

**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y  
ANTIMICÓTICA DE LOS EXTRACTOS DE *Myrciastes hallii*  
(arrayán), *Amaranthus asplundii* (ataco), *Peperomia peltigera* (pataku  
yuyo), ESPECIES REPORTADAS EN PEGUCHE – IMBABURA,  
SOBRE *Streptococcus mutans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*  
CAUSANTES DE ENFERMEDADES BUCOFARÍNGEAS.**

**PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:**

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**ELABORADO POR:**

**CRISTINA DAYANA GÓMEZ CRUZ**

**SANGOLQUÍ, 05 de Julio 2010**

**“Evaluación de la actividad antibacteriana y antimicótica de los extractos de *Myrcianthes hallii* (arrayán), *Amaranthus asplundii* (ataco), *Peperomia peltigera* (pataku yuyo), especies reportadas en Peguche – Imbabura, sobre *Streptococcus mutans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* causantes de enfermedades bucofaríngeas.”**

## **RESUMEN**

El presente trabajo comprendió la selección de 3 plantas utilizadas en la población de Peguche - Imbabura, para el tratamiento de enfermedades bucofaríngeas, que no se encuentran validadas científicamente y que tampoco se tiene información sobre las características fitoquímicas, estas plantas fueron *Myrcianthes hallii* (arrayán), *Amaranthus asplundii* (ataco), *Peperomia peltigera* (pataku yuyo), ya que éste trabajo tuvo como objetivo evaluar las propiedades antimicrobianas de las plantas ya mencionadas contra microorganismos causantes de enfermedades bucofaríngeas: *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, se realizó una identificación botánica, además se utilizaron métodos fitoquímicos para la extracción de tres extractos utilizando solventes de polaridad creciente hexano, etanol, agua. Luego se realizaron pruebas microbiológicas in vitro utilizando la técnica de difusión en agar para los microorganismos ya mencionados.

El mejor extracto fue *Myrcianthes hallii* (arrayán) en etanol, que inhibió a *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, pudiendo ser considerado como un extracto de gran espectro. Como etapa final se identificaron metabolitos secundarios de éste extracto, mediante pruebas fitoquímicas preliminares, identificando que en las hojas de ésta planta, se encuentran presentes taninos, flavonoides, saponinas y alcaloides en muy baja cantidad. De ésta manera se considera satisfactoria la utilización de *Myrcianthes hallii* (arrayán) para el tratamiento de enfermedades bucofaríngeas, validado así con criterio científico el uso empírico de ésta planta.

**"Evaluation of antibacterial and antifungal activity of extracts of *Myrcianthes hallii* (arrayán), *Amaranthus asplundii* (ataco), *Peperomia peltigera* (pataku yuyo) species reported in Peguche - Imbabura, on *Streptococcus mutans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* disease-causing oropharyngeal. "**

## **ABSTRACT**

This work involved the selection of three plants used in the population of Peguche - Imbabura, for the treatment of oropharyngeal diseases, which are not scientifically validated and that no information is available on phytochemical characteristics, these plants were *Myrcianthes hallii* (arrayán), *Amaranthus asplundii* (ataco), *Peperomia peltigera* (pataku yuyo), since this study aimed to evaluate the antimicrobial properties of the plants mentioned above against oropharyngeal disease-causing microorganisms: *Streptococcus mutans* ATCC 25 175, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, was performed botanical identification also specific phytochemical methods were used for the extraction of three extracts using solvents of increasing polarity hexane, ethanol, water. After microbiological tests were performed *in vitro* using the agar diffusion method for microorganisms mentioned above.

The best extract was *Myrcianthes hallii* (arrayán) in ethanol, which inhibited *Streptococcus mutans* ATCC 25 175, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, can be considered a broad spectrum extract. As the final stage of secondary metabolites were identified extract more effective in this case *Myrcianthes hallii* (arrayán) in ethanol, by qualitative tests, identified for the leaves of this plant, tannins, flavonoids, saponins. This way is considered satisfactory the use of *Myrcianthes hallii* (arrayán) for the treatment of oropharyngeal disease, and validated with scientific criteria the empirical use of this plant.

# CAPITULO I

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Introducción

En los últimos años la investigación científica de las plantas medicinales ha resurgido con inusitado interés, partiendo del hecho que gran parte de la población de muchos pueblos, especialmente el indígena, recurre a la medicina tradicional como única fuente para resolver sus problemas de salud (Kowii, 2001; Loor, 2000). Sin embargo, la medicina popular, está muriendo rápidamente, debido a los procesos de aculturación de los pueblos indígenas, fuentes de todo el conocimiento milenario, que ésta dejando de ser transmitido. (Heras, 1997).

El Ecuador siendo un país con una gran biodiversidad, rico en plantas vasculares, calculada en más de 20.000 especies entre herbolaria y especies forestales, no cuenta con muchos estudios que demuestren que las plantas de uso medicinal que generalmente se comercializan por sus propiedades curativas (Cerón, 2002), realmente presenten las propiedades atribuidas.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y otras organizaciones prestigiosas en función de la salud, fomentan y financian la utilización de plantas medicinales sobre una base científica con relación a la efectividad terapéutica y a la relativa inocuidad de estas, ya que estudios han revelado el potencial de las plantas superiores como fuente de agentes anti-infecciosos, permitiendo de esta manera un avance al uso empírico de las especies vegetales medicinales con una base científica (López *et al.*, 1997).

La investigación de plantas medicinales consta de diferentes disciplinas: la etnomedicina, la farmacología, la fitoquímica, la toxicología, la investigación clínica, la biotecnología y el diseño de medicamento.

Este trabajo pretende validar las propiedades medicinales de 3 plantas utilizadas en la comunidad de Peguche – Imbabura para el tratamiento de enfermedades bucofaríngeas. Las plantas seleccionadas son *Myrcianthes hallii* (Arrayán), *Peperomia peltigera* (Pataku yuyo), *Amaranthus asplundii* (Ataco) contra *Streptococcus mutans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*.

## 1.2 Formulación del Problema

El uso frecuente de antibióticos ha permitido que varios microorganismos generen resistencia a determinados medicamentos, teniendo que administrarse dosis cada vez más potentes. Las condiciones socio económicas baja de muchas personas y familias es la principal causa para no poder acceder a un especialista y por ende a los medicamentos, motivo por el cual gran parte de la población en el Ecuador recurre a la medicina natural.

Existen varias especies de uso conocido por las comunidades locales que pueden contener compuestos con potencial antimicrobiano, sin embargo muy poco de este conocimiento ha sido validado mediante bioensayos, y aún menos sus principios activos identificados.

Ya que la biotecnología, permite el aprovechamiento de la biodiversidad mediante la valorizaciones sostenibles, que contribuyen no solo a mejorar la salud y nutrición, sino también a aumentar la productividad agrícola e industrial, se quiere evaluar la actividad antimicrobiana de extractos de *Myrcianthes hallii*, *Amaranthus asplundii*, *Peperomia peltigera*, especies utilizadas en la comunidad de Peguche como tratamiento o paliativo de enfermedades bucofaríngeas.

Por este motivo se ha planteado el siguiente problema:

¿Los extractos de *Myrcianthes hallii* (arrayán), *Amaranthus asplundii* (ataco), *Peperomia peltigera* (pataku-yuyo), tienen acción antimicrobiana *in vitro* frente a *Streptococcus mutans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* microorganismos causantes de enfermedades bucofaríngeas?

### 1.3 Justificación

La gran diversidad de la flora ecuatoriana ha sido reconocida por ser inmensamente rica en plantas útiles (De la Torre, Navarrete, 2008), se sabe que los Andes ecuatorianos, es la zona más afectada por la deforestación con pérdida de diversidad, debido a la ampliación de la frontera agrícola (Acosta, 1995), sus habitantes principalmente indígenas han perdido en gran parte sus conocimientos, costumbres y tradiciones, por los procesos de aculturización (Farinango *et al.*, 2005). Sin embargo, el poco conocimiento local que sobrevive no ha sido validado o corroborado mediante estudios e investigaciones sobre sus principios y/o moléculas bioactivas (Ríos *et al.*, 2007).

Rocha (2006) manifiesta que el uso de la biotecnología, permite investigaciones que contribuyen a la descripción de nuevos principios activos u otros compuestos fitoquímicos que servirán como base en la experimentación farmacológica o en la síntesis de nuevos fármacos, que ayuden en el tratamiento o en el paliativo de muchas enfermedades que aqueja a la comunidad en general (CESA, 1993), entre las que se encuentran las infecciones respiratorias agudas (IRA) que forman parte de las infecciones bucofaríngeas, y que según el Ministerio de Salud Pública (MSP) (2009) se encuentra como la causa número uno de muerte en la provincia de Imbabura, las afecciones dentales como: caries, periodontitis, halitosis, piorrea, cálculos dentales, que suelen conducir a afecciones más graves que incluso pueden causar la muerte si no existe un tratamiento o prevención (Gamboa *et al.*, 2000).

Según registros del Ministerio de Salud Pública (2009), la falta de recursos tanto humanos como económicos que existen dentro de la comunidad rural, no han permitido un seguimiento y control de las enfermedades mencionadas. (Hinostroza, 2008; Arias, 2002).

Este trabajo se encuentra basado en la investigación *in vitro*, del efecto antimicrobiano de los extractos de *Myrcianthes hallii* (arrayán), *Amaranthus asplundii* (ataco), *Peperomia peltigera* (pataku yuyo), frente a *Streptococcus mutans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, causantes de enfermedades bucofaríngeas, por ello ésta investigación presenta un potencial beneficioso, para la comunidad de Peguche y la comunidad en general, ya que las plantas utilizadas en este estudio contienen principios activos que pueden ser aislados e identificados mediante la aplicación de la biotecnología (Barahona & Játiva, 1995).



## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo General

- Evaluar la actividad antibacteriana y antimicótica de los extractos de *Myrcianthes hallii* (arrayán), *Amaranthus asplundii* (ataco), *Peperomia peltigera* (pataku yuyo), sobre *Streptococcus mutans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* causantes de enfermedades bucofaríngeas.

### 1.4.2 Objetivos Específicos

1. Obtener extractos de *Myrcianthes hallii* (arrayán), *Amaranthus asplundii* (ataco), *Peperomia peltigera* (pataku yuyo), utilizando n-hexano, etanol, agua.
2. Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de los extractos obtenidos sobre el crecimiento de: *Streptococcus mutans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*.
3. Comparar la actividad antibacteriana y antimicótica del extracto más efectivo frente a antibióticos empleados en el tratamiento de las enfermedades causadas por: *Streptococcus mutans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*.
4. Establecer los principales metabolitos secundarios de la planta con mayor actividad antibacteriana y antimicótica mediante screening fitoquímico.
5. Divulgar los resultados obtenidos.

## 1.5 Fundamentos Teóricos

### 1.5.1 Descripción del Área de Estudio

#### 1.5.1.1 Especificaciones Generales

**Provincia:** Imbabura

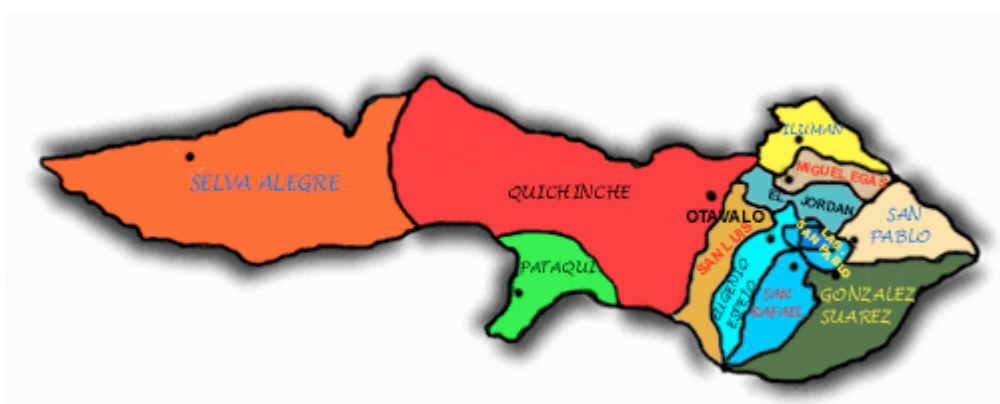
**Cantón:** Otavalo

**Parroquia:** Dr. Miguel Egas Cabezas (Peguche)

**Comunidad:** Peguche

#### 1.5.1.2 Ubicación Geográfica

La parroquia Doctor Miguel Egas Cabezas (Peguche) se encuentra ubicada en el cantón Otavalo (provincia de Imbabura (Figura 1-1) Limita al Norte desde el cruce de la vía Doctor Miguel Egas, San Juan de Ilumán con la quebrada de Ilumán grande. Al Sur con la cumbre del cerro Imbabura, al Este alcanza las nacientes de la quebrada de Alcantarilla o quebrada Susanahuico, hasta el cruce de la carretera San Juan de Ilumán-San Pablo, hasta la altura longitudinal de la localidad de Agato. Al Oeste desde el cruce del río Jatunyaco con la vía Otavalo-San Juan de Ilumán, por dicha vía hasta el cruce con la quebrada de Ilumán Grande. (San Feliz, 1988)



**Figura 1-1:** Ubicación cantonal

Fuente: Otavalonet, 2003

### 1.5.1.3 Aspecto Vegetal

La vegetación predominante en el área de estudio que constituye una ceja andina, está cubierta de formas vegetativas de aspecto leñoso, herbáceo y diverso. El continuo despojo de la vegetación propia de éste lugar, han reducido las especies propias de la zona, como: chulpi, mishca, zaramaíz, cusco, motilón, pumamanqui, matache, laurel, palo borracho, guatizic, yurayuashcaspi, aliso. (San Feliz, 1988)



**Figura 1-2:** Aspecto Vegetal de Peguche

### 1.5.1.4 Aspecto Climático

Peguche tiene un clima temperado alrededor de 18 a 22° C y en la noche desciende a 2 ° C. Todas las variaciones meteorológicas influyen directamente en la vida de las plantas por lo que el estudio de las relaciones clima vida, es el bioclima. Esta zona tiene una humedad relativa entre 75 y 85 con una nubosidad mensual menor, generalmente las lluvias se dan entre enero – mayo. (San Feliz, 1988)

### **1.5.2 Etnomedicina en el Ecuador**

El interés actual en la medicina etnomédica y la búsqueda de alternativas terapéuticas tiene sus raíces en la insatisfacción hacia la medicina convencional, tanto por su falta de éxito en la cura de algunas enfermedades como por los efectos colaterales que ciertos medicamentos acarrearán.

Centenares de plantas medicinales, son utilizadas de forma empírica con fines médicos, es decir sin conocer los posibles principios activos que puedan justificar su actividad terapéutica (Cerón, 2003), muchas de estas plantas son utilizadas por las comunidades indígenas, rurales e incluso las que ahora se localizan en los barrios urbano-marginales de las grandes ciudades, todos ellos poseedores de un conocimiento ancestral en el uso de plantas como medicamentos. (Sosa, 2006)

Debido a que el uso de plantas en diversas poblaciones del Ecuador, está ligada a las tradiciones culturales, la etnobotánica ha sido clave para investigar como cada población aprovecha la flora de su entorno por ser parte de su identidad (Rios & Kaziol, 2007), sin embargo, actualmente los procesos de aculturación en las comunidades indígenas, están acelerando la desaparición no solo de la pérdida de las especies de plantas útiles, sino también del saber milenario de las nacionalidades indígenas, por ello la importancia de que las especies vegetales de uso frecuente, se encuentre científicamente evaluadas, ya que implica la posibilidad de tener información de aquellas que requieren un manejo adecuado e inmediato para evitar su extinción.

Considerando que la prevención y el tratamiento eficaz de las enfermedades infecciosas del hombre se encuentran ligadas directamente al conocimiento de los agentes causales (Nolte, 1971), se deben llevar a cabo ensayos biológicos de productos naturales, con el fin de evaluar la bioactividad de las plantas (Barahona & Jativa, 1995), y así convalidar la utilidad del saber campesino celosamente guardado, ya que es probable que pocas especies rara vez sean útiles, como también es posible que las

comunidades que conocen estas especies, conozcan más usos, o hayan creado más aplicaciones por especie, igualmente se puede decir que algunas especies que son útiles en un espacio y tiempo determinado, no lo sean en otros distintos. (Paz y Miño, Balsleu, & Valencia, 1997)

### **1.5.3 Estudio fitoquímico de plantas**

Muchas especies vegetales son estudiadas con frecuencia para hallar en ellas su posible valor farmacológico, en especial por sus propiedades estrogénicas, antipiréticas, midriáticas antihelmínticas, astringentes, amebicidas, fungicidas, antibióticas.

Según Roca (2003) tradicionalmente las investigaciones sobre plantas medicinales no trascendían de aislar, caracterizar y publicar una nueva estructura de origen natural, con o sin actividad farmacológica y utilizaba en general el criterio de selección casual o al azar de plantas, que no daba éxito para encontrar nuevos compuestos.

Actualmente la aplicación de la biotecnología, considerada como una ciencia multidisciplinaria que incluye ya en sus estudios referencias taxónomicas, etnomédicas, etnobotánicas, ecológicas, y otras; permite la validación científica del conocimiento tradicional sobre los usos de la biodiversidad, tales como las plantas medicinales y microorganismos, con el fin de expandir y acelerar significativamente el estudio y uso de la biodiversidad y sus productos. CESA (1993) indica que al utilizar técnicas analíticas de extracción e identificación de sustancias y/o moléculas con principios activos, se puede brindar con criterios científicos, alternativas terapéuticas a personas de bajos recursos.

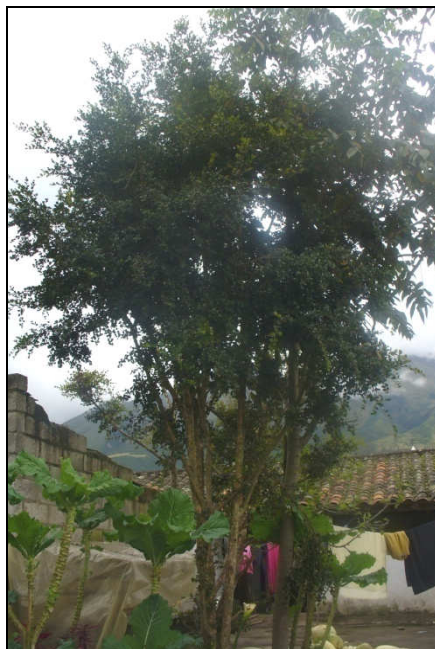
La investigación fitoquímica de una planta, puede comprender los siguientes aspectos:

- Extracción de la planta.
- Separación y aislamiento de los componentes de interés.
- Caracterización de las rutas biosintéticas.
- Valoraciones cuantitativas.

#### 1.5.4 Descripción especies vegetales de estudio

En el presente estudio se eligieron tres plantas utilizadas tradicionalmente como medicinales en la comunidad de Peguche, las cuales fueron seleccionadas por referencia de su uso etnomédico en afecciones bucofaríngeas y por no poseer estudios previos de su actividad antimicrobiana.

##### 1.5.4.1 Arrayán: *Myrcianthes hallii*



**Figura 1-3:** *Myrcianthes hallii* (arrayán)

#### 1.5.4.1.1 Descripción botánica (De la Torre & Navarrete, 2008)

**Orden:** Myrtales

**Familia:** Myrtaceae

**Género:** *Myrcianthes*

**Especie:** *hallii*

**Nombres comunes:** arrayán, wawall hembra, chiruito.

**Nombre botánico:** *Myrcianthes hallii* (O. Berg) Mc. Vaugh

#### 1.5.4.1.2 Características generales

Es un árbol o arbusto silvestre nativo del Ecuador, posee una altura entre 10 – 15 m, de hojas opuestas, a veces alternas, de forma ovada, la lámina de la hoja tiene venas secundarias pinnadas o basal, a menudo con venas intramarginales cerca del margen. Tiene las inflorescencias axilares o terminales, posee flores bisexuales, a veces polígamas, actinomorfas, los lóbulos del cáliz 3 - 5 o más, son separados o connados en una caliptra. Tiene 4 o 5 Pétalos, estambres generalmente numerosos, filamentos separados o connados en 5 paquetes de pétalos opuestos; anteras 2-unicelulares, dorsifijas o basifijas, dehiscentes longitudinalmente, o rara vez terminal, por lo general terminan en conectores 1 o más glándulas apical. Ovario inferior, semi-inferior, o muy pocas veces fusionados entre sí, superior, de 2 a más, lóbulos, muchas veces presenta placentación parietal axilar. Fruto en cápsula, baya, o drupas. Semillas sin endosperma o endospermo escaso y fino; cartilaginoso testa membranosa o finas, a veces ausente, embrión recto o curvo (BSF, 2009). Para ésta planta se han definido algunos componentes fitoquímicos: aceite aromático, glucósidos de fenol, antraquinónico, ramosantina, saponinas, taninos. (Cerón, 2003 & CESA, 1993)

#### **1.5.4.1.3 Distribución**

Se encuentra distribuido entre los 2.200-3.000 m.s.n.m. Alrededor de 130 géneros y 4500-5000 especies se encuentran en la región del Mediterráneo, el África, Madagascar, Asia tropical y templada, Australia, islas del Pacífico tropical y América del Sur donde se puede encontrar 10 géneros (cinco introducidas) y 121 especies (50 endémicas) en China. Muchas se cultivan ornamentalmente en jardines, árboles de la calle, o árboles de la plantación (BSF, 2009).

#### **1.5.4.1.4 Usos etnobiológicos del arrayán en el Ecuador**

Las hojas, tallos de ésta planta son utilizadas para disminuir la hiperactividad e inflamación de la mucosa respiratoria y fluidifican las secreciones bronquiales, por ello se la utiliza en afecciones bronquiales, dolores estomacales, las hojas secas y molidas, o en infusión son aplicadas a heridas para ayudar a cicatrizarlas, sirven para curar reumatismo (De la Torre & Navarrete, 2008), se utilizan para tratar caries, encías sangrantes, resfríos, cólicos, dolor de muelas, y afecciones posparto (Matheus, 2007). Calma el dolor de pies, es eficaz para tratar el sudor nocturno, el fruto se usa para cicatrizar el ombligo y tratar la diarrea en niños. Al hervir en agua la fruta expele una cera de la cual se puede hacer velas, también sirve para peinar el cabello, las ramas secas se usa como combustible. (Cerón. M; 2003)



#### 1.5.4.2 Ataco: *Amaranthus asplundii*



**Figura 1-4:** *Amaranthus asplundii* (ataco)

##### 1.5.4.2.1 Descripción botánica (De la Torre & Navarrete, 2008)

**Orden:** Caryophyllales

**Familia:** Amaranthaceae

**Género:** *Amaranthus*

**Especie:** *asplundii*

**Nombres comunes:** ataco, blede, ataku de castilla, blede blanco, blede macho, blede negro, salig.

**Nombre botánico:** *Amaranthus asplundii* Thell.

##### 1.5.4.2.2 Características generales

Generalmente es una hierba, pocas veces arbusto, nativa del Ecuador, generalmente anual, raramente perennes. Posee hojas pecioladas alternas u opuestas, de forma ovada, obovadas, espatuladas, lanceoladas, los márgenes por lo general plano,

ligeramente ondulado, o crispados, ápices agudos, obtusos. Tallos erectos, ascendentes, generalmente ramificada, en ocasiones simples, sin espinas. Las inflorescencias terminales dispuestas en espigas, panículas o glomérulos, los componentes de inflorescencias terminales a menudo sostenidas por hojas reducidas. Flores unisexuales, postiladas sostenidas por brácteas membranosas ovadas, lanceoladas, lineares, solitarias o agrupadas en racimos. Tépalos ausentes; estambres ausentes; pistilo 1, 1 óvulo; estilo de 0.1-1 mm, o ausente, estigmas 2-3, delgado. Flores estaminadas: 3-5 tépalos, igual o subiguales; estambres 3-5, filamentos distintos, anteras 4-locular, pistilos ausente o rudimentario. Frutas secas en una cápsula carnosa, indehiscente, de forma irregular de ruptura, Semillas lenticulares, subgloboso o cilíndrico, lisa. (BSF, 2009)

La familia *Amaranthaceae* reporta presencia de nitritos y nitratos, triterpenos, taninos, saponinas; las semillas contienen proteínas y el tallo hierro. (Cabrera, 2005)

#### **1.5.4.2.3 Distribución**

Han sido registradas entre los 2.200-3.000 m.s.n.m, por toda América del Sur y ciertas regiones del Viejo Mundo, donde son consideradas como malas hierbas. (BSF, 2009)

#### **1.5.4.2.4 Usos etnobiológicos del ataco en el Ecuador**

El fruto y las hojas tiernas son comestibles, se usan en la preparación de coladas, ensaladas y morcillas de chanco. El zumo de la raíz machacada se usa para tratar el malestar producido por los cólicos menstruales, la flor en infusión y mezclada con aguardiente, se usa para tratar el resfrío, la infusión de la raíz se bebe para tratar el colorín y la diarrea en niños, la raíz machacada se usa para tratar la holanda (Matheus, 2007), es astringente, aplicable en irritaciones de la boca y de la garganta y puede servir para lavados externos. (De la Torre & Navarrete, 2008)

#### 1.5.4.3 Pataku-yuyo: *Peperomia peltigera*



**Figura 1-5:** *Peperomia peltigera* (pataku-yuyo)

##### 1.5.4.3.1 Descripción botánica (De la Torre & Navarrete, 2008)

**Orden:** Piperales

**Familia:** Piperaceae

**Género:** *Peperomia*

**Especie:** *peltigera*

**Nombres comunes:** Pataku yuyo, corazoncillo, patacón.

**Nombre botánico:** *Peperomia peltigera* C.DC.

##### 1.5.4.3.2 Características generales

Es una hierba terrestre epífita, anual o perenne, Los aces vasculares más o menos dispersos en la sección transversal. Hojas carnosas, alternas, a menudo opuestas o verticiladas, las bases a menudo asimétricas, lámina de la hoja visible con nervadura pinnada, nervios laterales ascendentes primordiales, o poco visibles, las venas terciarias

aparentemente ausente o muy débil. Tallos subterráneos, suculentos y verdes, con nudo engrosado, erecto, glabro o pubescente. Inflorescencia una espiga pedunculada, rara vez se agrupan en una umbela. Flores sésiles, pequeñas, bisexuales, hermafroditas, polígamas o dioicas, casi siempre sésiles, brácteas pequeñas, generalmente peltadas o cupular, generalmente sin perianto. Estambres 2, filamentos libres, Estigma 1, anteras separadas, dehiscentes longitudinalmente. Frutos sésiles o estipitadas en drupa pequeña o nuececilla; pericarpio carnoso, delgado o seco. Las semillas poseen almidón y un embrión incrustado en el endosperma. (BSF, 2009)

Se multiplica por esquejes, división de matas y por medio de hojas con un pequeño trozo de pecíolo. En su cultivo la utilización de calor de fondo es adecuada, la perjudican los riegos con aguas salinas, soportan condiciones de luz bajas. El género *Peperomia*, reporta la presencia de flavonoides, saponinas, alcaloides en menor cantidad, taninos y diversas terpenlactonas. (Guillermo, 2002)

#### **1.5.4.3.3 Distribución**

Se encuentra en la sierra ecuatoriana entre 1000 a 2500 m.s.n.m. El género *Peperomia* es nativo de América del Sur, gran parte de las especies son nativas de la región amazónica, cerca de ocho o nueve géneros y especies de 2000-3000: se encuentran en regiones tropicales y subtropicales, principalmente en Sudamérica, Asia, unos pocos en África. (BSF, 2009)

#### **1.5.4.3.4 Usos etnobiológicos del pataku-yuyo en el Ecuador**

La decocción de las hojas se bebe para tratar la pena, la infusión de la planta se toma para tratar problemas de los nervios, la planta trata afecciones indeterminadas, las hojas en infusión o en colonia se usan para tratar afecciones del corazón, las hojas en infusión son usadas para tratar el colerín y la pulmonía, es eficaz para combatir el

insomnio, además es utilizado para tratar caries y dolor de encías, las hojas machacadas se aplican en los sitios con dolencias. La infusión de toda la planta sirve para hacer gárgaras y tratar la inflamación de la garganta, la amigdalitis aguda y combate la tos (De la Torre, Navarrete, 2008). En otras partes del mundo se utilizan como plantas de interior, plantas de invernadero y en regiones cálidas como plantas de jardín. (BSF, 2009).

### **1.5.5 Obtención de extractos**

Las plantas contienen gran cantidad de compuestos bioactivos, denominados metabolitos secundarios, para su obtención se pone en contacto una fase sólida con una líquida, al entrar en contacto el soluto se difunde desde el sólido a la fase líquida, permitiendo la separación de los principios activos de la estructura original. Ya que muchos de los metabolitos secundarios son hidrofóbicos se extraen por medio de solventes orgánicos como: etanol, cloruro de metileno, cloruro de etilo, cloroformo, etc. Y otros son hidrofílicos y se obtienen utilizando agua, los extractos obtenidos pueden ser líquidos y en polvo.

Los métodos tradicionales de extracción requieren altos tiempos de residencia y grandes cantidades de solvente, el cual se encuentra asociado al uso de calor y agitación, que incluyen la utilización de equipos como el soxhlet. (Lizcano, 2007)

### **1.5.6 Principios activos**

Las plantas son fundamentales en el desarrollo de la medicina moderna. Su acción preventiva o curativa se debe a sustancias químicas que provocan un efecto fisiológico en el organismo. Estas sustancias se conocen como principios activos, que son producto del metabolismo secundario de la planta (Domingo, 2003).

Son compuestos químicos propios de la planta que se encuentran sometidos a una serie de variables físicas tales como: humedad del suelo, condiciones de luz, temperatura, factores ambientales, entre otros. El metabolismo secundario compromete aquellos procesos químicos que son únicos para una planta dada y no son universales, los metabolitos secundarios cambian de una planta a otra, pues precursores químicos comunes pueden conducir a resultados totalmente diferentes. Muchos de los principios activos de las plantas pueden encontrarse en su raíz, hojas, corteza, tallo, flores y fruto, de donde deben extraerse para ser utilizadas (Navarro & Fabiola, 2004).

La formación del metabolito secundario no es vital para la planta, aunque cumplen misiones de naturaleza muy diversa, algunos metabolitos están implicados ecológicamente en la relación planta-organismo, como los pigmentos de las flores, que atraen a los insectos polinizadores, o los compuestos que inhiben el crecimiento de otros organismos (sustancias alelopáticas), o que protegen a la planta productora de infecciones (fitoalexinas) o de los depredadores (disuasorios nutritivos). Otros metabolitos secundarios tienen misiones fisiológicas. Dentro de esta vasta diversidad, existen especies vegetales con propiedades de interés para la investigación y el descubrimiento de nuevos productos. Sin embargo, se calcula que menos del 10 % de las plantas han sido evaluadas en la búsqueda de actividad biológica. (Mendoza, Moreno, Weil, & Elango, 2007)

La actividad antimicrobiana de los extractos vegetales ha revelado el potencial de las plantas superiores como fuente de agentes antiinfecciosos, permitiendo de esta manera un avance al uso empírico de las especies vegetales con una base científica. La fitoquímica permite detectar y posteriormente identificar los principios activos responsables de las propiedades atribuidas a las plantas.

### **1.5.6.1 Alcaloides**

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, 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)

### **1.5.6.2 Flavonoides**

Son estructuras fenólicas que contienen un grupo carbonilo y son solubles en agua. Constituyen la familia más amplia de fenoles naturales, son sintetizados en todas las plantas, pero su composición química varía entre especies, en respuesta al ambiente. Son sintetizados en el citoplasma y migran hacia las vacuolas celulares. Tienen propiedades antioxidantes, diuréticas, antimicrobianas, entre otros. (Villacís, 2009) Su actividad frente a los microorganismos probablemente se debe a que forman complejos con las proteínas solubles y extracelulares y con las células de la pared bacteriana. (Domingo, 2003)

### **1.5.6.3 Taninos**

Son sustancias de origen vegetal, no nitrogenadas de estructura polifenólica, solubles en agua, alcohol y acetona. Estas sustancias son de sabor astringente y tienen la propiedad común de curtir la piel, debido a su capacidad de unirse a macromoléculas de hidratos de carbono y proteínas (Domingo, 2003).

El término tanino se emplea para denominar ciertas sustancias presentes en extractos vegetales capaces de combinarse con proteínas de la piel animal, evitando su putrefacción y convirtiéndola en cuero, dentro de los vegetales, se encuentran en las vacuolas celulares combinados con alcaloides, proteínas u osas. Tienen propiedades cicatrizantes, antidiarreicas, antídotos para envenenamientos, antimicrobianas. Su actividad biológica se debe a que actúan como inhibidores enzimáticos además de privar a los microorganismos de medio apropiado para que pueda desarrollarse. (Villacís, 2009)

#### **1.5.6.4 Saponinas**

Son heterósidos naturales, solubles en agua y característicamente espumosos tras agitar una solución acuosa que los contenga. Poseen propiedades diuréticas, digestivas, antiinflamatorias, expectorantes, antimicrobianas generalmente antiprotozoaria, y otras. (Villacís, 2009) Prevalcen en las partes subterráneas de las plantas, su actividad biológica se debe a que las saponinas se unen al colesterol y otros esteroides de la membrana celular causando su inestabilidad, lisis y muerte celular.

### **1.5.7 Descripción de Enfermedades Bucofaríngeas**

#### **1.5.7.1 Infecciones Respiratorias Agudas (IRA)**

Las Infecciones Respiratorias Agudas son padecimientos infecciosos de las vías respiratorias que en ocasiones se complican con neumonía. Las IRA constituyen un importante problema de salud pública, y mucho más si se produce en zonas donde no existe cobertura total de medicina, generalmente se manifiesta con fiebre y se localiza en el aparato respiratorio. Este está formado por una porción alta y una baja. El sector alto comprende la nariz, los senos paranasales, la garganta (faringe) con las amígdalas y el oído medio y la epiglotis. Las vías respiratorias bajas comprenden la laringe y la



tráquea, cuando una infección ataca las vías respiratorias bajas, según el sitio, se habla de laringitis, traqueítis, bronquitis, bronquiolitis, alveolitis o neumonitis y de combinaciones de éstas como son: laringotraqueobronquitis, bronconeumonía, etc. (Barreda, 2008)

El 75% de los casos de IRA son de origen viral, a otras complicaciones otitis media y neumonía se agrega la etiología bacteriana, éstas enfermedades bucofaríngeas, están íntimamente relacionadas entre sí, ya que las investigaciones realizadas confirman la relación entre la salud de la cavidad bucal con la salud general, además cuando una persona no se alimenta bien es más fácil que se contagie de una bacteria o bacilo que genere la enfermedad.

Debido a que es difícil diferenciar a quienes tienen una infección primaria, y quienes tienen una infección del mismo tipo, pero por bacterias, ya que de hecho son idénticos los signos y los síntomas de uno y otro cuadro clínico, razón por la cual las infecciones agudas se diagnostican principalmente sobre bases clínicas, lo cual dificulta el empleo juicioso de los antibióticos en estos casos, es así que el consumo enorme de fármacos contra dichas enfermedades ha contribuido al aumento en la frecuencia de resistencia a ellos, entre los microorganismos patógenos extranosocomiales más frecuentes, como *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*. (Arce, 2008)

### **1.5.7.2 Infecciones Bucofaríngeas**

Son parte de las IRA, y van desde cuadros víricos leves que ceden por sí solos, hasta infecciones bacterianas graves y mortales. El síntoma inicial más frecuente es la faringitis, que constituye una de las causas más frecuentes de visitas ambulatorias de adultos y niños. A pesar de que también la faringitis es un síntoma de muchos cuadros no infecciosos, la mayor parte de los pacientes con una nueva faringitis por lo común tienen un cuadro agudo de origen vírico o bacteriano en la faringe, microorganismos de muy diverso tipo causan la faringitis aguda. (Arce, 2008)

### **1.5.7.3 Infecciones de la boca**

Además de la enfermedad periodontal como la gingivitis, las infecciones dentro de la cavidad de la boca muy a menudo dependen del ataque de especies como *Candida albicans*, que además de presentar faringitis se puede identificar placas friables blanquecinas o grisáceas en las encías, la lengua y la mucosa de la cavidad bucal.

La angina de Vincent, conocida también como gingivitis, se caracteriza por dolor e inflamación de las encías, con úlceras en las papilas interdentes, que fácilmente sangran. La ocasionan las bacterias anaerobias de la cavidad bucal, por lo cual en forma típica los enfermos muestran mal aliento (halitosis) y el cuadro inicial suele ser de fiebre, malestar general y linfadenopatía. (Arce, 2008)

La angina de Ludwig es una celulitis de evolución rápida, potencialmente mortal, que afecta los espacios sublinguales y submandibular y, de forma característica, tiene como punto de partida alguna pieza dental infectada o extraída en fecha reciente, muy a menudo segundos y terceros molares inferiores. (Arce, 2008)

### **1.5.7.4 Caries**

Es una enfermedad de origen infeccioso producida por la placa bacteriana, específicamente por *Streptococcus mutans* y el *Lactobacillus acidophilus*, modulada por ciertos factores ambientales, que afectan la pieza dentaria produciendo una lesión desmineralizada de las estructuras del diente con una posterior formación de cavidad. Es de evolución crónica o aguda, afectando las diferentes estructuras duras de la pieza dentaria como son el esmalte y la dentina (Castillo, 2009). La caries es una enfermedad multifactorial con innumerables factores primarios y secundarios que están involucrados en su etiología y su gravedad.

La evaluación de la mayor cantidad de parámetros involucrados en el proceso asegura una mayor eficiencia en el diagnóstico de la enfermedad y en el descubrimiento de los individuos más susceptibles a ella, los cuales son los llamados pacientes de alto riesgo. (Castillo, 2009)

Pueden ser considerados de alto riesgo si presentan una de estas situaciones:

- Alteración o disminución en el flujo salival.
- Presencia de un número elevado de *Streptococcus mutans* y lactobacilos en boca.
- Pacientes que no hayan tenido contacto previo con flúor.
- Aparición de caries nuevas en un pasado inmediato.
- Presencia de caries en superficies que normalmente no son atacadas por caries.
- Pacientes con alta frecuencia de ingesta de sacarosa.
- Pacientes con abundante placa bacteriana.

Enumerar y describir los principales microorganismos implicados en todas las infecciones bucofaríngeas (respiratorias, periodontitis, caries, etc.) son muy complejos de describir. Por ello la constancia en investigaciones relacionadas han permitido afirmar a un microorganismo como causante de una o varias enfermedades. (Liébana, 1995), que incluso se puedan relacionar unas con otras, por ello es necesario comprender bien la causa de una afección, para instaurar una adecuada prevención así como un efectivo tratamiento. (Farias, 2008)

## 1.5.8 Descripción de Microorganismos patógenos utilizados

### 1.5.8.1 Generalidades de *Streptococcus mutans*

#### 1.5.8.1.1 Taxonomía (Fernández, 2008)

**Dominio:** Bacteria

**Phylum:** Firmicutes

**Clase:** Bacilli

**Orden:** Lactobacillales

**Familia:** Streptococcaceae

**Género:** *Streptococcus* del grupo A de Lancefield

**Grupo:** Viridans

**Especie:** *S. mutans*

#### 1.5.8.1.2 Descripción del género y especie

Se trata de cocos grampositivos, anaerobios facultativos, asociados en parejas o cadenas, no producen catalasa y fermentan la glucosa con producción de ácido láctico. Es alfa hemolítico.

