



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

“Determinación de la actividad antibacteriana de extractos de plantas medicinales frente a *Enterococcus faecalis*.”

**Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Bioquímico
farmacéutico**

Autores:

Oliver José Ramírez Condoy

CI: 0106422645

ojrc95@gmail.com

Fanny Marcela Redrován Berrezueta

CI: 0105918973

fanny.redrovan94@gmail.com

Directora:

Dra. María de Lourdes Jerves Andrade MgT.

CI: 0101660579

maria.jerves@ucuenca.edu.ec

Cuenca – Ecuador

22 de octubre del 2021

**RESUMEN (ABSTRACT)**

Enterococcus faecalis es un microorganismo considerado como agente etiológico de diferentes procesos infecciosos, tales como: infecciones de la piel, osteomielitis, neumonía, infecciones del tracto urinario, endocarditis, infecciones de heridas, entre otros, siendo los pacientes hospitalizados una población más vulnerable a esta bacteria. El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos metanólicos y clorofórmicos de las plantas *Peperomia galioides*, *Otholobium mexicanum*, *Zingiber officinale* y *Rosmarinus officinalis* frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 (resistente a la vancomicina) y una cepa clínica de *Enterococcus faecalis* aplicando la técnica de microdilución, la cuál es una técnica de ensayo que permite valorar la sensibilidad *in vitro* de las bacterias frente a agentes antimicrobianos, y teniendo en cuenta que los principios activos de ciertas plantas al ser extraídos con diferentes solventes son capaces de inhibir el crecimiento bacteriano, se evaluó esta bioactividad. Según la literatura revisada las plantas mencionadas previamente presentan metabolitos secundarios capaces de inhibir a microorganismos gram positivos. La actividad antibacteriana se calculó para ser expresada como IC50 e IC90. Los resultados revelaron que los extractos de *Otholobium mexicanum* fueron los más activos seguido de los de *Peperomia galioides* y un extracto de *Rosmarinus officinalis* mientras que ninguno de los extractos de *Zingiber officinale* presentaron actividad antibacteriana a las concentraciones probadas frente a las cepas utilizadas. Dada la actividad significativa de algunos extractos, los resultados obtenidos podrían servir de base para futuros estudios con el fin de su probable utilización en productos naturales.

Palabras clave: Actividad antibacteriana *in vitro*. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 resistente a la vancomicina. IC50. IC90. Microdilución.



ABSTRACT

Enterococcus faecalis is a microorganism considered as an etiological agent of different infectious processes, such as: skin infections, osteomyelitis, pneumonia, urinary tract infections, endocarditis, wound infections, among others, hospitalized patients being a more vulnerable population to this bacterium. The objective of the present study was to evaluate the *in vitro* antibacterial activity of the methanolic and chloroformic extracts of the plants *Peperomia galioides*, *Otholobium mexicanum*, *Zingiber officinale* and *Rosmarinus officinalis* against *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecalis* 51299 and a ATCC 51299 (resistant to vancomycin), *Enterococcus faecalis* clinic strain applying the microdilution technique, which is a test technique that allows assessing the *in vitro* sensitivity of bacteria against antimicrobial agents, and taking into account that the active principles of certain plants when extracted with different solvents are capable of inhibiting bacterial growth, this bioactivity was evaluated. According to the literature reviewed, the previously mentioned plants present secondary metabolites capable of inhibiting gram-positive microorganisms. Antibacterial activity was calculated to be expressed as IC50 and IC90. The results revealed that the extracts of *Otholobium mexicanum* were the most active, followed by those of *Peperomia galioides* and an extract of *Rosmarinus officinalis*, while none of the extracts of *Zingiber officinale* showed antibacterial activity at the concentrations tested against the strains used.

Given the significant activity of some extracts, the results obtained could serve as the basis for future studies with the aim of their probable use in natural products.

Keywords: *In vitro* antibacterial activity. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 resistant to vancomycin. IC50. IC90. Microdilution.



CONTENIDO

CAPÍTULO 1.....	1
1.1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.2. IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.....	1
1.3. JUSTIFICACIÓN.....	2
1.4. HIPÓTESIS.....	3
1.5. OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS	3
CAPÍTULO 2.....	4
MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. BACTERIAS.....	4
2.1.1. Definición.....	4
2.1.2. Resistencia bacteriana.....	4
2.1.3. Género <i>Enterococcus</i>	5
2.1.3.1. <i>Enterococcus faecalis</i>	6
2.1.4. <i>Enterococcus faecalis</i> resistente a los antibióticos.....	7
2.1.4.1. Resistencia a los aminoglucósidos.....	7
2.1.4.2. Resistencia a la vancomicina.....	7
2.1.4.3. Resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol.....	8
2.1.5. Prevalencia de <i>Enterococcus spp.</i>	9
2.2. MEGA DIVERSIDAD DE FLORA EN EL ECUADOR	9
2.3. PLANTAS MEDICINALES.....	10
2.3.1. Congona	10
2.3.2. Trinitaria.....	11
2.3.3. Jengibre	12
2.3.4. Romero.....	13
2.4. EXTRACTOS VEGETALES Y MEDICINALES.	14
2.4.1 Definición.....	14



2.4.2. Extractos con actividad antibacteriana.....	14
2.4.3. Extracción	15
2.4.3.1. Métodos de obtención de extractos vegetales	15
2.4.3.1.1. Maceración	15
2.4.3.1.2. Percolación	15
2.4.3.1.3. Digestión	16
2.4.3.1.4. Infusión y decocción	16
2.4.4. Métodos para evaluar la actividad antibacteriana de los extractos.....	16
2.4.4.1. Método de difusión en disco.	16
2.4.4.2. Método de microdilución	17
2.4.4.3. Método de macrodilución.....	17
2.4.4.4. Método de bioautografía	18
CAPÍTULO 3.....	19
3.1 METODOLOGÍA DE TRABAJO	19
3.1.1. Recolección	20
3.1.2. Lavado y Secado.....	21
3.1.3. Desecación	21
3.1.4. Troceado.....	22
3.1.5. Preparación de los extractos.....	22
3.1.5.1. Humectación.....	23
3.1.5.2. Maceración	23
3.1.5.3. Percolación	24
3.1.5.4. Concentración del extracto.....	25
3.1.5.4.1. Extractos metanólicos	26
3.1.5.4.2. Extractos clorofórmicos	28



3.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS FRENTE A LAS DIVERSAS CEPAS DE <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i>	29
3.2.1 Elaboración del cryostock.....	29
3.2.2. PREPARACIÓN DE LOS CONTROLES DE ANTIMICROBIANO	31
3.2.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES.....	31
3.2.3.1. Preparación de los extractos.....	31
3.2.3.2. Preparación de la placa de dimetilsulfóxido (DMSO).....	31
3.2.3.3. Preparación de la placa de agua.....	32
3.2.3.4. Preparación de la placa test	32
CAPÍTULO 4.....	34
RESULTADOS Y DISCUSIONES	34
4.1. Obtención, reactivación y verificación de la cepa clínica	34
4.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana	35
4.2.1. Extractos metanólicos	35
4.2.2. Extractos clorofórmicos	36
4.2.1. Actividad antibacteriana	37
4.3. Control de antibióticos.....	44
4.4. Rendimientos.....	44
CAPÍTULO 5	47
5.1. CONCLUSIONES.....	47
5.2. RECOMENDACIONES.....	48
BIBLIOGRAFÍA.....	49
ANEXO 1. Certificado de identificación taxonómica de las plantas medicinales utilizadas en la presente investigación.	54
ANEXO 2. Porcentajes de inhibición de los extractos clorofórmicos de las plantas medicinales frente a <i>E. faecalis</i> ATCC 29212.....	55



ANEXO 3. Cálculo e interpretación de IC50 e IC90 de los extractos clorofórmicos de las plantas medicinales frente a <i>E. faecalis</i> ATCC 29212.....	56
ANEXO 4. Porcentajes de inhibición de los extractos clorofórmicos de las plantas medicinales frente a <i>E. faecalis</i> ATCC 51299.....	57
ANEXO 5. Cálculo e interpretación de IC50 e IC90 de los extractos clorofórmicos de las plantas medicinales frente a <i>E. faecalis</i> ATCC 51299.....	58
ANEXO 6. Porcentajes de inhibición de los extractos clorofórmicos de las plantas medicinales frente a <i>E. faecalis</i> (cepa clínica).....	59
ANEXO 7. Cálculo e interpretación de IC50 e IC90 de los extractos clorofórmicos de las plantas medicinales frente a <i>E. faecalis</i> (cepa clínica).....	60
ANEXO 8. Porcentajes de inhibición de los extractos metanólicos de las plantas medicinales frente a <i>E. faecalis</i> ATCC 29212.....	61
ANEXO 9. Cálculo e interpretación de IC50 e IC90 de los extractos metanólicos de las plantas medicinales frente a <i>E. faecalis</i> ATCC 29212.....	62
ANEXO 10. Porcentajes de inhibición de los extractos metanólicos de las plantas medicinales frente a <i>E. faecalis</i> ATCC 51299.....	63
ANEXO 11. Cálculo e interpretación de IC50 e IC90 de los extractos metanólicos de las plantas medicinales frente a <i>E. faecalis</i> ATCC 51299.....	64
ANEXO 12. Porcentajes de inhibición de los extractos metanólicos de las plantas medicinales frente a <i>E. faecalis</i> (cepa clínica).....	65
ANEXO 13. Cálculo e interpretación de IC50 e IC90 de los extractos metanólicos de las plantas medicinales frente a <i>E. faecalis</i> (cepa clínica).....	66
ANEXO 14. Diámetro de zona y puntos de corte frente a <i>Enterococcus</i> spp. (CLSI 2021).....	67
ANEXO 15. Control de antibióticos para la cepa de <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212.	68
ANEXO 16. Control de antibióticos para la cepa de <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299.	69
ANEXO 17. Control de antibióticos para la cepa clínica de <i>Enterococcus faecalis</i>	70
ANEXO 18. Fórmula para el cálculo de porcentaje de inhibición.	71



ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1 Mapa esquemático de la transposición Tn1546 de <i>Enterococcus</i> spp. (Jawetz et al., 2016).....	8
Ilustración 2 Congona, <i>Peperomia galioides</i> . Fuente: Propiedad de los autores.	11
Ilustración 3 Trinitaria, <i>Otholobium mexicanum</i> . Fuente: Propiedad de los autores.	12
Ilustración 4 Jengibre, <i>Zingiber officinale</i> Fuente: Propiedad de los autores.	13
Ilustración 5 Romero, <i>Rosmarinus officinalis</i> L. Fuente: Propiedad de los autores.....	14
Ilustración 6 Procedimiento para la obtención de extractos clorofórmicos y metanólicos. Fuente: Propiedad de los autores.....	19
Ilustración 7 Proceso de secado Fuente: Propiedad de los autores.	21
Ilustración 8 PLACA TEST: Distribución de los extractos obtenidos en la placa de test, más el control de sensibilidad al antibiótico, control de esterilidad del medio y control de viabilidad de la cepa. Fuente: Propiedad de los autores.	33
Ilustración 9 Tinción de Gram; Positivo para <i>Enterococcus faecalis</i> . Fuente: Propiedad de los autores.....	34
Ilustración 10 Gráfica de actividad antibacteriana IC 50 de <i>Otholobium mexicanum</i> . Fuente: propiedad de los autores.....	41
Ilustración 11 Gráfica de actividad antibacteriana IC 50 de <i>Peperomia galioides</i> . Fuente: propiedad de los autores	42
Ilustración 12 Comparación de los valores de IC50 de diferentes extractos de las plantas medicinales utilizadas en la presente investigación. Fuente: Propiedad de los autores ..	43



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Recolección y transporte de las plantas a estudiar.	21
Tabla 2 Concentración de microorganismos en las diluciones.	30
Tabla 3 Identificación de la cepa clínica facilitada por el laboratorio Dra. Sonia Domínguez.	34
Tabla 4 Clasificación de la actividad antibacteriana de los extractos de plantas medicinales para su interpretación (Jerves et al., 2014).	35
Tabla 5 IC50 - IC90 ($\mu\text{g/mL}$). Efecto de los extractos metanólicos de plantas medicinales frente a <i>Enterococcus</i> cepa clínica y cepas de referencia ATCC.	36
Tabla 6 IC50 - IC90 ($\mu\text{g/mL}$). Efecto de los extractos clorofórmicos de plantas medicinales frente a <i>Enterococcus faecalis</i> cepa clínica, y cepas de referencia ATCC.	37



Cláusula de Propiedad Intelectual

OLIVER JOSÉ RAMÍREZ CONDOY, autor/a del trabajo de titulación "Determinación de la actividad antibacteriana de extractos de plantas medicinales frente a *Enterococcus faecalis*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 22 de octubre del 2021

Oliver José Ramírez Condoy

C.I: 0106422645



Cláusula de Propiedad Intelectual

FANNY MARCELA REDROVÁN BERREZUETA, autor/a del trabajo de titulación "Determinación de la actividad antibacteriana de extractos de plantas medicinales frente a *Enterococcus faecalis*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 22 de octubre del 2021

Fanny Marcela Redrován Berrezueta

C.I: 0105918973



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

FANNY MARCELA REDROVÁN BERREZUETA en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "**Determinación de la actividad antibacteriana de extractos de plantas medicinales frente a *Enterococcus faecalis***", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 22 de octubre del 2021

Fanny Marcela Redrován Berrezueta

C.I: 0105918973



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

OLIVER JOSÉ RAMÍREZ CONDOY en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "**Determinación de la actividad antibacteriana de extractos de plantas medicinales frente a *Enterococcus faecalis*.**", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 22 de octubre del 2021

Oliver José Ramírez Condoy

C.I: 0106422645



DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a Dios que ha estado presente en cada paso que he dado, guiando siempre mi camino y dándome la fortaleza para siempre seguir adelante.

A mis padres Franklin y Dolores, quienes son mi mayor fuente de inspiración, les doy mi agradecimiento más profundo y especial por haberme brindado su amor y apoyado incondicionalmente toda su vida; no hubiera llegado hasta este punto de no haber sido por ustedes y por ello siempre estaré agradecido con Dios y la vida.

A mis hermanas y hermano Diana, Génesis y Samuel, que me alegran todos los días y me impulsan a seguir adelante y dar lo mejor de mí, les deseo lo mejor y que cumplan todas sus metas y propósitos. Siempre podrán contar conmigo.

De igual manera a mis abuelitos y tíos porque también han sido parte de mi desarrollo personal y profesional y siempre han estado a mi lado en este caminar.

Y a mis amigos, en especial a mi mejor amiga y compañera de tesis, Marcela, por apoyarme y estar junto a mi durante mi trayecto por la Universidad, trabajo de integración curricular y vida personal.

Estoy muy agradecido de poder compartir este logro con todos ustedes y espero que estén muy orgullosos de mí.

Oliver



DEDICATORIA

El presente trabajo va dedicado a Dios por haber sido luz en medio de mi tempestad, porque a pesar de haberme tropezado un millón de veces me tendió la mano para levantarme bendiciéndome de mucha sabiduría y fortaleza para poder continuar.

A mi padre, Miguel Redrován quien me ha brindado su apoyo y me ha enseñado que con sacrificio y esfuerzo se logra hasta lo imposible.

A mi madre, Zoila Berrezueta quien en todo momento fue pilar fundamental para que logre cada uno de mis sueños y metas, una madre amorosa y luchadora, quien a pesar de haber sentido perderme me ayudó a regresar y ver que después de años de tormenta, el sol puede volver a brillar.

A mis hermanas, Gabriela y Daniela, que son parte importante de mi desarrollo personal, que siempre han creído en mi y me han impulsado a no rendirme jamás, a ellas les deseo lo más bonito de la vida, que logren cada meta y que sepan todos los sueños por más locos que parezcan son posibles.

A mi hijo, Joaquín Nicolás, por el cual día a día lucho continuamente por ser una mejor persona, por conseguir cada meta propuesta, por enseñarle que, aunque sea difícil todo es posible, aquel que sin saber me salvo la vida, le doy gracias a Dios por la fortuna de ser su madre.

A mi esposo, Danny Urgiles, por ser mi compañero de vida y apoyo incondicional.

Un especial agradecimiento a mis mejores amigos Oliver Ramírez y Kevin Quindil con quien hemos pasado buenos y malos momentos a lo largo de toda nuestra carrera universitaria, y en nuestra vida diaria, por extenderme una mano sincera en momentos difíciles de mi vida, siempre los llevaré en mi corazón.

Marcela



AGRADECIMIENTOS:

El presente trabajo va dirigido con expresión de gratitud.

A nuestros padres, Franklin y Dolores; Miguel y Zoila, por su apoyo permanente, por llevarnos por el camino de la superación, exigirnos y motivarnos a diario, con el objetivo de alcanzar nuestras metas y ser profesionales de calidad.

A nuestra tutora la Dra. María de Lourdes Jerves por su paciencia, esfuerzo y constancia, por habernos guiado a lo largo de la realización de este trabajo, gracias por su conocimiento y experiencia.

Al departamento de investigación de plantas medicinales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, quienes nos abrieron sus puertas y nos brindaron su ayuda y conocimiento a lo largo de la realización de la presente investigación.

Estamos agradecidos por compartir este logro con ustedes, esperando se sientan orgullosos.

Oliver y Marcela

CAPÍTULO 1

1.1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la prevalencia de enfermedades ocasionadas por microorganismos patógenos se ha convertido en una preocupación generalizada dentro del ámbito médico-científico; dado que constituye un riesgo inminente para la Salud Pública, es por ello que a través de ensayos, métodos o técnicas científicas se procura descubrir por medio de las fuentes naturales compuestos bioactivos que inhiban el crecimiento bacteriano (Cantón & Ruíz, 2013).

Desde tiempos ancestrales el ser humano ha encontrado en la naturaleza soluciones a un sin número de afecciones, dolencias o patologías utilizando plantas medicinales y nutraceuticas. En la actualidad muchos de los tratamientos con los antibióticos habituales no han presentado buenos resultados al momento de combatir contra bacterias potencialmente patógenas y de origen nosocomial, esto se debe a la multidrogoresistencia que han generado mediante diversos mecanismos genéticos los microorganismos para garantizar su supervivencia (Gallegos, 2016).

Se ha podido evidenciar que los compuestos bioactivos que presentan las plantas pueden resultar como una alternativa bastante eficiente y eficaz frente a bacterias patógenas de interés. En el Ecuador se encuentran numerosas especies nativas e introducidas, siendo un término adecuado para denominar a este país como megadiverso, por ser un territorio con una alta riqueza en recursos vegetales a nivel mundial, las mismas que pueden contribuir a la salud humana para aliviar diferentes dolencias (Segovia et al., 2015).

Esta investigación ha generado información etnobotánica sobre la actividad antibacteriana de cuatro plantas presentes en el territorio ecuatoriano, *Peperomia galioides*, *Otholobium mexicanum*, *Zingiber officinale* y *Rosmarinus officinalis* frente a una bacteria de interés *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) por su alta resistencia al tratamiento antibacteriano habitual e inclusive presentando genes de alta resistencia a uno de los antibióticos de última línea como es el caso de la vancomicina.

1.2. IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

El género *Enterococcus* incluye varias especies, *E. faecalis* es una de ellas y también un patógeno nosocomial importante en la actualidad. *E. faecalis* puede dar lugar a cuadros de bacteriemia, endocarditis, infecciones urinarias, tejidos blandos, heridas, etc. (Reyes & Jerves, 2017).

La resistencia a antibióticos surgió con el inicio de la terapia antimicrobiana como un medio de supervivencia y adaptación; las bacterias capaces de provocar infecciones han generado diferentes mecanismos de resistencia, entre ellos tenemos a: bombas de eflujo que expulsan del citoplasma a las sustancias atacantes, enzimas que hidrolizan los antibióticos y expresión de nuevas proteínas de membrana (Reyes & Jerves, 2017).

La resistencia que puede presentar *E. faecalis* puede ser intrínseca (desarrollada naturalmente sin haber estado expuesto previamente a un antibiótico) o adquirida. Se ha evidenciado resistencia intrínseca a antibióticos como penicilinas, clindamicina, trimetoprim-sulfametoxazol y cefalosporinas. Las resistencias adquiridas pueden darse con todos los antibacterianos restantes y esto es debido a mutaciones o genes adquiridos a través de plásmidos o transposones. La aparición de cepas resistentes a glucopéptidos como vancomicina y teicoplanina representan un gran problema en el tratamiento de *E. faecalis* ya que son antibióticos frecuentemente utilizados como última alternativa para enterococos multirresistentes y esto limita las opciones terapéuticas para las infecciones causadas por esta bacteria (Reyes & Jerves, 2017).

1.3. JUSTIFICACIÓN

A través de las generaciones las plantas medicinales han sido de gran importancia para la humanidad pues su mayor aplicación se refiere al tratamiento y alivio de varias enfermedades. Es por ello que hoy en día el estudio científico de las plantas medicinales y su utilidad es completamente pertinente para resolver algunos problemas de salud (Cosme, 2008).

