEL REPORT FORM													 MICROGEN BIOPRODUCTS																	
Lab. No.		Specimen Type: <i>CHEESE SANDWICH</i>																												
3341		Date: <i>28<sup>TH</sup> JANUARY 2002</i>																												
Well Number				GN A wells								GN B wells																		
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24			
Reaction				Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V.P.	Citrate	TDA	Gelatine	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
Result							++	-	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-
Reaction Index				4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions							6			7			6			0			0			7			6			0		
Profile No:				<i>67600760</i>											Final Identification:				<i>E. coli</i>											

WF6125/01/12



**Importante:**

Las tiras Microgen GN-ID A dan lugar a un Perfil numérico de 4 dígitos.

Las tiras Microgen GN-ID A+B dan lugar a un Perfil numérico de 8 dígitos.

Las tiras Microgen GN-ID A+B dan lugar a un Perfil numérico de 9 dígitos si el organismo aislado es oxidasa positivo

**LIMITACIONES DE USO**

1. Los resultados se deben interpretar por los clínicos en el contexto de toda la información clínica y de laboratorio disponible.
2. El sistema Microgen ID ha sido diseñado para la identificación de estos microorganismos incluidos en la base de datos. No se debe usar para identificar ninguna otra bacteria.
3. Analizar solamente colonias puras, únicas puesto que una mezcla de colonias puede dar lugar a resultados erróneos.
4. Las reacciones obtenidas cuando se utiliza el Microgen GN-ID pueden diferir de los datos publicados obtenidos cuando se utilizan formulaciones alternativas de sustratos o reactivos.
5. Algunas cepas bacterianas pueden tener reacciones bioquímicas atípicas y pueden ser difíciles de identificar.
6. Los resultados de identificación generados por el software deben ser interpretados por personal entrenado.
7. Se debe tener en cuenta la fuente del organismo aislado, la tinción Gram., la morfología de la colonia, los test adicionales y los test contra la identificación cuando se vaya a determinar la identificación final del organismo.
8. La movilidad y el test de nitratos se debe realizar en los bacilos Gram. negativos, oxidasa positivos. Es necesario un Perfil numérico de 9 dígitos para interpretar los resultados usando el Software Microgen Identification System.
9. La tira GN-ID A puede no ser capaz de diferenciar acuradamente entre *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp* y *Serratia spp*. Las especies de estos tres géneros se pueden diferenciar usando las tiras GN-ID A+B. Alternativamente, se pueden usar tests adicionales como el test de motilidad y de DNAsa.

**CONTROL DE CALIDAD**

La realización del sistema Microgen GN-ID se puede monitorear usando cepas de control apropiadas.

Se recomiendan los siguientes cultivos para asesoramiento independiente de laboratorio:

*Klebsiella pneumoniae* NCTC 9528

*Acinetobacter baumannii* ATCC 19606

*Proteus mirabilis* ATCC 14153

*Escherichia coli* ATCC 25922

	GNA											GNB													
	L Y S	O R N	H 2 S	G L U	M A N	X Y L	O N P	I N D	U R E	V P	C I T	T D A	N I T	G E L	M A L	I N O	S O R	R H A	S U C	L A C	A R A	A D O	R A F	S A L	A R G
<i>K.pneumoniae</i> NCTC 9528	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>A.baumannii</i> ATCC 19606	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>P.mirabilis</i> ATCC 14153	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E.coli</i> ATCC 25922	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-

## BASE DE DATOS

El sistema Microgen GN-ID se basa en métodos de análisis bioquímico standards. Los datos proporcionados para la interpretación de los perfiles de reacción se basa en lo establecido en las fuentes de literatura (2,3,4).

## CARACTERÍSTICAS DE PROCEDIMIENTO

El Microgen GN-ID A (MID-64) ha sido evaluado en comparación con dos productos comerciales muy bien establecidos en el Mercado para la identificación de organismos aislados. Se analizaron 197 cepas características de *Enterobacteriaceae* con los 3 productos.