El término *viridans* deriva del latín *viridis*, que significa verde, ya que producen, en su mayoría, unas colonias pequeñas en agar sangre rodeadas de un halo estrecho de hemólisis verde debido a una destrucción incompleta de los eritrocitos (hemólisis  $\alpha$ ). En este grupo de microorganismos se incluyen aquellos estreptococos que, sin ser  $\beta$ -hemolíticos (con algunas excepciones en *Streptococcus anginosus*), no poseen antígenos de pared de los grupos B o D, no crecen en caldo con 6,5% de cloruro de sodio y no son solubles en bilis ni inhibidos por la optoquina. (Gamboa, 2006)

El grupo *viridans*, presenta en la actualidad, dificultades para lograr una identificación de especies, la Tabla 1-1 muestra un esquema de identificación para éste grupo.

**Tabla 1-1:** Clasificación de *Streptococcus* del grupo *viridans* más aceptadas

<b>Colman y Williams (1972)</b>	<b>Facklam (1977)</b>	<b>Coykendall (1989)</b>	<b>Bruckner y Colonna (1997)</b>
<i>S. salivarius</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>S. salivarius</i>
<i>S. mitior</i>	<i>S. mitis</i>	<i>S. mitis</i>	<i>S. mitis</i>
	<i>S. sanguis II</i>		
<i>S. sanguis</i>	<i>S. sanguis I</i>	<i>S. sanguis</i>	<i>S. sanguis</i>
<i>S. milleri</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. anginosus</i>	<i>S. milleri</i>
	<i>S. anginosus-constellatus</i>		
<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>
	<i>S. morbillorum</i>		
	<i>S. acidominimus</i>		
	<i>S. uberis</i>		

Fuente: Fernández, 2008

### 1.5.8.1.3 Pruebas bioquímicas

Fermentación de rafinosa (+), manitol (+), melobiosa (+), trehalosa (+) e inulina (+); hidrólisis de la esculina en presencia (-) y ausencia de bilis (+); ureasa (-); hidrólisis de la arginina (-), catalasa (+), y resistencia a optoquina.

#### **1.5.8.1.4 Hábitat**

*Streptococcus mutans* se encuentra en forma permanente en la cavidad oral después de la erupción dental, debida fundamentalmente a que requiere la presencia de tejido duro no descamativo para su colonización. La principal fuente de adquisición y transmisión de *Streptococcus mutans* en los niños es la saliva de sus madres. (Gamboa, 2006)

#### **1.5.8.1.5 Manifestaciones Clínicas**

La comunidad de microorganismos orales usualmente implica una sucesión de poblaciones; este proceso comienza con la colonización del hábitat por grupos de microorganismos pioneros. Por sí solas y en estado de equilibrio, la mayoría de las bacterias de la cavidad oral son inofensivas; sin embargo, cuando se conjugan condiciones especiales del ambiente oral, de los mecanismos de infección del microorganismo y de la respuesta del huésped, estas bacterias se convierten en actores principales, exhibiendo todo su potencial infeccioso que conduce al estado de enfermedad. (Fernández *et al*, 2004)

*Streptococcus mutans* es un agente infeccioso muy importante en endocarditis, la participación de este microorganismo en infecciones orales y no orales ha generado un interés por el conocimiento de su susceptibilidad a agentes antimicrobianos. La caries dental sin ser una entidad que comprometa la vida, constituye una de las patologías actuales más frecuentes y costosas, con una duración de por vida. Por otro lado, el torrente sanguíneo puede ser invadido transitoriamente por *Streptococcus mutans* tras un traumatismo u otros procesos, que incluirían las manipulaciones dentales, cirugía del tracto respiratorio superior (amigdalectomías), o cirugía e instrumentalización del aparato genitourinario o del tracto intestinal. (Gamboa, 2006)

Un elevado consumo de azúcar en combinación con un valor-pH frecuentemente bajo contribuye al aumento de los *Streptococcus mutans*, en la cavidad bucal. Estos gérmenes son cocos Gram positivos, que se caracterizan por las siguientes propiedades:

- Capacidad de adherencia a la sustancia dura dental
- Sistema de transporte de azúcares
- Producción de ácido láctico a partir del azúcar
- Producción de polisacáridos intracelulares y extracelulares
- Tolerancia de un medio ácido

Estas bacterias adherentes disponen de receptores especiales y producen además, una matriz pegajosa, el dextrán, que les permite cohesionarse fuertemente entre sí. (Castro, 2005). Es una bacteria cocacea, Gram positiva, microaerofílica.

Hay que considerar que un descenso de pH impide el crecimiento de muchas bacterias, mientras que el número de *Streptococcus mutans* aumenta. (Fernández, 2008)

#### **1.5.8.1.6 Cultivo**

Para poder crecer y desarrollarse “*in vitro*” necesita de medios enriquecidos como el Agar Sangre de Cordero y un ambiente con baja tensión de oxígeno, sus células se disponen en cadenas. Las colonias de este microorganismo son fácilmente diferenciadas: altas, convexas, pulvinadas, mucoides, tiene un diámetro de 0,5 a 0,75  $\mu$  de diámetro y opacas, con un aspecto que recuerda al vidrio esmerilado. (Neira, 2005) En forma concomitante con la síntesis de dextrano a partir de la sacarosa, las colonias de este microorganismo emiten un exudado acuoso en la superficie del medio de cultivo a menudo lo suficientemente abundante para que corra y forme un charco en torno a la colonia.

Aunque se pueden multiplicar en presencia de oxígeno algunos autores recomiendan incubar las placas inoculadas 24 horas en anaerobiosis y luego 24 horas en aerobiosis, ya que esto favorece tanto la formación de agua oxigenada, como la síntesis de polisacáridos extracelulares, ambos útiles para la diferenciación y reconocimiento. (Alcaide, 2008). La temperatura óptima para su desarrollo es 36 +/- 1°C.

#### **1.5.8.1.7 Susceptibilidad antibiótica**

Es sensible a la acción de la penicilina y otros antibióticos como las cefalosporinas, los macrólidos, los aminoglucósidos, la vancomicina, la rifampicina, el cotrimoxazol, las lincosamidas, cloranfenicol y el imipenem que actualmente es el más activo *in vitro* frente a las cepas resistentes a la penicilina. (Fernández, 2008)

#### **1.5.8.2 Generalidades de *Klebsiella pneumoniae***

##### **1.5.8.2.1 Taxonomía**

**Dominio:** Bacteria

**Phylum:** Proteobacteria

**Clase:** Gammaproteobacteria

**Orden:** Enterobacteriales

**Familia:** Enterobacteriaceae

**Género:** *Klebsiella*

**Especie:** *K. pneumoniae*



#### **1.5.8.2.2 Descripción del género**

El género *Klebsiella* está formado por bacilos Gram negativos (0.5 por 1 a 3 µm), anaeróbicos facultativos y oxidasa negativos. Las bacterias del género *Klebsiella* se caracterizan por ser generalmente capsuladas, no móviles con flagelos peritricos, productoras de la enzima lisina descarboxilasa pero no de la enzima ornitina descarboxilasa. (Izquierdo, 2003)

#### **1.5.8.2.3 Pruebas bioquímicas**

Indol (-), Citrato (+), Lisina (+), (+/+) TSI (con el gas), Úrea (+), No motil, Ornitina (+), Voges-Poskauer (+). (Izquierdo, 2003)

#### **1.5.8.2.4 Hábitat**

En humanos portadores de *Klebsiella pneumoniae* se encuentra en las vías respiratorias superiores y en el tracto intestinal.

#### **1.5.8.2.5 Manifestaciones Clínicas**

La gran mayoría de las infecciones por *Klebsiella* están asociadas con la hospitalización, como patógenos oportunistas que son, las especies del género *Klebsiella* infectan principalmente a individuos inmunocomprometidos que se hallan hospitalizados y padecen severas enfermedades subyacentes, como pueden ser la diabetes mellitus o la obstrucción pulmonar crónica. (Izquierdo, 2003)

Las infecciones nosocomiales causadas principalmente por *Klebsiella pneumoniae*, la especie más importante del género desde el punto de vista médico y están asociadas a una alta morbilidad y mortalidad. *Klebsiella pneumoniae* causa, principalmente, infecciones del tracto urinario y neumonías y es el segundo agente causal, tras *Echerichia coli*, de septicemias nosocomiales por bacterias Gram negativas, produce también enteritis y meningitis (en lactantes). (Izquierdo, 2003). El porcentaje de individuos portadores de *Klebsiella* aumenta radicalmente en el ambiente hospitalario y la colonización en el paciente se asocia significativamente con la utilización de antibióticos (Lemus, 2004)

Los principales factores de virulencia asociados a *Klebsiella pneumoniae* son los polisacáridos capsulares, las fimbrias o adhesinas, los sideróforos y el lipopolisacárido. Todos ellos tienen una gran importancia y la patogenicidad de la bacteria es resultado de la acción conjunta de varios de estos factores, que permitirán a la bacteria entrar y multiplicarse en el interior del hospedador, resistir su sistema inmune (o simplemente no estimularlo) y producirle un daño. (Izquierdo, 2003)

Una mala terapia puede ser a veces fatal en pacientes que reciben antibióticos inapropiados, creando una multirresistencia de patógenos gram negativo, la cual requiere un gran control. (Lemus, 2004)

#### **1.5.8.2.6 Cultivo**

Se desarrollan bien en medios artificiales, para poder crecer y desarrollarse “*in vitro*” necesita Agar MacConkey, en el que produce colonias de color rosa púrpura, de igual forma en EMB Agar y en SS agar, todas las especies forman ácido o ácido y gas a partir de la glucosa. Es oxidasa negativos, reducen nitratos a nitritos. Producen colonias relativamente grandes, de color gris opaco, secas o mucoides en agar sangre. (Lemus, 2004) Crece rápidamente en el laboratorio bajo condiciones aerobias.

### **1.5.8.2.7 Susceptibilidad antibiótica**

*Klebsiella pneumoniae* presenta sensibilidad intrínseca a las cefalosporinas de espectro extendido y a las cefamicinas, dado que no contiene la beta lactamasa cromosómica del tipo AmpC.

### **1.5.8.3 Generalidades de *Candida albicans***

#### **1.5.8.3.1 Taxonomía (Murray. P *et al.*, 2007)**

**Reino:** Fungi

**División:** Deuteromycota

**Clase:** Blastomycetes

**Familia:** Candidaceae

**Género:** *Candida*

**Especie:** *C. albicans*

#### **1.5.8.3.2 Descripción del género**

Las levaduras del género *Candida* son hongos dimorfos, se suelen presentar como una célula oval levaduriforme de 2 a 4 micras, con paredes finas; sin embargo, en tejidos infectados también se han identificado formas filamentosas de longitud variable, con extremos redondos de 3 a 5 micras de diámetro y pseudohifas. (Segundo, 2006)

#### **1.5.8.3.3 Pruebas de identificación**

Prueba de formación de tubos germinativos que es una prueba simple, rápida y económica que permite la identificación en 2 a 3 horas. Otra técnica útil para la identificación rápida de cepas de *Candida albicans* es la filamentización de las levaduras y formación de clamidoconidias en agar harina de maíz-tween 80. También se realizan pruebas bioquímicas, pero no son muy comunes, auxogramas de hidratos de carbono, auxonograma para sustancias nitrogenadas y fermentación de sustancias hidrocarbonadas (zimograma). (López, Giro, Ramos, Ramadán, & Bulacio, 2005)

#### **1.5.8.3.4 Hábitat**

El hombre es el principal reservorio de este tipo de hongo, y ya que es un hongo oportunista, se puede encontrar como comensal en piel, estómago, colon, recto, boca y garganta de individuos sanos. En la cavidad bucal la colonización es significativamente distinta de sitio a sitio, sin embargo la capacidad de infección por *Candida* disminuye porque existe un equilibrio biológico con la flora comensal bacteriana, ya que estas pueden contribuir a la colonización y proliferación de especies de *Candida* en la cavidad bucal, generalmente *Streptococcus mutans*. (Pardi & Cardozo, 2002)

#### **1.5.8.3.5 Manifestaciones clínicas**

*Candida albicans*, en principio no es patógena, ya que la flora bacteriana beneficiosa y el sistema inmunitario limitan su crecimiento y frenan su excesiva proliferación, manteniendo así un equilibrio. Pero cuando se rompe este equilibrio *Candida albicans* empieza a proliferar y puede dar lugar a un conjunto de enfermedades denominadas Candidiasis o micosis candidiásica, que pueden consistir en leves infecciones de mucosas y piel o desencadenar diseminaciones sistémicas graves, pudiendo afectar órganos vitales. Para multiplicarse utiliza, sobre todo, carbohidratos

simples. Así, las personas que sufren alguna candidiasis suelen sentir la necesidad de comer muchos dulces. (Segundo, 2006)

La candidiasis suele ser una enfermedad de fácil contagio, ya que es transmisible por contacto sexual, a través de las manos u objetos diversos. También se ha observado transmisión vertical, es decir, que pasa de madres a hijos, si durante el parto la madre sufre Candidiasis genital. Además, lesiona rápidamente las células y los tejidos que invade.

La candidiasis oral se manifiesta en forma de manchas de color blanco rosado sobre la lengua, encías, mucosa oral o comisuras de los labios. Puede ser asintomática o producir dolor, ardor o mal sabor de boca. Algunas veces, puede causar grietas, úlceras y hendiduras. La candidiasis esofágica, aparece en la profundidad de la garganta. Se manifiesta con dolor pectoral y dificultad para deglutir. (Segundo, 2006)

Se cree que las hifas pueden penetrar al tejido en forma más rápida que la levadura, la cual es mucho más difícil de ingerir y por lo tanto al ser esta propiedad exclusiva de *Candida albicans* esto le confiere mayor patogenicidad que las otras formas de *Candida*.

#### **1.5.8.3.6 Cultivo**

Las especies de *Candida* crecen bien en medios de cultivo con agar, peptona, dextrosa, maltosa o sacarosa. Se presenta bajo condiciones de cultivo semianaeróbico o facultativo y está formado por células elongadas que se mantienen unidas entre sí como una cadena y blastoconidias o blastosporas que están agrupadas en montones a lo largo del pseudomicelio, en los sitios en que los extremos finales de las células pseudomiceliales se empalman con otras.

Las colonias muy pequeñas aparecen en un lapso de 24 a 36 horas en Agar Sabouraud y miden de 1,5 a 2 m.m. de diámetro después de 5 a 7 días. Las colonias son típicamente blancas por completo, pero adquieren un color crema o requemado al continuar envejeciendo, su temperatura óptima de crecimiento es 37° C. (Pardi & Cardozo, 2002)

#### **1.5.8.3.7 Susceptibilidad antimicótica**

Es sensible a nistatina, anfotericina  $\beta$ , fluconazol, hay que considerar que algunas cepas pueden adquirir resistencia a éstos medicamentos antimicóticos. (Segundo, 2006)

#### **1.5.9 Descripción de Antimicrobianos**

Son sustancias químicas sintetizadas parcial o totalmente en laboratorio, son capaces de inhibir el crecimiento y/o destruir microorganismos de cualquier tipo como: bacterias, hongos y virus. Constituyen la base fundamental del tratamiento de las enfermedades infecciosas. (Mora, 2007)

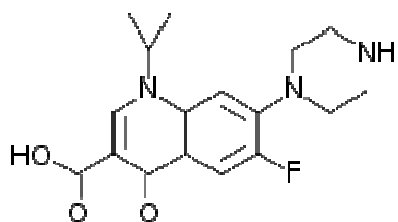
Los agentes antimicrobianos tienen un modo específico de acción contra las células microbianas, pudiendo interferir con:

- Síntesis de la pared bacteriana
- Alteración de la permeabilidad de la membrana celular
- Inhibir la síntesis de Ácidos nucleicos
- Inhibir la síntesis de proteínas
- Inhibir una ruta metabólica.

### 1.5.9.1 Ciprofloxacina

Es un antibiótico genérico del grupo de las fluoroquinolonas.

**Nombre químico:** Ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperacilil) quinolin-3-carboxílico



#### 1.5.9.1.1 Mecanismo de acción

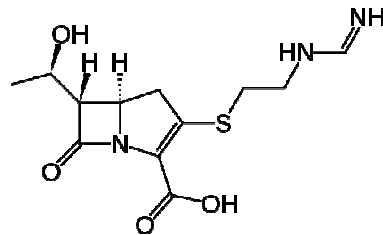
Los efectos antibacterianos de la ciprofloxacina se deben a la inhibición de la topoisomerasa IV y la DNA-girasa bacterianas. Estas topoisomerasas alteran el DNA introduciendo pliegues super helicoidales en el DNA de doble cadena, facilitando el desenrollado de las cadenas. La DNA-girasa tiene dos subunidades codificadas por el gen *gyrA*, y actúan rompiendo las cadenas del cromosoma bacteriano y luego pegándolas una vez que se ha formado la superhélice. Las quinolonas inhiben estas subunidades impidiendo la replicación y la transcripción del DNA bacteriano, aunque no se conoce con exactitud porque la inhibición de la DNA-girasa conduce a la muerte de la bacteria. Las células humanas y de los mamíferos contienen una topoisomerasa que actúa de una forma parecida a la DNA-girasa bacteriana, pero esta enzima no es afectada por las concentraciones bactericidas de la ciprofloxacina.

Como todas las quinolonas, la ciprofloxacina muestra un efecto post-antibiótico: después de una exposición, los gérmenes no pueden reiniciar su crecimiento durante unas 4 horas, aunque los niveles del antibiótico sean indetectables. (IQB, 2007)

### 1.5.9.2 Imipenem

Es un antibiótico betalactámico

**Nombre químico:** monohidrato del ácido [5R-[5a, 6a(R\*)]] -6-(1-hidroxietil)-3-[[2-[(iminometil)amino]etil]tio]-7-oxo-1-azabicyclo [3.2.0]-hepta-2-en-2-carboxílico o monohidrato de N-formimidoil-tienamicina.



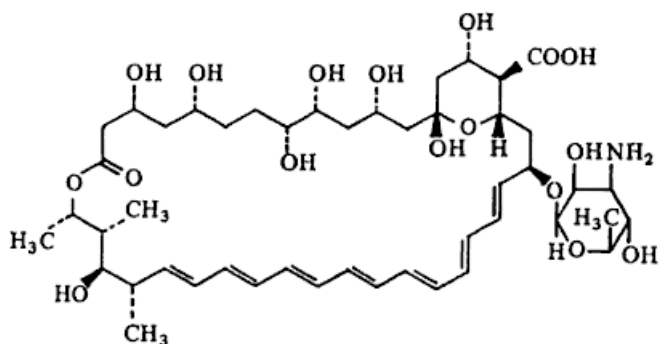
#### 1.5.9.2.1 Mecanismo de acción

Imipenem actúa como antimicrobiano inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana en varias bacterias gram-negativas y gram-positivas. Permanece estable en presencia de betalactamasas (penicilinasas y cefalosporinas) producidas por diferentes gérmenes, además actúa como potente inhibidor de betalactamasas de bacterias gram-negativas que son resistentes a la mayoría de antibióticos betalactámicos. (Thomson, 2004)

### 1.5.9.3 Anfotericina $\beta$

Este es un antimicótico de amplio espectro obtenido del hongo *Streptomyces nodosus*. (Korolkovas, A., & Burckhalter, J., 1983)





Se utiliza como el tratamiento inicial para micosis diseminadas y extracutáneas, siendo posteriormente reemplazado por imidazoles. (Rivera, 2007)

### 1.5.9.3.1 Mecanismo de acción

Se fija a los esteroides de la membrana de la célula fúngica la cual se altera y se pierden las macromoléculas celulares y los iones sodio, potasio e hidrogeniones, lo que origina un daño irreversible. La resistencia a este fármaco se puede deber a una disminución en la cantidad de ergosterol de la membrana o a una modificación en su estructura. (Rivera, 2007)

## 1.6 HIPÓTESIS

Los extractos obtenidos de *Myrcianthes hallii* (arrayán), *Amaranthus asplundii* (ataco), *Peperomia peltigera* (pataku yuyo), son capaces de provocar un efecto inhibitorio eficaz *in vitro* en cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*.

## **CAPITULO II**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **2.1 Participantes**

La presente investigación contó con la participación de: Dr. Carlos Cárdenas, Dr. Carlos Chiriboga, Dr. Franklin Gavilánez, Dr. Carlos Cerón, como colaboradores científicos, adicionalmente se tuvo la colaboración en la fase microbiológica del Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez” sede Quito.

#### **2.2 Zona de estudio**

La presente investigación se realizó en dos fases.

##### **Fase de campo**

Se realizó en la localidad de Peguche-Imbabura, ubicado a 0° 14' de latitud norte, y entre los 73° 16' longitud Greenwich, 0°14'30" meridiano de Quito. A una altitud de 2556 m.s.n.m. (Google Earth, 2009). Esta localidad posee una topografía plana, con presencia de ligeras colinas, suelos de color negro, utilizados para cultivo de maíz, la mayor parte de la zona es agrícola (Figura 2-1).

### **Fase de laboratorio**

Fue realizada en las instalaciones de los Laboratorios de Fitoquímica y Microbiología de la Carrera de Ciencias Agropecuarias, IASA I, Hacienda el Prado, y en el Laboratorio de Microbiología perteneciente a la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, de la Escuela Politécnica del Ejército ESPE, ubicada en el Valle de Los Chillos – Sangolquí.



**Figura 2-1:** Localidad de Peguche

### **2.3 Duración del estudio**

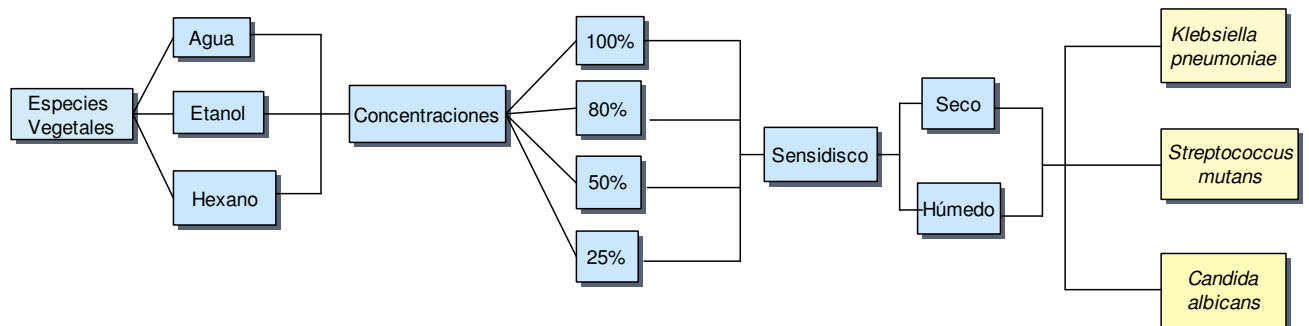
La fase de campo, colección y descripción de las especies vegetales utilizadas en el presente estudio, se desarrolló entre los meses de marzo a julio del 2009; la fase de laboratorio se desarrolló en el mes de octubre del 2009 a mayo del 2010; siendo concluido todo el estudio en el mes de junio del 2010.

## 2.4 Diseño experimental

Se aplicó un diseño experimental factorial completo y balanceado, con una distribución factorial de  $3^2 \times 2^2 \times 4$  para un total de 432 tratamientos con 4 repeticiones.

Los factores analizados corresponden a:

Factor 1: microorganismos *Streptococcus mutans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*; Factor 2: especies vegetales *Myrcianthes hallii* (arrayán), *Amaranthus asplundii* (ataco), *Peperomia peltigera* (pataku-yuyo); Factor 3: solventes agua, etanol, hexano; Factor 4: estado de disco, disco seco, disco húmedo; Factor 5: tiempo de medición, 24 horas y 48 horas para bacterias, 48 horas y 72 horas para la levadura; Factor 6: concentraciones, 25%, 50%, 80%, 100%.



**Figura 2-2:** Esquema del diseño experimental

## **2.5 Procedimientos**

### **2.5.1 Materiales**

#### **2.5.1.1 Equipo**

- Autoclave
- Balanza analítica
- Estufa
- Incubadora a 25- 37°C
- Mechero Bunsen
- Microscopio
- Micropipetas 10µL
- Refrigeradora
- Centrifugadora
- Plancha de calentamiento
- Rotavapor
- Horno con aire circulante
- Molino eléctrico
- pHímetro
- Bomba para vacío

#### **2.5.1.2 Reactivos**

- Agua bidestilada
- Agua destilada
- Agar Sabouraud
- Agar Sangre

- Agar Müller Hinton
- Agar Müller Hinton enriquecido con sangre de carnero al 5%
- Etanol al 99,5% Grado Analítico
- Fluconazol 200 mg (Anfotericina  $\beta$ )
- Ciprofloxacina
- Imipenem
- Optoquina
- Hexano marca Fisher
- Hidróxido de sodio al 10%
- Vainillina
- Magnesio en vírta
- Ácido Sulfúrico concentrado
- Ácido clorhídrico 5%
- Cloruro férrico
- Reactivo de gelatina 1%
- Cloruro de sodio
- Solución salina estéril.
- Reactivo de: Dragendorff, Rosenthailer, Wagner

### **2.5.1.3 Cristalería**

- Erlenmeyer 1000 mL
- Frascos de vidrio color ámbar con tapón de rosca de 10, 60, 90, 120, 240mL.
- Pipetas 1mL, 10mL
- Probetas 10mL, 100 mL, 1000mL
- Tubos de ensayo pirex con tapón de rosca 15 mL
- Tubos de ensayo 10mL
- Varilla de vidrio estéril
- Vasos de precipitación 100 mL, 1000 mL

- Cajas de Petri
- Embudo
- Bureta
- Soporte universal
- Envases de vidrio pirex 500mL, 1000 mL
- Envases de vidrio 1000 mL

#### 2.5.1.4 Otros

- Algodón
- Asa de nicromo en argolla
- Hisopos
- Fósforos
- Papel Filtro
- Papel Filtro Whatman
- Micro filtros estériles de acetato de celulosa con poro 0,45  $\mu\text{m}$
- Pinzas
- Perforadora
- Tubos ependorff
- Rack de puntas para micropipeta 10  $\mu\text{L}$
- Jeringuillas estériles 10 mL, 3 mL, 5mL
- Tijeras
- Pipetas Pasteur 1 mL
- Hojas de papel
- Papel aluminio
- Masking tape
- Cinta de autoclave
- Cuaderno de apuntes
- Tijeras de podar
- Bolsas plásticas
- Bandejas

- Regla milimetrada
- Pie de rey
- Envases para anaerobiosis

## **2.5.2 Metodología**

### **2.5.2.1 Selección de plantas en el estudio**

Las plantas seleccionadas para el presente estudio fueron escogidas en base a entrevistas realizadas durante el mes de mayo del año 2009, en la parroquia de Peguche, sobre el uso etnomedicinal de la flora del sector en el tratamiento de enfermedades lábiles como la caries, inflamación de encías, e inclusive para el tratamiento de enfermedades que representan morbilidad como faringitis, amigdalitis, bronquitis, que constituyen la denominadas enfermedades bucofaríngeas, por medio de las cuales se logró recolectar varias plantas con sus nombres locales y populares, constituyendo el fundamento de la investigación que se llevó a cabo en esta zona. (Cárdenas *com. pers.*, 2009)

Las entrevistas fueron realizadas de forma individual, en casa del informante o en el campo, procurando buscar la comodidad de la persona consultada, en algunos casos se entrevistó conjuntamente a grupos de hombres y mujeres mayores, reunidos en plazas dentro del pueblo. La aproximación al informante se realizó explicando la finalidad de éste estudio.



### 2.5.2.2 Modelo de encuesta

La información de cada planta utilizada se obtuvo recabando todo tipo de datos, destacando lo referente a su utilización, como simple o en mezcla, así como las partes utilizadas, para ello se elaboró encuestas que reúnen toda la información suministrada. (Figura 2-3)

No.			
Sexo:		Edad:	
¿Conoce usted plantas usadas en el tratamiento de enfermedades bucofaríngeas?			
SI _____		NO _____	
Datos de la Planta:			
Nombre vulgar	usos	parte utilizada	forma de uso
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____

**Figura 2-3:** Modelo de encuesta de propiedades etnomedicinales de plantas utilizadas en la comunidad de Peguche

### 2.5.2.3 Herborización de especies

Con base en la información obtenida en las encuestas se seleccionaron 3 plantas usadas empíricamente en el control de enfermedades bucofaríngeas, dichas plantas son: *Myrcianthes hallii* (arrayán), *Amaranthus asplundii* (ataco), *Peperomia peltigera* (pataku-yuyo), la selección se llevó a cabo considerando las plantas más utilizadas, así como las que no posean reporte de estudios en el ámbito fitoquímico y en el efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, microorganismos incluidos en éste estudio.

Utilizando las técnicas de colección botánica descritas por Cerón (2003), fueron recolectadas las muestras de cada especie vegetal para su identificación el 03 de Junio del 2009, en la localidad de Peguche a 2200 m.s.n.m., en cultivos traseros, domésticos, en jardines adyacentes a casas, ferias populares y crecimiento silvestre.



**Figura 2-4:** Mercado popular Otavalo, hierbero

#### 2.5.2.4 Identificación Botánica

Se realizó la identificación taxonómica, con el apoyo del especialista botánico Dr. Carlos Cerón MSc. mediante claves taxonómicas y bibliografía. Una vez clasificadas, las muestras fueron incorporadas al Herbario “Alfredo Paredes” QAP, de la Facultad de Filosofía de la Universidad Central del Ecuador.

Los ejemplares de las especies en estudio se encuentran codificados con el número:

<i>Myrcianthes hallii</i> (O. Berg) Mc. Vaugh (Figura 2-5)	0075290
<i>Amaranthus asplundii</i> Thell (Figura 2-6)	0075291
<i>Peperomia peltigera</i> C.DC (Figura 2-7)	0075289

#### 2.5.2.5 Preparación de los extractos

El material vegetal se lavó varias veces con agua, con el fin de eliminar suciedad y luego secado en horno con aire circulante a una temperatura de 50°C durante 16 horas; Las plantas se procesaron inmediatamente antes de cada evaluación de acuerdo al uso popular, como se detalla en la Tabla 2-1. (Cárdenas *com. pers.*, 2009)

**Tabla 2-1:** Especies y partes de las plantas utilizadas para determinar la actividad antibacteriana y antimicótica de extractos vegetales sobre *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*.

No.	Familia	Nombre Científico	Nombre Común	Parte utilizada
1	<i>Myrtaceae</i>	<i>Myrcianthes hallii</i>	Arrayán	Hojas
2	<i>Amaranthaceae</i>	<i>Amaranthus asplundii</i>	Ataco	Hojas – Flor
3	<i>Piperaceae</i>	<i>Peperomia peltigera</i>	Pataku-yuyo	Hojas – Tallo



Familia: Myrtaceae  
N. Científico: *Myrcianthes hallii* (O. Berg) Mc. Vaugh.  
N. Vulgar: Arrayán  
Uso: Medicinal  
Muestra No. 3  
Lugar de Recolección: Peguche  
N. Recolector: Cristina Gómez C.  
Tesis: "Investigación etnomedicinal en la comunidad de Peguche  
y extracción de principios activos de plantas con beneficio en el  
control de enfermedades bucofaríngeas" ESPE

**Figura 2-5:** Muestra de herbario, *Myrcianthes hallii* (arrayán)



**Figura 2-6:** Muestra de herbario, *Amaranthus asplundii* (ataco)



**Figura 2-7:** Muestra de herbario, *Peperomia peltigera* (pataku-yuyo)

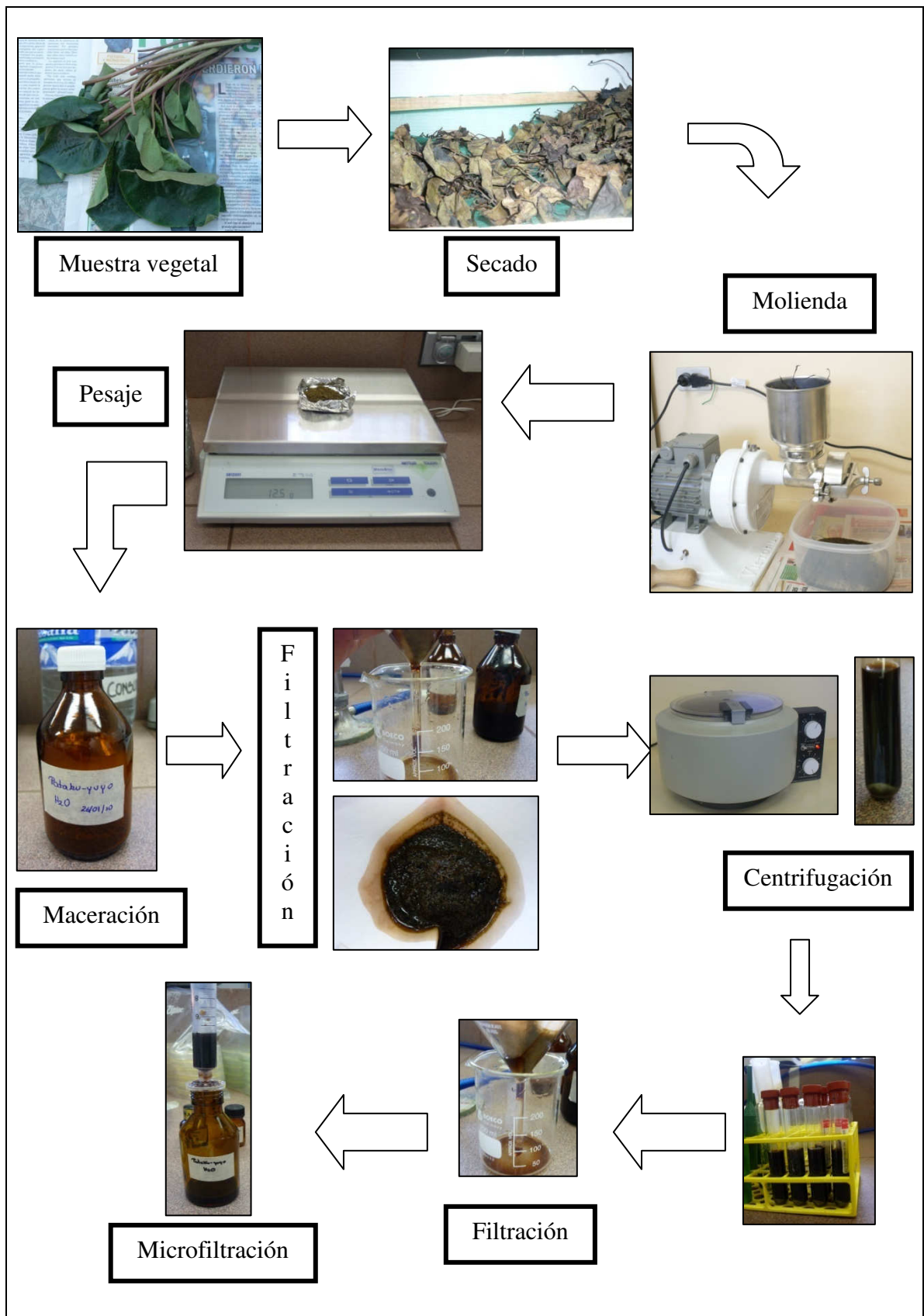
La planta completamente seca fue pulverizada utilizando un molino eléctrico, el proceso de molienda fue alimentado poco a poco a través de un embudo o tolva, hasta obtener un polvo semi-fino, el cual se colectó en recipientes plásticos para posteriormente ser colocados en envases de vidrio color ámbar debidamente sellados e identificados.

Para la elaboración de extractos, se llevó a una concentración de 100 mg/mL, para lo cual se procesaron 12,5g de cada una de las especies vegetales coleccionadas, que fueron maceradas en 125 mL de cada uno de los solventes utilizados en este estudio (agua, etanol, hexano).