En particular este tipo de plantas son fuente de productos naturales con actividades biológicas, lo que ha generado un gran interés dentro de diferentes ramas de la salud para extraer estos productos y así estudiar su composición química, diferentes bioactividades y aplicaciones, entre una de ellas la capacidad antibacteriana (Tituaña et al., 2018).

El impacto científico de la presente investigación es aportar con información sobre la actividad antibacteriana de los extractos hidrofílicos y lipofílicos de las plantas *Peperomia galioides*, *Otholobium mexicanum*, *Zingiber officinale* y *Rosmarinus officinalis* frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecalis* resistente a la vancomicina ATCC 51299 y cepa clínica de *Enterococcus faecalis*, que posiblemente en un futuro sirvan de base para el estudio de nuevas alternativas en el tratamiento de

infecciones causadas por esta bacteria o también ser empleadas en la fabricación de desinfectantes de uso hospitalario.

Se pretende, además, aprovechando la biodiversidad de flora de nuestro país impulsar futuros estudios de plantas medicinales evidenciando científicamente su bioactividad.

Por otro lado, los resultados obtenidos, inciden en la sociedad en general al validar los conocimientos ancestrales mediante técnicas experimentales de la actividad antibacteriana de las plantas estudiadas, fomentando también el uso racional de las mismas.

1.4. HIPÓTESIS

- Los extractos metanólicos y/o clorofórmicos obtenidos de las plantas *Peperomia galioides*, *Otholobium mexicanum*, *Zingiber officinale* y *Rosmarinus officinalis* presentan actividad antibacteriana frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecalis* resistente a la vancomicina ATCC 51299 y cepa clínica de *Enterococcus faecalis*.

1.5. OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos de las plantas *Peperomia galioides*, *Otholobium mexicanum*, *Zingiber officinale* y *Rosmarinus officinalis* frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecalis* resistente a la vancomicina ATCC 51299 y cepa clínica de *Enterococcus faecalis* aplicando la técnica de microdilución.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener los extractos metanólicos y clorofórmicos de las plantas *Peperomia galioides*, *Otholobium mexicanum*, *Zingiber officinale* y *Rosmarinus officinalis*.
- Determinar su actividad antibacteriana.
- Analizar los resultados obtenidos aplicando técnicas bioestadísticas como el cálculo del IC50 e IC90.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1. BACTERIAS

2.1.1. Definición

Son microorganismos unicelulares y los más abundantes en el planeta. Se caracterizan por presentar tamaños entre 0,5 y 5 micras (μm) aproximadamente. Tienen pared celular y se reproducen por un mecanismo denominado bipartición o fisión binaria (Lucana & Huanca, 2014).

Al aplicar la tinción de Gram podemos clasificar a las bacterias en gram positivas y gram negativas mediante el uso de diferentes colorantes como violeta cristal y fucsina o safranina (Lucana & Huanca, 2014).

La diferencia entre estos dos grupos se debe a que la pared celular de las bacterias gram positivas está formada por una gruesa capa de peptidoglicano que les permite retener el colorante violeta cristal, siendo así que cuando se observa estas bacterias al microscopio presentan un color morado o violeta característico, mientras que la pared celular de las bacterias gram negativas no es lo suficientemente gruesa como la de las gram positivas, es decir no pueden retener en gran cantidad el colorante violeta de cristal, por lo que al observarlas al microscopio, se diferencian por su color rosado característico (Mollinedo & González, 2014).

Además, pueden poseer diferentes formas, distinguiéndose tres tipos fundamentales: cocos (de forma esférica), bacilos (en forma de bastoncillo) y formas helicoidales. Dentro de este último grupo se destacan los vibrios (en forma de coma), espirilos (en forma de tirabuzón) y espiroquetas (helicoidal flexible) (Mollinedo & González, 2014).

2.1.2. Resistencia bacteriana

Actualmente, los investigadores advierten sobre un escenario que podría acabar con la humanidad. Las bacterias en las últimas décadas se han adaptado al entorno que las rodea y por ende han evolucionado su capacidad de soportar los antibióticos a un ritmo muy veloz, los antibióticos son sustancias químicas que a partir del descubrimiento de la penicilina han ayudado a salvar muchísimas vidas humanas, permitiendo que la esperanza de vida se extienda 20 años más (Kukso, 2016).

La resistencia a los antibióticos, que puede ser definida como la capacidad de una bacteria para subsistir en concentraciones de antibiótico que evitan el crecimiento de otras de su

misma especie, es realmente un problema grave en el mundo (Alos, 2015). En países en donde el consumo de antibióticos es exagerado las bacterias son más resistentes. En el año 2013 a nivel mundial se produjeron más de 700.000 muertes que fueron atribuidas a la resistencia antibiótica. Se pronostica que para el año 2050 las muertes por resistencia a los antibióticos superen los 10 millones. Se considera que llegará a ser la primera causa de muerte superando al cáncer, es decir morirá una persona cada 3 segundos. La Organización Panamericana de la Salud (OPS) emitió una alerta epidemiológica por la presencia de microorganismos con mecanismos de multidrogoresistencia haciendo mucho más difícil controlar las infecciones de origen bacteriano. Esto se ha generado básicamente por una automedicación indiscriminada e inadecuada, además de que una de las industrias responsables de esta situación es la alimentaria, ya que hay antibióticos hasta en lo que comemos, se dice que el 80% de los tratamientos antibacterianos se utilizan en animales de granja estimulando el crecimiento o evitando posibles infecciones, entre los países que más abusan del uso de los antibióticos en animales tenemos Estados Unidos, Brasil y China (Kukso, 2016).

Por otro lado, las bacterias evolucionan o desarrollan mecanismos de defensa de manera mucho más acelerada en relación al tiempo que le lleva al investigador desarrollar un antibiótico. Se dice que se está entrando en la era post-antibiótica y es inevitable la aparición de resistencia por parte de las bacterias, pero se puede frenar esta situación alarmante para el mundo tomando conciencia e incrementado la vigilancia farmacológica, además de buscar alternativas nuevas no solamente a nivel sintético si no a través de las plantas medicinales (Kukso, 2016).

2.1.3. Género *Enterococcus*

En la antigüedad los enterococos pertenecían al género *Streptococcus* más específicamente del grupo D de Lancefield (sistema de clasificación serológica de los estreptococos β hemolíticos), pero no fue hasta 1970 que fueron clasificados como un género independiente (Díaz et al., 2010).

Se caracterizan por ser cocos gram positivos, con tamaños de entre 0,6-2,0 μm x 0,6-2,5 μm . No forman endosporas (células especializadas encargadas de asegurar la supervivencia de la bacteria debido a cambios ambientales), pueden presentarse en forma de pares o cadenas cortas y son anaerobios facultativos (pueden desarrollarse tanto en presencia como en ausencia de oxígeno) (Díaz et al., 2010).

Estos microorganismos presentan otras características como:

- Fermentan una gran cantidad de carbohidratos, especialmente la lactosa, con la formación de ácido láctico, no forman gas y producen un pH final que puede ir de 4,2 a 4,6 y su crecimiento óptimo se da a una temperatura de 37°C (Díaz et al., 2010).
- Las colonias en diferentes agares pueden ser incoloras o presentar un color grisáceo, con un diámetro de 2-3 mm y un tiempo de incubación aproximado de 48 horas (Díaz et al., 2010).
- Comúnmente no son hemolíticos (γ hemólisis), aunque a veces pueden realizar hemólisis de tipo α (lisis parcial de eritrocitos con coloración verde alrededor de las colonias) o en menor medida hemólisis tipo β (hemólisis clara alrededor de las colonias) (Jawetz et al., 2016).
- Son PYR (método rápido presuntivo para la identificación de *E. faecalis* basado en la actividad enzimática pirrolidónil arilamidasa) positivos, proliferan en presencia de bilis, hidrolizan la bilis, es decir son bilis-esculina positivos y crecen fácilmente en un medio de cloruro de sodio (NaCl) al 6.5% (Jawetz et al., 2016).

Los enterococos habitan dentro del tracto gastrointestinal del hombre y de otras especies, aunque también pueden encontrarse en el tracto genitourinario y saliva. Pueden causar enfermedades como infecciones del tracto urinario, endocarditis, bacteriemias, y otras afecciones, por lo que se les considera patógenos oportunistas para el humano (Díaz et al., 2010).

Existen 33 especies que pertenecen a este género y *E. faecalis* es la especie más frecuente aislada en muestras clínicas de infecciones causadas por enterococos (se le asocia que es el causante del 80-90% de estas infecciones), seguida por *Enterococcus faecium* (10-15% de estas infecciones). Por nombrar otros ejemplos tenemos los siguientes: *E. avium*, *E. dispar*, *E. malodoratus*, *E. hirae* (Koneman, 2017).

2.1.3.1. *Enterococcus faecalis*

E. faecalis pertenece al género *Enterococcus*, es una bacteria gram positiva, inmóvil, anaerobia facultativa y fermenta varios carbohidratos, con reacción catalasa positiva muy débil cuando crecen en agar sangre. Tiene forma esférica, y puede medir entre 0,6-2,0 μm por 0,6-2,5 μm , no forman esporas y su temperatura óptima de crecimiento es de 35°C. Toleran pHs altos y por lo general producen β o γ hemólisis (Díaz et al., 2010).

Puede habitar en el tracto gastrointestinal de humanos y otros mamíferos, por lo que son indicadores de contaminación fecal. Se ha encontrado esta especie en tierra, alimentos y agua debido a su capacidad de poder sobrevivir en diversas condiciones (Díaz et al., 2010).

E. faecalis es la especie que con mayor frecuencia se aísla a nivel nosocomial y produce enfermedades como infecciones del tracto urinario (ITU), bacteriemia, infecciones de heridas quirúrgicas, meningitis o endocarditis (Díaz et al., 2010).

Uno de los tópicos más importantes de esta bacteria es la resistencia intrínseca a determinados antibióticos; por ejemplo, las penicilinas. Las cepas de *E. faecalis* que contienen el gen *vanA* son capaces de desarrollar resistencia por la vancomicina y teicoplanina (Jawetz et al., 2016).

2.1.4. *Enterococcus faecalis* resistente a los antibióticos.

Se ha observado una resistencia intrínseca a las penicilinas resistentes a la penicilinasa, todas las cefalosporinas y a los monobactámicos. Presenta una resistencia leve intrínseca a muchos aminoglucósidos, una sensibilidad intermedia o resistencia a las fluoroquinolonas, y una sensibilidad moderada a la penicilina y a la ampicilina. Los *Enterococcus* son inhibidos más no destruidos por a la ampicilina (Jawetz et al., 2016).