Organismo	Número total	Microgen GN A	Com. Test 1	Com. Test 2
<i>E. coli</i>	43	43	43	43
<i>Shigella spp</i>	4	4	4	4
<i>S. sonnei</i>	3	3	3	3
<i>K. Pneumoniae</i>	13	13	13	13
<i>K. oxytoca</i>	11	11	11	11
<i>E. cloacae</i>	8	7*	8	0**
<i>E. aerogenes</i>	3	3	3	1+
<i>S. marcescens</i>	2	2	2	2
<i>C. freundii</i>	9	9	9	8 <sup>++</sup>
<i>C. diversus</i>	2	2	2	2
<i>H. alvei</i>	1	1	1	1
<i>P. mirabilis</i>	11	11	11	11
<i>P. vulgaris</i>	2	2	2	2
<i>P. stuartii</i>	2	2	2	2
<i>Salmonella spp</i>	83	83	83	83
<b>Total identificados correctamente</b>	197	196	197	186

\*1 cepa se identificó como *E. cloacae* con Microgen GN A pero como *E. gergoviae* con el test comercial 1. Sin embargo, *E. gergoviae* no se incluye en la base de datos de Microgen GN A; (se incluye en la base de datos de Microgen GN A+B). Como este organismo se identificó con el género correcto, se consideró que Microgen GN A era equivalente al test comercial 1.

\*\*6 cepas identificadas por el test comercial 2 como *C. diversus*, 1 cepa como *S. liquefaciens*, 1 cepa como *K. ozanae*.

+2 cepas identificadas por el test comercial 2 como *S. liquefaciens*

<sup>++</sup> 1 cepa identificada por el test comercial 2 como *K. ozeane*

Microgen GN-ID A+B (MID-64 & 65) ha sido evaluado en comparación con dos productos disponibles en el Mercado y muy bien establecidos. Se analizaron 190 cepas plenamente caracterizadas de *Enterobacteriaceae* con los tres productos.

Organismo	Número total	Microgen GN A+B	Com. Test 1	Com. Test 2
<i>E. coli</i>	43	43	43	43
<i>Shigella spp</i>	3	3	3	3
<i>S. sonnei</i>	4	4	4	4
<i>K. pneumoniae</i>	12	12	12	12
<i>K. oxytoca</i>	2	2	2	2
<i>K. terrigena</i>	1	1	0*	1
<i>E. cloacae</i>	9	9	9	8**
<i>E. aerogenes</i>	3	3	3	1***
<i>S. marcescens</i>	4	4	4	4
<i>C. freundii</i>	2	2	2	2
<i>C. youngae</i>	4	4	0+	4
<i>C. brakki</i>	2	2	2	2

<i>C. amalonaticus</i>	1	1	1	1
<i>H. alvei</i>	2	2	2	1 <sup>++</sup>
<i>P. mirabilis</i>	11	11	11	11
<i>P. vulgaris</i>	2	2	2	2
<i>P. stuartii</i>	2	2	2	2
<i>Salmonella spp</i>	83	83	83	83
<b>Total correctamente identificadas</b>	190	190	185	186

\* 1 organismo aislado de *K. terrigena* se identificó erróneamente como *K. pneumoniae* por el test comercial 1

\*\* 1 organismo aislado de *E. cloacae* se identificó erróneamente como *K. pneumoniae* por el test comercial 2

\*\*\* 2 organismos aislados de *E. aerogenes* se identificaron erróneamente como *S. fonticola* por el test comercial 2

+ Ninguno de los 4 organismos aislados de *C. youngae* no fueron identificados por el test comercial 1

\*\* 1 organismo aislado de *H. alvei* se identificó erróneamente como *Y. ruckeri* por el test comercial 2

## REPRODUCIBILIDAD

**Intra-lote:** Se analizó un panel de siete cultivos bacterianos utilizando tres lotes de GN A y 1 lote de GN B. Cada lote de producto se utilizó en 3 ocasiones por un laborante diferente en cada ocasión. Los resultados obtenidos por los tres laborantes se correlacionaron muy bien dando una reproducibilidad intra-ensayo superior al 99%.