**Infusión acuosa:** el material seco y molido se extrajo con agua bidestilada hervida, macerando durante 24 horas en oscuridad, luego filtrado para eliminar sólidos remanentes, el líquido filtrado fue centrifugado a 1000 rpm por 60 min, posteriormente esta fue esterilizada mediante filtración a través de micro filtros de 0.45  $\mu\text{m}$  (Figura 2-8). El extracto acuoso fue conservado en refrigeración a 4°C hasta su uso (menos de 30 días). (Castro, 2005)

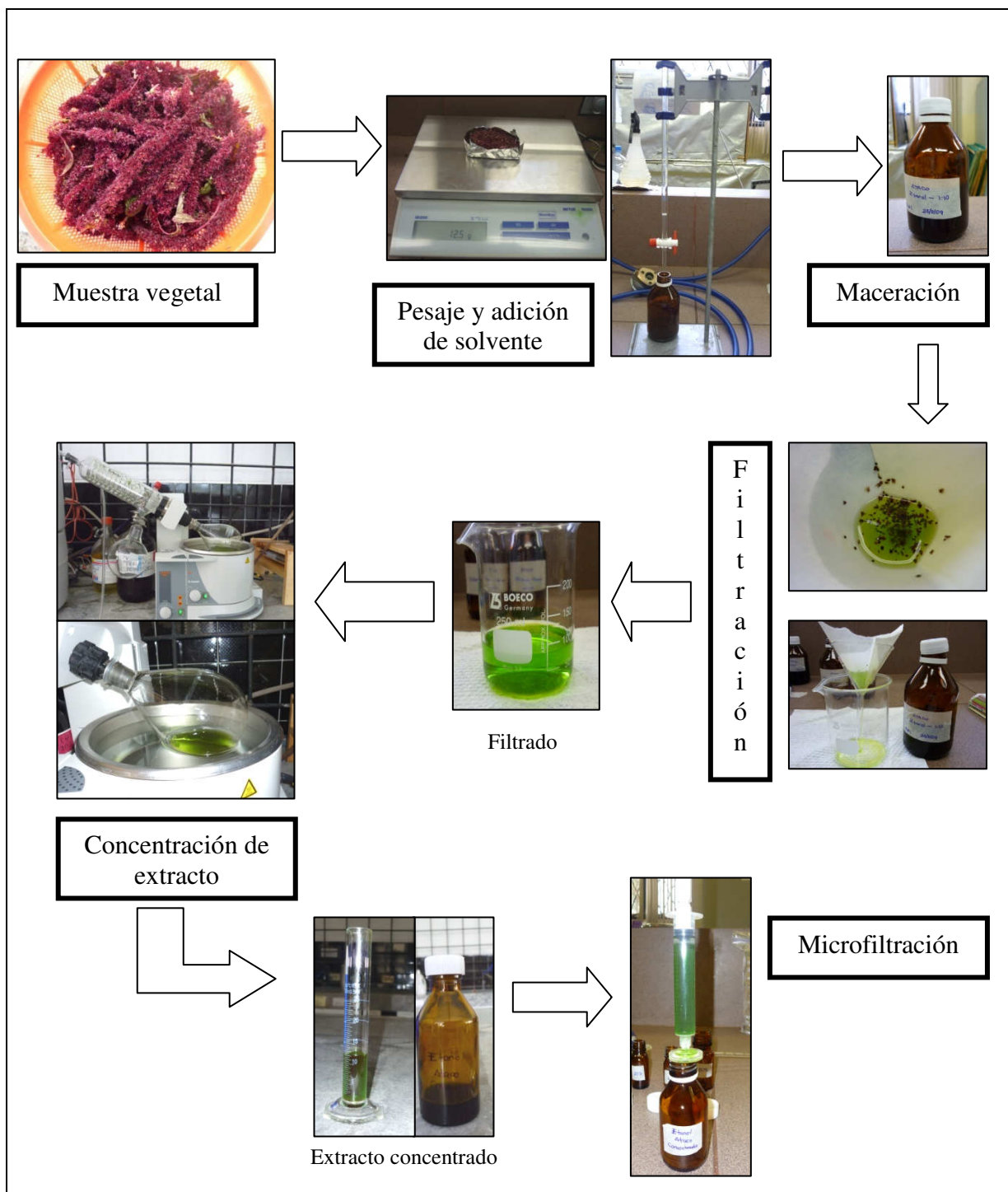
**Extracto etanólico:** Se realizó un macerado con etanol al 99,5% durante 7 días en oscuridad, al término de la maceración el extracto resultante se filtró, el líquido filtrado fue concentrado mediante rotavapor Heidolph LABOROTA 4000-EFFICIENT a 60°C a presión reducida y se llevó a sequedad en un 80%, resultando el extracto alcohólico total, el concentrado se esterilizó mediante filtración a través de micro filtros de 0.45  $\mu\text{m}$ . (Figura 2-9), luego fue conservado en refrigeración a 4°C para los ensayos biológicos. (Castro, 2005)





**Figura 2-8:** Procedimiento para obtener extracto total acuoso de *Peperomia peltigera* (pataku-yuyo) por maceración

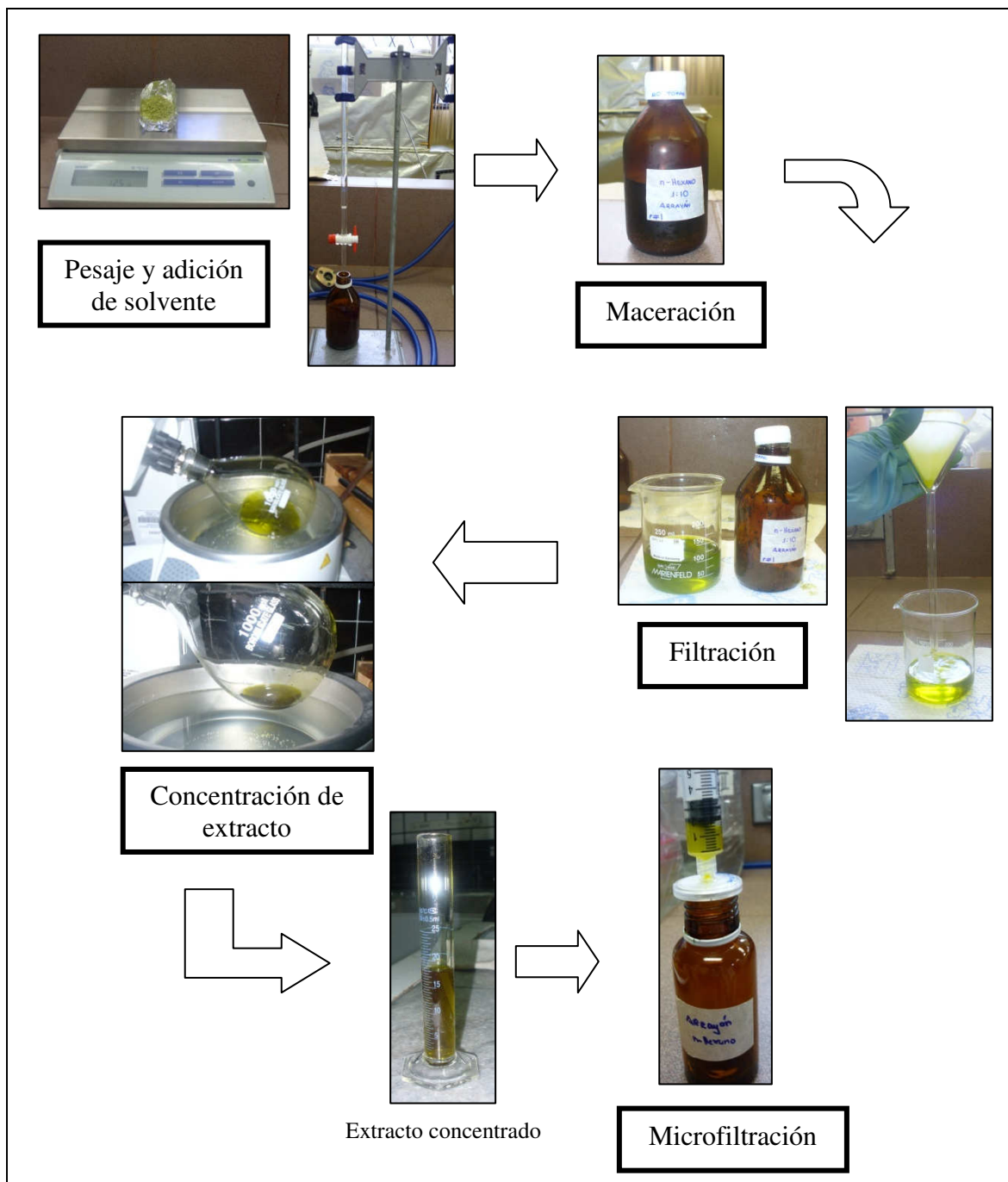




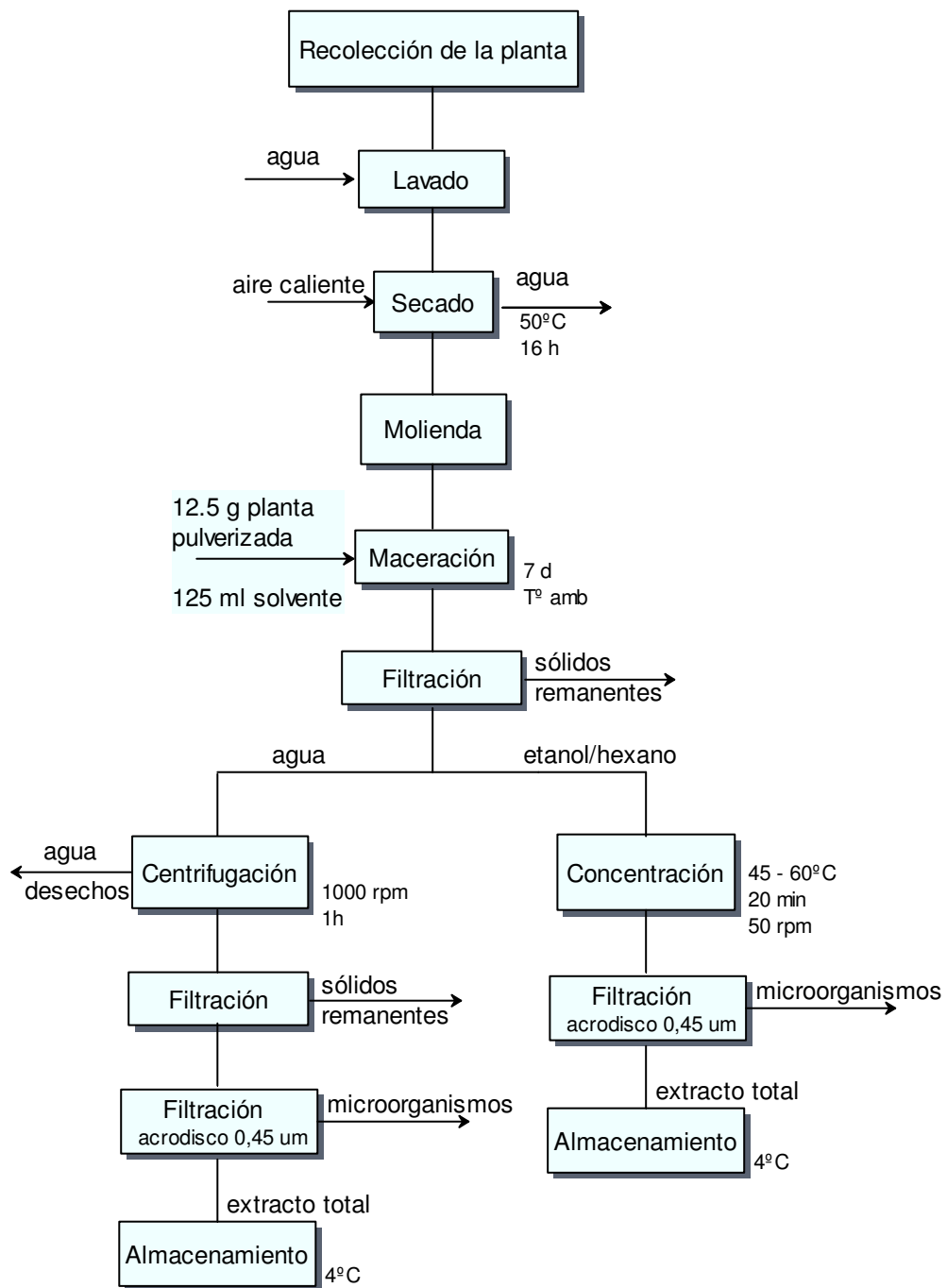
**Figura 2-9:** Procedimiento para obtener extracto total etanólico de *Amaranthus asplundii* (ataco) por maceración

**Extracto hexánico:** Al material molido y seco de cada una de las plantas utilizadas en este estudio, se maceró con hexano por 7 días en oscuridad,

posteriormente se filtró, el líquido filtrado fue concentrado mediante rotavapor Heidolph LABOROTA 4000-EFFICIENT a 45°C, resultando el extracto hexánico, el concentrado se esterilizó mediante filtración a través de micro filtros de 0.45 µm. (Figura 2-10), luego conservado en refrigeración a 4°C para los ensayos biológicos. (Castro, 2005)



**Figura 2-10:** Procedimiento para obtener extracto total hexánico de *Myrcianthes hallii* (arrayán) por maceración



**Figura 2-11:** Diagrama de proceso para la obtención de extractos vegetales

### 2.5.2.6 Extractos vegetales

Los extractos vegetales que se utilizaron en la presente investigación fueron: extracto total acuoso, etanólico y hexánico de *Myrcianthes hallii* (arrayán), *Amaranthus asplundii* (ataco) y *Peperomia peltigera* (pataku-yuyo), a partir de los cuales se prepararon soluciones diluidas con los solventes extractores, a concentraciones de 25%, 50%, 80%, en alícuotas de 1 ml, y conservadas en frascos ámbar a 4°C hasta su uso.

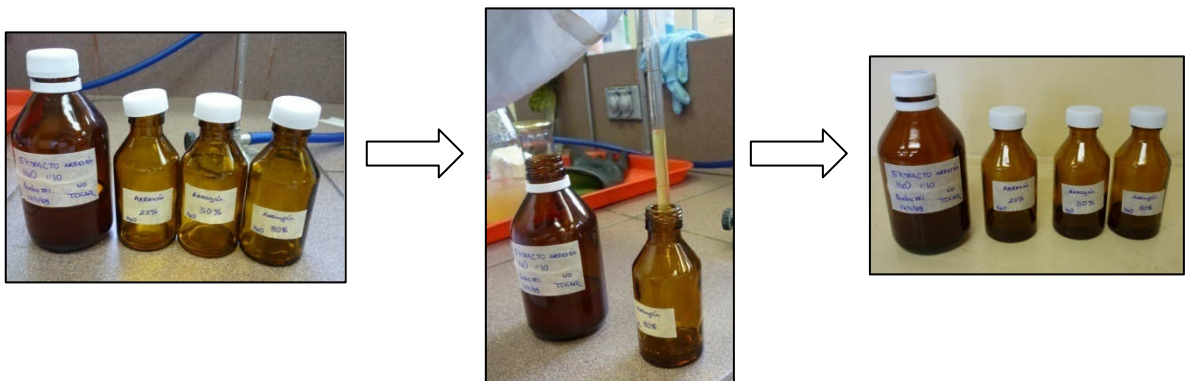


Figura 2-12: Preparación de diluciones

### 2.5.2.7 Microorganismos de referencia

Las fracciones activas de los extractos acuosos, etanólicos, hexánicos, de *Myrcianthes hallii* (arrayán), *Amaranthus asplundii* (ataco), *Peperomia peltigera* (pataku yuyo), se ensayaron contra especímenes clínicos de microorganismos causantes de enfermedades bucofaríngeas (Tabla 2-2). Las cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* fueron proporcionadas por el Departamento de Microbiología del Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez”, la cepa *Streptococcus mutans* ATCC 25175, se adquirió por medio de MEDIBAC Inc. S.A. distribuidor de Microbiologics (Anexo B).

**Tabla 2-2:** Microorganismos utilizados en el ensayo antimicrobiano

Microorganismo	Tipo de microorganismo
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bacilo Gram -
<i>Streptococcus mutans</i>	Coco Gram +
<i>Candida albicans</i>	Levadura

Las cepas seleccionadas para éste estudio fueron sometidas a pruebas bioquímicas para su identificación (Anexo C), en el Laboratorio de Microbiología del Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez” sede Quito.



**Figura 2-13:** Cepas microbianas a) *Klebsiella pneumoniae* b) *Streptococcus mutans* c) *Candida albicans*

#### 2.5.2.8 Medios de cultivo

Se utilizó medios estandarizados para antibiogramas (Tabla 2-3). Los medios fueron preparados como indica el fabricante: Mueller Hinton → 38 gramos en 1000 mL de agua destilada, Sabouraud → 65 gramos en 1000 mL de agua destilada, luego se disponen a esterilización en autoclave de marca All American a 121°C y a 18psi por 15 min, se espera a que lleguen a temperatura ambiente y se dispensan 20 mL en cada caja petri, se lleva a refrigeración a 4°C hasta su posterior utilización. (Cona, 2002 & Prat, 2006)

**Tabla 2-3:** Medios de cultivo utilizados para realización de los bioensayos

<b>Microorganismo</b>	<b>Medio de cultivo antibiograma</b>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Agar Müeller Hinton
<i>Streptococcus mutans</i>	Agar Müeller Hinton enriquecido con sangre
<i>Candida albicans</i>	Agar Sabouraud

### 2.5.2.9 Controles

Con el objeto de descartar el efecto inhibitorio de los solventes, se prepararon placas de control negativo en las cuales se utilizaron discos impregnados con 10µL de cada uno de los solventes utilizados. Como control positivo para *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus mutans* se utilizaron sensibilizadores comerciales de antibióticos utilizados en el control de las bacterias mencionadas, para *Candida albicans* se utilizó Fluconazol por ser ampliamente utilizado en el tratamiento de diferentes tipos de candidiasis. (Tabla 2-4).

**Tabla 2-4:** Controles positivos de susceptibilidad antimicrobiana

<b>Microorganismo</b>	<b>Control +</b>	<b>Concentración</b>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ciprofloxacina	5 mcg
<i>Streptococcus mutans</i>	Imipenem	10 mcg
<i>Candida albicans</i>	Fluconazol componente activo Anfotericina β	25 mg

### 2.5.2.10 Preparación del inóculo

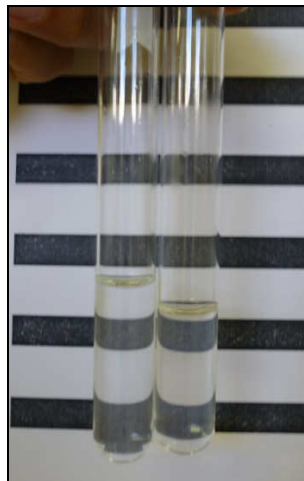
Inicialmente se verificó la viabilidad de cada uno de los microorganismos seleccionados, para ello se replicaron en medios específicos: *Klebsiella pneumoniae* sobre MacConkey Agar, *Streptococcus mutans* sobre Agar Sangre, *Candida albicans* sobre Sabouraud, e incubándose por 24 horas a 37°C. (Cona, 2002 & Prat, 2006)





**Figura 2-14:** Cepas microbianas en medios específicos a) *Klebsiella pneumoniae* b) *Streptococcus mutans* c) *Candida albicans*

A partir de estos cultivos en crecimiento activo, en 5 mL de solución salina estéril se ajusto el inculo a una turbidez equivalente a 0,5 en escala de McFarland ( $1 \times 10^6$  UFC/ml), que permite a simple vista (Figura 2-15) conocer la cantidad aproximada de células bacterianas y de levaduras presentes en la dilución. (Cona, 2002 & Prat, 2006)



**Figura 2-15:** Comprobación visual Escala 0.5 de McFarland

### 2.5.2.11 Preparación de sensidiscos

Los microorganismos de referencia fueron enfrentados a los extractos utilizando para esto discos de papel de filtro Whatman de 5 mm estériles,

impregnándolos con cada uno de los extractos hasta una carga total de 10  $\mu$ L. (Figura 2-16)

### Sensidiscos secos

Los discos una vez impregnados del extracto se colocaron en un recipiente de vidrio sellado, a temperatura ambiente cerca del mechero, para secarlos y evitar su contaminación.

### Sensidiscos húmedos

Los discos fueron colocados en un recipiente de vidrio estéril cerca del mechero, e inmediatamente luego de haber sido impregnados del extracto se ubicaron sobre el agar solidificado, previamente inoculado.



**Figura 2-16:** Preparación sensidiscos a) extractos y antibióticos b) sensidiscos impregnados con extracto etanólico c) sensidiscos impregnados con extracto acuoso

#### 2.5.2.12 Inoculación de cajas

Obteniéndose visualmente la suspensión ajustada a la escala McFarland, se introdujo un hisopo estéril en la suspensión y se rotó varias veces, luego se presionó el hisopo a la pared del tubo para eliminar el exceso de inóculo, inmediatamente se



procedió a inocular sobre la superficie de las cajas que contienen los medios mencionados en la Tabla 2-3, estriando el hisopo en 3 direcciones, posteriormente se dejó reposar la placa inoculada por 5 minutos.

### **Aplicación de los discos a las cajas inoculadas**

Los sensidiscos se dispusieron en la superficie del agar, utilizando pinzas estériles haciendo una pequeña presión, para asegurar la difusión del extracto sobre el agar, de la misma manera se colocaron los discos de control positivo y negativo, que fueron preparados simultáneamente (Figura 2-18). (Cona, 2002 & Prat, 2006)

Una vez colocados los discos sobre el agar, se incuban las placas de forma invertida, conforme la Tabla 2-5.

**Tabla 2-5:** Condiciones y Requerimiento para el crecimiento de microorganismos

<b>Microorganismo</b>	<b>Tiempo incubación</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Condición</b>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24 – 48 horas	37°C	Aerobia
<i>Streptococcus mutans</i>	24 – 48 horas	37°C	Anaerobia
<i>Candida albicans</i>	48 – 72 horas	37°C	Aerobia

#### **2.5.2.13 Lectura de placas**

Al término del tiempo de incubación indicado para cada microorganismo, se procedió a la medición del diámetro de los halos en milímetros. Se midieron los diámetros de cada halo de inhibición en tres direcciones, empleando un calibrador marca ESSER (Figura 2-17).

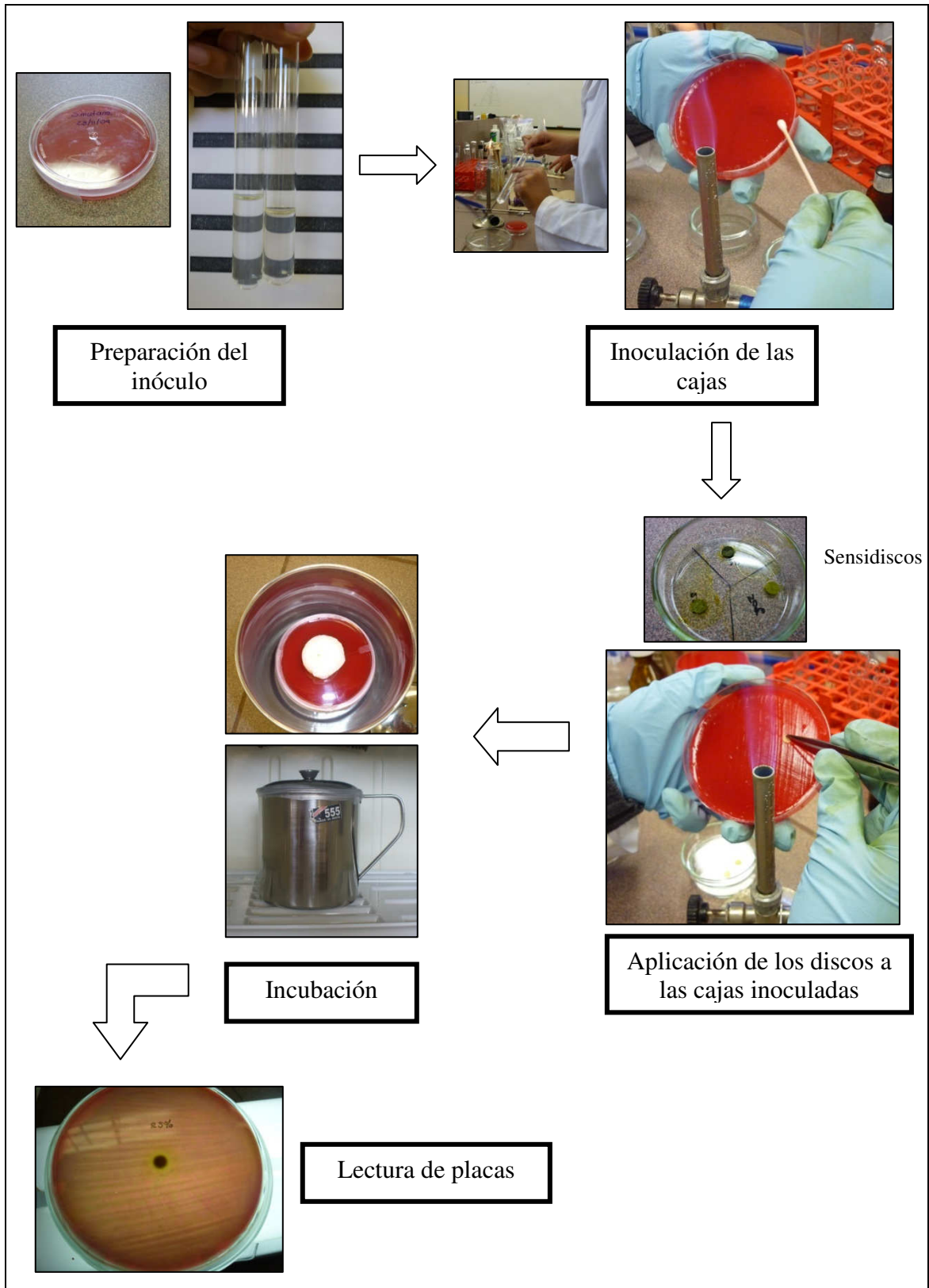
Los valores obtenidos se promediaron hallándose el diámetro medio que fue utilizado como índice de actividad antibacteriana, la presencia o ausencia de una zona de inhibición fue usada como criterio para definir los extractos activos o inactivos. (Lizcano & Vergara, 2008).

En el caso de *Streptococcus mutans* se hizo uso de luz reflejada con fondo oscuro.

Se comparó el diámetro de la zona inhibida por el extracto con el diámetro del antibiótico comercial usado como control positivo de la inhibición.



**Figura 2-17:** Medición diámetros halos de inhibición



**Figura 2-18:** Procedimiento para la evaluación de actividad antimicrobiana (*Streptococcus mutans*)

#### **2.5.2.14 Pruebas fitoquímicas**

Se evaluó el extracto que mayor porcentaje de inhibición presentó frente a los microorganismos en estudio. Para la identificación de los metabolitos secundarios se emplearon reactivos específicos de coloración para grupos funcionales descritas por Barranco (2004). La preparación de los reactivos se indica en el Anexo D.

##### **Alcaloides:**

Se utilizó 5 gotas del extracto etanólico obtenido, se disuelve en 5 mL ácido clorhídrico al 10%, se agita y se filtra hasta que el filtrado sea transparente. El filtrado se ensaya con el reactivo de Dragendorff y de Wagner, se consideró prueba positiva cuando se produce un precipitado de color castaño - rojizo.

##### **Saponinas:**

###### a) Ensayo de agua caliente

Se disolvió en un tubo de ensayo 0,5 mL del extracto etanólico con 5 mL de agua destilada, se procedió a agitar vigorosamente por 3 minutos. La formación de espuma estable por 10 min, con apariencia de panal de abejas se consideró como prueba positiva. (Domínguez, 2002)

###### b) Rosenthaler

En un tubo de ensayo se colocó 0.5 mL del extracto etanólico, se añade una gota del reactivo de Rosenthaler y una gota de ácido sulfúrico concentrado. Se consideró prueba positiva la presencia de un color violeta. (Domínguez, 2002)

## **Flavonoides:**

### a) Shinoda

En un tubo de ensayo se agregó 0.5 mL del extracto etanólico, se le diluye con el solvente extractor (relación 1:1), se le adicionó pequeños trozos de viruta de magnesio amalgamado y 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado. Se consideró prueba positiva para flavonas y flavonoles (amarillo a rojo), flavanonoles (rojo a magenta), flavanonas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavononas, chalconas y auronas no dan coloración. (Domínguez, 2002)

### b) Hidróxido de sodio (NaOH)

En un tubo de ensayo se agregó 0,5 mL del extracto etanólico, se diluyó con el solvente extractor (relación 1:1), se le agregó 3 gotas de hidróxido de sodio al 10%. Se consideró prueba positiva la aparición de colores amarillo o naranja. (Ramírez, 2005)

## **Taninos:**

### a) Reacción con Cloruro Férrico ( $\text{FeCl}_3$ )

Se disolvió 0,5 mL del extracto etanólico en 5 mL agua, se filtró y se tomó una alícuota de 1mL, se agregó una gota de  $\text{FeCl}_3$ , se consideró prueba positiva la presencia de un precipitado de verde a marrón para derivados de catecol, y coloraciones azul - negra para derivados de pirogalol. (Domínguez, 2002)

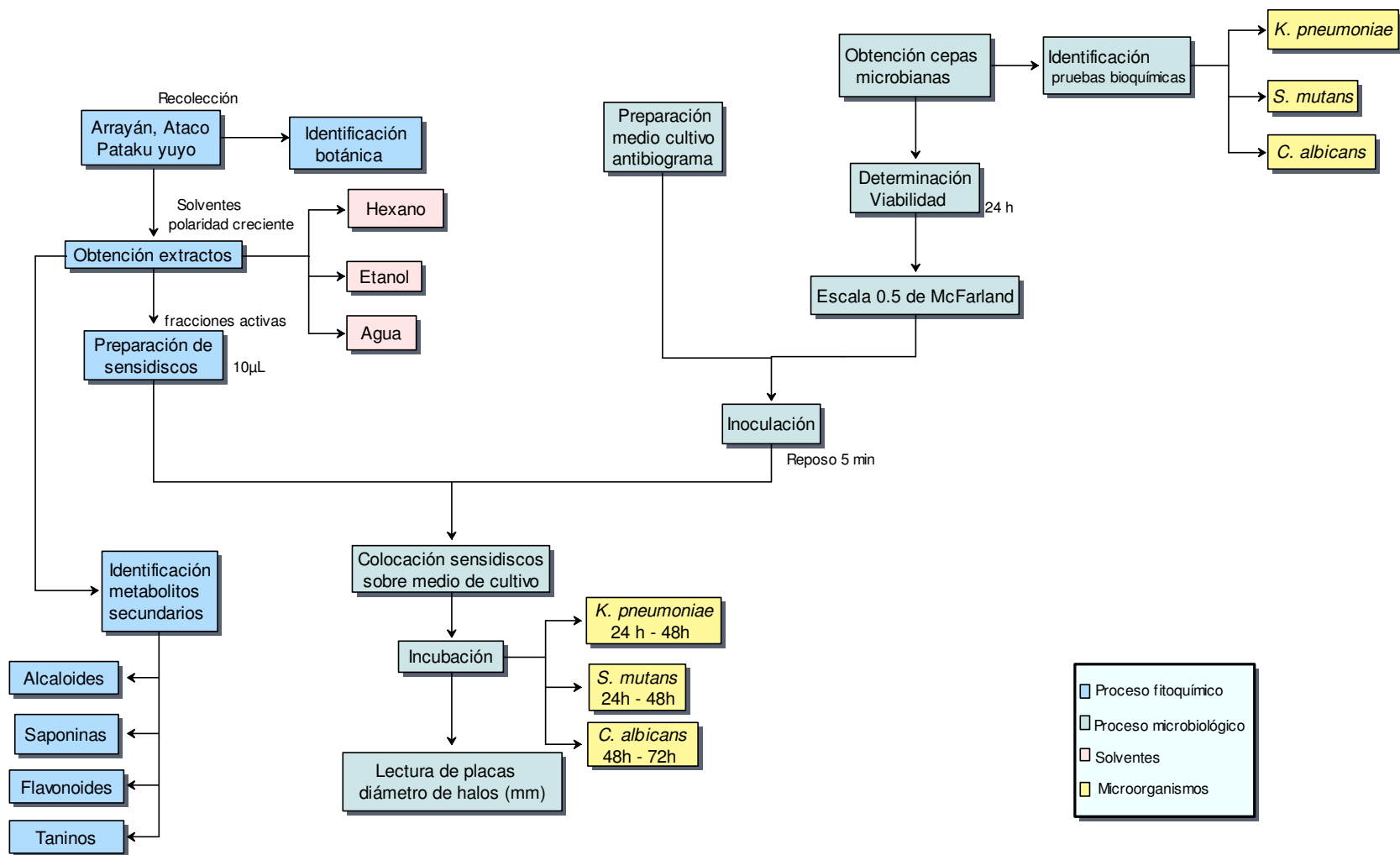
### b) Reacción con gelatina

Un precipitado abundante indica presencia de taninos. (Domínguez, 2002)

### **2.5.3 Análisis de Datos**

Se aplicó ANOVA univariante a los diámetros de halo y la significancia se reportó con un nivel de confianza del 95%, además se utilizó pruebas de comparación de medias Tukey. (Romero *com. pers.*, 2009) (Gutiérrez & De la Vara, 2008)

Los datos obtenidos se analizaron mediante el paquete estadístico para Windows SPSS versión 15,0 (SPSS, 2006).



**Figura 2-19:** Esquema general de metodología

## CAPITULO III

### RESULTADOS

En la fase de campo se realizó encuestas a 50 personas dentro de la zona de estudio, muchas de las cuales dijeron carecer de información. A partir de la información recopilada se encontraron 51 especies vegetales utilizadas en la comunidad de Peguche como tratamiento o paliativo de enfermedades bucofaríngeas, de las cuales se escogieron 3 para la realización del presente trabajo, las cuales fueron seleccionadas por su amplio uso dentro de la comunidad y la disponibilidad de las mismas. En el Anexo A se puede observar la tabulación de la información obtenida.

#### 3.1 Extracción

La preparación de los extractos fue de fácil procedimiento, sin presentar ningún inconveniente al momento de obtenerlos. La Tabla 3-1 revela que la extracción con agua produce mayor cantidad de extracto recuperado, por lo que se le considera como el solvente que mayor rendimiento.

**Tabla 3-1:** Extracción con agua

<b>Planta</b>	<b>Filtrado recuperado (mL)</b>	<b>Extracto recuperado (mL)</b>	<b>Características del extracto</b>
<i>Myrcianthes hallii</i> (arrayán)	100	60	Color verde – olor fuerte
<i>Amaranthus asplundii</i> (ataco)	83	60	Color rojo carmín – presencia de espuma
<i>Peperomia peltigera</i> (pataku-yuyo)	60	43	Color café



**Tabla 3-2:** Extracción con etanol

<b>Planta</b>	<b>Filtrado recuperado (mL)</b>	<b>Extracto recuperado (mL)</b>	<b>Características del extracto</b>
<i>Myrcianthes hallii</i> (arrayán)	100	10	Color verde oscuro
<i>Amaranthus asplundii</i> (ataco)	90	11	Color verde
<i>Peperomia peltigera</i> (pataku-yuyo)	105	4	Color verde esmeralda

**Tabla 3-3:** Extracción con hexano

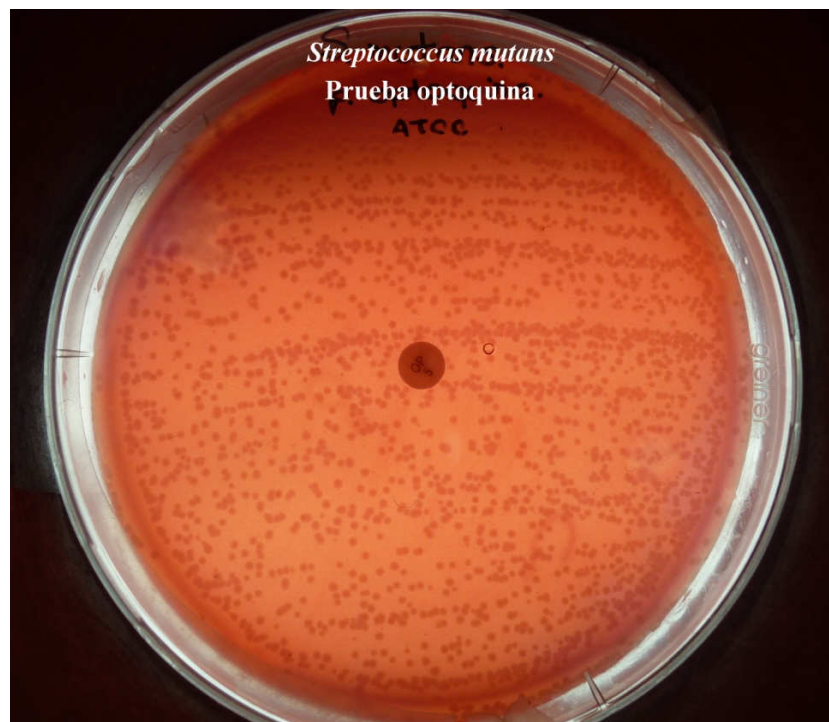
<b>Planta</b>	<b>Filtrado recuperado (mL)</b>	<b>Extracto recuperado (mL)</b>	<b>Características del extracto</b>
<i>Myrcianthes hallii</i> (arrayán)	110	22	Color verde amarillento
<i>Amaranthus asplundii</i> (ataco)	100	11	Color verde
<i>Peperomia peltigera</i> (pataku-yuyo)	100	6	Color verde amarillento

### 3.2 Pruebas Bioquímicas

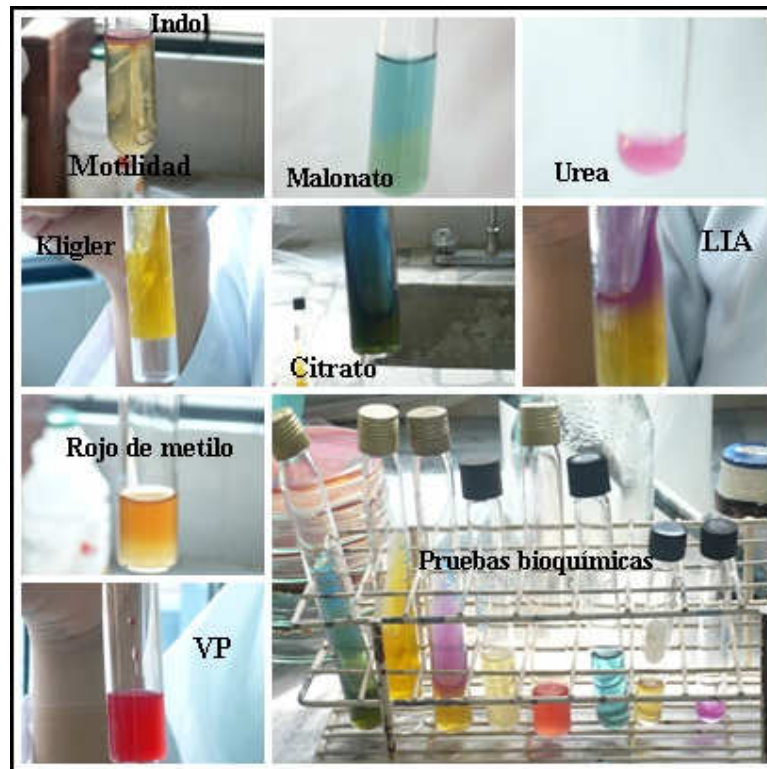
La tabla 3-4 muestra los test bioquímicos que permitieron la identificación de los microorganismos utilizados en éste estudio. *Streptococcus mutans* (Figura 3-1), *Klebsiella pneumoniae* (Figura 3-2), *Candida albicans* (Figura 3-3).

**Tabla 3-4:** Resultados de pruebas bioquímicas

Microorganismo	Prueba bioquímica	Resultado
<i>Streptococcus mutans</i>	Optoquina	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Citrato	+
	Kligler	+
	LIA	-
	Motilidad	-
	Indol	+
	Rojo de metilo	-
	Malonato	+
	Prueba VP	+
	Úrea	+
	<i>Candida albicans</i>	Tubo germinal



**Figura 3-1:** Prueba bioquímica en la identificación de *Streptococcus mutans*



**Figura 3-2:** Pruebas bioquímicas en la identificación de *Klebsiella pneumoniae*



**Figura 3-3:** Tubo germinal para la identificación de *Candida albicans*

### 3.3 Actividad Antimicrobiana

Se emplearon cuatro niveles de concentración de los extractos para cada microorganismo, y se empleó un protocolo de ensayo descrito para medir el efecto antimicrobiano de extractos, se tomó como referencia el halo de inhibición del control positivo empleado para determinar el mejor extracto. En el caso de los controles positivos, todas las cepas fueron sensibles al antibiótico (Tabla 3-5).

Por lo que respecta al control negativo, los halos de inhibición siempre fueron de 0 mm para todos los microorganismos, a excepción de *Candida albicans*, que presentó un halo de inhibición de 5,9 mm para el control negativo de etanol en disco húmedo.

**Tabla 3-5:** Susceptibilidad de los microorganismos a antibióticos de referencia

Microorganismo	Antibiótico	$\bar{X}$ Diámetro del halo (mm)
<i>Streptococcus mutans</i>	Imipenem	40,7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ciprofloxacina	34,8
<i>Candida albicans</i>	Fluconazol	23,9

La medición de la actividad antimicrobiana se realizó según muestra la Tabla 2-5. Los resultados obtenidos se presentan por días de evaluados.

#### 3.3.1 Evaluación a las 24 horas (bacterias) y 48 horas (levadura)

Se realizó la tabla ANOVA utilizando como variable dependiente el diámetro del halo de inhibición en mm.