Esta multiresistencia que generalmente desarrollan los microorganismos es básicamente por la adición de genes de resistencia a través de plásmidos o transposones e inclusive mutaciones espontáneas que elevan el nivel de resistencia a numerosos antibióticos (Jerves-Guerrero, 2017).

2.1.4.1. Resistencia a los aminoglucósidos

El alto grado de resistencia a los aminoglucósidos por algunos enterococos se debe a la presencia de enzimas que modifican los aminoglucósidos enterocócicos. Los genes que codifican a estas enzimas se suelen encontrar en plásmidos conjugados o transposones (Jawetz et al., 2016).

2.1.4.2. Resistencia a la vancomicina

La vancomicina es el glucopéptido de elección como alternativo de la penicilina para tratar infecciones enterocócicas. Existen múltiples fenotipos de resistencia a este antibiótico, entre estos están: el fenotipo *vanA* que presenta en su gran mayoría resistencia inducible a la vancomicina y a la teicoplanina; el fenotipo *vanB* presenta resistencia a la vancomicina, pero susceptible a la teicoplanina; el fenotipo *vanC* está presente en

especies aisladas con menor frecuencia del género *Enterococcus*; el fenotipo vanD que presenta resistencia moderada a la vancomicina y leve o con sensibilidad a la teicoplanina; el fenotipo vanE con resistencia de bajo nivel a la vancomicina y susceptibilidad a la teicoplanina y los fenotipos vanG y vanL presentes por lo general en *E. faecalis*, demuestran un bajo nivel de resistencia a la vancomicina y con susceptibilidad a la teicoplanina. Los genes vanR y vanS se consideran sistemas reguladores de dos componentes que son sensibles a la vancomicina o teicoplanina en el medio ambiente. También se requiere de los genes vanH, vanA y vanX para que se produzca una resistencia a la vancomicina; vanY y vanZ no se consideran necesarios o esenciales para la resistencia a la vancomicina (Jawetz et al., 2016).

Los enterococos que presentan resistencia a la vancomicina normalmente poseen plásmidos que les otorgan resistencia a la ampicilina y los aminoglucósidos, y por esto se utilizan para tratar las infecciones por enterococos resistentes a la vancomicina fármacos nuevos como daptomicina, linezolid, quinupristina-dalfopristina y tigeciclina (Jawetz et al., 2016).

La resistencia se genera por una transposición genética como se observa en la imagen a continuación:

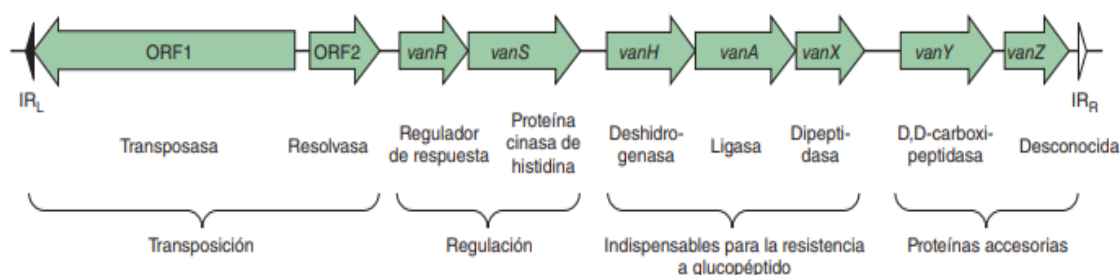


Ilustración 1 Mapa esquemático de la transposición Tn1546 de *Enterococcus spp.* (Jawetz et al., 2016).

2.1.4.3. Resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol

Los enterococos frecuentemente han mostrado sensibilidad a trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMZ) en las pruebas *in vitro*, pero se ha demostrado que estos fármacos no son eficaces para tratar las infecciones. Esto se debe a que los enterococos pueden utilizar folatos exógenos disponibles *in vivo* y, por ello, evaden la inhibición provocada por los fármacos (Jawetz et al., 2016).

2.1.5. Prevalencia de *Enterococcus spp.*

Según un estudio sobre prevalencia publicado por el European Center for Diseases Control and Prevention (ECDC) en el año 2012, *Escherichia coli* (*E. coli*) (15,9%) es el patógeno más importante en la infección nosocomial, siendo el segundo y tercero *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (15,9%) y *Enterococcus spp.* (9,6%), respectivamente (Cantón & Ruíz, 2013). Esto se debe básicamente a que estos dos últimos han desarrollado una multiresistencia a los antibióticos considerándose un problema en la infección nosocomial haciendo cada vez más un reto controlar infecciones producidas por estos patógenos. Hoy en día los aislamientos intrahospitalarios corresponden fundamentalmente a *E. faecalis* y en segundo lugar a *Enterococcus faecium*. Las infecciones intrahospitalarias por *Enterococcus spp.* ha incrementado su prevalencia en los últimos años, generalmente por su amplia resistencia intrínseca, principalmente a antibióticos como cefalosporinas y aminoglucósidos, y adquirida a diversos antimicrobianos como la vancomicina, de extenso uso en los centros de salud (Rodríguez et al., 2013).

2.2. MEGA DIVERSIDAD DE FLORA EN EL ECUADOR

Ecuador es un país que posee una riqueza biológica y concentración diversa en flora considerada como una de las más grandes del planeta y esto es explicado por su ubicación en la línea ecuatorial, y condiciones biológicas específicas debido al hecho de estar atravesado por la cordillera de los Andes y poseer parte de territorio amazónico (Segovia et al., 2015).

La flora del Ecuador ha sido desde siempre reconocida por ser inmensamente rica en plantas útiles; como referencia se tiene que los indígenas empleaban las plantas que crecían ya sea con fines medicinales, de construcción, alimenticio, etc. En nuestro país están registradas 3.118 plantas que pertenecen a 206 familias que poseen fines medicinales. Según estudios de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, el 45% de estas plantas se emplean en el tratamiento de diversos síntomas, mientras que el 26% se encarga de las afecciones que son generalmente causadas por microorganismos tales como bacterias, virus, hongos o protozoos, y otro grupo minoritario de plantas que tratan las heridas, lesiones y algunos desórdenes del sistema digestivo. Se considera que la comunidad de los kichwas establecidos en la región amazónica son considerados como los que más especies usan, continuando con los kichwas de la Sierra y de los mestizos (Chávez, 2017).

Esta impresionante cifra resalta la enorme utilidad de la flora nativa del Ecuador, a pesar de que muchos desconocen la utilidad de las diversas plantas presentes en el país, pudiendo ser a su vez un recurso para el país, en particular para la gente de escasos ingresos que vive en las áreas rurales y que, en muchos casos, depende enteramente del bosque para obtener alimentos, medicinas y vivienda (Torre et al., 2008).

2.3. PLANTAS MEDICINALES

Las plantas medicinales son consideradas como la principal herramienta terapéutica de uso tradicional. Debido a que desde la antigüedad la medicina tradicional es utilizada para el alivio de las enfermedades y el dolor. Hoy por hoy se ha desarrollado un gran interés por un mejor entendimiento y utilidad de medicinas alternativas, entre las que sobresale la medicina natural. El uso de plantas medicinales se lo lleva a cabo muchas de las veces de un modo empírico y basándose en la tradición; a pesar de ello, actualmente los estudios de fitoterapia han avanzado mucho, permitiendo tener una base científica sólida, por lo cual ha tomado mayor significado la investigación de nuevas fuentes vegetales de metabolitos con actividad antiinflamatoria, antitumoral, analgésica, antimalárica, antibacteriana, antifúngica, etc. (Torres et al., 2017).

En nuestro país las plantas medicinales, se utilizan como sustitutas de las medicinas farmacéuticas. A pesar de ello, no se ha obtenido la suficiente evidencia científica que afiance a la medicina herbaria dentro de los sistemas de salud (Gallegos, 2016).

2.3.1. Congona

Nombre científico: *Peperomia galioides*.

Peperomia galioides es una planta herbácea, aromática, nativa del continente sudamericano en una zona comprendida entre Colombia, Perú, Ecuador y Bolivia. Se la puede encontrar entre los 2600 – 4000 metros sobre el nivel del mar, su hábitat natural son climas húmedos y semisombreados. Puede llegar a medir entre los 10-50 cm, su tallo es cilíndrico, presenta ramificaciones en la base y nudos inferiores. Sus hojas son verticiladas pecioladas de 8 por nudo, colgantes, ovaladas de 0.8-1.2 cm de largo y de 5-6 mm de ancho y un espesor de 1.5-2.5 mm. su inflorescencia es en espigas, hermafrodita, el fruto es una drupa con una semilla (Ponce, 2019).

Compuestos bioactivos: *Peperomia galioides* presenta diferentes metabolitos secundarios con propiedades antibacterianas; entre los más importantes podemos destacar los triterpenos y compuestos fenólicos como los flavonoides (Aguilar, 2007).

Uso medicinal: entre los usos populares de esta especie se menciona sus propiedades terapéuticas como cicatrizante, antiinflamatorio, descongestivos, para las quemaduras, hemorroides, caída del cabello, el escorbuto, antiespasmódico, analgésico, en otros reportes se menciona la actividad terapéutica frente a úlceras gástricas, afecciones hepáticas, cardiotónicas. También se ha informado sobre la actividad antibacteriana del extracto etanólico frente a *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* (Ponce, 2019).



Ilustración 2 Congona, *Peperomia galioides*. Fuente: Propiedad de los autores.

2.3.2. Trinitaria

Nombre científico: *Otholobium mexicanum*.

Es un arbusto perenne perteneciente a la familia *Fabaceae*, que puede llegar a medir de uno a tres metros de altura y se puede encontrar desde los 2000 a 2800 metros sobre el nivel del mar. Las hojas de la trinitaria se caracterizan por ser compuestas, tripartitas, lanceoladas, de peciolo corto, borde entero y ápice acuminado. Sus flores son zigomorfas de color violeta o azul marino. En el Ecuador se lo conoce por varios nombres como wallwa, culén, trinitaria blanca, entre otros (León-López, 2014).

Compuestos bioactivos: Entre los metabolitos secundarios más importantes de *Otholobium mexicanum* destacan los taninos, flavonoides, furocumarinas (psoraleno), terpenoides y el bakuchiol, este último se encuentra en mayor concentración en la planta y es un monoterpene fenólico o llamado también meroterpeno (derivado de un terpenoide y de otro tipo de molécula) (León-López, 2014).

Uso medicinal: particularmente por infusión se usan las hojas y las flores para tratar la diarrea, dolor y acidez estomacal e indigestión (León-López, 2014).



Ilustración 3 Trinitaria, *Otholobium mexicanum*. Fuente: Propiedad de los autores.

2.3.3. Jengibre

Nombre científico: *Zingiber officinale*.