**Inter-lote:** Se analizaron tres lotes de GN A y dos lotes de GN B con un panel de siete cultivos bacterianos. Se obtuvieron unos resultados con una reproducibilidad inter-lote superior al 99%.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Lapage S.P, Bascombe S, Willcox W.R and Curtis M.A. (1973) Identification of Bacteria by Computer: General Aspects and Perspectives J.Gen. Microbiol. **77**: 273 -290
2. Murray, Baron, Pfaller, Tenover, Tenover Manual of Clinical Microbiology, 6<sup>th</sup> Edition
3. Ewing W.H. (1972) Identification of *Enterobacteriaceae*, 3<sup>rd</sup> Edition, Minneapolis: Burgess Printing Company
4. Ewing W.H. (1986) *Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae*, 4<sup>th</sup> Edition. Elsevier Science Publishing Co., New York, N.Y.
5. Murray P.R. (Ed) (1999) Manual of Clinical Microbiology 7<sup>th</sup> Edition. American Society for Microbiology, Washington, DC
6. Cruickshank R, Duguid J.P, Marmion B.P, Swain R.H.A. The Practice of Medical Microbiology, Medical Microbiology, 12<sup>th</sup> Edition, pp180-181
7. Barritt M.M, (1936) The intensification of the Voges Proskauer reaction by the addition of alpha naphthol. J. Pathol. Bacteriol **42**: 441
8. Conn H.J, (1936) On the detection of nitrate reduction. J. Bacteriol. **21**: 225
9. Singer J. and Volcani B.E. (1955) An improved ferric citrate test for differentiating Proteus-Providencia group from other Enterobacteriaceae. J. Bacteriol. **69**: 255
10. Gadebusch H.H and Gabriel S. (1956) Modified stable Kovacs reagent for the detection of indol Am. J. Clin. Pathol. **26**: 1373

**ANEXO G**

**FICHAS DE REPORTE DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE  
MICROGEN™ GN-ID IDENTIFICACIÓN**

# GN-ID A+B PANEL REPORT FORM

Lab. No. LACONAL

Specimen Type: E. coli ATCC 8739  
Date: 01 Julio 2013

Well Number				GN A wells												GN B wells																	
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24						
Reaction				Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H2S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V.P.	Citrate	TDA	Gelatine	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine			
Result				+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-			
Reaction Index				4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions							5			7			6			5			0			6			6			3					

Octal Code: 57650663 Final Identification: \_\_\_\_\_  
2

WF6125/08/03

# GN-ID A+B PANEL REPORT FORM

Lab. No. LACONAL

Specimen Type: C. albicans ATCC 10221  
Date: 01 Julio 2013

Well Number				GN A wells												GN B wells																	
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24						
Reaction				Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H2S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V.P.	Citrate	TDA	Gelatine	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine			
Result							+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+			
Reaction Index				4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions							5			0			4			0			0			0			1								

Octal Code: 50400001 Final Identification: \_\_\_\_\_

WF6125/08/03

**ANEXO H**  
**ANÁLISIS FITOQUÍMICO**



UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
REPORTE DE ANALISIS

**ANALISIS SOLICITADO:** Screening Fitoquímico  
**SOLICITANTE:** Gabriela Yáñez  
**MUESTRA:** Tomillo  
**FECHA DE ENTREGA:** 4 - 10 - 2013

**Resultado:** Se realizó un análisis fitoquímico de la muestra proporcionada por el solicitante (Hojas secas molidas), obteniéndose los siguientes resultados:

Alcaloides.....	-
Taninos.....	+
Saponinas.....	+/-
Flavonoides.....	++
Aceites esenciales.....	++
Coumarinas.....	-
Triterpenos.....	+
Glicósidos cardiotónicos.....	-
Aceites fijos.....	-
Coumarina.....	-

EQUIVALENCIAS: Abundante Cantidad	= +++
Mediana Cantidad	= ++
Poca Cantidad	= +
Indicios	= +/-
Ausencia	= -

Atentamente,

Dra. Rita Urgilés de Alarcón MSc.  
**BIOQUIMICA**

**REPORTE DE ANALISIS**





UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
**REPORTE DE ANALISIS**

**ANALISIS SOLICITADO:** Screening Fitoquímico  
**SOLICITANTE:** Gabriela Yáñez  
**MUESTRA:** Paico  
**FECHA DE ENTREGA:** 4 - 10 - 2013

**Resultado:** Se realizó un análisis fitoquímico de la muestra proporcionada por el solicitante (Hojas secas molidas), obteniéndose los siguientes resultados:

Alcaloides.....	+
Taninos.....	+
Saponinas.....	-
Flavonoides.....	+
Aceites esenciales.....	++
Coumarinas.....	-
Triterpenos.....	+
Glicósidos cardiotónicos.....	-
Aceites fijos.....	-
Coumarina.....	-

EQUIVALENCIAS: Abundante Cantidad = +++  
Mediana Cantidad = ++  
Poca Cantidad = +  
Indicios = +/-  
Ausencia = -

Atentamente,

Dra. Rita Urgilés de Alarcón MSc.  
**BIOQUIMICA**