**Tabla 3-6:** Resumen de Tabla ANOVA para 24 horas (bacterias); 48 horas (levadura)

<b>Fuente</b>	<b>Suma de cuadrados tipo III</b>	<b>gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>Valor p</b>	<b>Eta al cuadrado parcial</b>
Microorganismo	64,612	2	32,306	20,016	,000	,058
Extracto	1788,750	8	223,594	138,534	,000	,631
Disco	61,867	1	61,867	38,332	,000	,056
Concentración	92,267	3	30,756	19,056	,000	,081
Microorganismo * Extracto	215,055	16	13,441	8,328	,000	,171
Microorganismo * Disco	39,181	2	19,590	12,138	,000	,036
Extracto * Disco	27,145	8	3,393	2,102	,034	,025
Microorganismo * Extracto * Disco	133,466	16	8,342	5,168	,000	,113
Microorganismo * Concentración	38,877	6	6,479	4,015	,001	,036
Extracto * Concentración	164,713	24	6,863	4,252	,000	,136
Microorganismo * Extracto * Concentración	462,422	48	9,634	5,969	,000	,307
Disco * Concentración	13,805	3	4,602	2,851	,037	,013
Microorganismo * Disco * Concentración	3,604	6	,601	,372	,897	,003
Extracto * Disco * Concentración	76,935	24	3,206	1,986	,004	,069
Microorganismo * Extracto * Disco * Concentración	144,962	48	3,020	1,871	,000	,122
Total	3327,661	215				

Los resultados obtenidos en la Tabla 3-6, nos muestran que los grupos definidos por microorganismo, extracto, concentración, disco, poseen diferencia significativa de la actividad inhibitoria  $p < 0,05$ . Las interacciones entre Microorganismo \* Extracto, Microorganismo \* Disco, Extracto \* Disco, Microorganismo \* Extracto \* Disco, Microorganismo \* Concentración, Extracto \* Concentración, Microorganismo \* Extracto \* Concentración, Disco \* Concentración, Extracto \* Disco \* Concentración, Microorganismo \* Extracto \* Disco \* Concentración también poseen una actividad inhibitoria media significativamente diferente  $p < 0.05$ .

La interacción entre Microorganismo \* Disco \* Concentración tienen una significancia de 0,897, indica que el nivel de significación para todos los factores medidos, y las interacciones entre ellos poseen un efecto significativo sobre la actividad inhibitoria, aceptando la hipótesis nula, es decir que no existe diferencias significativas de los halos de inhibición entre la interacción de microorganismo, disco, concentración, es decir que son homogéneos. Para una mejor interpretación de resultados, se hará uso de gráficos de perfil para explicar la interacción entre variables.

Debido a la diferencia significativa de los factores evaluados: Microorganismos *Streptococcus mutans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, Concentración 100%, 80%, 50%, 25%; Disco disco seco, disco húmedo, Extracto de *Myrcianthes hallii* (arrayán), *Amaranthus asplundii* (ataco), *Peperomia peltigera* (pataku – yuyo) en agua, etanol y hexano; para poder determinar los mejores resultados se realizó pruebas de comparación de medias de Tukey.

**Tabla 3-7:** Prueba de comparación de medias de Tukey de acuerdo a los diámetros de los halos de inhibición, para los extractos utilizados.

Tipo de extracto	N	Subconjunto				
		5	4	3	2	1
Pataku - yuyo - Hexano	96	5,444				
Pataku - yuyo - Agua	96	5,525				
Arrayán - Hexano	96	5,607				
Ataco – Hexano	96	5,683	5,683			
Pataku - yuyo - Etanol	96		6,194	6,194		
Ataco – Agua	96			6,554		
Ataco – Etanol	96			6,564		
Arrayán – Agua	96				7,148	
Arrayán - Etanol	96					<b>10,323</b>

En la comparación de medias de los extractos la Tabla 3-7, demuestra que los extractos de Pataku - yuyo – Hexano, Pataku - yuyo – Agua, Arrayán – Hexano, presentan la actividad inhibitoria más baja con respecto a sus medias, Ataco – Hexano, Pataku - yuyo – Etanol, presentan un inhibición mayor a los extractos del subgrupo 5, Ataco – Agua, Ataco – Etanol presentan mayor actividad inhibitoria con respecto a los extractos del subgrupo 4, las medias de Arrayán – Agua y Arrayán – Etanol nos indican que son los extractos más representativos porque presentan mayor actividad, sin embargo se considera que el extracto Arrayán – Etanol difiere significativamente de los otros extractos al presentar la mayor media.

**Tabla 3-8:** Prueba de comparación de medias de Tukey para *Klebsiella pneumoniae*

Tipo de extracto	N	Subconjunto		
		3	2	1
Pataku - yuyo – Hexano	32	5,269		
Pataku - yuyo – Etanol	32	5,397		
Ataco - Hexano	32	5,450		
Arrayán - Hexano	32	5,728		
Ataco - Etanol	32	5,778		
Pataku - yuyo - Agua	32	5,828		
Ataco - Agua	32	6,438		
Arrayán - Agua	32	6,816		
Arrayán - Etanol	32		<b>9,884</b>	
Ciprofloxacina control positivo	288			34,774

**Tabla 3-9:** Prueba de comparación de medias de Tukey para *Streptococcus mutans*

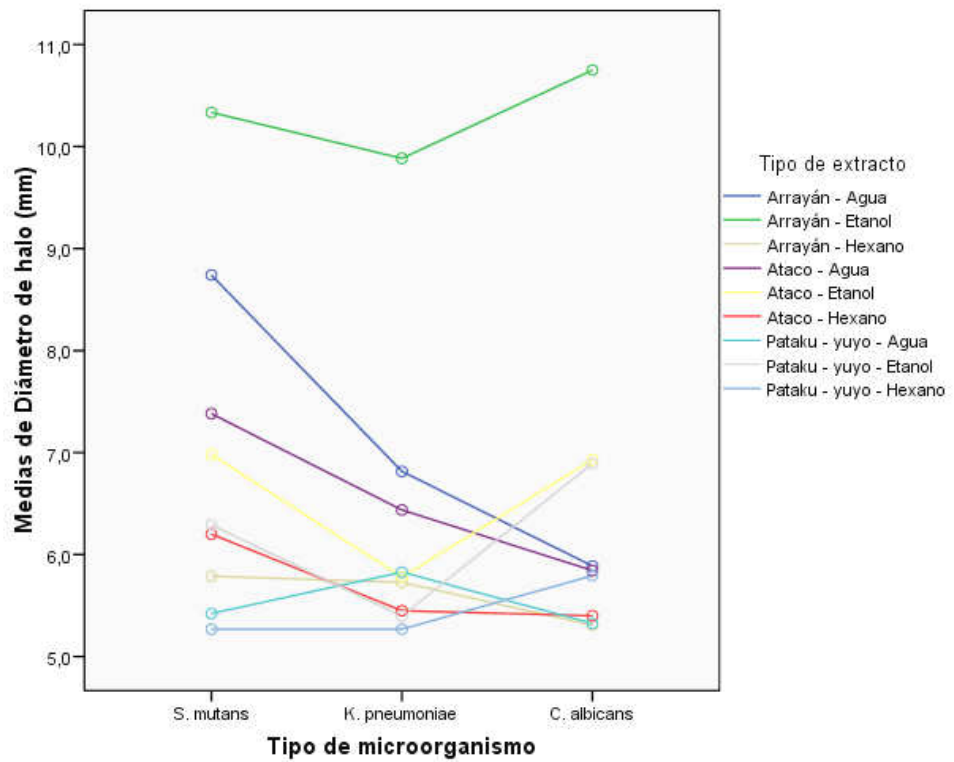
Tipo de extracto	N	Subconjunto		
		3	2	1
Pataku - yuyo - Hexano	32	5,269		
Pataku - yuyo - Agua	32	5,422		
Arrayán - Hexano	32	5,788		
Ataco - Hexano	32	6,200		
Pataku - yuyo - Etanol	32	6,291		
Ataco - Etanol	32	6,981	6,981	
Ataco - Agua	32	7,381	7,381	
Arrayán - Agua	32	8,741	8,741	
Arrayán - Etanol	32		<b>10,334</b>	
Imipenem control positivo	288			41,442



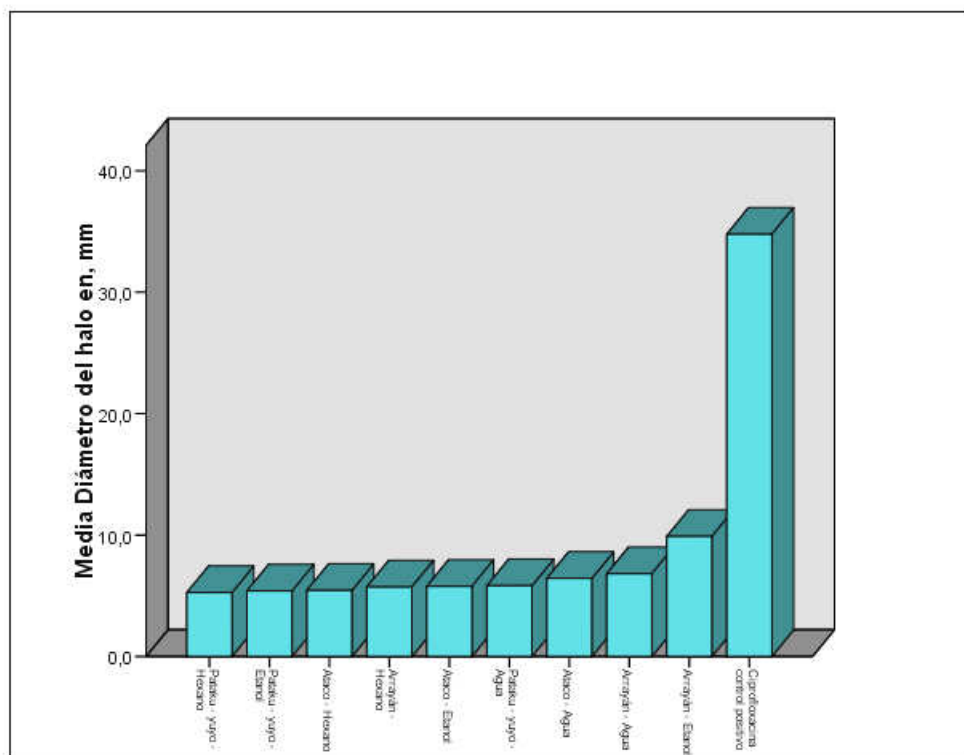
**Tabla 3-10:** Prueba de comparación de medias de Tukey para *Candida albicans*

Tipo de extracto	N	Subconjunto		
		3	2	1
Arrayán - Hexano	32	5,306		
Pataku - yuyo - Agua	32	5,325		
Ataco - Hexano	32	5,400		
Pataku - yuyo - Hexano	32	5,794		
Ataco - Agua	32	5,844		
Arrayán - Agua	32	5,888		
Pataku - yuyo - Etanol	32	6,894		
Ataco - Etanol	32	6,931		
Arrayán - Etanol	32		<b>10,750</b>	
Fluconazol control positivo	288			23,924

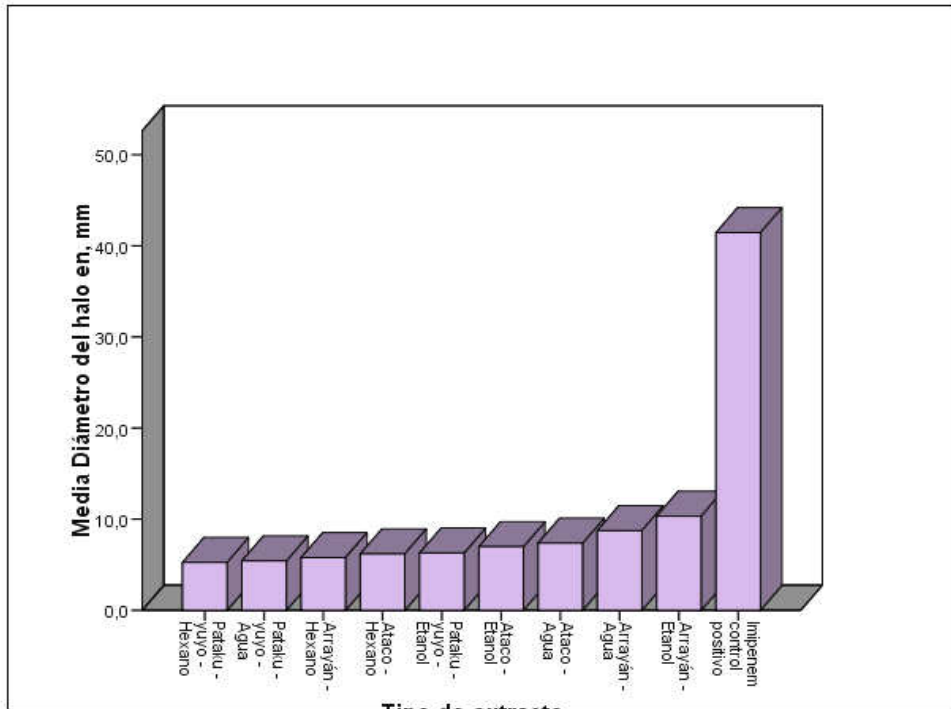
Las Tablas 3-8, 3-9, 3-10 indican que los controles positivos específicos para cada microorganismo presenta una media de halo altamente significativa, en comparación con los halos observados con los extractos evaluados, además se puede comprobar que el extracto de Arrayán – Etanol es el que presenta mayor actividad inhibitoria en los tres microorganismos evaluados en éste estudio (Gráfica 3-1).



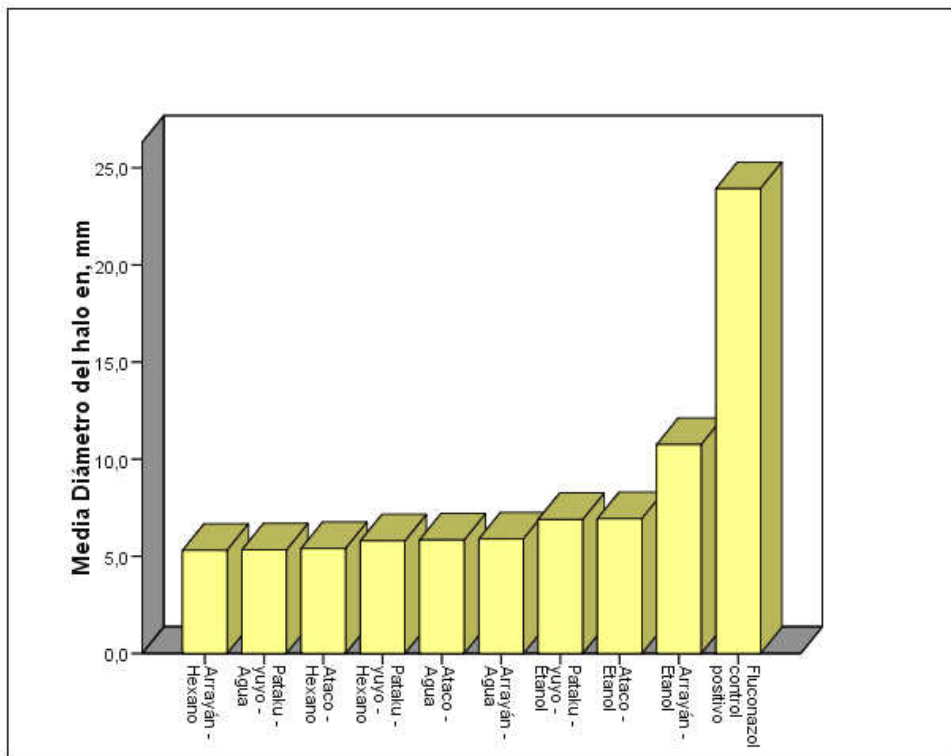
**Gráfica 3-1:** Actividad de microorganismos frente al tipo de extracto



**Gráfica 3-2:** Actividad de *Klebsiella pneumoniae* frente a los extractos y al control positivo



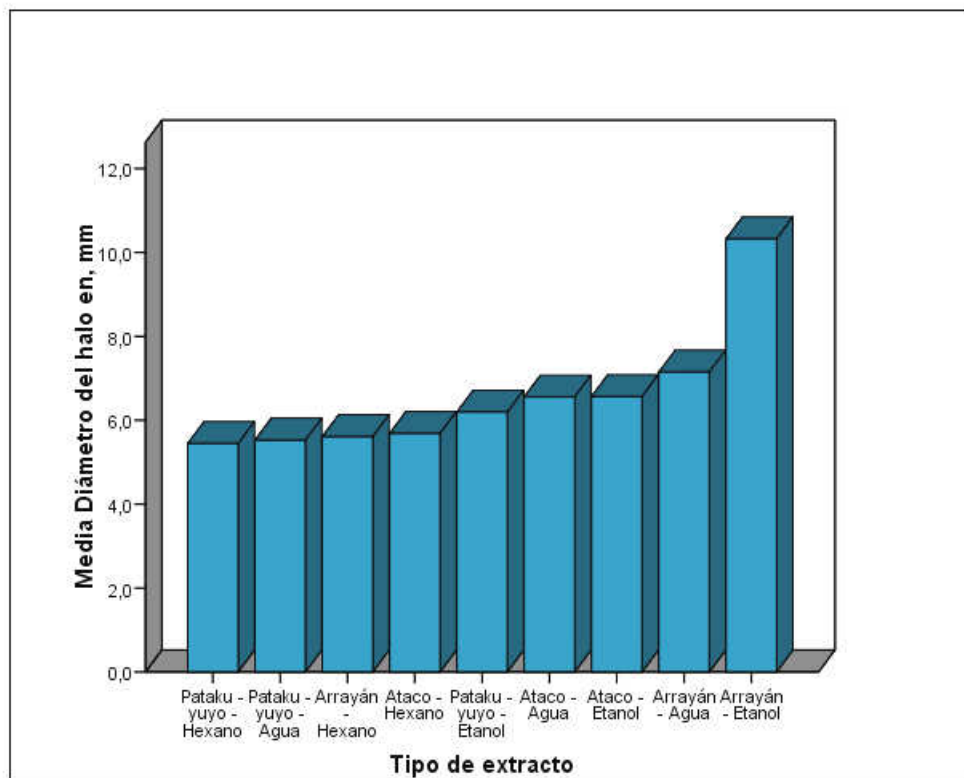
**Gráfica 3-3:** Actividad de *Streptococcus mutans* frente a los extractos y al control positivo



**Gráfica 3-4:** Actividad de *Candida albicans* frente a los extractos y el control positivo

Las Gráficas 3-2, 3-3 y 3-4, muestran que al considerar el control positivo para cada microorganismo, el extracto que muestra mayor efectividad en los tres microorganismos evaluados es Arrayán – Etanol, con una actividad entre  $10,068 < \mu < 10,578$  como muestra la Tabla 3-11.

En la Tabla 3-11 y Gráfica 3-5 se puede observar que la menor actividad fue la mostrada por los extractos de Pataku-yuyo – Agua, Pataku – yuyo – Hexano, Arrayán – Hexano, Ataco – Hexano, los cuales no muestran una diferencia significativa entre sí.



**Gráfica 3-5:** Actividad de los extractos

**Tabla 3-11:** Medias del diámetro del halo según el extracto utilizado.

Tipo de extracto	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
			Límite inferior	Límite superior
Arrayán - Agua	7,148	,130	6,893	7,403
Arrayán - Etanol	10,323	,130	10,068	10,578
Arrayán - Hexano	5,607	,130	5,353	5,862
Ataco - Agua	6,554	,130	6,300	6,809
Ataco - Etanol	6,564	,130	6,309	6,818
Ataco - Hexano	5,683	,130	5,429	5,938
Pataku - yuyo - Agua	5,525	,130	5,270	5,780
Pataku - yuyo - Etanol	6,194	,130	5,939	6,448
Pataku - yuyo - Hexano	5,444	,130	5,189	5,698

**Tabla 3-12:** Prueba de comparación de medias de Tukey de acuerdo a los diámetros de los halos de inhibición, para los microorganismos utilizados

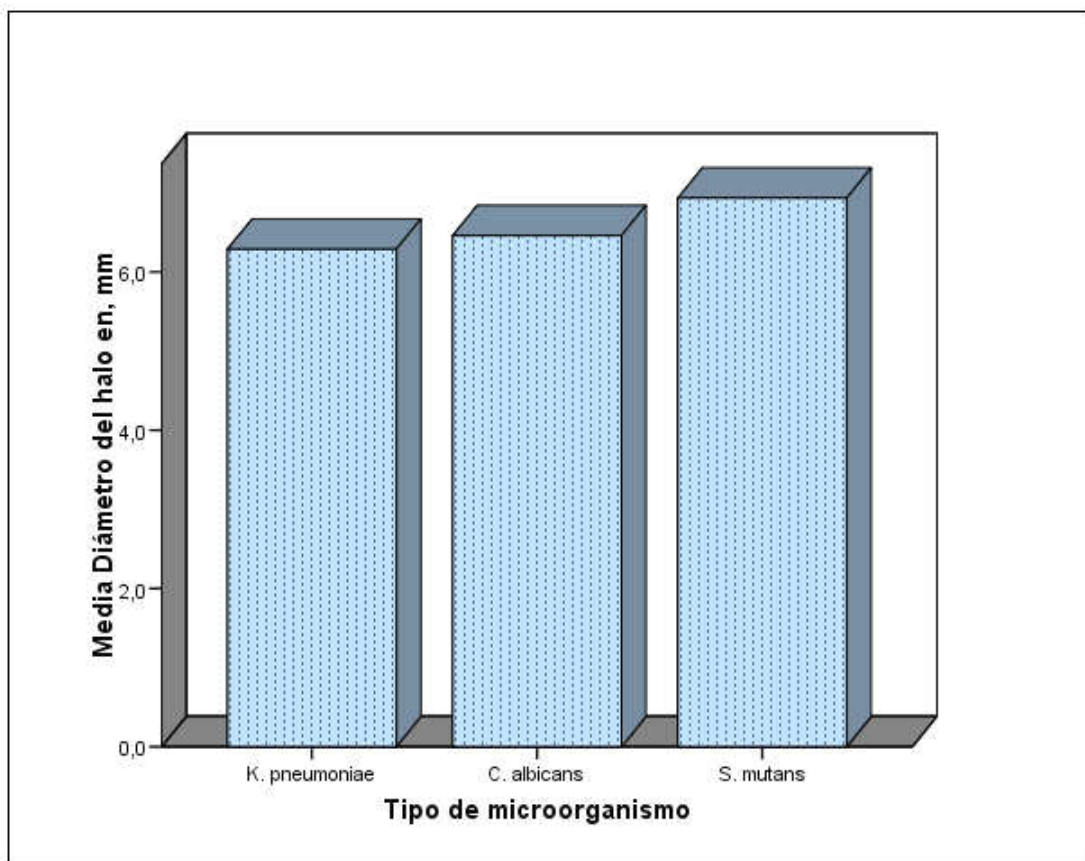
Tipo de microorganismo	N	Subconjunto	
		2	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	288	6,288	
<i>Candida albicans</i>	288	6,459	
<i>Streptococcus mutans</i>	288		<b>6,934</b>

La Tabla 3-12 indica que el microorganismo más sensible en el presente estudio fue *Streptococcus mutans* que presenta una media de 6.934, seguido de *Candida albicans* y de *Klebsiella pneumoniae* que resultó ser el microorganismo más resistente.

**Tabla 3-13:** Medias del diámetro del halo para los microorganismos utilizados

Tipo de microorganismo	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
			Límite inferior	Límite superior
<i>Streptococcus mutans</i>	6,934	,075	6,787	7,081
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6,288	,075	6,141	6,434
<i>Candida albicans</i>	6,459	,075	6,312	6,606

La actividad inhibitoria para *Streptococcus mutans* se encuentra entre  $6,787 < \mu < 7,081$ , *Klebsiella pneumoniae* entre  $6,141 < \mu < 6,434$  y *Candida albicans* entre  $6,312 < \mu < 6,606$ . Según se muestra en la Tabla 3-13.



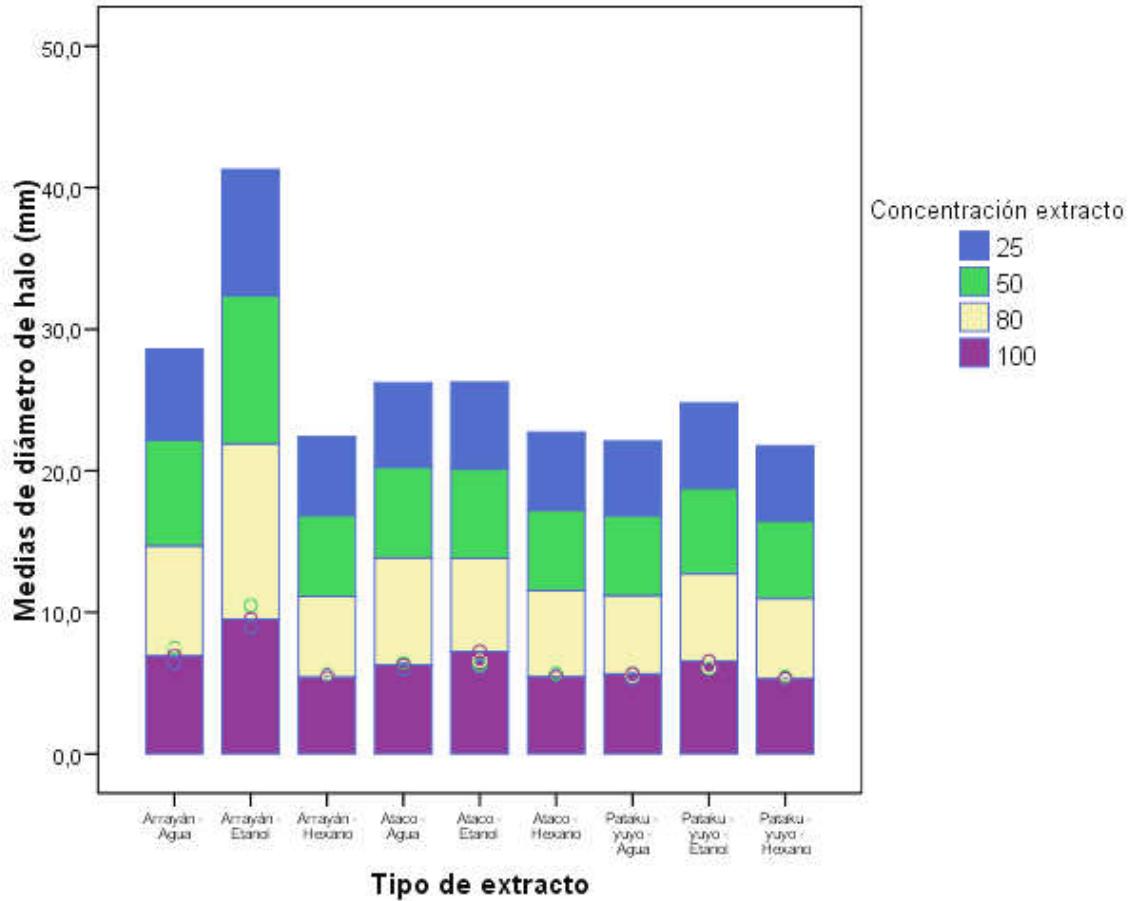
**Gráfica 3-6:** Actividad de microorganismos

En la Gráfica 3-6 se confirma que el microorganismo que reportó sensibilidad significativamente alta a todos los extractos ensayados fue la cepa no clínica *Streptococcus mutans* ATCC 25175, seguido por *Candida albicans* y *Klebsiella pneumoniae*.

**Tabla 3-14:** Prueba de comparación de medias de Tukey de acuerdo a los diámetros de los halos de inhibición, para las concentraciones utilizadas

Concentración extracto	N	Subconjunto		
		3	2	1
25	216	6,140		
100	216		6,469	
50	216		6,580	
80	216			<b>7,052</b>

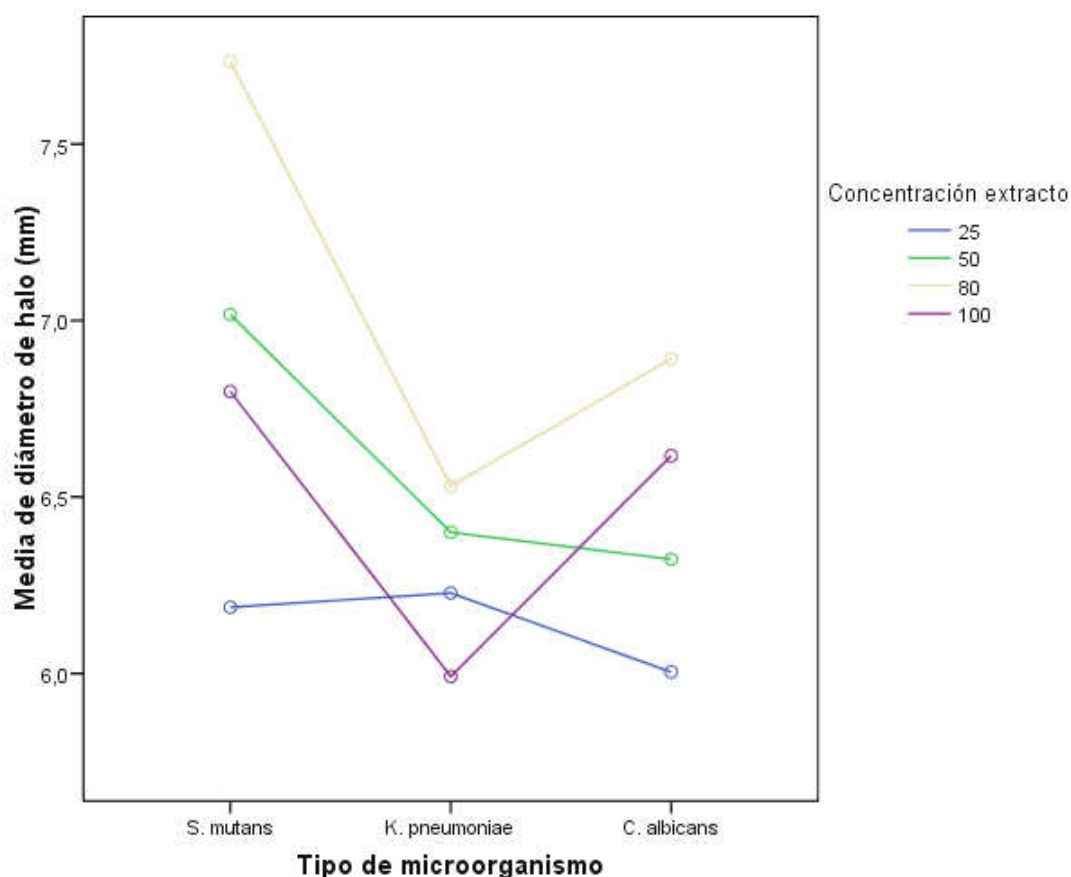
En la Tabla 3-14, se muestra que la concentración más efectiva en la actividad antibacteriana es la de 80%, la cual presenta una media de 7,052.



**Gráfica 3-7:** Actividad de los extractos a las concentraciones evaluadas

Las Gráficas 3-7 y 3-8, confirman que la concentración al 80% es la que mayor efectividad presentó en los extractos y microorganismos evaluados en éste estudio.

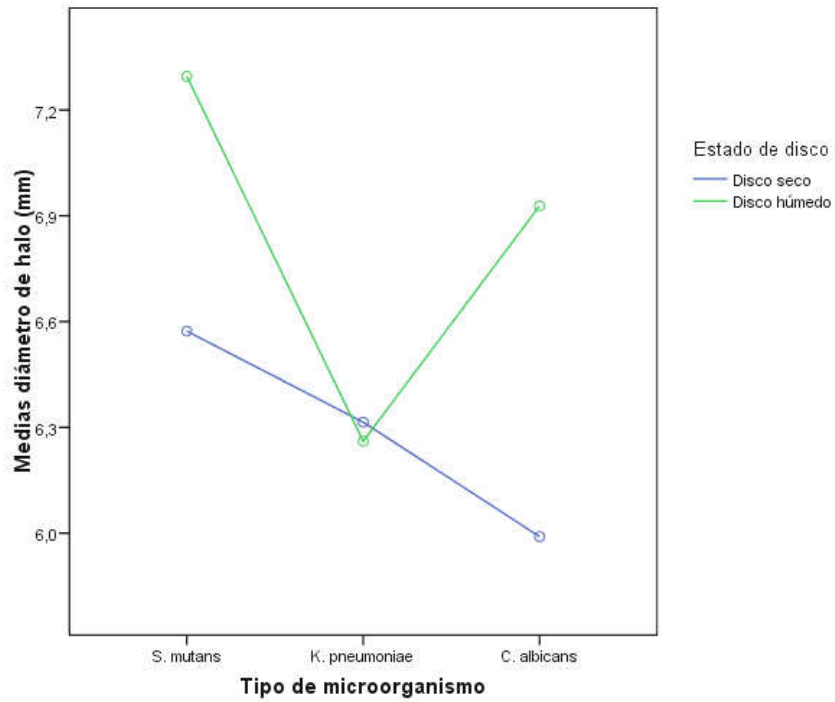




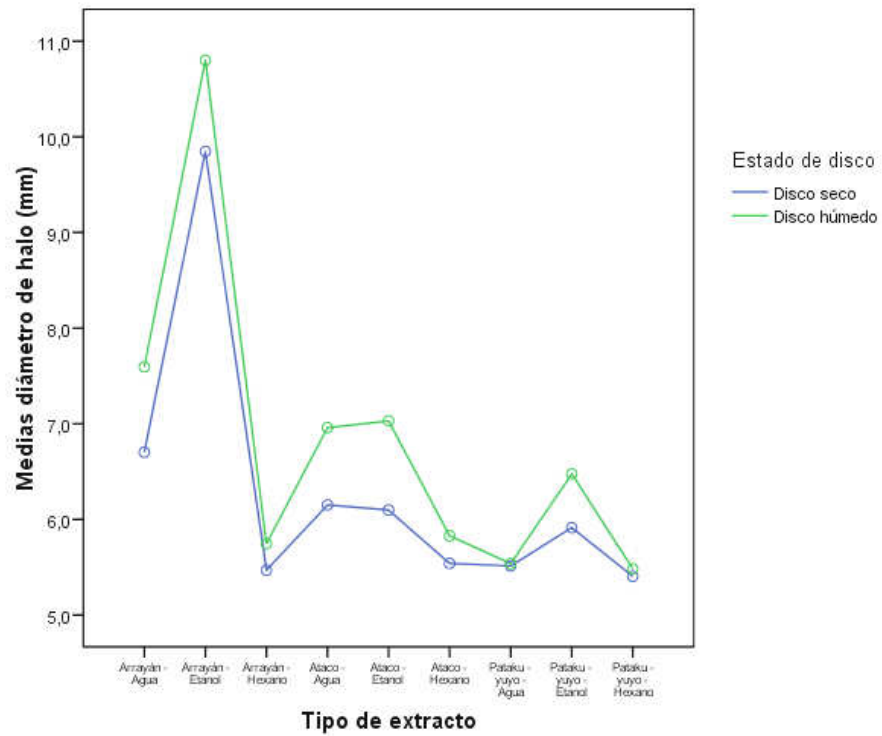
**Gráfica 3-8:** Actividad de las distintas concentraciones evaluadas por microorganismo

Al evaluar el estado del disco, el disco que mayor actividad antimicrobiana presentó fue el disco húmedo para *Streptococcus mutans* con una actividad entre  $7,087 < \mu < 7,503$ ; *Candida albicans* entre  $6,720 < \mu < 7,136$ ; mientras que para *Klebsiella pneumoniae* el disco seco y el disco húmedo actúan de manera similar, según muestra la Tabla 3-15 y la Gráfica 3-9.

En la Gráfica 3-10 se observa que los extractos evaluados tienen mayor efectividad al ser utilizados en disco húmedo, a excepción de los extractos de Pataku – yuyo – Agua y Pataku – yuyo – Hexano que no muestra una diferencia significativa al ser utilizado en disco seco o disco húmedo. En la Gráfica 3-11 se observa que el disco húmedo el más efectivo para las cuatro concentraciones evaluadas.



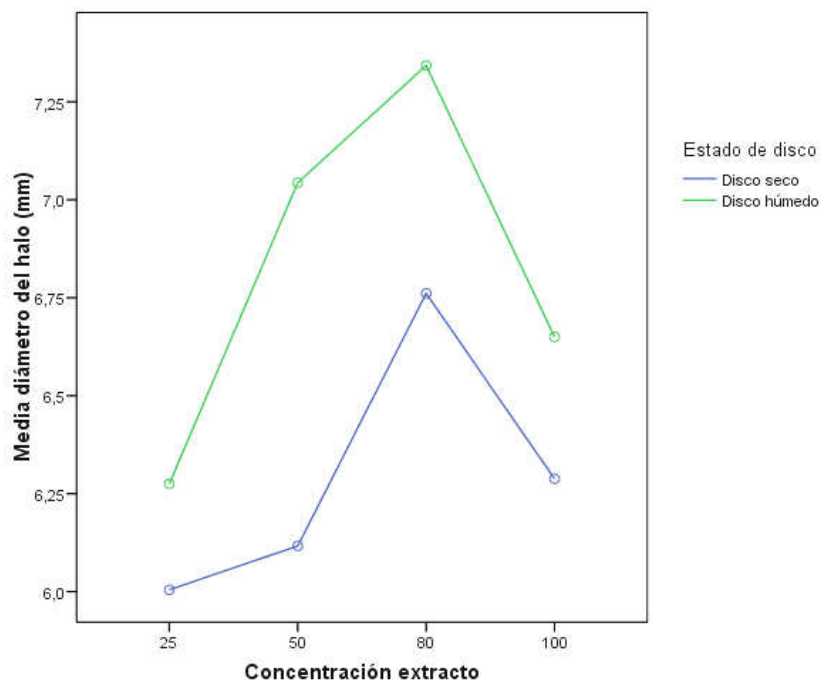
**Gráfica 3-9:** Actividad antimicrobiana con respecto al estado de disco para cada microorganismo



**Gráfica 3-10:** Actividad antimicrobiana de los extractos evaluados, con respecto al estado de disco

**Tabla 3-15:** Medias del diámetro del halo según el estado de disco para cada microorganismo

Tipo de microorganismo	Estado de disco	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
				Límite inferior	Límite superior
<i>Streptococcus mutans</i>	Disco seco	6,573	,106	6,365	6,781
	Disco húmedo	7,295	,106	7,087	7,503
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Disco seco	6,315	,106	6,107	6,522
	Disco húmedo	6,260	,106	6,053	6,468
<i>Candida albicans</i>	Disco seco	5,990	,106	5,782	6,198
	Disco húmedo	6,928	,106	6,720	7,136



**Gráfica 3-11:** Actividad antimicrobiana de las concentraciones evaluadas, con respecto al estado de disco

### 3.3.2 Evaluación a las 48 horas (bacterias) y 72 horas (levadura)

Se realizó la tabla ANOVA utilizando como variable dependiente el diámetro del halo de inhibición en mm.

**Tabla 3-16:** Resumen de Tabla ANOVA para 48 horas (bacterias); 72 horas (levadura)

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Valor p	Eta al cuadrado parcial
Microorganismo	27,909	2	13,955	19,806	,000	,058
Extracto	894,306	8	111,788	158,662	,000	,662
Disco	28,514	1	28,514	40,470	,000	,059
Concentración	47,433	3	15,811	22,441	,000	,094
Microorganismo * Extracto	106,265	16	6,642	9,426	,000	,189
Microorganismo * Disco	16,202	2	8,101	11,497	,000	,034
Extracto * Disco	28,165	8	3,521	4,997	,000	,058
Microorganismo * Extracto * Disco	53,013	16	3,313	4,703	,000	,104
Microorganismo * Concentración	21,114	6	3,519	4,995	,000	,044
Extracto * Concentración	142,371	24	5,932	8,419	,000	,238
Microorganismo * Extracto * Concentración	217,870	48	4,539	6,442	,000	,323
Disco * Concentración	7,971	3	2,657	3,771	,011	,017
Microorganismo * Disco * Concentración	9,104	6	1,517	2,154	,046	,020
Extracto * Disco * Concentración	45,384	24	1,891	2,684	,000	,090
Microorganismo * Extracto * Disco * Concentración	48,985	48	1,021	1,448	,028	,097
Total	1694,606	215				

Los resultados obtenidos en la Tabla 3-16, nos muestran que los grupos definidos por microorganismo, extracto, concentración, disco, poseen diferencia significativa de la actividad inhibitoria  $p < 0,05$ . Las interacciones entre Microorganismo \* Extracto, Microorganismo \* Disco, Extracto \* Disco,

Microorganismo \* Extracto \* Disco, Microorganismo \* Concentración, Extracto \* Concentración, Microorganismo \* Extracto \* Concentración, Disco \* Concentración, Microorganismo \* Disco \* Concentración, Extracto \* Disco \* Concentración, Microorganismo \* Extracto \* Disco \* Concentración también poseen una actividad inhibitoria media significativamente diferente  $p < 0.05$ , lo que indica que todos los factores influyen en la actividad inhibitoria en la evaluación a las 48 horas (bacterias) y 72 horas (levadura).