Llamado también Tubanka, ahirinri, hatun ahirinri, ichu ahirinri, ukillas ahirinri, catarro ahirinri, jengibre, haje hierba, etc., es una planta introducida del suroriente asiático, India y China, habiendo sido cultivada en el Ecuador predominando en los paisajes andinos, es un rastrero perenne, perteneciente a la familia *Zingiberaceae* y tiene la capacidad de crecer hasta un metro y medio de alto (Guanoluisa & Hidalgo, 2018).

Compuestos bioactivos: Según Guanoluisa & Hidalgo (2018) los componentes químicos de *Zingiber officinale* pueden ser divididos en volátiles y no volátiles. Dentro de los compuestos volátiles con actividad antibacterial tenemos a derivados terpénicos como citrionelol, geraniol, linalol; y sesquiterpenos como la β -bisabolona. Los compuestos no volátiles como el gingerol, shogaol y zingerona aportan cualidades antiulcerosas, antiinflamatorias y astringencia respectivamente.

Uso medicinal: se ha visto que tiene efectos positivos sobre el sistema cardiovascular, aliviando los calambres, tensión y reduciendo la presión arterial; sobre el sistema gastrointestinal minimizando síntomas como el vómito (Guanoluisa & Hidalgo, 2018).

Tiene un gran potencial frente a diferentes microorganismos y se ha evidenciado el efecto antibacteriano sobre cepas bacterianas como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, etc. (Guanoluisa & Hidalgo, 2018).



Ilustración 4 Jengibre, *Zingiber officinale* Fuente: Propiedad de los autores.

2.3.4. Romero

Nombre científico: *Rosmarinus officinalis*.

El romero es una planta aromática muy conocida y empleada desde la antigüedad para fines culinarios y medicinales. Es una planta introducida en el Ecuador y nativa de la cuenca mediterránea donde crece de forma muy abundante y en la península Ibérica. Se considera como un arbusto siempre verde, leñoso, que puede llegar a medir hasta dos metros de altura, sus hojas son rígidas, lineales, lanceoladas con forma de aguja y de aspecto coriáceas, cubierta de una capa de diminutos pelos. De las axilas de las ramas superiores brotan flores muy pequeñas labiadas de color azul o violeta, y sus frutos son tetraquenios (Ávila et al., 2011).

Compuestos bioactivos: *Rosmarinus officinalis* contiene varios metabolitos secundarios con diferentes actividades farmacológicas; por ejemplo, sus compuestos flavonoides (diosmetina, diosmina, sinensetina) son los causantes de su actividad antioxidante; mientras que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales y extractos es atribuida a compuestos fenólicos y compuestos como el α -pineno, acetato de bornilo, el alcanfor y el 1,8-cineol (Flores et al., 2019).

Usos medicinales: el romero es carminativo, digestivo y antiespasmódico, y tiene propiedades coleréticas, colagogas, hepatoprotectoras y antirreumáticas. Esta planta también presenta un efecto diurético, antiinflamatorio, antiulcerogénico y antioxidantes. También en algunos estudios se les atribuye la propiedad antimicrobiana frente a diferentes microorganismos patógenos para el ser humano (Ávila et al., 2011).



Ilustración 5 Romero, *Rosmarinus officinalis* L. Fuente: Propiedad de los autores.

2.4. EXTRACTOS VEGETALES Y MEDICINALES.

2.4.1 Definición

Los extractos son concentrados de consistencia sólida, líquida o intermedia obtenidos por procesos donde se pone en contacto los productos vegetales con solventes adecuados que permitan la extracción de sus principios activos; entre los solventes más comunes tenemos el agua y los diferentes alcoholes (con los cuales se obtienen extractos hidrosolubles) y solventes como la acetona y el éter (con los cuales se obtienen extractos liposolubles). Por lo tanto, los extractos medicinales son aquellos que se obtienen de plantas medicinales. Entre los principios activos que se pueden obtener mediante extracción tenemos flavonoides, terpenos, aceites esenciales, alcaloides, fenoles, etc. (Valarezo, 2019).

La actividad biológica de estos principios activos es de gran importancia ya que pueden tener diferentes propiedades como antiinflamatorias, analgésicas, antioxidantes, antifúngicas, antibacterianas, etc., y ser aplicados en diferentes industrias como la alimentaria, perfumería, farmacéutica, principalmente (Valarezo, 2019).

2.4.2. Extractos con actividad antibacteriana.

Diversos estudios han logrado probar la actividad de las especies vegetales como alternativas fitoterapéuticas utilizándose como coadyuvantes para tratar o aliviar diversas patologías. Por ejemplo, Pájaro Nerlis y otros autores en el 2018, demostraron la actividad antibacteriana del extracto etanólico del pecíolo del *Rheum rhabarbarum* frente a cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli* (Pájaro et al., 2018).

Pío-León y otros autores en Chile en el año 2013, demostraron la actividad antibacterial de los extractos metanólicos y clorofórmicos de *Byrsonima crassifolia*, *Psidium sartorianum* y *Crescentia alata* contra bacterias patógenas humanas como *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, y *Staphylococcus aureus* (Pío-León et al., 2013).

Esto sucede gracias a la presencia de componentes químicos que poseen las plantas en su metabolismo, que provocan la liberación de principios activos capaces de producir actividades terapéuticas. Desde la antigüedad la población ancestral encontraba formas para emplear estos metabolitos y de ese modo aliviar, curar o disminuir dolencias (Pío-León et al., 2013).

2.4.3. Extracción

Para la extracción de principios activos presentes en las plantas existen diferentes métodos. Cada principio activo tiene una naturaleza química que lo diferencia de otros, por lo cual se necesitarán líquidos extractivos que sean afines al mismo y permitan su extracción. A continuación, se nombran los métodos de extracción más importantes.

2.4.3.1. Métodos de obtención de extractos vegetales

2.4.3.1.1. Maceración

La maceración es un método simple de extracción se lo realiza a temperatura ambiente y protegido de la luz, consiste en colocar la droga o material vegetal fragmentado en un recipiente y remojar con un solvente puede ser agua, etanol o glicerina, dejando reposar por un periodo de tiempo determinado de 2 – 14 días agitando esporádicamente. En ese método se tiene filtra el líquido que se obtiene, comprimiendo el residuo resultante, se recupera el solvente en un evaporador rotatorio y finalmente se obtiene el extracto (Amaguaña & Churuchumbi, 2018).

Se lo aplica para drogas rígidas como tallos o raíces entre otros, sin ocupar mucho solvente. A pesar de las ventajas nombradas, este proceso es muy lento, se satura el solvente ocupado y por lo tanto no hay una extracción completa de la droga (Carrión & García, 2010).

2.4.3.1.2. Percolación

Se considera a este método según la Farmacopea Americana, USP, como el método oficial de extracción. A través de esta técnica la mezcla hidroalcohólica va a penetrar la droga pulverizada en un solo sentido, el material vegetal es bañado nuevamente con el solvente cediendo todos los componentes solubles (Amaguaña & Churuchumbi, 2018).

En este proceso al ser continuo no hay saturación del solvente por lo tanto hay una extracción completa de principios activos. Sin embargo, se necesita de un gran volumen de solvente (Carrión & García, 2010).

2.4.3.1.3. Digestión

Se adapta particularmente en algunas plantas que presenten principios activos que sean difíciles de extraer, ya sea por estar contenidos en partes leñosas de la planta o que requieran de calor por un tiempo prolongado (Amaguaña & Churuchumbi, 2018).

2.4.3.1.4. Infusión y decocción

Son modificaciones de la maceración y mediante el aumento de la temperatura se acelera la extracción de sustancias activas. En la infusión se vierte el agua caliente sobre la droga fragmentada, la cual está sobre un recipiente de vidrio, acero inoxidable, u otros; cerrado adecuadamente. Se deja en reposo por un periodo de 15 a 30 minutos y se cuela (Mukherjee, 2008).

En la decocción se lleva a temperatura de ebullición conjuntamente la droga cruda más el menstuo por un lapso de 15 a 30 minutos (Mukherjee, 2008).

2.4.4. Métodos para evaluar la actividad antibacteriana de los extractos.

2.4.4.1. Método de difusión en disco.

También conocido como el método de Kirby Bauer, el microorganismo de interés será inoculado con una concentración 0.5 Mc Farland en la superficie de una placa de agar, se utiliza el medio de Müeller Hinton porque crecen bien la mayor parte de bacterias patógenas, el pH del medio debe estar entre 7.2 -7.4, sobre este se adicionan discos impregnados del antibiótico a una concentración conocida. Estas placas deberán incubarse por un lapso de 16 a 18 horas a una temperatura de 35- 37°C. Durante este tiempo de incubación, el antibiótico se extiende de manera radial desde el disco a través del agar, por lo tanto, su concentración irá decreciendo a medida que se aleja del disco. En cierto momento, la concentración del antibiótico en el medio de cultivo será incapaz de inhibir al microorganismo patógeno. El diámetro del área de inhibición que se formó alrededor del disco deberá ser interpretado según las categorías de sensible, susceptible dependiente de la dosis, intermedio o resistente (S, SDD, I, o R) basándose en las tablas publicadas por organismos encargados del control de tales métodos, por ejemplo, el Comité Nacional de Estándar de Laboratorios Clínicos de los Estados Unidos de Norteamérica (CLSI) (Aulacio, 2002 & Picazo, 2000).

2.4.4.2. Método de microdilución

La microdilución es una técnica de análisis microbiológico de carácter cuantitativo que básicamente trata de analizar la actividad inhibitoria de una determinada sustancia, se realiza en una placa de poliestireno que contiene 96 pocillos. La placa puede contener de 7 a 8 diluciones de 12 diferentes agentes antibacterianos, una parte de la primera columna desde la A hasta la D de la microplaca será destinada como control positivo, se adiciona caldo + inóculo bacteriano, y desde la E hasta H como control negativo, se coloca solo el medio de cultivo estéril y la columna número 12 se utiliza para el control de la sensibilidad; en donde, se emplea una serie de diluciones del antibiótico según el caso y que debe incluir las que correspondan a los puntos de corte de la sensibilidad del microorganismos estudiado. Se trabaja con micropipetas que permiten tomar volúmenes determinados y placas de microdilución, que facilita el desarrollo de dicho método, que interpreta la inhibición del crecimiento bacteriano en los diferentes pocillos por medio de un analizador automatizado que mide la turbidez presente en cada dilución. Este método permite obtener los resultados en un tiempo más corto que con otros métodos, también confiere al investigador un control de estandarización y reproducibilidad de los resultados. La microdilución, actualizada por el National Committee for Clinical Institute (CLSI), permite acceder a un informe selectivo de los antibacterianos (Carmilema & Delgado, 2010).

2.4.4.3. Método de macrodilución

Se considera que macrodilución es uno de los métodos más utilizados para establecer la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) del antibiótico, esta concentración puede evaluarse a través de la observación directa sin la necesidad de utilizar ningún instrumento óptico. En esta técnica se prueba la actividad inhibitoria de una sustancia o medicamento dentro una suspensión normalizada de bacterias empleando diferentes concentraciones del agente antimicrobiano, se realizan una serie de soluciones que minimizan la concentración de un modo progresivo, en un medio líquido estandarizado. Para realizar de manera óptima esta técnica se requiere de tubos de dilución con un contenido mínimo de 1 mL. Este método nos permite realizar el cultivo estandarizado de la mayoría de microorganismos y la reproducibilidad de resultados (Carmilema & Delgado, 2010).

2.4.4.4. Método de bioautografía

Este método se caracteriza por ser sencillo y rápido, combinando las ventajas de la cromatografía en capa fina y la detección de la actividad antibacteriana, a manera que se identifica directamente las fracciones con dicha actividad (Colorado, et al., 2007).

La bioautografía utiliza tres enfoques: la bioautografía directa, donde el microorganismo crece directamente en la placa cromatográfica de capa fina (TLC); la bioautografía de contacto, donde los compuestos antimicrobianos se transfieren desde la placa de TLC a una placa de agar inoculado mediante contacto directo y la bioautografía de recubrimiento de agar, donde se aplica un medio de agar sembrado directamente sobre la placa de TLC. A pesar de su alta sensibilidad, su aplicabilidad se limita a los microorganismos que crecen fácilmente en TLC (Cos, et al., 2006).

CAPÍTULO 3

3.1 METODOLOGÍA DE TRABAJO

Para la obtención de los extractos clorofórmicos y metanólicos se procedió de la siguiente manera:

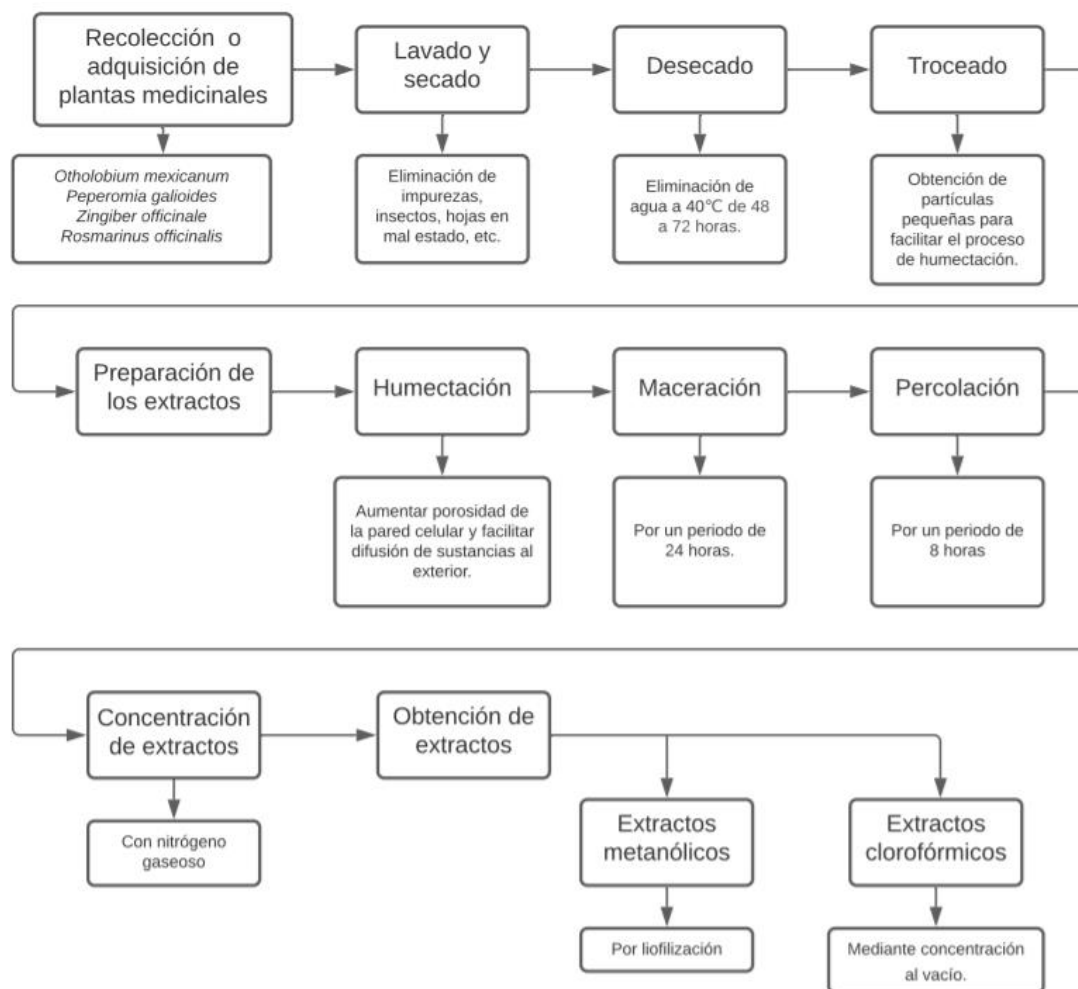


Ilustración 6 Procedimiento para la obtención de extractos clorofórmicos y metanólicos.
Fuente: Propiedad de los autores.

3.1.1. Recolección

<i>Peperomia galioides</i> (Congona)	Esta planta fue recolectada del sector camino viejo a Girón, con coordenadas proporcionadas por los investigadores del proyecto de Plantas Medicinales del departamento de Biociencias y llevada al laboratorio de lavado de plantas en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca en fundas de papel para su respectivo lavado y secado. Se recolectó aproximadamente 300 g de materia fresca (hojas), para la obtención de 20 g de materia seca. Esta planta al ser recolectada, fue debidamente caracterizada. * Certificado adjunto de caracterización en ANEXO 1.
<i>Otholobium mexicanum</i> (Trinitaria)	Esta planta fue recolectada del sector camino viejo a Girón, con coordenadas proporcionadas por los investigadores del proyecto de Plantas Medicinales del departamento de Biociencias y llevada al laboratorio de lavado de plantas en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca en fundas de papel para su respectivo lavado y secado. Se recolectó aproximadamente 200 g de materia fresca (hojas), para la obtención de 20 g de materia seca. Esta planta al ser recolectada, fue debidamente caracterizada. *Certificado adjunto de caracterización en ANEXO 1.
<i>Zingiber officinale</i> (Jengibre)	Esta planta fue adquirida en el mercado 10 de agosto de la ciudad de Cuenca, Ecuador y llevada al laboratorio de lavado de plantas en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca en fundas de papel para su respectivo lavado y secado. Se adquirió aproximadamente 260 g de materia fresca (raíces), para la obtención de 20 g de materia seca.

<i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero)	Esta planta fue adquirida en el mercado 10 de agosto de la ciudad de Cuenca, Ecuador y llevada al laboratorio de lavado de plantas en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca en fundas de papel para su respectivo lavado y secado. Se adquirió aproximadamente 200 g de materia fresca (hojas), para la obtención de 20 g de materia seca.
--	---

Tabla 1 Recolección y transporte de las plantas a estudiar.

Se destaca que las plantas *Otholobium mexicanum* y *Peperomia galioides* fueron recolectadas según las normativas de buenas prácticas de agricultura y recolección para plantas medicinales de la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, 2003).

3.1.2. Lavado y Secado

Las partes de interés fueron lavadas bajo agua corriente para eliminar en su totalidad impurezas tales como tierra, insectos, etc., desechando aquellas que estuviesen en mal estado; tras este proceso se colocaron en remojo con agua destilada por 10 minutos.

Transcurridos los 10 minutos se colocaron las hojas y raíces sobre papel periódico, mismo que debe estar encima de una malla de acero inoxidable previamente sanitizada. Cabe recalcar que cada malla está etiquetada con el nombre de la planta correspondiente.

Se dejaron secar las hojas por un periodo de 24 horas a temperatura ambiente.



Ilustración 7 Proceso de secado Fuente: Propiedad de los autores.

3.1.3. Desecación

Pasadas las 24 horas se colocaron las mallas, con el material vegetal, dentro de una estufa (Modelo Pro 3) a una temperatura de 40°C. Dependiendo de la carnosidad del material

vegetal seleccionado este proceso puede durar de 48 a 72 horas. Se dice que este proceso culmina cuando las hojas sean fácilmente trozeables y el jengibre haya perdido en su totalidad la humedad.

3.1.4. Troceado

En una licuadora (Osterizer) previamente sanitizada se trocean las partes de las plantas seleccionadas por separado. Este proceso ayuda a obtener partículas pequeñas para facilitar el proceso de humectación.



Ilustración 7 Proceso de troceado. Fuente: Propiedad de los autores.



Ilustración 8 Material vegetal troceado. Fuente: Propiedad de los autores.

3.1.5. Preparación de los extractos

Se tomó como referencia los PNTs de obtención de extractos clorofórmicos y metanólicos del laboratorio de fitoquímica de la facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca.

3.1.5.1. Humectación

Se pesó 10 g del troceado en un recipiente de vidrio mismo que fue humectado con metanol puro (99.8%) (Sigma-Aldrich) y en otro recipiente también se pesó 10 g del troceado que fue humectado con cloroformo al 99% (Merck).

El proceso de humectación tuvo una duración de 24 horas y esto se realizó con el objetivo de facilitar el paso del solvente y así aumentar la porosidad de la pared celular; tras esto se facilita la difusión de las sustancias extraíbles hacia el exterior de las células (Cañar & Paguay, 2017).



Ilustración 9 Proceso de humectación: Pesar 10 g del pulverizado. Fuente: Propiedad de los autores.



Ilustración 10 Proceso de humectación. Fuente: Propiedad de los autores.

3.1.5.2. Maceración

Transcurrido el proceso de humectación se prepararon los percoladores donde se colocaron las drogas ya humectadas, con cloroformo y metanol, tal como se observa en

la ilustración número 11, se dejó en maceración por un periodo de 24 horas, asegurándose que cada llave de los embudos de separación estuviese bien cerrada para evitar pérdida de la fracción más concentrada y protegiendo de la luz.

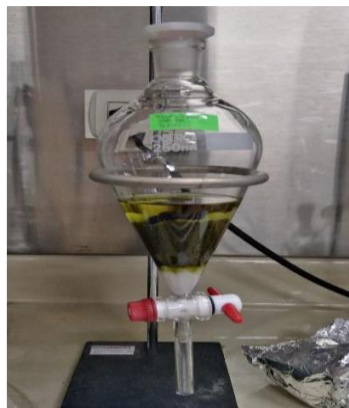


Ilustración 11 Proceso de maceración. Fuente: Propiedad de los autores.