Debido a la diferencia significativa de los factores evaluados y para poder determinar los mejores resultados se realizó pruebas de comparación de medias de Tukey.

**Tabla 3-17:** Prueba de comparación de medias de Tukey de acuerdo a los diámetros de los halos de inhibición, para los extractos utilizados a 48 horas (bacterias); 72 horas (levadura)

Tipo de extracto	N	Subconjunto		
		3	2	1
Pataku - yuyo - Hexano	96	5,275		
Pataku - yuyo - Agua	96	5,359		
Arrayán – Hexano	96	5,396		
Ataco – Hexano	96	5,472		
Ataco – Agua	96	5,502		
Arrayán – Agua	96		5,983	
Ataco – Etanol	96		6,025	
Pataku - yuyo - Etanol	96		6,089	
Arrayán – Etanol	96			<b>8,736</b>

En la comparación de medias de los extractos la Tabla 3-17, se demuestra que los extractos de Pataku - yuyo – Hexano, Pataku - yuyo – Agua, Arrayán – Hexano, Ataco – Hexano, Ataco – Agua, presentan la actividad inhibitoria más baja con

respecto a sus medias en el segundo tiempo de evaluación, Arrayán – Agua, Ataco – Etanol, Pataku - yuyo – Etanol presentan mayor actividad inhibitoria con respecto a los extractos del subgrupo 3, sin embargo la media de 8,736 del extracto Arrayán – Etanol indica que es el extractos más representativo.

**Tabla 3-18:** Prueba de comparación de medias de Tukey para *Klebsiella pneumoniae* a 48 horas (bacterias); 72 horas (levadura)

Tipo de extracto	N	Subconjunto		
		3	2	1
Ataco – Hexano	32	5,241		
Pataku - yuyo – Hexano	32	5,281		
Pataku - yuyo – Etanol	32	5,350		
Arrayán – Agua	32	5,406		
Ataco – Etanol	32	5,447		
Pataku - yuyo – Agua	32	5,509	5,509	
Arrayán – Hexano	32	5,516	5,516	
Ataco – Agua	32	5,619	5,619	
Arrayán – Etanol	32		<b>8,406</b>	
Ciprofloxacina control positivo	288			34,774

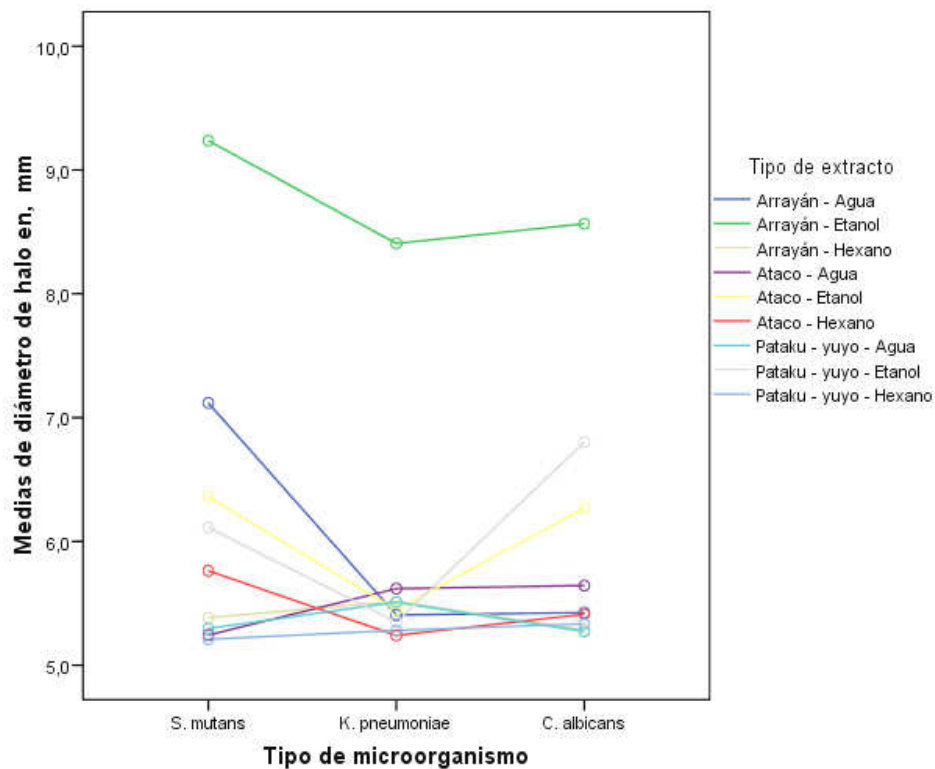
Las Tablas 3-18, 3-19, 3-20 indican que los controles positivos específicos para cada microorganismo al segundo tiempo de evaluación, presenta una media de halo altamente significativa, en comparación con los halos observados con los extractos, se comprueba que el extracto de Arrayán – Etanol se mantiene como el extracto que presenta mayor actividad inhibitoria en los tres microorganismos evaluados. (Gráfica 3-12)

**Tabla 3-19:** Prueba de comparación de medias de Tukey para *Streptococcus mutans* a 48 horas (bacterias); 72 horas (levadura)

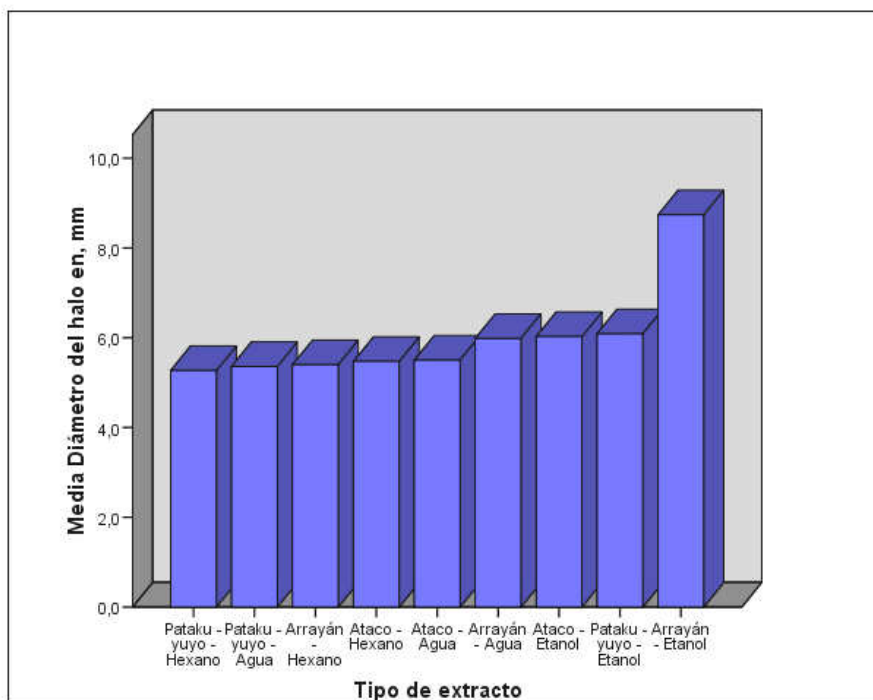
Tipo de extracto	N	Subconjunto		
		3	2	1
Pataku - yuyo - Hexano	32	5,209		
Ataco – Agua	32	5,244		
Pataku - yuyo – Agua	32	5,297		
Arrayán – Hexano	32	5,384		
Ataco – Hexano	32	5,763	5,763	
Pataku - yuyo – Etanol	32	6,113	6,113	
Ataco – Etanol	32	6,359	6,359	
Arrayán – Agua	32	7,119	7,119	
Arrayán – Etanol	32		<b>9,238</b>	
Imipenem control positivo	288			41,442

**Tabla 3-20:** Prueba de comparación de medias de Tukey para *Candida albicans* a 48 horas (bacterias); 72 horas (levadura)

Tipo de extracto	N	Subconjunto	
		2	1
Pataku - yuyo - Agua	32	5,272	
Arrayán – Hexano	32	5,288	
Pataku - yuyo - Hexano	32	5,334	
Ataco – Hexano	32	5,413	
Arrayán – Agua	32	5,425	
Ataco – Agua	32	5,644	
Ataco – Etanol	32	6,269	
Pataku - yuyo - Etanol	32	6,803	
Arrayán – Etanol	32	<b>8,566</b>	
Fluconazol control positivo	288		23,299



**Gráfica 3-12:** Actividad de microorganismos frente al tipo de extracto a 48 horas (bacterias) y 72 horas (levadura)



**Gráfica 3-13:** Actividad de los extractos a 48 horas (bacterias) y 72 horas (levadura)



En la Tabla 3-21 y Gráfica 3-13 se puede observar que la menor actividad fue mostrada por los extractos de Pataku-yuyo – Agua, Pataku – yuyo – Hexano, Arrayán – Hexano, Ataco – Hexano, los cuales no muestran una diferencia significativa entre sí.

**Tabla 3-21:** Medias del diámetro del halo según el extracto utilizado a 48 horas (bacterias) 72 horas (levadura)

Tipo de extracto	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
			Límite inferior	Límite superior
Arrayán – Agua	5,983	,086	5,815	6,152
Arrayán – Etanol	8,736	,086	8,568	8,905
Arrayán – Hexano	5,396	,086	5,228	5,564
Ataco – Agua	5,502	,086	5,334	5,670
Ataco – Etanol	6,025	,086	5,857	6,193
Ataco – Hexano	5,472	,086	5,304	5,640
Pataku - yuyo - Agua	5,359	,086	5,191	5,528
Pataku - yuyo - Etanol	6,089	,086	5,920	6,257
Pataku - yuyo - Hexano	5,275	,086	5,107	5,443

La Tabla 3-22 indica que el microorganismo más sensible en el presente estudio fue *Streptococcus mutans* que presenta una media de 6,192, seguido de *Candida albicans* y de *Klebsiella pneumoniae*.

**Tabla 3-22:** Prueba de comparación de medias de Tukey de acuerdo a los diámetros de los halos de inhibición, para los microorganismos utilizados

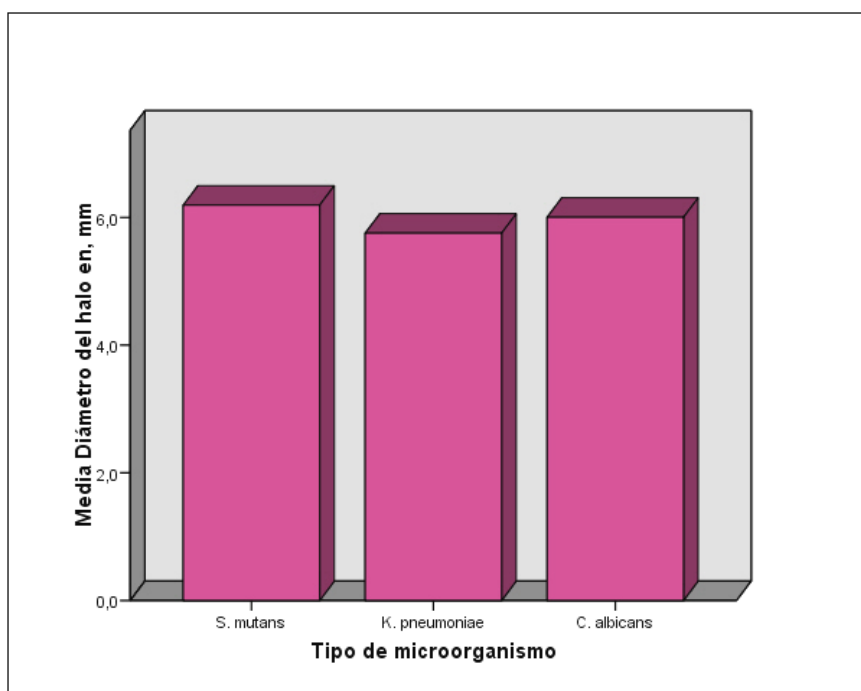
Tipo de microorganismo	N	Subconjunto		
		3	2	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	288	5,753		
<i>Candida albicans</i>	288		6,001	
<i>Streptococcus mutans</i>	288			<b>6,192</b>

La actividad inhibitoria para *Streptococcus mutans* se encuentra entre  $6,095 < \mu < 6,289$ , *Klebsiella pneumoniae* entre  $5,656 < \mu < 5,850$  y *Candida albicans* entre  $5,904 < \mu < 6,098$ . Según se muestra en la Tabla 3-22.

**Tabla 3-23:** Medias del diámetro del halo para los microorganismos utilizados a 48 horas (bacterias), 72 horas (levadura)

Tipo de microorganismo	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
			Límite inferior	Límite superior
<i>Streptococcus mutans</i>	6,192	,049	6,095	6,289
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5,753	,049	5,656	5,850
<i>Candia albicans</i>	6,001	,049	5,904	6,098

En la Gráfica 3-14 se confirma que el microorganismo que reportó sensibilidad significativamente alta, a todos los extractos ensayados fue la cepa no clínica *Streptococcus mutans* ATCC 25175, seguido por *Candida albicans* y *Klebsiella pneumoniae*.

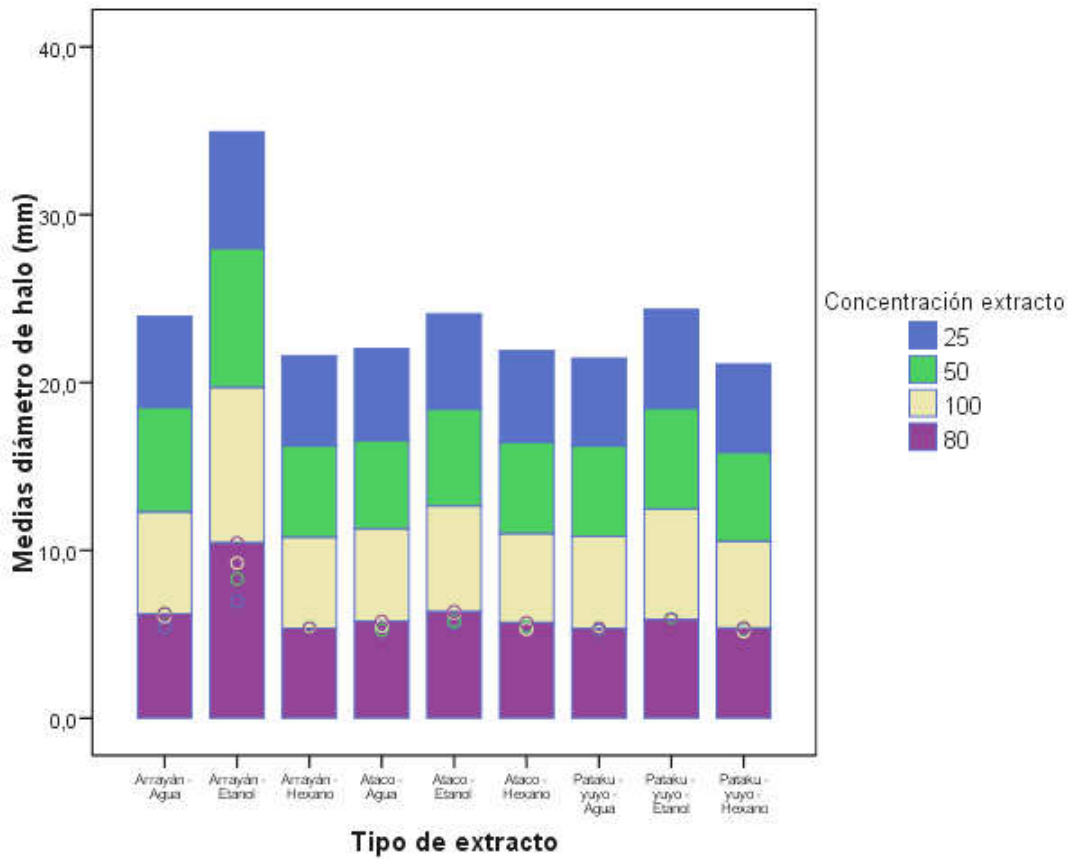


**Gráfica 3-14:** Actividad de microorganismos a 48 horas (bacterias), 72 horas (levadura)

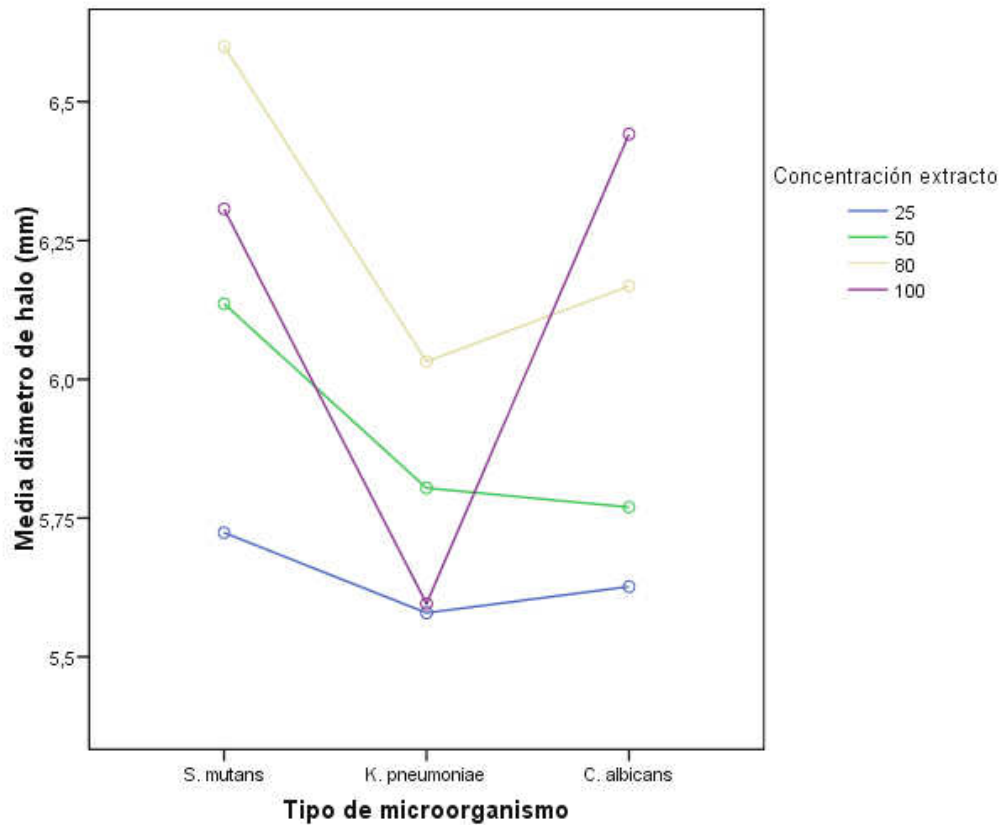
**Tabla 3-24:** Prueba de comparación de medias de Tukey de acuerdo a los diámetros de los halos de inhibición, para las concentraciones utilizadas

Concentración extracto	N	Subconjunto		
		3	2	1
25	216	5,643		
50	216		5,903	
100	216			6,115
80	216			<b>6,267</b>

La Tabla 3-24, muestra que la concentración más efectiva, en la actividad antibacteriana es la de 80%, seguida por la de 100%, las medias indican que no existe una diferencia significativa entre éstas dos concentraciones, sin embargo las concentraciones 50% y 25% tienen medias más bajas con respecto a las otra dos.



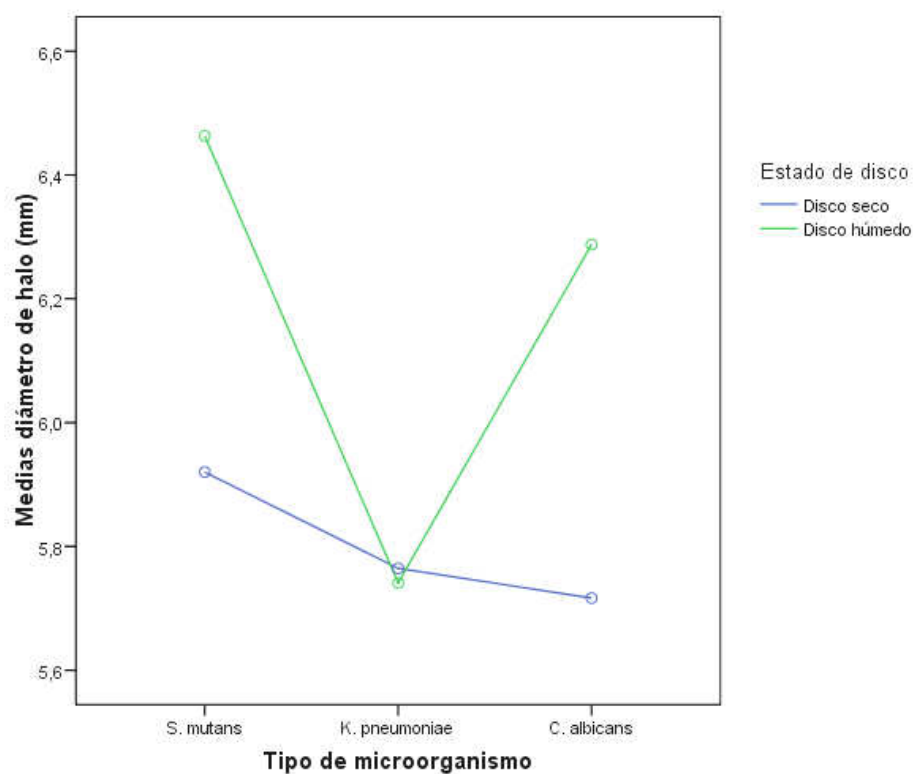
**Gráfica 3-15:** Actividad de los extractos a las concentraciones evaluadas a 48 horas (bacterias) y 72 horas (levadura)



**Gráfica 3-16:** Actividad de las distintas concentraciones evaluadas por microorganismo a 48 horas (bacterias) y 72 horas (levadura)

Las Gráficas 3-15 y 3-16, confirman que la concentración al 80% es la que mayor efectividad presentó en los extractos y microorganismos evaluados en éste estudio.

Al evaluar el estado del disco, el disco que mayor actividad antimicrobiana presentó fue el disco húmedo para *Streptococcus mutans* con una actividad entre  $6,326 < \mu < 6,601$ ; *Candida albicans* entre  $6,149 < \mu < 6,4236$ ; mientras que para *Klebsiella pneumoniae* mayor actividad presenta el disco seco con una actividad entre  $5,627 < \mu < 5,902$  que no varía significativamente con respecto al disco húmedo; según muestra la Tabla 3-25 y la Gráfica 3-17.

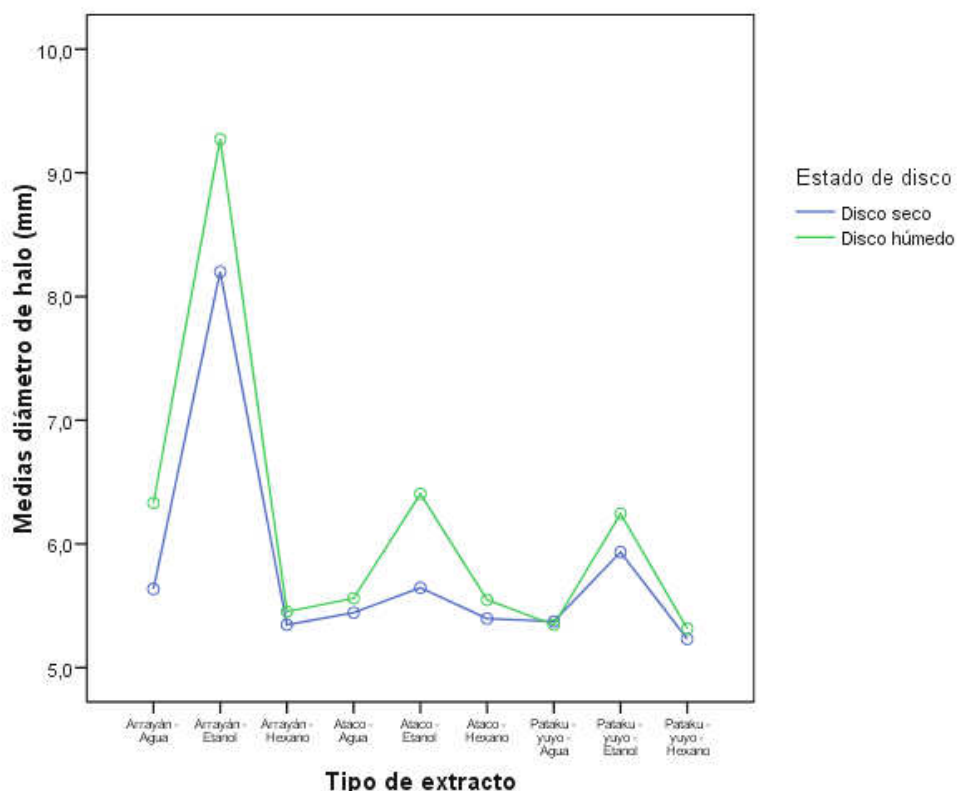


**Gráfica 3-17:** Actividad antimicrobiana con respecto al estado de disco para cada microorganismo evaluados a 48 horas (bacterias) y 72 horas (levadura)

**Tabla 3-25:** Medias del diámetro del halo según el estado de disco para cada microorganismo evaluados a 48 horas (bacterias) y 72 horas (levadura)

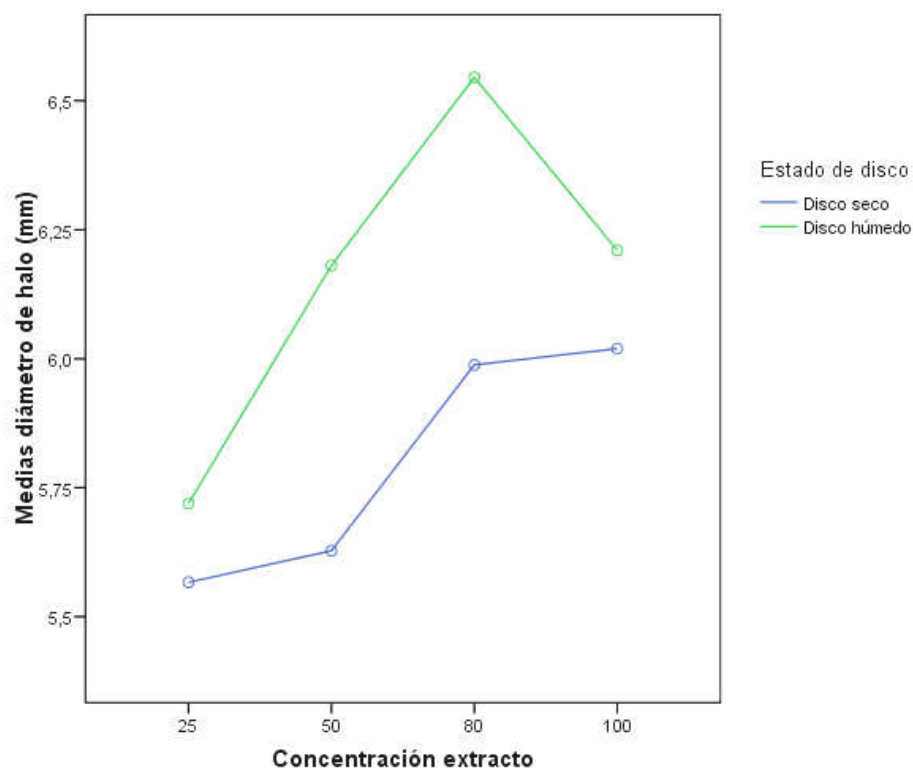
Tipo de microorganismo	Estado de disco	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
				Límite inferior	Límite superior
<i>Streptococcus mutans</i>	Disco seco	5,920	,070	5,783	6,057
	Disco húmedo	6,463	,070	6,326	6,601
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Disco seco	5,765	,070	5,627	5,902
	Disco húmedo	5,741	,070	5,604	5,878
<i>Candida albicans</i>	Disco seco	5,717	,070	5,579	5,854
	Disco húmedo	6,286	,070	6,149	6,423

En la Gráfica 3-18 se observa que los extractos evaluados tienen mayor efectividad al ser utilizados en disco húmedo, a excepción de los extractos de Pataku – yuyo – Agua y Pataku – yuyo – Hexano que no muestra una diferencia significativa al ser utilizado en disco seco o disco húmedo.



**Gráfica 3-18:** Actividad antimicrobiana de los extractos evaluados, con respecto al estado de disco evaluados a 48 horas (bacterias) y 72 horas (levadura)

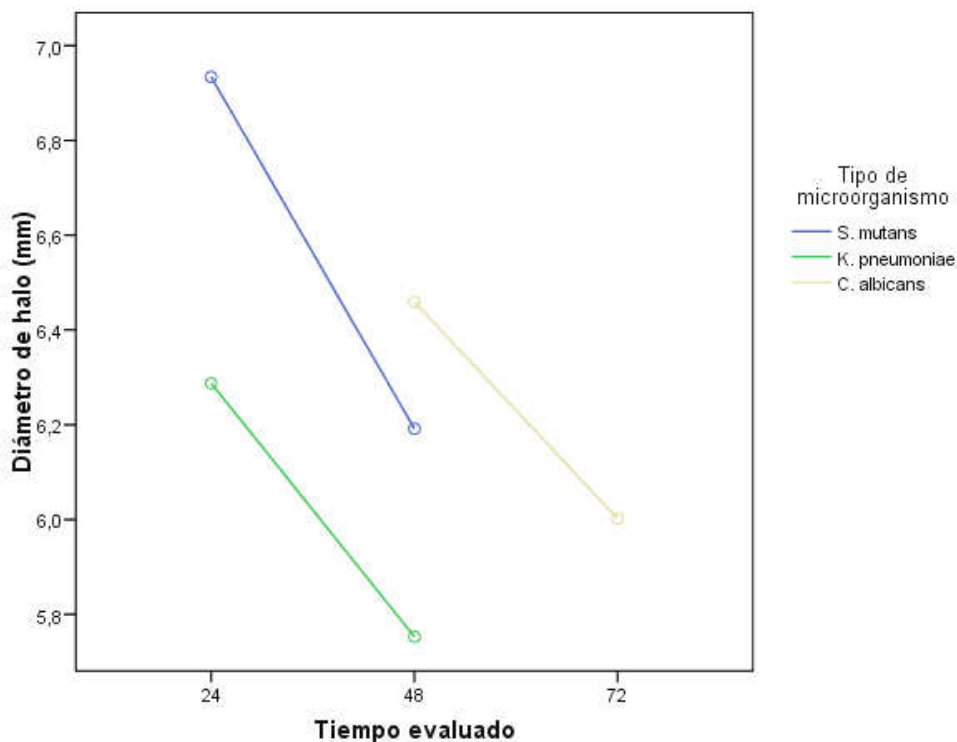
En la Gráfica 3-19 se observa que el disco húmedo es el más efectivo para las cuatro concentraciones evaluadas.



**Gráfica 3-19:** Actividad antimicrobiana de las concentraciones evaluadas, con respecto al estado de disco evaluados a 48 horas (bacterias) y 72 horas (levadura)

Los resultados obtenidos evidenciaron una máxima acción antimicrobiana de los extractos a las 24 horas de incubación para bacterias y 48 horas de incubación para la levadura, como muestra la Gráfica 3-20



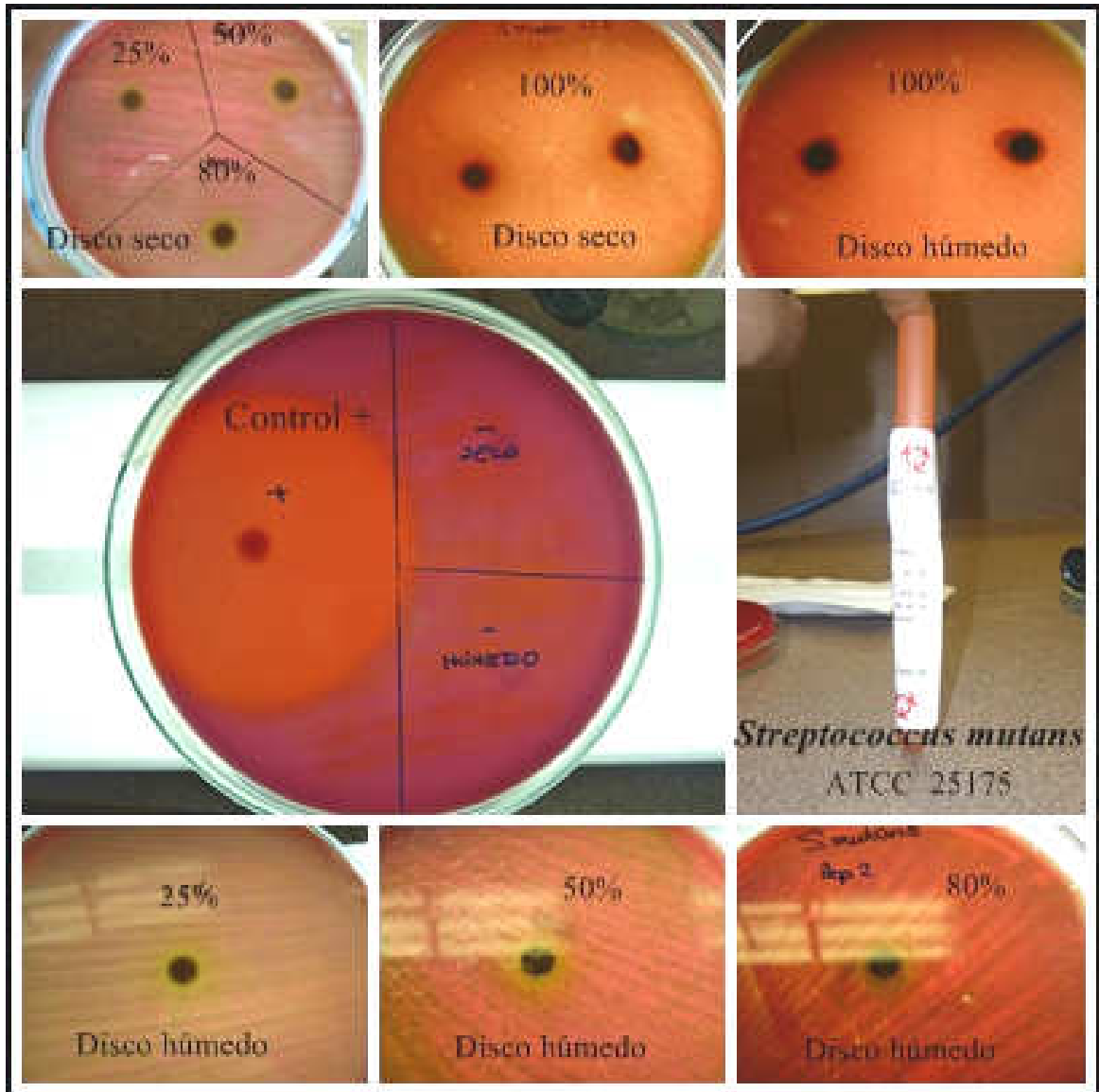


**Gráfica 3-20:** Actividad antibacteriana de los extractos con respecto a los tiempos de evaluación.

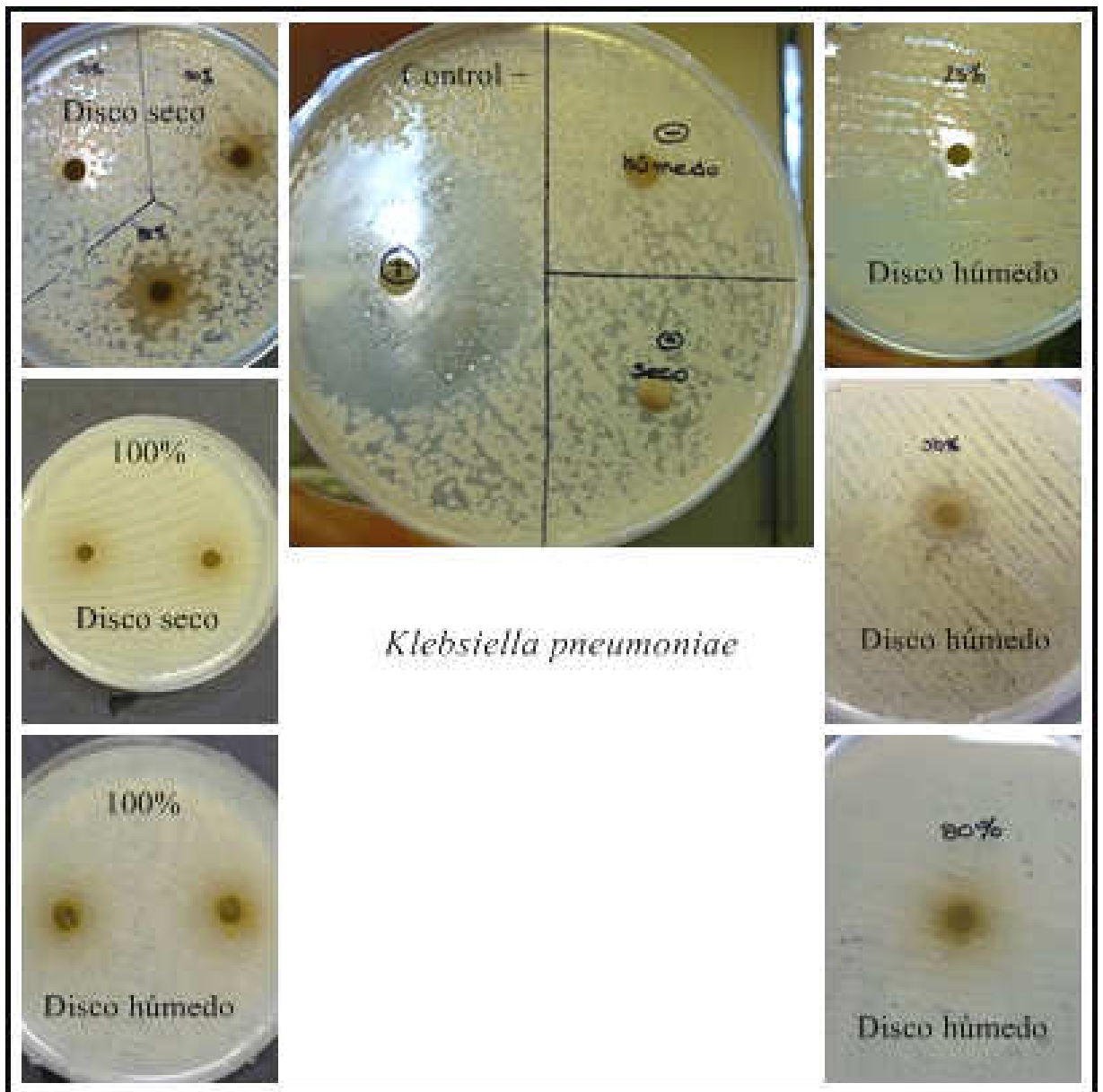
La acción antibacteriana de cada uno de los extractos, sobre los microorganismos utilizados (bacterias y levadura), tiende a disminuir su capacidad para inhibir a las 48 horas y 72 horas de evaluación respectivamente.