3.1.5.3. Percolación

Pasadas las 24 horas se inició con el proceso de percolación, primeramente, recolectando el 75% del peso total en volumen de la planta empleada para la extracción, que en este caso correspondió a 7,5 mL a una velocidad constante de 20 gotas por minuto, esta se denomina la primera fracción y es la más concentrada del proceso.



Ilustración 12 Proceso de percolación: Primera fracción. Fuente: Propiedad de los autores.

La percolación tuvo una duración de 8 horas y en cada percolador se mantuvo siempre el volumen del solvente metanol y cloroformo respectivamente por 1 cm por encima de la droga.

El producto de este proceso se recolectó en un balón envuelto con papel aluminio, tapado con papel film y guardado en refrigeración para evitar la evaporación y alteración de los principios activos hasta que se lleve a cabo el siguiente proceso.

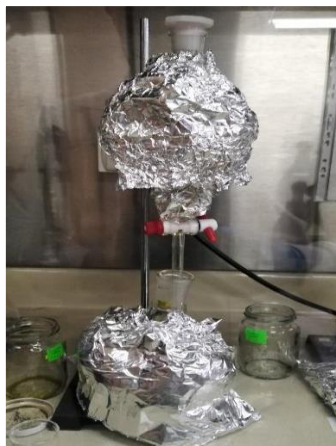


Ilustración 13 Proceso de percolación. Fuente: Propiedad de los autores.

3.1.5.4. Concentración del extracto

El producto de la extracción por percolación se llevó a sequedad utilizando un Rotavapor (Heidolph Laborota 4011 HB G3, Alemania) a una temperatura de 27°C a 100 rpm.



Ilustración 14 Proceso de concentración y colocación de la primera fracción. Fuente: Propiedad de los autores.

Luego se procedió a la redisolución, donde se ocupó la primera fracción obtenida al inicio de la percolación; este proceso se llevó a cabo en Baño de María a 37 °C con ultrasonido (Cole Parmer, Illinois, EEUU), luego se pasó a un tubo de ensayo y se siguió agregando (de poco a poco) más solvente para lograr la completa redisolución del extracto.

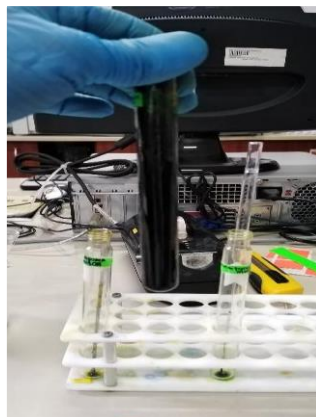


Ilustración 15 Proceso de concentración. Producto de la redisolución. Fuente: Propiedad de los autores.

Después de la redisolución, se procedió a concentrar (eliminación de solvente en exceso) con nitrógeno gaseoso hasta obtener un volumen aproximado de 2 mL.



Ilustración 16 Proceso de concentración. Eliminación de solvente con nitrógeno gaseoso. Fuente: Propiedad de los autores.

3.1.5.4.1. Extractos metanólicos

Los extractos metanólicos fueron desecados por liofilización, el cual es un proceso de secado, donde primeramente se congela el agua presente en el extracto y luego se somete a un proceso de vacío para eliminarla por completo en forma de vapor sin pasar por el estado líquido (proceso de sublimación); para esto se trabaja por debajo del punto triple del agua ($0,01^{\circ}\text{C}$ y $4,5\text{ mmHg}$): -50°C entre $0,1$ y $0,09\text{ mbar}$ (Cañar & Paguay, 2017).

Los 2 mL de extracto obtenidos tras la concentración con nitrógeno gaseoso fueron trasvasados a un tubo para liofilización, pesado previamente. Para no perder extracto se utilizó agua ultrapura para lavar el tubo (donde se encontraban los 2 mL procedentes del

proceso de concentración con nitrógeno gaseoso) con la ayuda del Baño de María a 27°C con ultrasonido (Cole Parmer, Illinois, EEUU); se puede ocupar la cantidad de agua ultrapura necesaria sin sobrepasar los 25 mL marcados en el tubo para liofilización.

Se llevó el tubo para liofilización al biofreezer (temperatura de -70°C), cubierto con una tapa de papel aluminio y se dejó por 5 minutos, luego se giró el tubo y se dejó 3 minutos más; este último proceso se repitió hasta que el extracto cubra las paredes del tubo para liofilización.



Ilustración 17 Proceso de obtención de extractos metanólicos. Fuente: Propiedad de los autores.

Se cubrió todo el tubo para liofilización con papel aluminio, se guardó en el biofreezer a una temperatura de -70°C por 24 horas y transcurrido este periodo de tiempo se llevó el tubo al equipo para liofilización (LABCONCO, EEUU) por 24 horas.



Ilustración 18 Proceso de obtención de extractos metanólicos: Liofilización. Fuente: Propiedad de los autores.

Una vez culminado el proceso de liofilización se pesó el tubo más el extracto liofilizado en una balanza analítica (BOECO) y de éste se dispensaron aproximadamente 5 mg en envases herméticos o viales previamente pesados.



Ilustración 19 Obtención de extractos metanólicos. Fuente: Propiedad de los autores.

Los extractos secos fueron guardados almacenados a -20°C para garantizar su conservación.

3.1.5.4.2. Extractos clorofórmicos

Los 2 mL de extracto obtenidos tras la concentración con nitrógeno gaseoso fueron dispensados en 6 viales pesados previamente. Para no perder extracto se utilizó cloroformo al 99% para lavar el tubo (donde se encontraban los 2 mL procedentes del proceso de concentración con nitrógeno gaseoso) con la ayuda del Baño de María a 27°C con ultrasonido (Cole Parmer, Illinois, EEUU).

Los viales fueron llevados al equipo de concentrador al vacío (RAPIDVAP, LABCONCO) donde se los sometió a ciclos de 60 minutos, a temperatura ambiente y 150 mbar de presión hasta obtener pesos constantes.



Ilustración 20 Proceso de obtención de extractos clorofórmicos: Concentración al vacío.

Fuente: Propiedad de los autores.

Una vez culminado el proceso de concentración al vacío se seleccionó el vial con mayor cantidad de extracto, y de este se dispensaron aproximadamente 5 mg en viales previamente pesados.

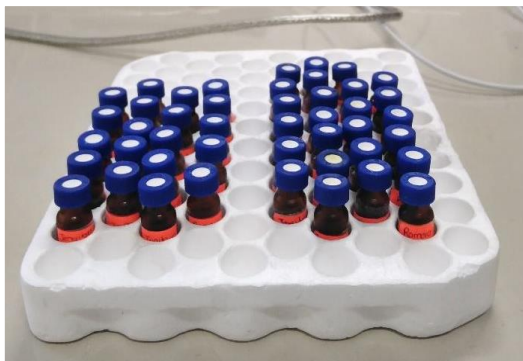


Ilustración 21 Obtención de extractos clorofórmicos. Fuente: Propiedad de los autores.

Los extractos secos fueron guardados en un congelador a -20°C para garantizar su conservación.

3.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS FRENTE A LAS DIVERSAS CEPAS DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

3.2.1 Elaboración del cryostock

- Se Descongeló la cepa cryoconservada en suspensión de leche descremada a -80°C .
- Se colocó 100 μL de la suspensión bacteriana en el centro de la caja Petri con agar Müeller Hinton, luego se estrió con un asa calibrada de 10 μL distribuyendo de manera uniforme en todas las direcciones abarcando la totalidad de la caja.
- Se incubó a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas.
- Se colectó el crecimiento de las cajas Petri previamente sembradas.
- Se suspendió en 15 mL de agua destilada estéril (suspensión inicial).
- Se comparó la turbidez con un patrón de 0.5 de McFarland.
- Se homogenizó en el vortex.
- Se elaboró una serie de diluciones en tubos estériles desde 10^1 - 10^{10} :
 - Se colocó 900 μL de agua destilada estéril en los diez tubos
 - Se adicionó en el tubo #1, 100 μL de la suspensión bacteriana inicial y se homogenizó.
 - En el tubo #2, 100 μL del tubo #1 más 900 μL y se homogenizó.

- Se repitió el mismo procedimiento hasta completar las 10 diluciones.
- La suspensión inicial se debe guardar en refrigeración hasta obtener los resultados del número de UFC/mL de las siembras, inmediatamente realizado la primera dilución.
- Se añadió de cada una de las diluciones previamente obtenidas un volumen, que se expresa en la siguiente tabla, en el centro de la caja con agar Mueller Hinton y se estría con un asa estéril sin tocar los bordes para obtener una mejor estimación del número de colonias al momento del conteo, este procedimiento se debió realizar por duplicado. El volumen que se toma depende del aproximado del cálculo de UFC/mL.

Dilución	Concentración de suspensión bacteriana inicial	Volumen para la siembra μL	Conteo aproximado caja de TSA
10^{-4}	1×10^8 UFC/mL	10 μL	100 UFC
10^{-5}	1×10^8 UFC/mL	50 μL	50 UFC
10^{-6}	1×10^8 UFC/mL	100 μL	10 UFC
10^{-7}	1×10^8 UFC/mL	100 μL	1 UFC

Tabla 2 Concentración de microorganismos en las diluciones.

- Se Incubó a 37°C por 24 horas
- Se determinó UFC/mL mediante el recuento de colonias en cada caja Petri el número de colonias de los duplicados no debe diferenciarse en un porcentaje mayor al 5%, entre diluciones no debe haber una diferencia mayor al 10%.
- Se comparó los resultados entre sí, tener en cuenta que al aumentar el número de diluciones aumentan los errores ya sea por homogenización o al dispensar volúmenes.
- Se calculó el volumen de TSB + suspensión bacteriana inicial y se agregó al volumen final 10% de glicerol tomando como referencia 30 mL de volumen final.
- Se dispensó los 30 mL de la preparación anterior en criotubos en alícuotas de 1 mL, los viales finales tuvieron una concentración de 5×10^6 UFC/mL.
- Se crioconservaron a -80°C .

- Posteriormente se realizó la corrección del criostock y se calculó la concentración necesaria para la elaboración del inóculo bacteriano que se colocó en la placa test considerando la concentración que debe tener en la placa test: *E. faecalis*: 5×10^4 UFC/mL.