Los gráficos de perfil muestran que el extracto etanólico de *Myrcianthes hallii* (arrayán) presentó mayor actividad inhibitoria, observándose inhibición sobre todos los microorganismos evaluados, siendo notable la actividad sobre *Streptococcus mutans*. (Gráfica 3-1). Además se pudo determinar la efectividad del mismo a todas las concentraciones probadas (Gráfica 3-7, 3-15)

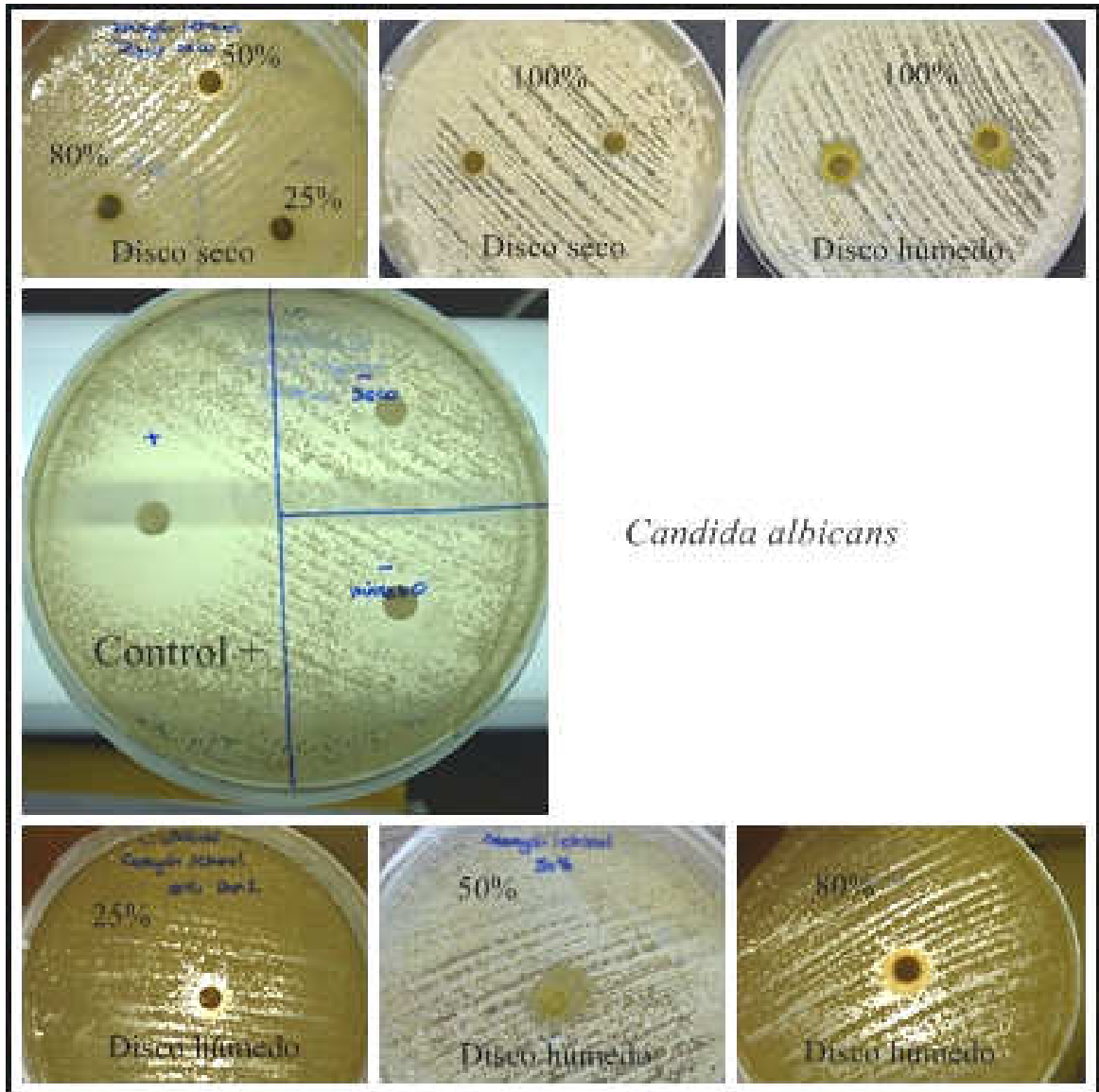
En las Figuras 3-4; 3-5; 3-6, se muestran los resultados obtenidos al evaluar el extracto de *Myrcianthes hallii* (arrayán) – etanol, sobre *Streptococcus mutans*, *Klebsiella penumoniae*, *Candida albicans*.



**Figura 3-4:** Actividad antimicrobiana del extracto de *Myrcianthes hallii* (arrayán) - etanol, sobre *Streptococcus mutans*

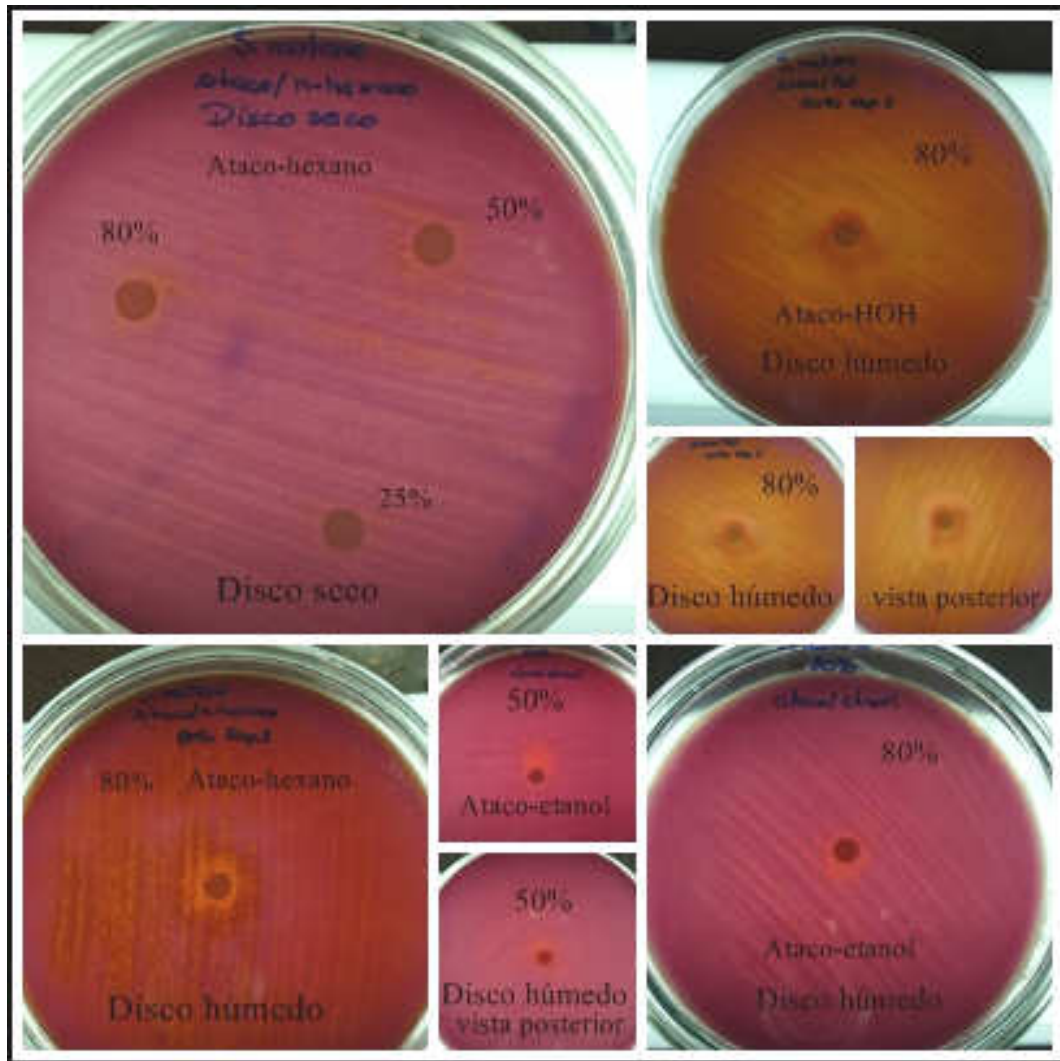


**Figura 3-5:** Actividad antimicrobiana del extracto de *Myrcianthes hallii* (arrayán) - etanol, sobre *Klebsiella pneumoniae*

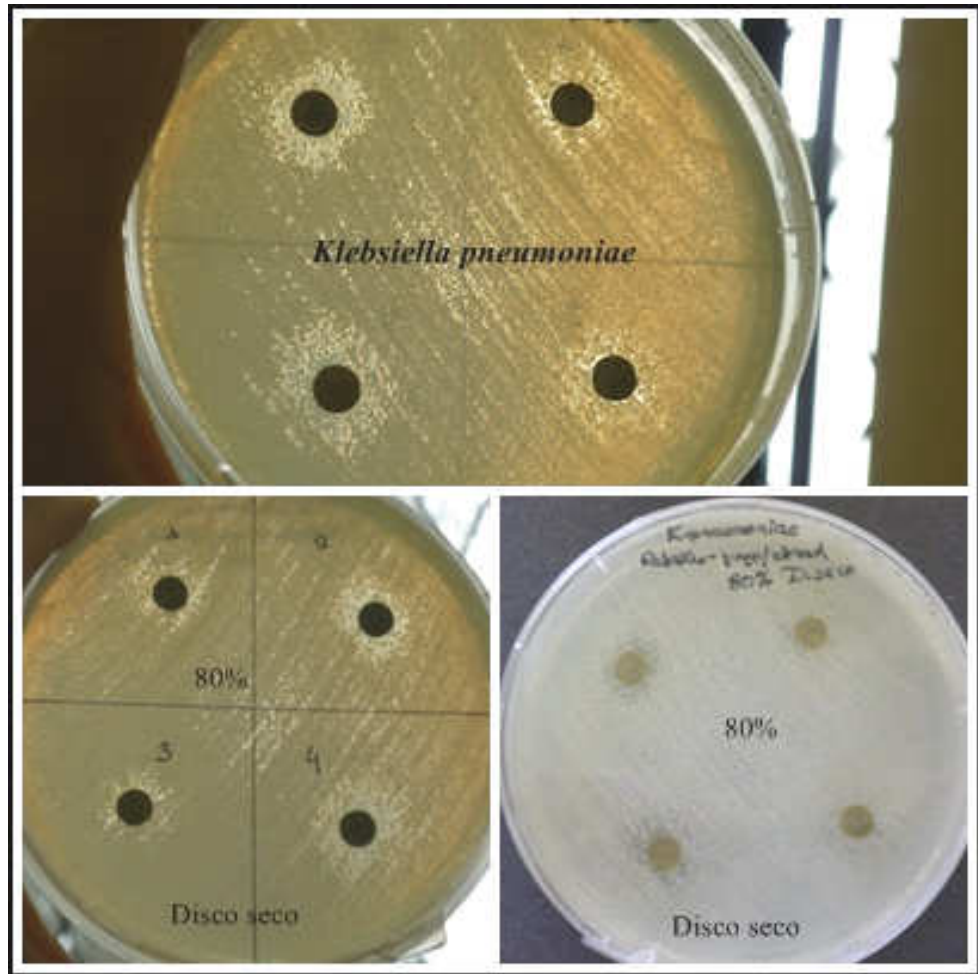


**Figura 3-6:** Actividad antimicrobiana del extracto de *Myrcianthes hallii* (arrayán) etanol, sobre *Candida albicans*

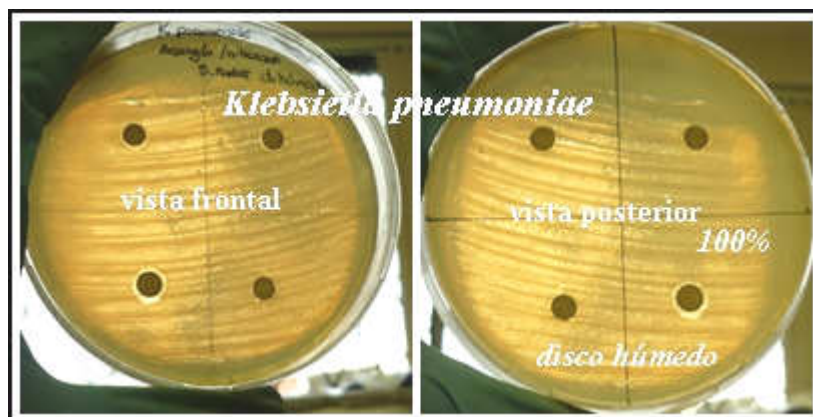
En las Figuras 3-7; 3-8; 3-9, se muestran los resultados más representativos al evaluar los extractos de *Myrcianthes hallii*, *Amaranthus asplundii*, *Peperomia peltigera*, frente a *Streptococcus mutans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*.



**Figura 3-7:** Actividad antimicrobiana de los extractos de *Amaranthus asplundii* (ataco), sobre *Streptococcus mutans*

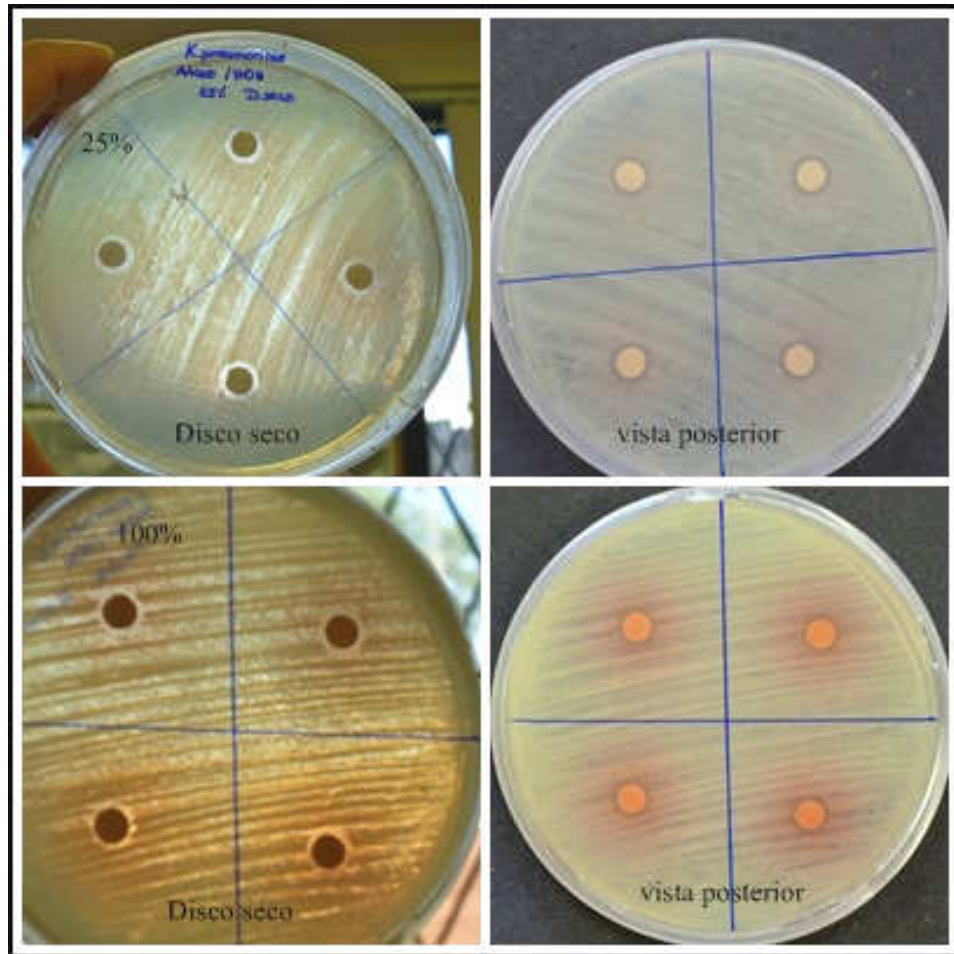


**Figura 3-8:** Actividad antimicrobiana del extracto de *Peperomia peltigera* (pataku - yuyo)-etanol, sobre *Klebsiella pneumoniae*



**Figura 3-9:** Actividad antimicrobiana del extracto de *Myrcianthes hallii* (arrayán)-hexano, sobre *Klebsiella pneumoniae*

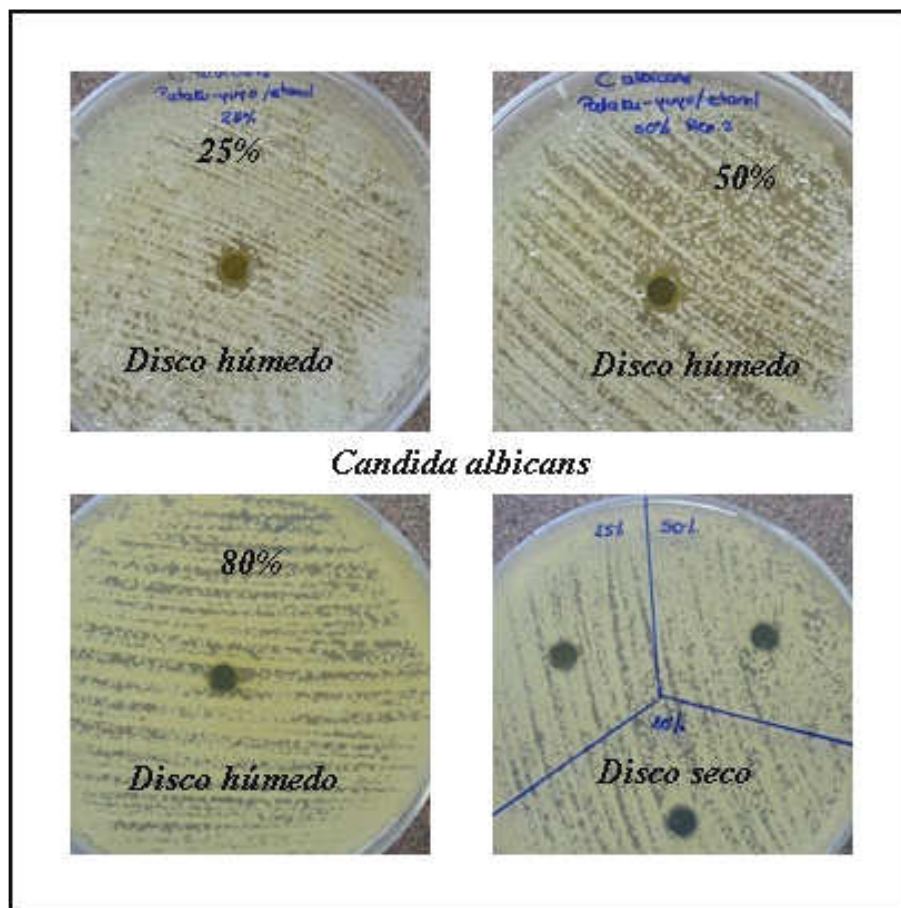




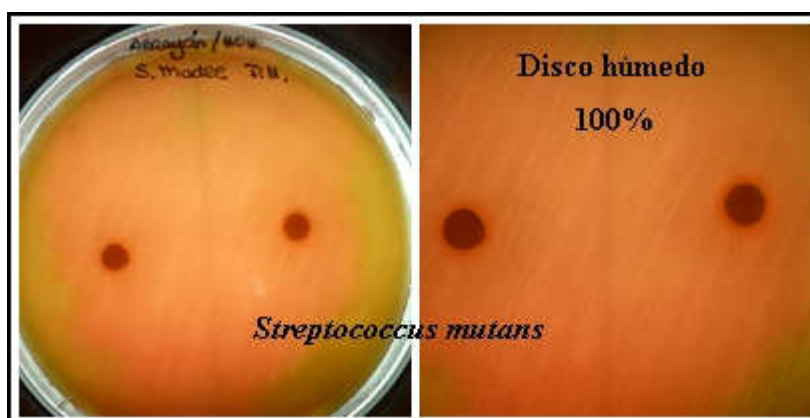
**Figura 3-10:** Actividad antimicrobiana del extracto de *Amaranthus asplundii* (ataco)-agua, sobre *Klebsiella pneumoniae*



**Figura 3-11:** Actividad antimicrobiana del extracto de *Amaranthus asplundii* (ataco)-etanol, sobre *Candida albicans*

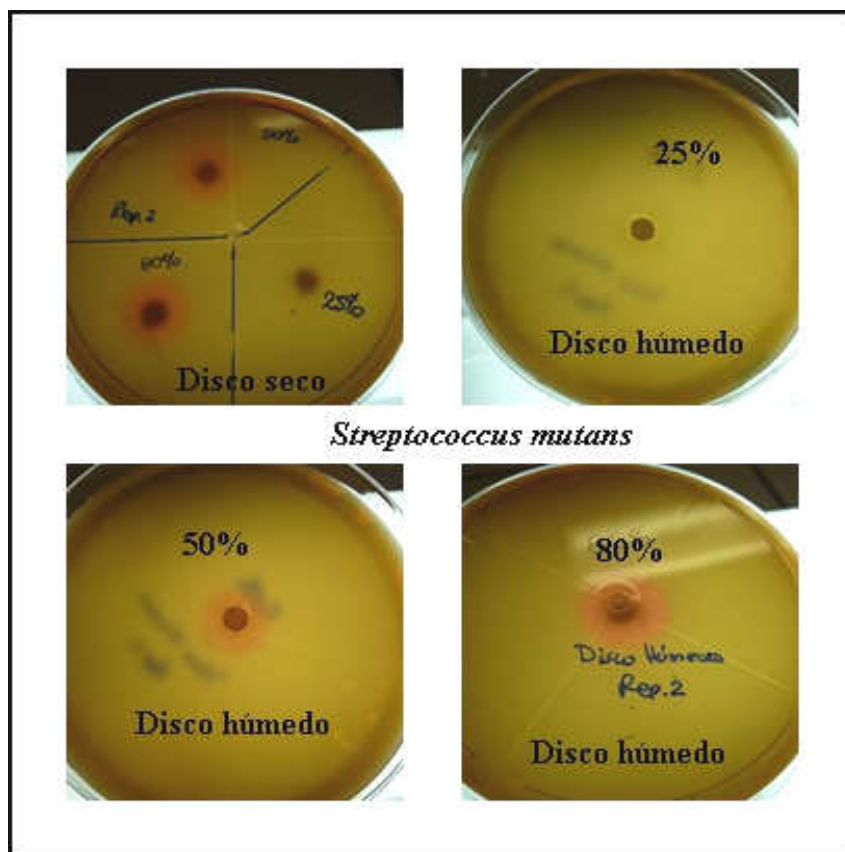


**Figura 3-12:** Actividad antimicrobiana del extracto de *Peperomia peltigera* (pataku-yuyo)-etanol, sobre *Candida albicans*

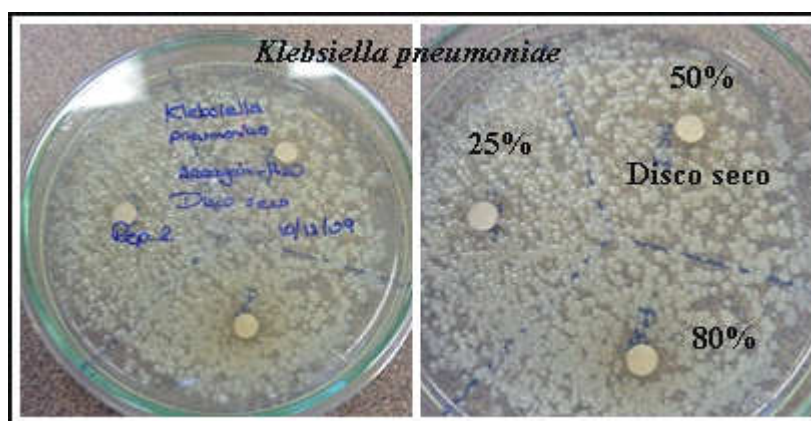


**Figura 3-13:** Actividad antimicrobiana del extracto de *Myrcianthes hallii* (arrayán)-agua, sobre *Streptococcus mutans*





**Figura 3-14:** Actividad antimicrobiana del extracto de *Myrcianthes hallii* (arrayán)-agua, sobre *Streptococcus mutans*



**Figura 3-15:** Actividad antimicrobiana del extracto de *Myrcianthes hallii* (arrayán)-agua, sobre *Klebsiella pneumoniae*

### 3.4 Pruebas fitoquímicas preliminares

Con base a los resultados estadísticos obtenidos en la Tabla 3-7; Tabla 3-17 y la Gráfica 3-1, Gráfica 3-12, se determinó que el extracto más eficiente frente a todos los microorganismos evaluados es el extracto *Myrcianthes hallii* (arrayán) en etanol, para el cual se determinó por pruebas cualitativas la presencia de metabolitos secundarios, responsables de la actividad antimicrobiana, los resultados se muestran a continuación en la Tabla 3-25 y la Figura 3-13.

**Tabla 3-26:** Identificación de metabolitos secundarios por pruebas de coloración y precipitación en la fracción etanólica de *Myrcianthes hallii* (arrayán)

Metabolitos <i>Myrcianthes hallii</i> (hojas)	Pruebas	Experimental
Alcaloides	Dragendorff	-
	Wagner	+
Flavonoides	Hidróxido de sodio	++
	Shinoda	-
Taninos	Reacción con FeCl <sub>3</sub>	+++
	Reacción con gelatina	+++
Saponinas	Rosenthaler	+++
	Prueba de la espuma	+++

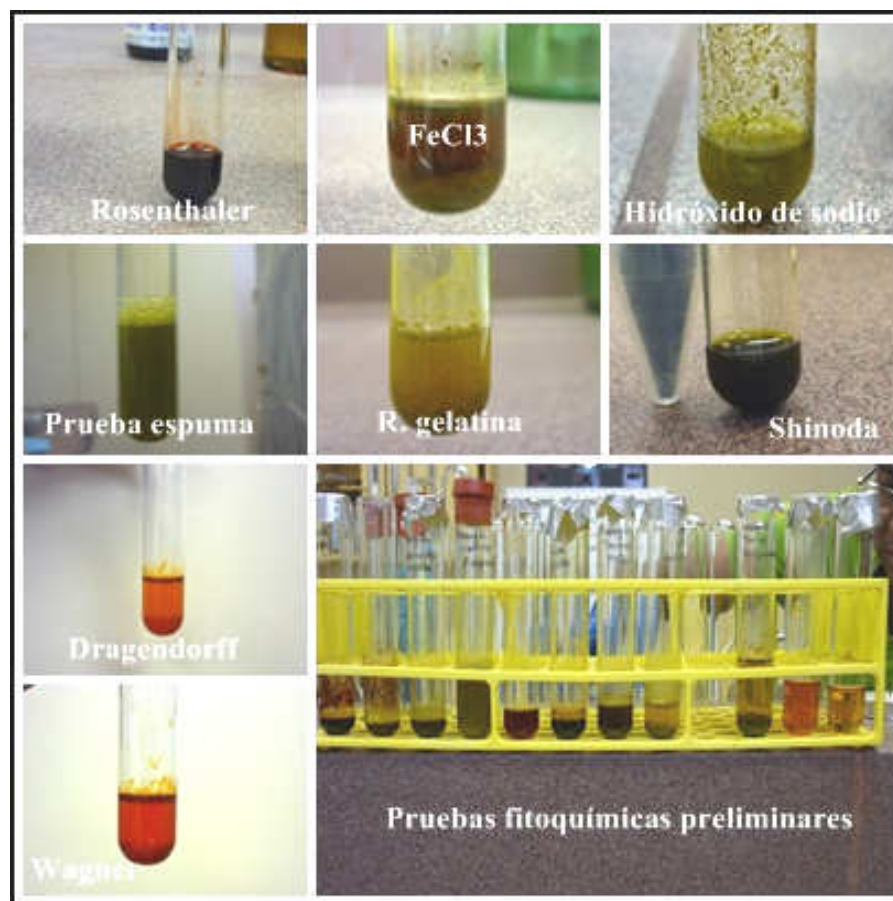
**Simbología:** (-) No detectado; (+) Poco o escaso; (++) Moderado; (+++) Abundante

Al realizar las pruebas preliminares se pudo observar la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos y saponinas. En el caso de flavonoides, con la prueba de Shinoda, se obtuvo una coloración verde, pero tomando en cuenta la prueba de hidróxido de sodio que resulto positiva, y la bibliografía encontrada que indica la presencia de flavonoides en ésta planta, se tomo como prueba positiva considerando que la cantidad utilizada quizás no haya sido la necesaria para detectar este principio activo.

En la prueba de taninos donde se utilizó sales férricas, se obtuvo un precipitado negruzco, lo que podría representar la presencia de taninos hidrolizables.

Se detectó la presencia de alcaloides en cantidad escasa con el reactivo de Wagner, aunque en la bibliografía se menciona la ausencia de alcaloides.

En la prueba de saponinas se obtuvo un resultado positivo para el ensayo con agua, y con la prueba de Rosenthaler.



**Figura 3-16:** Pruebas fitoquímicas preliminares para *Myrcianthes hallii* (arrayán) en etanol

## CAPITULO IV

### DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede afirmar que las tres especies vegetales ensayadas en éste estudio son productoras de sustancias bioactivas con efecto antimicrobiano, lo cual contribuye al fortalecimiento y credibilidad de los conocimientos ancestrales, siendo el extracto de *Myrcianthes hallii* (arrayán) - etanol, el que mayor actividad antimicrobiana presentó, como se puede observar en las Tablas 3-7; 3-17, y en las Gráficas 3-5; 3-13.

La Tabla 3-26 muestra los resultados de las pruebas fitoquímicas preliminares de *Myrcianthes hallii* (arrayán), la cual indica que ésta planta es rica en metabolitos secundarios, destacándose un alto contenido de taninos, saponinas, y flavonoides, éste último con la prueba de Shinoda presentó una coloración verde, según Domínguez (2002) el no producir un vire en la coloración, indica la presencia de isoflavononas, chalconas y auronas, lo cual confirma lo expuesto por Cerón (2003) y CESA (1993), a pesar de no encontrarse reportado en bibliografía, se detectó la presencia de alcaloides en muy poca cantidad, observándose un precipitado color rojo en la prueba realizada con reactivo de Wagner.

Las Tablas 3-7; 3-17, muestran que *Peperomia peltigera* (pataku yuyo) no presentó una inhibición antimicrobiana considerable frente a los microorganismos ensayados, posiblemente se deba a que los principios activos de ésta planta, se encuentren muy diluidos, o necesiten otro solvente extractor de menor o mayor polaridad, y que por ello ejerzan una acción antimicrobiana baja o a su vez no ejerzan ningún tipo de acción sobre los microorganismos.

El extracto de *Myrcianthes hallii* (arrayán) – Agua y *Amaranthus asplundii* (ataco) – Agua, presentaron actividad inhibitoria leve sobre *Streptococcus mutans* y

*Klebsiella pneumoniae* como se muestra en las Gráficas 3-3 y 3-2 y las Tablas 3-18 y 3-19, lo que indica que éstas plantas poseen metabolitos secundarios polares, de amplio espectro de acción, y que deberían ser consideradas para estudios fitodirigidos.

El efecto de inhibir a microorganismos Gram positivos, Gram negativos y levaduras, puede sugerir que *Myrcianthes hallii* (arrayán) es una buena fuente de productos potencialmente antibacterianos de amplio espectro siendo mucho más efectivo en Gram positivos.

Considerándose que el extracto etanólico de *Myrcianthes hallii* (arrayán) resultó ser el más efectivo, se puede decir que la actividad antimicrobiana presentada por éste se debe al tipo de solvente utilizado, ya que etanol tiende a arrastrar gran cantidad de compuestos polares como taninos, flavonoides y según Villacís (2009) estos compuestos han reportado propiedades antimicrobianas, destacándose la acción de inhibir la síntesis de la pared celular ó a su vez inhibir la síntesis de ADN o ARN, ya que la estructura plana 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 (Espinoza, 2003), para el caso de la *Candida albicans* éstos compuestos probablemente pueden actuar inhibiendo la biosíntesis de ergosterol o de otros esteroides presentes en la pared celular de la levadura, alterando su permeabilidad. (Rivera, 2007)

Se evidenció que la actividad antimicrobiana mostrada por *Myrcianthes hallii* (arrayán), en comparación a los controles positivos tiene una diferencia significativamente alta, como se puede observar en las Tablas 3-8 y 3-19 para *Klebsiella pneumoniae*, Tablas 3-9; 3-18 para *Streptococcus mutans*, Tablas 3-10; 3-20 para *Candida albicans*, esto se debe a que los antibióticos utilizados son altamente concentrados, purificados y específicos para las cepas utilizadas en el estudio, mientras que los extractos probados en éste estudio son una mezcla de componentes fitoquímicos que pueden interactuar entre sí o individualmente, razón por la cual Mendoza &

Moreno (2006) explican, que es necesario entender que la actividad biológica potente y específica es una propiedad poco usual en metabolitos secundarios.

Es importante resaltar que el Etanol al 99,5% utilizado para extraer y diluir las muestras evaluadas en éste estudio, presentó una actividad tóxica leve sobre *Candida albicans* en disco húmedo produciendo un halo de 5,9 mm, lo cual indicaría que para ésta cepa todos los extractos etanólicos en especial el de *Myrcianthes hallii* en etanol, posiblemente no tengan la actividad inhibitoria presentada, sin embargo no se puede descartar la actividad mostrada, ya que al evaluar el mismo extracto en disco seco, presenta un halo promedio de 5,990 mm para 48 horas y de 5,717 mm para 72 horas, (Tablas 3-14 y 3-25), considerando que en disco seco el solvente etanol se evapora rápidamente, en el disco quedaría concentrado los componentes fitoquímicos de la planta arrastrados por el solvente, en este caso taninos, flavonoides, saponinas, los que se considerarían como responsables de la actividad antimicrobiana.

Lizcano & Vergara (2006), utilizaron extractos etanólicos de *Myrcianthes rhopaloides*, *Passiflora manicata*, *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, contra *Candida albicans* con las cuales se observó que el aceite esencial de *Myrcianthes rhopaloides* tuvo un inhibición significativamente alta para *Candida albicans*, resultado que concuerda con el estudio aquí presentado, en el cual se utilizó una planta del mismo género, obteniéndose resultados semejantes.

Otros estudios efectuados con extracto de guaco *Mikania leaevigata* y *Mikania glomerata* sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans*, utilizando extractos etanólicos, fracciones de hexano, etil y acetato de cada una de estas plantas, a diferencia de los resultados obtenidos en éste estudio Aricapa, 2009 si obtuvo resultados positivos con la fracción de hexano.

Estudios con extractos acuosos y hexánicos de la raíz de *Erythrina herbacea*, la corteza de los tallos de *Zanthoxylum caribaeum* y de *Dendropanax arboreus* sobre *Klebsiella pneumoniae*, coinciden con los resultados de éste trabajo, ya que ésta bacteria presenta gran resistencia a ser inhibida utilizando éstos solventes (Ordaz. *et al*, 2006).

Según bibliografía consultada y especializada no existen datos disponibles sobre ensayos y estudios efectuados con las plantas utilizadas en el presente trabajo, sin embargo los estudios antes expuestos, concuerdan con los obtenidos en ésta investigación, ya que los microorganismos evaluados presentan mayor inhibición con extractos obtenidos en solventes no muy polares como etanol, diclorometano, acetato de etilo.

De los resultados obtenidos se puede deducir que la actividad antimicrobiana de los extractos depende del solvente utilizado, de la concentración adecuada y en especial de la planta, por esto el método de extracción tiene una influencia significativa en la obtención de los diferentes principios activos presentes en la planta, en esta investigación para la obtención de principios activos de *Myrcianthes hallii* (arrayán) debido a su composición fitoquímica fue conveniente utilizar etanol como solvente para una actividad inhibitoria significativa sobre *Streptococcus mutans*, *Klebsiella pneumoniae* y *Candida albicans*.

Los extractos de hexano de las tres especies evaluadas, no presentaron inhibición considerable en el crecimiento de los microorganismos estudiados, sin embargo al presentar una inhibición baja, revela que en estos extractos existen compuestos orgánicos de baja polaridad que son capaces de inhibir el crecimiento de estos organismos, considerando la importancia de realizar nuevos estudios con otros solventes de polaridad creciente.

El factor tiempo, presenta una diferencia marcada en la actividad de los extractos debido a la capacidad de multiplicación elevada de los microorganismos, es así que cuando el microorganismo alcanza la fase estacionaria, nuevas células se encuentran dividiéndose, entrando a la fase de adaptación, donde los genes implicados en algún proceso se adaptan al ambiente en el que se encuentra y crean resistencia a los antimicrobianos, en este caso los extractos (Ordaz, *et al* 2006), en ésta investigación se muestra que la actividad antimicrobiana de los extractos pierde efectividad a las 48 horas de incubación para bacterias y 72 horas de incubación para levadura

La mayor o menor concentración de los extractos en pruebas antimicrobianas, influye directamente sobre la actividad, es así que un aumento moderado de la concentración multiplica la velocidad de muerte del microorganismo, mientras que una concentración baja no tiene acción antimicrobiana (Prescott, 2004). En la presente investigación todos los extractos evaluados presentaron inhibición a la concentración de 80% como muestra la Gráfica 3-7 y 3-15, posiblemente se debe a que los extractos más concentrados posean más principios activos que interactúen con los microorganismos, mientras que más diluidos posean principios activos libres y en baja concentración que no puedan interactuar y por ende no penetrar la pared microbiana.

Según los resultados el disco que mayor actividad antimicrobiana presentó fue el disco húmedo, para *Streptococcus mutans* y *Candida albicans*, esto puede deberse a que tienen la capacidad de difundirse en mayor área, interactuando con mas colonias del microorganismo, en el caso de *Klebsiella pneumoniae*, tanto el disco seco, como el disco húmedo actúan de manera similar, lo que indica que se podría utilizar cualquier estado de disco para ejercer inhibición. Como se puede observar en la Tabla 3-12 y la Tabla 3-22 *Klebsiella pneumoniae* es el microorganismo más resistente debido a su estructura, ya que posee una membrana de protección que la hace resistente a cualquier tipo de antimicrobiano.



*Streptococcus mutans* fue el microorganismo más sensible a la actividad de los extractos evaluados (Tabla 3-12) debido a que las bacterias Gram positivas poseen una pared celular de peptidoglucano gruesa formada de fosfolípidos y proteínas; esto hace que los metabolitos identificados polares, sean más permeables y susceptibles a la pared y permita el paso de sustancias a su interior ocasionando la muerte microbiana (Neira *et al*, 2005).

*Candida albicans* posee una pared celular compuesta por varias capas finas, las cuales al transcurrir el tiempo de crecimiento de la levadura, se van desprendiendo, haciendo que ésta se vuelva más susceptible a la acción de los extractos, lo cual permite la inhibición de la biosíntesis del ergosterol o de otros esteroides presentes en la pared celular del hongo, lesionándola y alterando su permeabilidad; como consecuencia se produce la pérdida de elementos intracelulares esenciales (Pardi & Cardozo, 2002).

Un factor que influye en la inhibición antimicrobiana, es el ambiente de desarrollo, debido a que *Streptococcus mutans* crece en un ambiente anaeróbico, en el cual existe una menor producción de energía, una tensión de oxígeno baja tiende a aumentar su sensibilidad, mientras que las condiciones de aerobiosis de *Klebsiella pneumoniae* y *Candida albicans*, hace que aumente su resistencia frente a los extractos. (Inouye *et al*, 2001)

Una situación a controlar en la evaluación antimicrobiana, es la presencia de materiales extraños, en este caso la adición de sangre al medio Müller Hinton para *Streptococcus mutans* pudo haber afectado el verdadero poder antimicrobiano de los extractos, ya que algunos principios activos como los taninos tienen la capacidad de unirse a proteínas grandes y hacerlas precipitar, es así que éstos pudieron haberse unido a la proteína de la sangre y actuar como alimento microbiano. (Prescott, 2004).

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES

- La diferencia de polaridad de los solventes utilizados permitió que se obtengan en cada uno de los extractos distintos principios activos, causantes de la inhibición antimicrobiana.
  
- El extracto *Myrcianthes hallii* (arrayán) en etanol, presentó los mayores halos de inhibición en todos los microorganismos, obteniéndose una actividad antimicrobiana moderada frente a *Streptococcus mutans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*.
  
- El estudio fitoquímico preliminar determinó que en las hojas de *Myrcianthes hallii* (arrayán) predominan flavonoides, saponinas, taninos, compuestos de carácter polar, que pueden ser los responsables de la actividad antimicrobiana que presenta el arrayán.
  
- Los extractos hexánicos de las tres especies vegetales evaluadas mostraron actividad casi nula frente a *Streptococcus mutans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, debido a la baja capacidad de arrastre de compuestos bioactivos o a su vez a la poca cantidad de compuestos apolares en las tres especies vegetales evaluadas.
  
- *Peperomia peltigera* (pataku yuyo) y *Amaranthus asplundii*, mostraron un escaso poder inhibitorio frente a las cepas ensayadas en el presente estudio.

- *Streptococcus mutans* demostró ser el microorganismo más sensible a la acción de los diferentes extractos, mientras que *Klebsiella pneumoniae* resultó ser la más resistente, siendo marcadamente sensible sólo ante el extracto *Myrcianthes hallii* (arrayán) - etanol, los demás extractos no demostraron un claro efecto inhibitor sobre este microorganismo.
- Etanol fue el solvente más apropiado para extraer principios activos de todas las plantas evaluadas, debido a su capacidad de arrastre y disolución, por ello todos los extractos etanólicos, presentaron una mejor actividad antimicrobiana, que los extractos acuosos y hexánicos.
- La concentración que más actividad inhibitoria tuvo, con respecto al tipo de extracto, tipo de microorganismo fue la de 80%.
- Al evaluar el factor disco se demostró que mejor actividad posee el disco húmedo para *Streptococcus mutans* y *Candida albicans*, mientras que para *Klebsiella pneumoniae* el disco seco y húmedo tienen una acción inhibitoria similar.
- El mejor tiempo para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos analizados en el presente estudio, fue a las 24 horas para bacterias y 48 horas para la levadura.
- El presente trabajo sienta las bases para nuevas evaluaciones de las especies *Myrcianthes hallii*, *Peperomia peltigera*, *Amaranthus asplundii*, ya que hasta la actualidad no se ha reportado actividad antimicrobiana para ninguna de las plantas evaluadas en este estudio.

## CAPITULO VI

### RECOMENDACIONES

- Debido a que éste estudio es el primero en evaluación de actividad antimicrobiana de *Myrcianthes hallii*, *Amaranthus asplundii*, *Peperomia peltigera*, y para extender el estudio de estas especies, se propone realizar estudios similares a éste, para la búsqueda específica de compuestos con actividad antibacteriana, para lo cual se podría ensayar con otros microorganismos, otros solventes y otras condiciones que asemejen su uso tradicional, o a su vez trabajar con mayor cantidad de microorganismos causantes de enfermedades bucofaríngeas utilizando una sola planta, además se podría hacer estudios de toxicidad de los extractos, en especial del extracto que tuvo mayor acción antimicrobiana, para posteriormente tratar de formular antisépticos o desinfectantes.
- Realizar estudios con material fresco de la planta y compararlos con los resultados obtenidos en éste trabajo.
- Mejorar la extracción, aumentando el nivel de concentración con cantidades mayores de solvente y plantas, para probar si se obtienen mejores resultados en la inhibición antimicrobiana.
- La experiencia adquirida en el desarrollo de éste trabajo y los resultados expuestos en el mismo, indican que la lectura de la actividad antimicrobiana se realice a las 24 h para bacterias y a las 48 h para levaduras.

- Es de gran interés el realizar investigaciones con mayor número de concentraciones, para así poder determinar la Concentración Mínima Inhibitoria, y conocer el efecto ideal de los extractos.
- Para corroborar los resultados obtenidos para *Candida albicans*, es recomendable utilizar etanol al 96% como solvente extractor, mientras que para control negativo se debería utilizar diluido como muestra la investigación realizada por Huamani & Ruíz (2005).

## CAPITULO VII

### BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta, M. 1995. Vademécum de Plantas Medicinales del Ecuador. Quito: Abya Yala.
2. Anon (1997) [citado: Buitrón] Uso y Comercio de Plantas Medicinales. Ecuador. Análisis de bioactividad de plantas ecuatorianas
3. Añanca, E. (2009). Tesis: Efecto antibacteriano *in Vitro* del extracto acuoso de vainas de *Caesalpinia spinosa* (tara) en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Perú.
4. Arce, J.M. (2008). Infecciones de vías respiratorias superiores. Extraído el 19 de febrero, 2010, de: <http://mediclopedia.com/medicina-interna/1096/infecciones-de-vias-respiratorias-superiores/>
5. Arias, Y. (2002). Diplomado de Epidemiología. Sistema de vigilancia en salud oral en las zonas rurales y urbanas. Ambato. PUCE. pp 16
6. Aricapa, D. (2009). Tesis: Actividad antimicrobiana de plantas sobre microorganismo cariogénicos. Extraído el 10 de abril, 2010, de: [www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis324.pdf](http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis324.pdf)

7. Barahona, M., & Jativa, C. (1995). Evaluación Biológica de Actividad de Varias Plantas en Artemia Sativa. Biblioteca Ecuatoriana de Ciencias. Universidad Simón Bolívar. (Memorias de las Primeras Jornadas Ecuatorianas de Etnomedicina Andina).
8. Barranco, S. (2004). Búsqueda de compuestos antimicrobianos en *Heterotheca inuloides*, *Gnaphalium oxyphyllum*, *Passiflora incarnata*, *Rosmarinus officinalis* y *Ruta graveolens*. Tesis Licenciatura. Extraído el 30 de mayo, 2009, de: [http://catarina.pue.udlap.mx/udl\\_a/tales/documentos/lqf/barranco\\_1\\_sl/resumen.html](http://catarina.pue.udlap.mx/udl_a/tales/documentos/lqf/barranco_1_sl/resumen.html)
9. Barreda, P. (2008). Infección Respiratoria Aguda. Extraído el 15 de febrero, 2010, de: [http://www.geosalud.com/enfermedades\\_infecciosas/IRA.htm](http://www.geosalud.com/enfermedades_infecciosas/IRA.htm)
10. BayScience Foundation, Inc. (2009). Plants. Extraído el 2 de abril, 2010, de: <http://zipcodezoo.com/Plants/>
11. Buitrón, X. [citado: Miño] (1999) Uso y Comercio de Plantas Medicinales. Situación actual y aspectos importantes para su conservación. Ecuador
12. Buitrón, X. (2006). Comercio de plantas medicinales y productos derivados. Quito-Ecuador.
13. Cabrera, I. (2005). Las plantas y sus usos en las Islas de Providencia y Santa Catalina. Editorial Universidad del Valle. Extraído el 01 de junio, 2010, de:

<http://books.google.com.ec/books?id=-yo5hgMVWvIC&printsec=frontcover#v=onepage&q=Piperaceae&f=false>

14. Caffer, M. I.; Terragno, R.; Fraga, S.; Viñas, M. R.; Pichel, M.; & Binztein, N. (2007). Manual de Procedimientos, aislamiento, identificación y caracterización de *Vibrio cholerae*.
15. Carson, C., Hammer, K., & Riley, T. (2006). Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. Clinical Microbiology Reviews, January 2006, p. 50-62, Vol. 19, No. 1. Extraído el 22 de mayo, 2010, de: <http://cmr.asm.org/cgi/content/full/19/1/50>
16. Castillo, J. (2009). Recuento de *Streptococcus mutans*. Extraído el 19 de febrero, 2010, de: <http://odontologia.uchile.cl/revistaFO/v14n2/caries/index.html>
17. Castro, V. (2005). Inhibición del crecimiento *in vitro* de *Streptococcus mutans* por Papaina y Sanitrend. Extraído el 01 de junio, 2009, de: <http://www.medicinaoral.com/medoralfree01/v10Suppl1i/medoralv10suppl1ip27.pdf>
18. Cerón, C. (2002). Plantas medicinales de los Andes Ecuatorianos. Botánica Económica de los Andes Centrales. Herbario Alfredo Paredes (QAP), Escuela de Biología de la Universidad Central del Ecuador.



19. Cerón, C. (2003). Manual de botánica. Sistemática, Etnobotánica y Métodos de Estudio en el Ecuador. Herbario “Alfredo Paredes” QAP, Escuela de Biología de la Universidad Central de Ecuador. Quito – Ecuador: Editorial Universitaria.
20. Cerón, C. (2003). El bosque Los Arrayanes, San Gabriel, Carchi – Ecuador, Importancia Botánica. Etnobotánica y diversidad en el Ecuador. Quito pp136-157
21. CESA. (1993). Manual de Difusión Popular. Usos medicinales de las especies forestales nativas en el Ecuador. Quito: Intercooperation Suiza. Central Ecuatoriana de Servicios Agrícolas.
22. Cona, E. (2002). Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. Rev. Chile Infectología, No. 19, suplemento 2, S 77-81.
23. De la Torre, L., Navarrete, P., Muriel, M., Macía, M., & Balslev, H. (Eds.).(2008). Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador (pp.14, 20-23). Quito: Herbario QCA & Herbario AAU.
24. Domingo, D & López, B. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. Rev Esp Quimioterap. Vol. 16 (No. 4) pp; 385 – 393.
25. Domínguez, M.A. (2002). Tesis: Evaluación estructural y actividad antimicrobiana de los metabolitos presentes en *Rhoeo discolor* L. Hér Hance.

26. Espinoza, I. (2003). Análisis fitoquímico y actividad antibacteriana de *Tillandsia revurvata*. México.
27. Farias, F. (2008). Enfermedad Periodontal y Microorganismos Periodontopatógenos. Odous científica.
28. Farinango, M. Ñacato, V. Quilo, N. Vaca, M. Pichasaca, A. Ortiz, M. (2005). Salud Intercultural. Direccion Nacional de Salud de los Pueblos y Nacionalidades Indigenas. Direccion Provincial de Salud de Pichincha. Quito.
29. Fernández, F. (2008). Aspectos microbiológicos de los estreptococos del grupo viridans. Extraído el 15 de enero, 2010, de: [http://www.seimc.org/control/revi\\_Bacte/SGVirid.htm](http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/SGVirid.htm)
30. Fernández, M., Aguilera, A., Ibáñez, N., Buform, A., Aguilera, C., & Morell, Valentina. (2004). Amigadlitis Aguda. España
31. Gamazo, C.; López, I., & Díaz, R. (2005). “Manual práctico de microbiología”. Editorial Masson. Tercera edición. México. Pp 47 -50
32. Gamboa, F. (*et al*). (2000). Microbiología oral. Extraído el 12 de mayo, 2009, de: <http://www.javercol.javeriana.edu.co>

33. Gamboa, F. (2006). Estrategias microbiológicas con *Streptococcus mutans*. Fundamentos de ciencias básicas aplicadas a la odontología. Extraído el 16 noviembre, 2009, de:  
[http://books.google.com.ec/books?id=4szLuVOtgC0C&pg=PA15&dq=pruebas+bioquimicas+identificacion+streptococcus+mutans&source=gbs\\_toc\\_r&cad=6#v=onepage&q=&f=false](http://books.google.com.ec/books?id=4szLuVOtgC0C&pg=PA15&dq=pruebas+bioquimicas+identificacion+streptococcus+mutans&source=gbs_toc_r&cad=6#v=onepage&q=&f=false)
34. Gualtieri, M., Villalta, C., Guillén, A., Lapenna, E., & Andara, E. (2004). Determinación de la actividad Antimicrobiana de los Extractos de la *Azadirachta indica* A. Juss (Neem). Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. INHRR v.35 n.1. Extraído el 27 de abril, 2010, de:  
[http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S079804772004000100003&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S079804772004000100003&script=sci_arttext)
35. Guillermo, R. (2002). Comprobación del efecto cicatrizante de *Peperomia scutellaefolia* R.et.P., aspectos etnofarmacológicos, botánicos y estudio químico. Extraído el 23 de diciembre, 2009, de:  
[http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/tesis/salud/guillermo\\_n\\_r/generalidades.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/tesis/salud/guillermo_n_r/generalidades.htm)
36. Gutiérrez, H. De la Vara, R. (2008). Análisis y Diseño de Experimentos. Segunda edición. México DF: Mc. Graw Hill Interamericano.

37. Hashimoto, T; Yun, DJ; Yamada, Y. 1993. [Citado por Rocha, 2006].  
Production of tropane alkaloids in genetically engineered root cultures.  
Phytochemistry 32(3): 713-718.
38. Heras, A. (1997). Conocimiento sobre plantas medicinales en una comunidad estudiantil de Atlautla, estado de México. México. Extraído el 25 de abril, 2009 de: <http://www.tlahui.com/tlahui2/tlapiz1.htm#aida>
39. Herrera, F., & García, R. (2006). Evaluación *in Vitro* del efecto bactericida de extractos acuosos de laurel, clavo, canela y tomilla sobre cinco cepas bacterianas patógenas de origen alimentario. BISTUA Vol. 4 No. 2 pp13-19. Extraído el 20 de mayo, 2010, de: <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/903/90340202.pdf>
40. Hinostraza, D. (2008). Gasto catastrófico en salud en el hogar, seguro público y patología: su relación con el incumplimiento. Miembro del Comité Editorial de la Revista Ecuatoriana de Pediatría. Quito. Extraído el 20 de mayo, 2009, de: [http://www.pediatria.org.ec/bvs/2008/9.1.2008\\_38a50.pdf](http://www.pediatria.org.ec/bvs/2008/9.1.2008_38a50.pdf)
41. Huamani, M.E.; & Ruiz, J. (2005). Tesis “Determinación de la Actividad Antifúngica contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger*, de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú. Extraída el 31 de mayo, 2010, de: [http://www.cybertesis.edu.pe/sisbib/2005/huamani\\_am/pdf/huamani\\_am-TH.back.1.pdf](http://www.cybertesis.edu.pe/sisbib/2005/huamani_am/pdf/huamani_am-TH.back.1.pdf)

42. Inouye, S., Takizawa, T., Yamaguchi, H. (2001). Actividad antibacteriana de los aceites esenciales y sus principales componentes contra los patógenos del tracto respiratorio por contacto gaseoso. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Volúmen 47, No. 5. Extraído el 22 de mayo, 2010 de:  
<http://jac.oxfordjournals.org/cgi/content/full/47/5/565>
43. IQB. Diccionario ilustrado de términos médicos. (2007). Monografía: Ciprofloxacina. Extraído el 14 de marzo, 2010, de:  
<http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/c058.htm>
44. Izquierdo, L. (2003). Tesis: Biosíntesis del lipopolisacárido de *Klebsiella Pneumoniae*. España. Extraído el 22 de diciembre, 2009, de:  
[http://www.tesisenxarxa.net/TESIS\\_UB/AVAILABLE/TDX-0721103-105844/TOL211.pdf](http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UB/AVAILABLE/TDX-0721103-105844/TOL211.pdf)
45. Kowii, A. (2001). Sociedades diversas y educación. *Revista Iberoamericana de Educación*. Editada por la Organización de Estados Iberoamericanos (OEI). Número 26. Extraída el 25 de abril, 2009 de: <http://www.rieoei.org/rie26f.htm>
46. Korolkovas, A., & Burckhalter, J. (1983). Compendio esencial de química farmacéutica. Edit. Reverté, 1ra edición. pp580
47. Lemus, J. (2004). Tesis: Determinación de  $\beta$ -lactamasas de espectro ampliado y de espectro extendido, en cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* aisladas de pacientes del Hospital General de Enfermedad Común del Instituto

Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS), por medio del Método de Difusión en Disco. Guatemala. Extraída el 02 de octubre, 2009 de:  
[http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_2248.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2248.pdf)

48. Liébana, J. (1995). Microbiología Oral. Microbiología Periodontal. Pp.465-87. Madrid. España: Editorial Interamericana-Mc Graw-Hall. Varios capítulos.

49. Linares, M.J.; & Solís, F. (2001). Identificación de levaduras. Revista Iberiamericana de Micología. Extraído el 15 de mayo, 2009, de:  
<http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo11.pdf>

50. Lizcano, A., & Vergara, J. (2008). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos. Extraído el 10 de mayo, 2010, de:  
[http://www.jbb.gov.co/jardinbotanico/index.php?option=com\\_content&view=article&id=189&Itemid=127](http://www.jbb.gov.co/jardinbotanico/index.php?option=com_content&view=article&id=189&Itemid=127)

51. Lizcano, M.C. (2007). Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*) contra *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia sclerotiorum*.

52. Loor, I. (2000). Cuál es el valor que tienen las plantas medicinales. Ecología y Medio Ambiente. Extraído el 23 de abril, 2009 de:

<http://www.eldiario.com.ec/noticias-manabi-ecuador/99085-cual-es-el-valor-que-tienen-las-plantas-medicinales/>

53. López, R. Alvarez, M. López, T. González, J. 1997. Actividad antifúngica in vitro de *Pinus caribaea*. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 2:25-29
54. López, C., Giro, L., Ramos, L., Ramadán, S., & Bulacio, L. (2005). Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies del género *Candida*. Extraído el 17 de marzo, 2010, de:  
<http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v37n1/v37n1a03.pdf>
55. Matheus, C. 2007. Plantas que sanan. Petroecuador, Petroproducción, UAUT Bloque 15. Quito: Editorial Ecuatorial. pp 107- 108.
56. Mendoza, C., Moreno, M., Weil., & Elango, F. (2007). Evaluación del efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento *in vitro* de *Phytophthora palmivora* Butl. y *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. Tierra Tropical, revista de la Universidad EARTH. Extraído el 26 de abril, 2010, de:  
[http://usi.earth.ac.cr/tierratropical/archivos-de-usuario/Edicion/44\\_v3.1-08\\_Mendoza\\_Moreno.pdf](http://usi.earth.ac.cr/tierratropical/archivos-de-usuario/Edicion/44_v3.1-08_Mendoza_Moreno.pdf)
57. Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (2009). Diez Principales Causas de Morbilidad según Provincias Ecuador- 2007. Extraído el 25 de abril, 2009, de:  
<http://www.msp.gov.ec/images/mortalidad%202007.pdf>

58. Miño, G. (2007) Tesis: Investigación Fitoquímica e Identificación de Principios Activos en seis especies del género *Baccharis*. [Revisión de tesis]. Quito. pp. 10
59. Mongeli, E., & Pomilio, A. (2002). Nuevos medicamentos y etnomedicina del uso popular a la industria. Revista de divulgación científica y tecnológica de la asociación ciencia hoy, 12:2-3.
60. Mora, G. (2007). Antibióticos, clasificación y mecanismos de acción. Extraído el 12 de mayo, 2010, de:  
<http://www.slideshare.net/UABCMEDICINA/antimicrobianos>
61. Murray, P., Baron, E., Tenover, J., & Tenover, M. (2007). Manual de Microbiología Clínica. Editorial A SM. Press Washington DC. Novena edición. Volumen 2.
62. NAM. (2006). Candida. Extraída el 01 de junio, 2009 de: [www.aidsmap.com](http://www.aidsmap.com)
63. Naranjo, P. Escalera, R. (1995). Universidad Andina Simón Bolívar. Memorias de las Primeras Jornadas Ecuatorianas de Etnomedicina Andina. Quito: Corporación Editora Nacional. Volumen 2. pp 60, 61
64. Navarro, G., & Fabiola. R. (2004) Comprobación del efecto cicatrizante de *Peperomia scutellaefolia* R, et P., aspectos etnofarmacológicos, botánicos y estudio químico. Extraído el 25 abril, 2010, de:  
[http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/tesis/salud/guillermo\\_n\\_r/ref\\_bibliog.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/tesis/salud/guillermo_n_r/ref_bibliog.htm)



65. Neira, A., Ramírez, B., & Sánchez, N. (2005). Estudio fitoquímico y actividad antibacterial de *Psidium guineense* Sw (choba) frente a *Streptococcus mutans*, agente causal de caries dentales. REV CUBANA PLANT MED 2005;10(3-4)
66. Nolte, W. (1971). Microbiología odontológica. Editorial Interamericana, SA, México.
67. Ordaz, C., Clemente, R., Bocanegra, V., & Rivera, G. (2006). Actividad antibacteriana y mutagénica de extractos de tres plantas medicinales del municipio de Gómez Farías en el Estado de Tamaulipas, México. Extraído el 11 de mayo, 2010, de:  
[www.cotacyt.gob.mx/congreso/memoria/fscommand/.../cynthia.pdf](http://www.cotacyt.gob.mx/congreso/memoria/fscommand/.../cynthia.pdf)
68. Osorio, M. (1992). Boletín de la Sociedad Peruana de Medicina Interna. Las plantas medicinales. Vol.5 N° 4 Extraído el 25 de abril, 2009, de:  
<http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/spmi/v05n4/editorial.htm>
69. OPS. (1999). Sistemas de Salud Tradicionales en América Latina y el Caribe: Información de Base. Washington, D.C: Informe Técnico del Proyecto, Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de América
70. Pardi, G. & Cardozo, E. (2002). Algunas consideraciones sobre candida albicans como agente etiológico de candidiasis bucal. Volumen 40 n° 1. Extraído el 03 junio, 2009, de:  
<http://www.actaodontologica.com/ediciones/2002/1/editorial.asp>

71. Prat, S. (2006). Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar. Gobierno de Chile, Ministerio de Salud, Instituto de Salud Pública de Chile.
72. Paz y Miño, G., Balsleu, H., & Valencia, R. (1997). Etnobotánica, biodiversidad y diversidad cultural. Algunas hipótesis sobre la conservación del bosque y sus culturas indígenas. Uso y manejo de recursos naturales. Memorias del segundo Simposio Ecuatoriano de Etnobotánica y Botánica Económica. Ediciones Abya – Yala. Quito.
73. Pérez, E. (1996). [Citado por Rocha, 2006]. Plantas útiles de Colombia. Bogotá, Colombia, Fondo FEN.
74. Prescott, L. Harley, J. Klein, D. (2004). Microbiología. Quinta edición. Mc Graw Hill. España. Pp 897-911
75. Ramírez, L. (2005). Tesis: Farmacognosia y Fitoquímica de *Agave applanata*. México, extraído el 16 de abril, 2010, de:  
[http://catarina.udlap.mx/u\\_dl\\_a/tales/documentos/lqf/ramirez\\_l\\_al/](http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lqf/ramirez_l_al/)
76. Ramos, J., & Ruiz, J. (2003). Candidiasis. Extraído el 02 de junio, 2009, de:  
[http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/universitas/universitas\\_docs/vol9esp/5-control.pdf](http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/universitas/universitas_docs/vol9esp/5-control.pdf)
77. Raven, P; Evert, R; Eichhorn, S. (1999). [Citado por Rocha, 2006]. Biology of Plants. New York, W.H. Freeman and Worth Publishers. 944p.

78. Rios, M. Kaziol, M. Borgtoft, H, Granda, G. (2007). Plantas útiles del Ecuador. Aplicaciones, Retos y Perspectivas. Quito: Abya-Yala. pp 31-38, 54, 433.
79. Rivera, M. J. (2007). Actividad de seis extractos de hierbas usadas medicinalmente contra *Fonsecaea pedrosoi* y *Sporothrix scheckii*. Extraído el 15 de junio, 2009, de: [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_2489.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2489.pdf)
80. Roca, W. (2003). Estudio de las capacidades biotecnológicas e institucionales para el aprovechamiento de la biodiversidad en los países de la Comunidad Andina. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima-Perú
81. Rocha, SPJ. (2000) Engineering secondary metabolite production in transgenic *Nicotiana tabacum* and *Hyoscyamus muticus* and isolation of Myb sequences from *Catharanthus roseus*. Tesis Ph.D. University of East Anglia, Norwich, Reino Unido. 161p
82. Rocha, P.; Stenzel, O.; Parr, A.; Walton, N.; Christou, P.; Dräger, B.; Leech, M.J. (2002). Functional expression of tropinone reductase I (trI) and hyoscyamine-6 $\beta$ -hydroxylase (h6h) from *Hyoscyamus niger* in *Nicotiana tabacum*. *Plant Science* 162: 905-913.
83. Rocha, P. (2004). Conceptos básicos en biotecnología de la palma de aceite. *Palmas*, 25(especial): 11-17.

84. Rocha, P. (2006). Biotecnología en Plantas Medicinales y Aromáticas. En: II Segundo Congreso Internacional De Plantas Medicinales y Arómicas. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira
85. San Feliz, A. (1988). Monografía de Otavalo. Otavalo: Instituto Otavaleño de Antropología. Centro Regional de Investigación. Volúmen I. pp 30 – 45
86. Sánchez, J. (2005). Aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* productora de Beta-Lactamasa de Espectro Extendido (BLEE) en recién nacidos en el Hospital Infantil Dr. Robert Reid Cabral de Santo Domingo, República Dominicana. Extraída el 02 de octubre, 2009, de: <http://www.revista-api.com/4%20edicao%202005/pdfs/mat%2002.pdf>
87. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos. Plan de Desarrollo Región I Esmeraldas - Carchi – Imbabura. Extraído el 18 de abril, 2009, de: <http://www.oas.org/dsd/publications/Unit/oea60s/begin.htm#Contents>
88. Segundo, M.J. (2006). *Candida albicans* un hongo oportunista. Extraído el 17 de enero, 2010, de: [www.vitae.es](http://www.vitae.es)
89. SPSS. (2004). Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). SPSS Base 12.0 User's Guide for Windows. SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA. Extraído el 5 de junio, 2009, de: <http://www.spss.com/spss>

90. Sosa, M. (2006). Tesis Doctoral: Investigación y Caracterización de aceites esenciales de plantas aromáticas ecuatorianas. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Químicas.
91. Thomson, PLM. (2004). Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. Imipenem. México. Extraído el 15 de marzo, 2010, de:  
<http://www.libreriamedica8a.com/productos/2031.htm>
92. Trujillo, V., Guilarte, C. y Pardi, G. (2006). Pruebas Rápidas para la Detección de *Candida albicans* en Cavidad Bucal. Extraído el 05 de julio, 2009 de:  
[http://www.actaodontologica.com/ediciones/2006/3/pruebas\\_rapidas\\_candida\\_albicans.asp](http://www.actaodontologica.com/ediciones/2006/3/pruebas_rapidas_candida_albicans.asp)
93. Villacís, J. (2009). Temas de medicina natural – Fitomedicina.
94. Waterman, PG. (1992). [Citado por Rocha, 2006]. Roles for secondary metabolites in plants. Secondary metabolites: their function and evolution. a. JW. Chadwick, John Wiley & sons. 171: 64-87.

## ANEXOS

### ANEXO A

**Tabulación de los datos obtenidos en la realización de la encuesta de plantas utilizadas como tratamiento o paliativo de enfermedades bucofaríngeas en la comunidad de Peguche - Imbabura**

<b>Planta</b>	<b>Uso medicinal</b>	<b>Parte utilizada</b>	<b>Forma utilizada</b>	<b>Frecuencia de uso</b>
Anís	garganta	toda la planta	Infusión	1
Granadilla	garganta	fruto y hoja	Trituración	2
Toronjil	garganta	toda la planta	Infusión	4
Ataco	garganta	Flor, toda la planta	Infusión	5
Matico	garganta	hoja	Infusión	3
Taraxaco	garganta	hoja	Infusión	2
Manzanilla	garganta	toda la planta	Infusión	10
			Gárgaras	5
Menta	garganta	toda la planta	Infusión	6
			Gárgaras	2
Eucalipto	garganta	hojas	vaporizaciones	7
uña de gato	garganta	hoja	vaporizaciones	2
tomate de árbol	garganta	fruto	Asado	3
Paico	garganta	hoja	Infusión	1
	muelas	hoja	Trituración	1
Limón	muelas	semilla	Trituración	1
	garganta	zumo	Bebida	5
Boldo	garganta	hoja	Infusión	1
Borraja	garganta	hoja	Infusión	2
Ajo	garganta	diente de ajo	bebida + leche + miel	1

Cedrón	muelas	hoja	Trituración	7
Orégano	garganta	toda la planta	Gárgaras	5
Chilca	muelas	hoja	Trituración	1
Pataku-yuyo	muelas	hoja	Trituración	2
	garganta	hoja	Gárgaras	2
Arrayán	garganta	hoja	Gárgaras	3
	muelas	hoja	Trituración	2
Caballo chupa	garganta	toda la planta	Gárgaras	3
	muelas	toda la planta	Trituración	1
Llantén	garganta	hojas	Gárgaras	5
Anís	muelas	toda la planta	Trituración	2
Ataquikiña	garganta	toda la planta	Gárgaras	1
Juyanguilla	muelas	hojas	Trituración	1
	garganta	hojas	trituration + extracto	1
Botoncillo	muelas	flor	Trituración	1
		toda la planta	Gárgaras	1
Higo	garganta	hoja	gárgaras + infusión	1
Naranja	garganta	zumo	Bebida	1
Mora	garganta	hoja	gárgaras + infusión	1
Zambo	garganta	fruto	Bebida	1
		mesocarpio	Trituración	1
Alton Albas	garganta	hojas	Infusión	1
Rucuricaida (Chichicara)	garganta	toda la planta	trituration + extracto	1
Hierba De Cáncer	garganta	toda la planta	Infusión	1
Clavo De Olor	muelas	semilla	Trituración	3
Cebada	garganta	flor	Infusión	1
Choclo	garganta	flor	Infusión	1
Té	garganta	hoja	Gárgaras	2
Hierba Luisa	garganta	hoja	Infusión	3
Judas Scariote	dientes	hoja	trituration + extracto	2
Quinoa Malva	garganta	toda la planta	Infusión	2
Nogal	garganta	hojas	Infusión	1

Sauce	garganta	hojas	Infusión	1
Cachicerraja	garganta	hojas	infusión + leche	1
Marco	garganta	hojas	Infusión	1
Canela	garganta	corteza	infusión + puntas + limón	1
Malva	muelas	flor	Trituración	1
Laurel	garganta	hojas	Gárgaras	1
	aliento	hojas	Gárgaras	1
Trébol	garganta	hojas	Gárgaras	1
Hinojo	garganta	hojas	Gárgaras	1
Cebolla Blanca	muelas	hojas	Trituración	3



## ANEXO B

### Certificado de autenticidad de *Streptococcus mutans* ATCC 25175

<b>Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specifications and Performance Upon Initial Release</b>																																																																									
Specifications	Additional Information																																																																								
Microorganism Name: <i>Streptococcus mutans</i> Catalog Number: 0266 Lot Number: 26613 Reference Number: ATCC® 25175™** Purity: Pure Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 2 Expiration Date: 2010/10	<b>Release Information:</b> Quality Control Technologist: Karla Fjeld Release Date: 2009-02-02 Disclaimer: Last digit(s) of the Lot Number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The actual Lot Number is the first 5 digits of the printed lot number for Catalog #'s of 0999 or less. The actual Lot Numbers for Catalog #'s 01000 and greater are the first 6 digits of the printed lot number.																																																																								
Performance																																																																									
<b>Macroscopic Features:</b> Two colony types; small, circular, dome shaped, entire edge, white and the other is small, circular and translucent.	<b>Medium:</b> SBAP																																																																								
<b>Microscopic Features:</b> Small gram positive cocci to ovoid cells occurring singly, in pairs and predominately in chains	<b>Method:</b> Gram Stain																																																																								
<b>Vitek GP</b>  <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Phenotypic Features</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Results</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>D-AMYGDALIN</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHOLIPASE C</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>D-XYLOSE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>ARGININE DIHYDROLASE 1</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>BETA-GALACTOSIDASE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>ALPHA-GLUCOSIDASE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>CYCLODEXTRIN</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>L-Aspartate ARYLAMIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>BETA GALACTOPYRANOSIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>ALPHA-MANNOSIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>PHOSPHATASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>Leucine ARYLAMIDASE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>L-Proline ARYLAMIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>BETA GLUCURONIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>ALPHA-GALACTOSIDASE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>BETA-GLUCURONIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>Alanine ARYLAMIDASE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>Tyrosine ARYLAMIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>D-SORBITOL</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>UREASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>POLYMXIN B RESISTANCE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>D-GALACTOSE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>D-RIBOSE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>L-LACTATE alkalization</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>LACTOSE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>D-MALTOSE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>BACITRACIN RESISTANCE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>NOVOBIOCIN RESISTANCE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>GROWTH IN 6.5% NaCl</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>D-MANNITOL</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>D-MANNOSE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>METHYL-B-D-GLUCOPYRANOSIDE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> </tbody> </table>	Phenotypic Features	Results	D-AMYGDALIN	+	PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHOLIPASE C	-	D-XYLOSE	-	ARGININE DIHYDROLASE 1	-	BETA-GALACTOSIDASE	+	ALPHA-GLUCOSIDASE	+	Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	-	CYCLODEXTRIN	-	L-Aspartate ARYLAMIDASE	-	BETA GALACTOPYRANOSIDASE	-	ALPHA-MANNOSIDASE	-	PHOSPHATASE	-	Leucine ARYLAMIDASE	+	L-Proline ARYLAMIDASE	-	BETA GLUCURONIDASE	-	ALPHA-GALACTOSIDASE	+	L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	-	BETA-GLUCURONIDASE	-	Alanine ARYLAMIDASE	+	Tyrosine ARYLAMIDASE	-	D-SORBITOL	+	UREASE	-	POLYMXIN B RESISTANCE	+	D-GALACTOSE	+	D-RIBOSE	-	L-LACTATE alkalization	-	LACTOSE	+	N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE	+	D-MALTOSE	+	BACITRACIN RESISTANCE	+	NOVOBIOCIN RESISTANCE	+	GROWTH IN 6.5% NaCl	-	D-MANNITOL	+	D-MANNOSE	+	METHYL-B-D-GLUCOPYRANOSIDE	+	<b>Other Features/Challenges: Results</b>  Catalase (3% Hydrogen Peroxide): negative   <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 10px auto;">                         MEDIBAC INC. DISTRIBUIDOR DE MICROBIOLOGICS GARANTIZA QUE ESTE PRODUCTO Y CERTIFICADOS SON ORIGINALES                          LOTE: _____ EXPIRACION: _____                     </div> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;"> <hr style="width: 100%; border: 0; border-top: 1px solid black;"/>                         AUTHORIZED SIGNATURE                     </div>
Phenotypic Features	Results																																																																								
D-AMYGDALIN	+																																																																								
PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHOLIPASE C	-																																																																								
D-XYLOSE	-																																																																								
ARGININE DIHYDROLASE 1	-																																																																								
BETA-GALACTOSIDASE	+																																																																								
ALPHA-GLUCOSIDASE	+																																																																								
Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	-																																																																								
CYCLODEXTRIN	-																																																																								
L-Aspartate ARYLAMIDASE	-																																																																								
BETA GALACTOPYRANOSIDASE	-																																																																								
ALPHA-MANNOSIDASE	-																																																																								
PHOSPHATASE	-																																																																								
Leucine ARYLAMIDASE	+																																																																								
L-Proline ARYLAMIDASE	-																																																																								
BETA GLUCURONIDASE	-																																																																								
ALPHA-GALACTOSIDASE	+																																																																								
L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	-																																																																								
BETA-GLUCURONIDASE	-																																																																								
Alanine ARYLAMIDASE	+																																																																								
Tyrosine ARYLAMIDASE	-																																																																								
D-SORBITOL	+																																																																								
UREASE	-																																																																								
POLYMXIN B RESISTANCE	+																																																																								
D-GALACTOSE	+																																																																								
D-RIBOSE	-																																																																								
L-LACTATE alkalization	-																																																																								
LACTOSE	+																																																																								
N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE	+																																																																								
D-MALTOSE	+																																																																								
BACITRACIN RESISTANCE	+																																																																								
NOVOBIOCIN RESISTANCE	+																																																																								
GROWTH IN 6.5% NaCl	-																																																																								
D-MANNITOL	+																																																																								
D-MANNOSE	+																																																																								
METHYL-B-D-GLUCOPYRANOSIDE	+																																																																								
<b>Note For Vitek®:</b> 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.																																																																									
<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> </div> <div style="font-size: small;">                         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.                     </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: x-small; margin-top: 5px;"> <span>© 2009 MicroBioLogics, Inc. All Rights Reserved. 217 Osseo Avenue North Saint Cloud, MN 56303</span> <span>DOC.286 REVISION 2008.February.28 dt/ml</span> </div>																																																																									



**Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specifications and Performance Upon Initial Release**

Specifications	Additional Information
Microorganism Name: Streptococcus mutans Catalog Number: 0266 Lot Number: 26613 Reference Number: ATCC® 25175™** Purity: Pure Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 2 Expiration Date: 2010/10	<b>Release Information:</b> Quality Control Technologist: Karla Fjeld Release Date: 2009-02-02 <b>Disclaimer:</b> Last digit(s) of the Lot Number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The actual Lot Number is the first 5 digits of the printed lot number for Catalog #'s of 0999 or less. The actual Lot Numbers for Catalog #'s 01000 and greater are the first 6 digits of the printed lot number.
PULLULAN - D-RAFFINOSE + O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.) + SALICIN + SACCHAROSE/SUCROSE + D-TREHALOSE + ARGININE DIHYDROLASE 2 - OPTOCHIN RESISTANCE +	

**Note For Vitak®:** Although the Vitak® 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.



\* 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.

© 2009 MicroBioLogics, Inc. All Rights Reserved.  
217 Osseo Avenue North Saint Cloud, MN 56303

DOC-286 REVISION 2008 February 28 dt/ml

MEDIBAC INC. DISTRIBUIDOR DE MICROBIO-  
LOGICS GARANTIZA QUE ESTE PRODUCTO  
Y CERTIFICADO SON ORIGINALES  
LOTE: \_\_\_\_\_ EXPIRACION: \_\_\_\_\_

## ANEXO C

### Pruebas bioquímicas

#### **Rojo de metilo - Voges-Proskauer (VP)**

Se utiliza para identificar los diferentes géneros de enterobacterias usando las reacciones de fermentación que se originan por la fermentación de la glucosa. El rojo de metilo es un indicador de pH con un intervalo de viraje entre 6,0 (amarillo) y 4,4 (rojo), que se utiliza para visualizar la producción de ácidos por la vía de fermentación ácido mixto. (Prescott *et al*, 2004)

#### Interpretación

La prueba es positiva si se desarrolla un color rojo estable. Esto indica que la producción de ácido es suficiente para producir el viraje del indicador un color anaranjado, intermedio entre el rojo y el amarillo no es considerado como positivo.

La prueba VP es positiva si se desarrolla un color rojo-fucsia luego de 15 minutos, que indica la presencia de diacetilo, producto de oxidación de la acetoína.

#### **Citrato**

Utilizada para comprobar que es la única fuente de carbono en la identificación de enterobacterias, mediante el crecimiento y la alcalinización del medio. Este aumento de pH se visualiza con el indicador azul de bromotimol que vira al alcalino a pH 7,6. (Prescott *et al*, 2004)

### Interpretación

El ensayo es positivo cuando se observa crecimiento a lo largo de la estría, acompañado o no de un viraje del indicador al azul.

### **LIA (Lysine iron agar)**

Este ensayo permite identificar organismos que producen la descarboxilación o desaminación de la lisina. Durante las primeras etapas de la incubación el fondo virará el indicador de pH del medio al ácido (amarillo) por la fermentación de glucosa. Luego, si el aminoácido es descarboxilado se formarán aminas que provocan un retorno al color original del medio o hacia un viraje al básico (color violeta). (Caffer *et al*, 2007)

### Interpretación

Positiva: Pico violeta/fondo violeta

Negativa: Pico violeta/fondo amarillo

### **Ureasa**

La Urea es una diamida del ácido carbónico que puede ser hidrolizada con liberación de amoníaco y dióxido de carbono. Las enzimas que poseen muchos microorganismos hidrolizan la urea rápidamente. (Prescott *et al*, 2004)

### Interpretación

La coloración rosa intensa, se le considera como positivo.

## **Caldo Malonato**

Se lo utiliza para comprobar si la bacteria lo utiliza como única fuente de carbono. (Gamazo *et al*, 2005) produciendo una reacción alcalina y cambio de color del medio al azul.

## **Agar de Kligler**

Es un medio diferencial complejo, que se utiliza para poder evidenciar las características enzimáticas de las bacterias en aerobiosis y anaerobiosis, produciéndose la fermentación de la glucosa, lactosa y producción de gas en la fermentación. (Gamazo *et al*, 2005).

### Interpretación

Pico rojo/fondo amarillo: el microorganismo solamente fermenta la glucosa.

Pico amarillo/fondo amarillo: El microorganismo fermenta glucosa y lactosa.

Pico rojo/fondo rojo: El microorganismo es no fermentador de azúcares.

La presencia de burbujas, indica que el microorganismo produce gas.

El ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico.

## **Prueba de motilidad**

Esta prueba permite identificar bacterias de acuerdo a su motilidad a la reacción de Indol a la descarboxilación de la ornitina.

## Interpretación

Se considera resultado positivo la presencia de turbidez o crecimiento más allá de la línea de siembra, el resultado negativo constituye el crecimiento solo en la línea de siembra.

La prueba de indol se realiza una vez determinada la movilidad, resultado positivo: color rojo al agregar el reactivo revelador, resultado negativo: el color del reactivo revelador permanece incoloro – amarillento.

## Test de la Optoquina

Determina la sensibilidad de un microorganismo a la optoquina. (Prescott *et al*, 2004)

### Interpretación:

Si el microorganismo es sensible a la optoquina, se observa un halo de inhibición alrededor del disco y se considera como (+)

## Tubo de germinación

Utilizada en la identificación rápida y presuntiva de *Candida albicans* y *Candida stellatoidea*, que son las dos únicas especies del género *Candida* capaces de producir tubos germinales. Es una extensión filamentosa de la levadura, sin estrechamiento en su origen, cuyo ancho suele ser la mitad de la célula progenitora y su longitud tres o cuatro veces mayor que la célula madre (Linares & Solís, 2001)

## ANEXO D

### Preparación de Reactivos

**Reactivo de Wagner:** Disolver 1,27g de yodo y 2g de yoduro de potasio en 20 mL de agua aforar la solución a 100mL con agua destilada.

**Reactivo de Dragendorff:** En un matraz disolver 8g de nitrato de bismuto pentahidratado con 20mL de ácido nítrico. En otro matraz colocar 27,2 g de yoduro de potasio con 50 mL de agua. Mezclar las dos soluciones y dejarlas en reposo durante 24 horas. Decantar la solución y aforar a 100 mL.

**Reactivo de Rosenthaler:** Diluir 1 g de vainillina en 100 mL de etanol

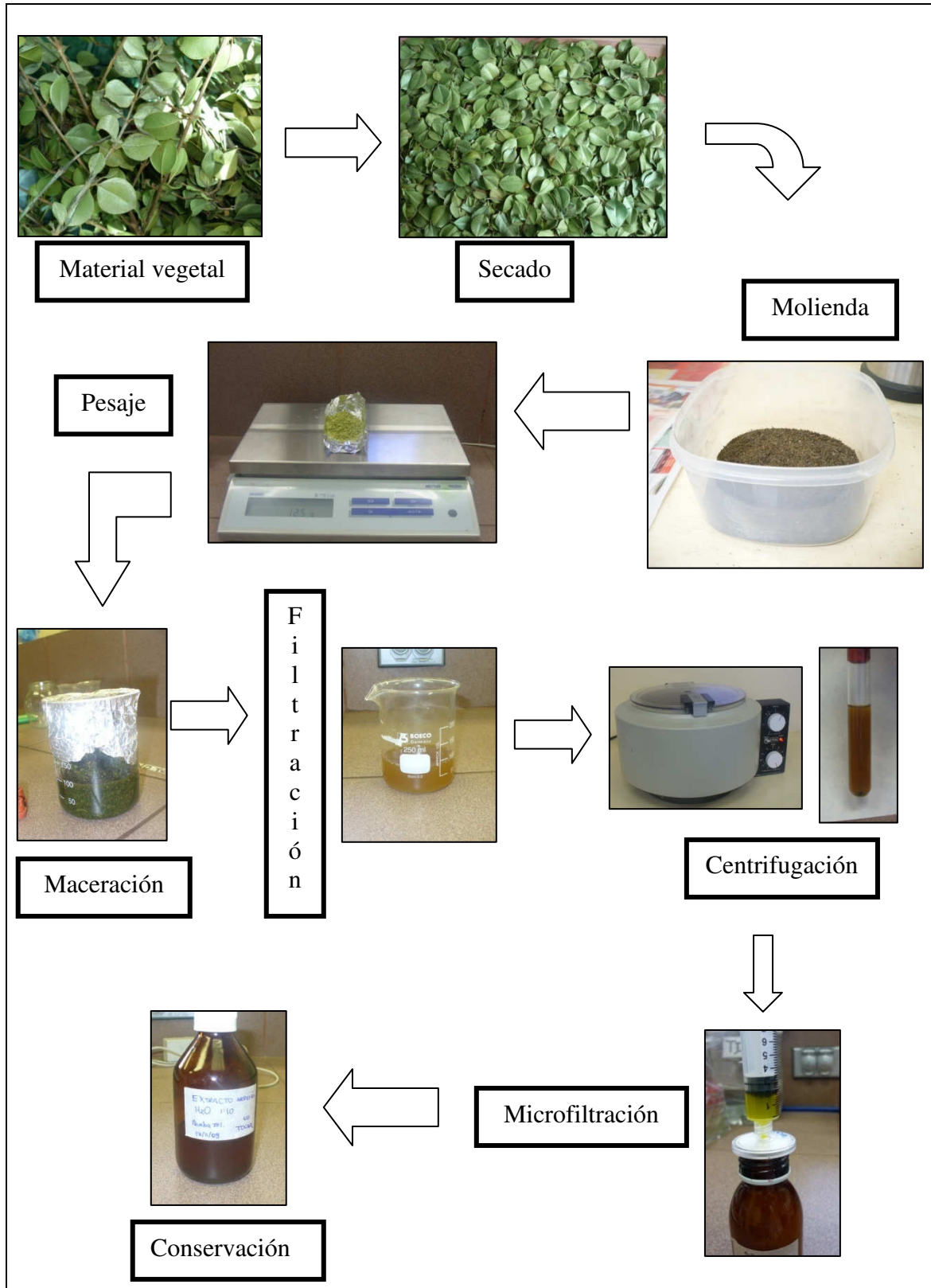
**Cloruro férrico:** Disolver 1,25 g de cloruro férrico en 25 mL de agua y aforar a 50 mL con alcohol metílico.

**Reactivo de gelatina:** 1g de gelatina + 100 ml H<sub>2</sub>O + 10g NaCl

(Ramírez, 2005)

## ANEXO E

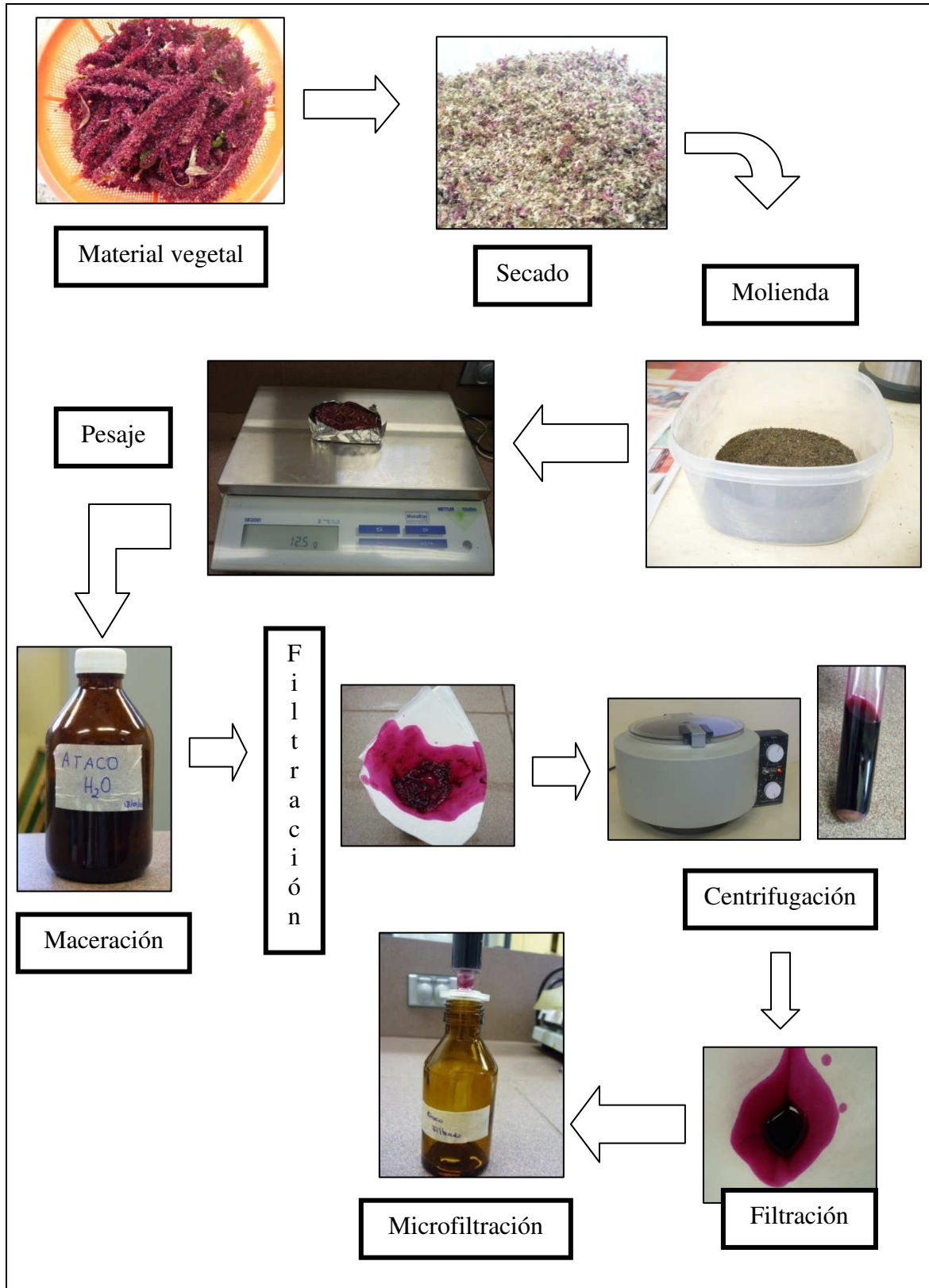
### Preparación del Extracto Acuoso de *Myrcianthes hallii* (arrayán)





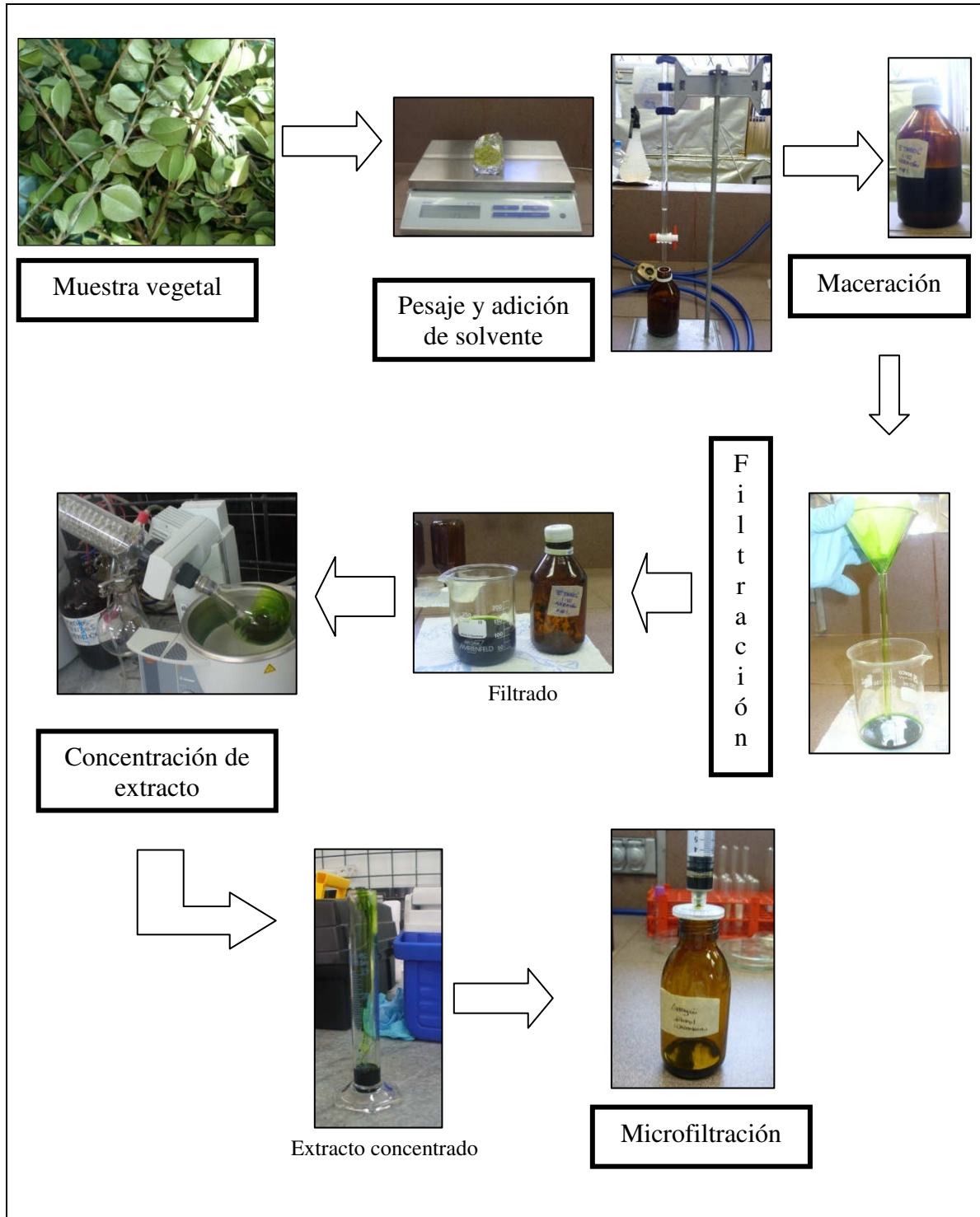
## ANEXO F

### Preparación del Extracto Acuoso de *Amaranthus asplundii* (ataco)



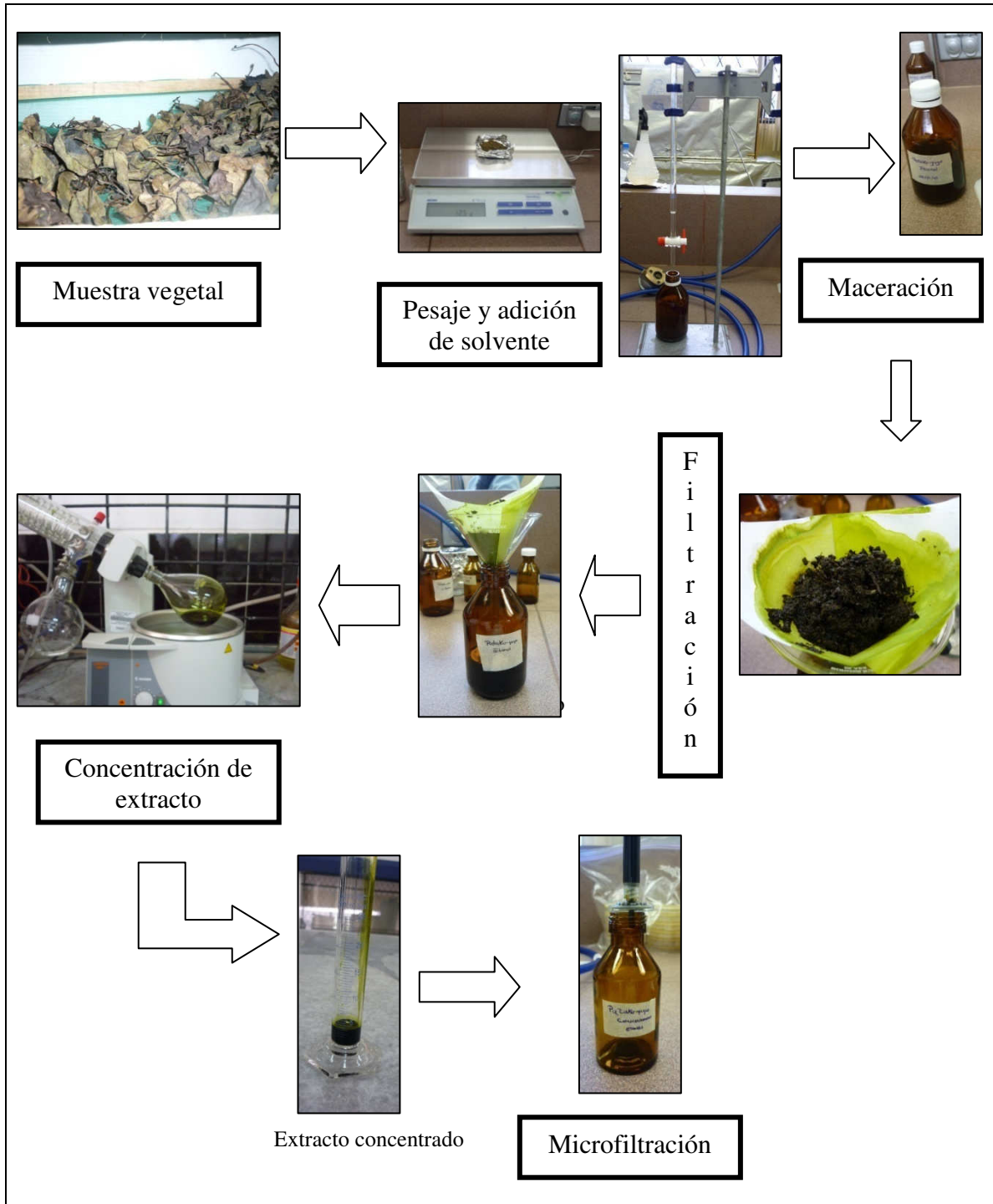
## ANEXO G

### Preparación del Extracto Etanólico de *Myrcianthes hallii* (arrayán)



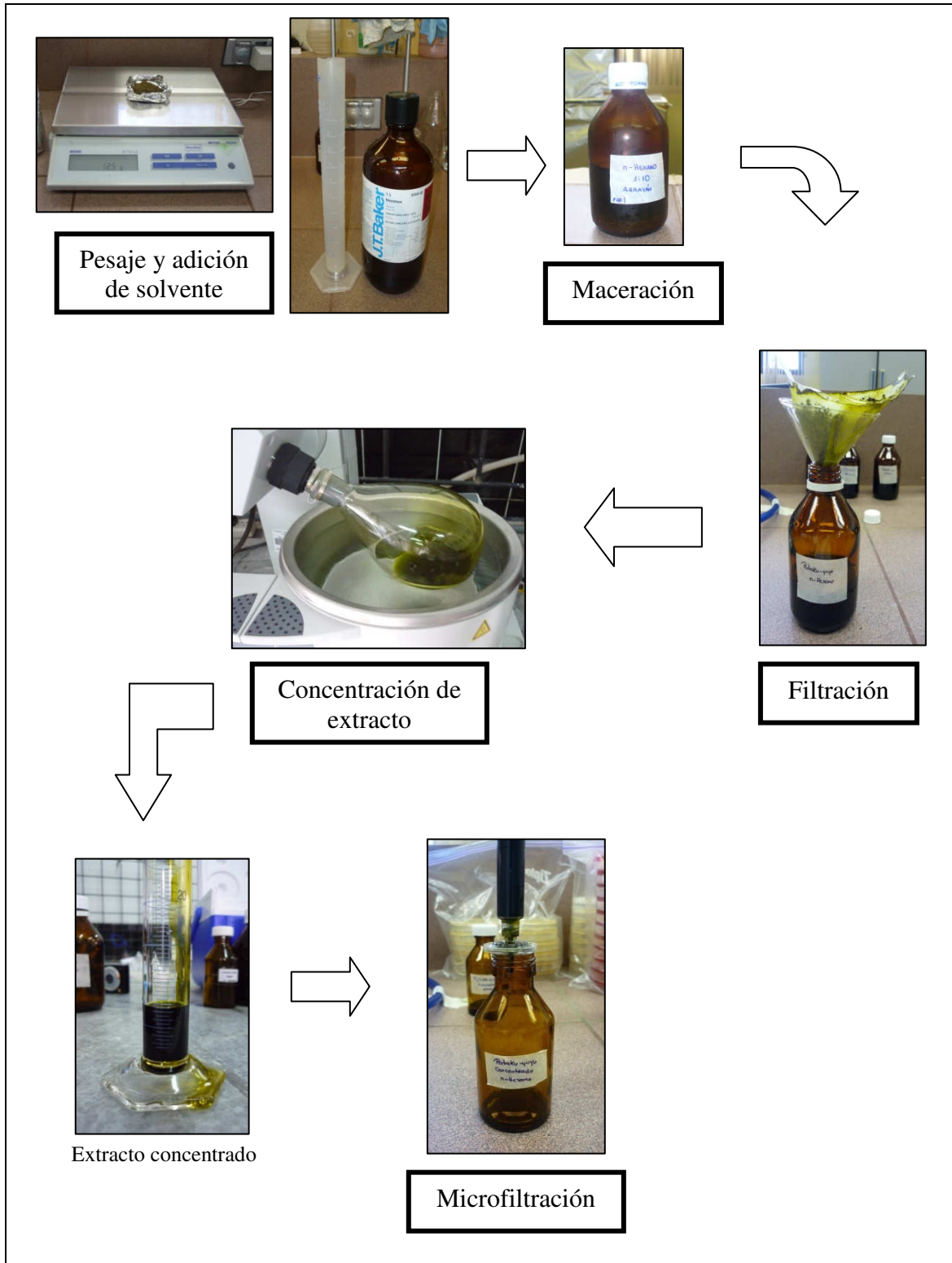
## ANEXO H

### Preparación del Extracto Etanólico de *Peperomia peltigera* (pataku – yuyo)



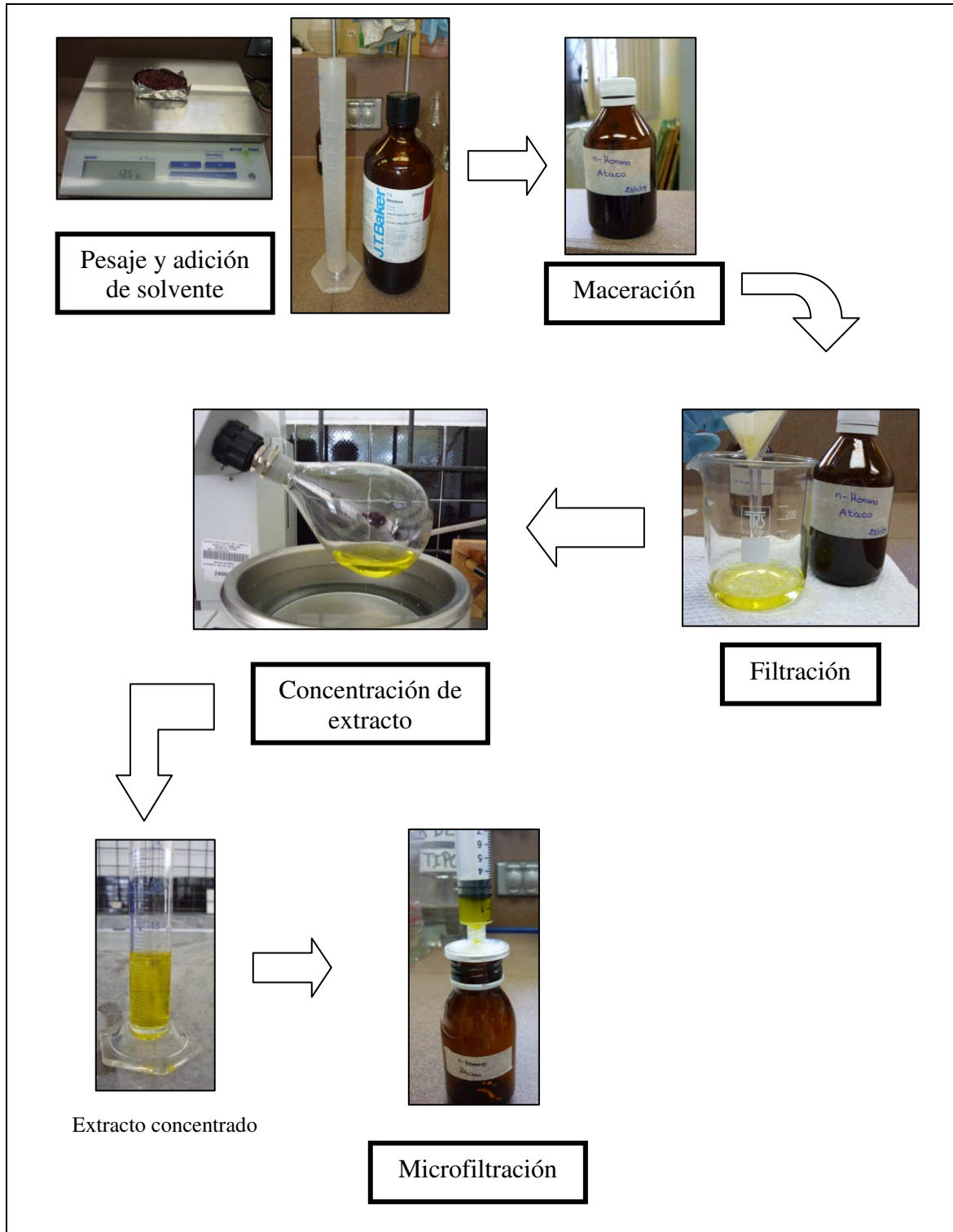
## ANEXO I

### Preparación del Extracto Hexánico de *Peperomia peltigera* (pataku – yuyo)



## ANEXO J

### Preparación del Extracto Hexánico de *Amaranthus asplundii* (ataco)



## ANEXO K

**Estadística descriptiva para todos los factores evaluados a 24 horas (bacterias), 48 horas (levadura)**

Tipo de microorganismo	Tipo de extracto	Concentración extracto	Estado de disco	Media	Desv. típ.	N	
<i>Streptococcus mutans</i>	Arrayán - Agua	25	Disco seco	5,400	,4690	4	
			Disco húmedo	7,200	,7439	4	
		50	Disco seco	7,700	3,1209	4	
			Disco húmedo	11,650	3,6042	4	
		80	Disco seco	8,225	2,6145	4	
			Disco húmedo	12,400	2,7215	4	
		100	Disco seco	7,050	,8021	4	
			Disco húmedo	10,300	2,0396	4	
		Arrayán - Etanol	25	Disco seco	7,875	,5315	4
				Disco húmedo	7,400	1,1225	4
			50	Disco seco	9,425	1,0996	4
				Disco húmedo	9,175	,9912	4
	80		Disco seco	12,875	,9674	4	
			Disco húmedo	12,175	1,6338	4	
	100		Disco seco	10,850	1,6093	4	
			Disco húmedo	12,900	1,5769	4	
	Arrayán - Hexano		25	Disco seco	5,525	,3862	4
				Disco húmedo	6,375	1,3961	4
			50	Disco seco	5,475	,3403	4
				Disco húmedo	6,100	1,3589	4



		80	Disco seco	5,500	,3559	4	
			Disco húmedo	6,025	1,5196	4	
		100	Disco seco	5,550	,4123	4	
			Disco húmedo	5,750	,5568	4	
	Ataco - Agua	25	Disco seco	5,350	,1291	4	
			Disco húmedo	5,925	1,2580	4	
		50	Disco seco	5,500	,4690	4	
			Disco húmedo	11,300	5,0233	4	
		80	Disco seco	9,725	2,4364	4	
			Disco húmedo	10,800	5,0484	4	
		100	Disco seco	5,250	,0577	4	
			Disco húmedo	5,200	,0000	4	
		Ataco - Etanol	25	Disco seco	6,950	1,3128	4
				Disco húmedo	7,825	1,2868	4
			50	Disco seco	7,500	1,0132	4
				Disco húmedo	6,825	1,1730	4
	80		Disco seco	7,100	1,1165	4	
			Disco húmedo	6,825	1,7017	4	
	100		Disco seco	6,075	,1893	4	
			Disco húmedo	6,750	,3317	4	
	Ataco - Hexano		25	Disco seco	5,500	,5354	4
				Disco húmedo	6,550	1,3478	4
		50	Disco seco	6,325	1,3720	4	
			Disco húmedo	6,025	1,0905	4	

		80	Disco seco	6,425	1,4728	4	
			Disco húmedo	7,400	2,2876	4	
		100	Disco seco	6,175	,7274	4	
			Disco húmedo	5,200	,0816	4	
	Pataku - yuyo - Agua	25	Disco seco	5,300	,2000	4	
			Disco húmedo	5,400	,4967	4	
		50	Disco seco	5,425	,2872	4	
			Disco húmedo	5,325	,5852	4	
		80	Disco seco	5,600	,4082	4	
			Disco húmedo	5,175	,0500	4	
		100	Disco seco	5,425	,2754	4	
			Disco húmedo	5,725	,0957	4	
		Pataku - yuyo - Etanol	25	Disco seco	5,550	,1000	4
				Disco húmedo	6,650	,3786	4
			50	Disco seco	5,350	,2517	4
				Disco húmedo	6,525	,3775	4
	80		Disco seco	6,225	,5620	4	
			Disco húmedo	6,350	,1732	4	
	100		Disco seco	7,475	,7136	4	
			Disco húmedo	6,200	,2944	4	
Pataku - yuyo - Hexano	25	Disco seco	5,225	,0957	4		
		Disco húmedo	5,375	,1258	4		
	50	Disco seco	5,250	,1000	4		
		Disco húmedo	5,425	,5188	4		



		80	Disco seco	5,200	,1414	4		
			Disco húmedo	5,175	,0500	4		
		100	Disco seco	5,275	,1893	4		
			Disco húmedo	5,225	,0500	4		
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Arrayán - Agua	25	Disco seco	5,650	,6191	4
					Disco húmedo	7,625	1,2894	4
	50			Disco seco	7,875	4,3370	4	
				Disco húmedo	5,925	1,0404	4	
	80			Disco seco	7,925	4,3277	4	
				Disco húmedo	5,900	,9201	4	
	100	Disco seco	7,975	1,2659	4			
		Disco húmedo	5,650	,4359	4			
Arrayán - Etanol	25	Disco seco	10,550	3,4161	4			
		Disco húmedo	9,500	2,4940	4			
	50	Disco seco	11,625	5,2124	4			
		Disco húmedo	12,525	1,7689	4			
	80	Disco seco	10,850	3,6419	4			
		Disco húmedo	12,700	1,9235	4			
100	Disco seco	5,150	,1291	4				
	Disco húmedo	6,175	1,1354	4				
Arrayán - Hexano	25	Disco seco	5,600	,2160	4			
		Disco húmedo	5,450	,0577	4			
	50	Disco seco	5,500	,0816	4			
		Disco húmedo	6,600	1,0863	4			

		80	Disco seco	5,925	,3096	4	
			Disco húmedo	6,400	1,4445	4	
		100	Disco seco	5,300	,5354	4	
			Disco húmedo	5,050	,0577	4	
	Ataco - Agua	25	Disco seco	9,200	1,0708	4	
			Disco húmedo	5,450	,4509	4	
		50	Disco seco	5,275	,2500	4	
			Disco húmedo	5,550	,4041	4	
		80	Disco seco	5,325	,2872	4	
			Disco húmedo	5,225	,0500	4	
		100	Disco seco	7,850	,5260	4	
			Disco húmedo	7,625	1,9551	4	
		Ataco - Etanol	25	Disco seco	5,050	,0577	4
				Disco húmedo	5,125	,1500	4
			50	Disco seco	5,075	,0957	4
				Disco húmedo	5,200	,2828	4
	80		Disco seco	5,900	,3162	4	
			Disco húmedo	5,825	,2986	4	
	100		Disco seco	6,650	1,2124	4	
			Disco húmedo	7,400	1,5055	4	
	Ataco - Hexano		25	Disco seco	5,225	,1500	4
				Disco húmedo	5,300	,0000	4
		50	Disco seco	5,400	,2944	4	
			Disco húmedo	5,375	,0957	4	
80		Disco	5,350	,2887	4		

			seco				
			Disco húmedo	6,625	,7932	4	
		100	Disco seco	5,200	,1414	4	
			Disco húmedo	5,125	,1500	4	
	Pataku - yuyo - Agua	25	Disco seco	5,200	,0816	4	
			Disco húmedo	5,200	,0000	4	
		50	Disco seco	5,625	,5439	4	
			Disco húmedo	6,925	,9500	4	
		80	Disco seco	5,625	,3403	4	
			Disco húmedo	6,025	,5679	4	
		100	Disco seco	6,575	,2872	4	
			Disco húmedo	5,450	,1915	4	
		Pataku - yuyo - Etanol	25	Disco seco	5,500	,6000	4
				Disco húmedo	5,900	,8367	4
			50	Disco seco	5,075	,0957	4
				Disco húmedo	5,175	,3500	4
	80		Disco seco	6,175	1,4886	4	
			Disco húmedo	5,125	,0957	4	
	100		Disco seco	5,175	,1258	4	
			Disco húmedo	5,050	,1000	4	
	Pataku - yuyo - Hexano	25	Disco seco	5,275	,2062	4	
			Disco húmedo	5,300	,0000	4	
		50	Disco seco	5,175	,2363	4	
			Disco húmedo	5,300	,0816	4	
80		Disco seco	5,350	,2887	4		

			Disco húmedo	5,300	,0000	4	
		100	Disco seco	5,150	,1915	4	
			Disco húmedo	5,300	,2160	4	
<i>Candida albicans</i>	Arrayán - Agua	25	Disco seco	6,175	,8302	4	
			Disco húmedo	6,525	1,0308	4	
		50	Disco seco	5,350	,5745	4	
			Disco húmedo	6,425	1,2971	4	
		80	Disco seco	5,875	1,0500	4	
			Disco húmedo	6,300	,7348	4	
		100	Disco seco	5,225	,2062	4	
			Disco húmedo	5,225	,2062	4	
		Arrayán - Etanol	25	Disco seco	8,600	1,6833	4
				Disco húmedo	9,600	2,1894	4
			50	Disco seco	7,625	2,0903	4
				Disco húmedo	12,525	1,4315	4
	80		Disco seco	13,775	4,0730	4	
			Disco húmedo	11,825	1,4385	4	
	100		Disco seco	8,950	1,3478	4	
			Disco húmedo	13,100	1,4213	4	
	Arrayán - Hexano		25	Disco seco	5,325	,1500	4
				Disco húmedo	5,275	,0500	4
			50	Disco seco	5,275	,0500	4
				Disco húmedo	5,300	,0816	4

		80	Disco seco	5,275	,0500	4	
			Disco húmedo	5,300	,0816	4	
		100	Disco seco	5,375	,0500	4	
			Disco húmedo	5,325	,0500	4	
	Ataco - Agua	25	Disco seco	5,000	,0000	4	
			Disco húmedo	5,025	,0500	4	
		50	Disco seco	5,050	,0577	4	
			Disco húmedo	5,725	,8382	4	
		80	Disco seco	5,025	,0500	4	
			Disco húmedo	9,250	,6758	4	
		100	Disco seco	5,250	,1732	4	
			Disco húmedo	6,425	,7588	4	
		Ataco - Etanol	25	Disco seco	5,150	,1732	4
				Disco húmedo	6,725	,4646	4
			50	Disco seco	5,100	,1414	4
				Disco húmedo	8,075	1,6153	4
	80		Disco seco	5,150	,1732	4	
			Disco húmedo	8,725	2,7305	4	
	100		Disco seco	7,475	1,6460	4	
			Disco húmedo	9,050	1,3026	4	
	Ataco - Hexano		25	Disco seco	5,150	,1732	4
				Disco húmedo	5,425	,3862	4
		50	Disco seco	5,225	,1500	4	
			Disco húmedo	5,725	,1500	4	

		80	Disco seco	5,225	,1708	4
			Disco húmedo	5,600	,5715	4
		100	Disco seco	5,275	,1500	4
			Disco húmedo	5,575	,3304	4
	Pataku - yuyo - Agua	25	Disco seco	5,375	,0500	4
			Disco húmedo	5,225	,0500	4
		50	Disco seco	5,300	,0816	4
			Disco húmedo	5,325	,1258	4
		80	Disco seco	5,350	,1291	4
			Disco húmedo	5,350	,1291	4
		100	Disco seco	5,350	,0577	4
			Disco húmedo	5,325	,0500	4
	Pataku - yuyo - Etanol	25	Disco seco	5,875	,5737	4
			Disco húmedo	6,725	,8732	4
		50	Disco seco	5,950	,5000	4
			Disco húmedo	8,175	1,9033	4
		80	Disco seco	5,375	,0957	4
			Disco húmedo	7,700	,7118	4
		100	Disco seco	7,225	1,2038	4
			Disco húmedo	8,125	1,9190	4
Pataku - yuyo - Hexano	25	Disco seco	5,550	,5066	4	
		Disco húmedo	5,350	,1000	4	
	50	Disco seco	5,700	,5354	4	
		Disco húmedo	5,975	,2062	4	

		80	Disco seco	6,200	,6683	4
			Disco húmedo	6,750	1,0344	4
		100	Disco seco	5,500	,7071	4
			Disco húmedo	5,325	,3775	4