3.2.2. PREPARACIÓN DE LOS CONTROLES DE ANTIMICROBIANO

- Se determinó el punto de corte para el antibiótico usado y la cepa bacteriana
- Se determinó el número de diluciones a realizar tomando en cuenta que se adicionaron los controles en toda la columna 12 de la placa test.
- Se calculó la concentración en cada uno de los pocillos.
- Se realizó una serie de diluciones: 64 µg/mL; 32 µg/mL; 16 µg/mL; 8 µg/mL; 4 µg/mL; 2 µg/mL; 1 µg/mL; 0.5 µg/mL, usando agua estéril obteniendo un volumen de 2 mL, el antimicrobiano empleado fue la ampicilina 1 g/4mL frente a las tres cepas de *Enterococcus faecalis*. Se tomó como referencia los puntos de corte (menores a 8 µg/mL (sensible) y mayores a 16 µg/mL (resistente)) para *Enterococcus faecalis* establecidos por el Instituto de Normas clínicas y de Laboratorio (CLSI, 2021), expuestos en el ANEXO 14.

3.2.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES.

3.2.3.1. Preparación de los extractos

- Se sanitizó previamente con alcohol al 70% la cámara de flujo laminar tipo II-A.
- Se disolvió en la cantidad necesaria de DMSO el extracto o fracción en miligramos para la obtención de una concentración de 20 mg/mL.
- Se homogenizó en el agitador rotatorio 360° por un periodo de tiempo de 12 –24 horas.
- Se visualizó al extracto disuelto por completo, en el caso de observar precipitados se lleva al baño María, en la opción set sonics por 60 min y homogeneizar en el vortex hasta obtener la disolución completa de la muestra.

3.2.3.2. Preparación de la placa de dimetilsulfóxido (DMSO)

- Se trabajó dentro de la cámara de flujo laminar tipo II-A.
- Se colocó un volumen de 20 µL de DMSO en las columnas 2 y 7 en una placa de 96 pocillos con fondo en V.

- Se añadió un volumen de 30 μL de DMSO en las columnas 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11.
- Se adicionó 20 μL del extracto en las columnas 2 y 7.
- Se homogenizó con una pipeta multicanal.
- Se transfirió 10 μL de las columnas 2 y 7 a las columnas 3 y 8, homogeneizar y continuar el proceso hasta las columnas 6 y 11.

3.2.3.3. Preparación de la placa de agua

- En una placa de 96 pocillos de fondo plano se colocó 80 μL de agua destilada estéril, desde la columna 2 hasta la columna 11.
- Transferir de la placa de DMSO previamente homogenizada 11.76 μL a su correspondiente en la placa de agua.
- Homogeneizar cada pocillo.

3.2.3.4. Preparación de la placa test

- Se preparó el inóculo bacteriano según los cálculos del criostock para los 96 pocillos y se homogenizó.
- Se transfirió 10 μL de la placa de agua a su correspondiente en una placa estéril de fondo plano.
- Se colocó 200 μL del medio estéril de TSB sin la cepa bacteriana en la columna 1 en las letras E, F, G y H (control de esterilidad del medio).
- Se adicionó 10 μL de cada una de la serie de diluciones del antibiótico en la columna 12 ocupando los 8 pocillos con concentraciones que fueron desde 64 $\mu\text{g/mL}$, 32 $\mu\text{g/mL}$, 16 $\mu\text{g/mL}$, 8 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ y 0.5 $\mu\text{g/mL}$, incluyendo dentro de estos rangos los puntos de corte.
- Se colocó 200 μL del inóculo bacteriano con una concentración final de 5×10^4 UFC/mL previamente preparado en cada uno de los pocillos de la microplaca, exceptuando los pocillos E, F, G y H de la columna 1 que solamente tenían TSB.
- Se colocó 200 μL del inóculo bacteriano con una concentración final de 5×10^4 en la columna 1 en las letras A, B, C y D (control de viabilidad del inóculo bacteriano).
- Se incubó de 18 a 24 horas a 37°C .
- Transcurrido este tiempo se procedió a leer la placa en un lector de microplacas con una longitud de onda de 405nm, en donde se determinó mediante turbidez el porcentaje de inhibición.

- A partir del porcentaje de inhibición se calculó la concentración mínima capaz de inhibir el 50% de la población bacteriana (IC50), y la concentración mínima capaz de inhibir el 90 % de la población bacteriana (IC90).

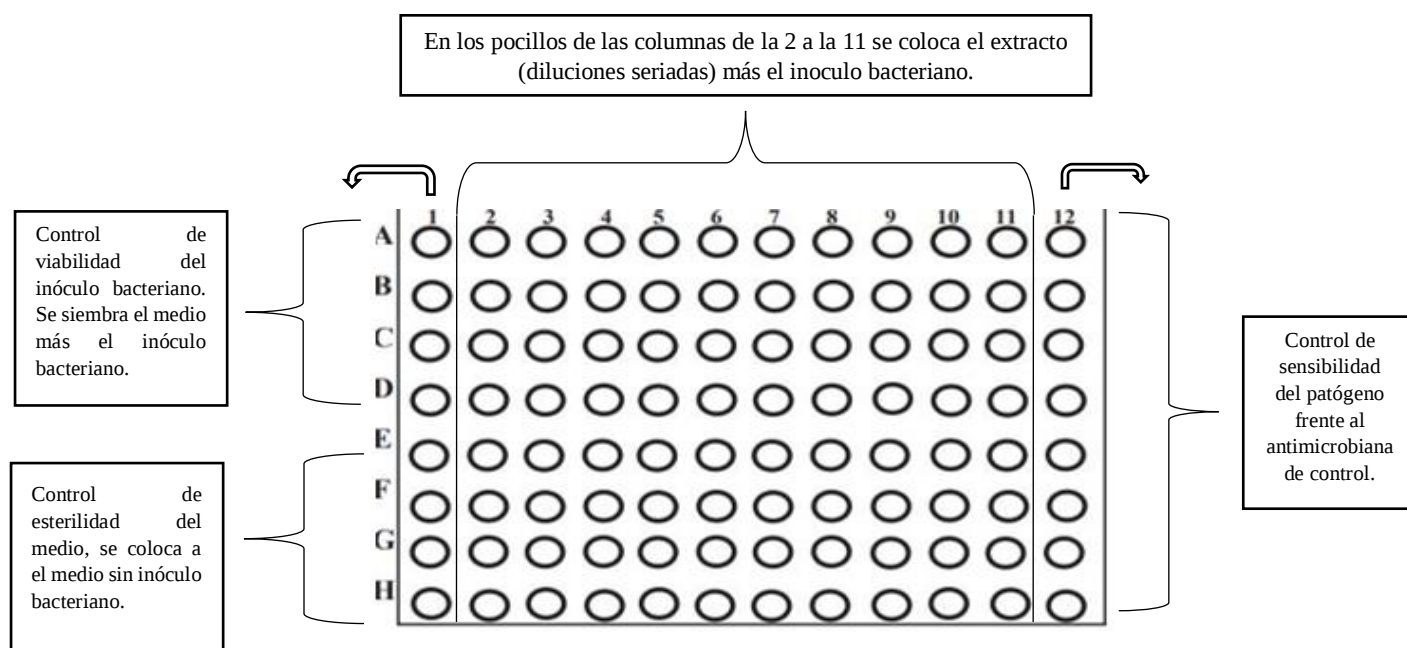


Ilustración 8 PLACA TEST: Distribución de los extractos obtenidos en la placa de test, más el control de sensibilidad al antibiótico, control de esterilidad del medio y control de viabilidad de la cepa. Fuente: Propiedad de los autores.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Obtención, reactivación y verificación de la cepa clínica

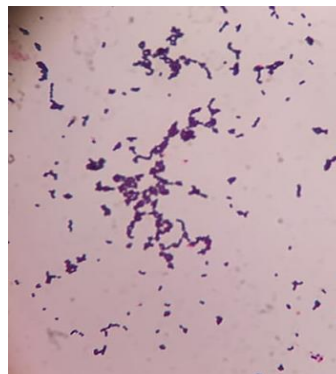
<i>Enterococcus faecalis</i>	
Crecimiento	Agar Mueller Hinton
Aspecto de colonias	Colonias incoloro a gris, poseen un tamaño de 2 - 3 mm de diámetro, crecen a una temperatura de 37°C – 45°C en un lapso de 24 – 48 horas.
Tinción de Gram	Cocos gram positivos en cadenas, aislados y en tétradas.  Ilustración 9 Tinción de Gram; Positivo para <i>Enterococcus faecalis</i>. Fuente: Propiedad de los autores
Catalasa	Negativo
Crecimiento en caldo tripticasa soya con NaCl 6.5%	Positivo
Bilis esculina	Positivo
Crecimiento de tripticasa soya en 45°C y 37°C.	Positivo

Tabla 3 Identificación de la cepa clínica facilitada por el laboratorio Dra. Sonia Domínguez.

4.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana

Se utilizaron tres cepas de *Enterococcus faecalis*, una cepa clínica y dos cepas ATCC: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 sin genes de resistencia y *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 resistente a la vancomicina. Los resultados fueron analizados de acuerdo a Jerves, et al. (2006) donde establece que, en modelos antiinfecciosos *in vitro*, la actividad de extractos o compuestos generalmente se expresa mediante valores numéricos (IC50, IC90, MIC, etc.). En este caso los valores fueron expresados mediante criterios de IC50 para determinar su actividad. Los extractos que presentaron valores de IC50 por debajo de 30 µg/mL son de mayor significancia, más aún si son valores menores a 5 µg/mL.

IC 50% de la población bacteriana	Interpretación
> 30 µg/mL	Inactivo
30- 5 µg/mL	Ligeramente activo
< 5 µg/mL	Muy activo

Tabla 4 Clasificación de la actividad antibacteriana de los extractos de plantas medicinales para su interpretación (Jerves et al., 2014).

4.2.1. Extractos metanólicos

<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212			
Nombre científico	IC 50 (µg/mL)	IC 90 (µg/mL)	Actividad
<i>Peperomia galiodes</i>	30,081	60,400	Inactivo
<i>Otholobium mexicanum</i>	8,665	15,406	Ligeramente activo
<i>Zingiber officinale</i>	No es activo a las concentraciones probadas	No es activo a las concentraciones probadas	Inactivo
<i>Rosmarinus officinalis</i>	20,234	No es activo a las concentraciones probadas	Ligeramente activo
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299			
Nombre científico	IC 50 (µg/mL)	IC 90 (µg/mL)	Actividad
<i>Peperomia galiodes</i>	48,661	No es activo a las concentraciones probadas	Inactivo

<i>Otholobium mexicanum</i>	10,586	No es activo a las concentraciones probadas	Ligeramente activo
<i>Zingiber officinale</i>	No es activo a las concentraciones probadas	No es activo a las concentraciones probadas	Inactivo
<i>Rosmarinus officinalis</i>	No es activo a las concentraciones probadas	No es activo a las concentraciones probadas	Inactivo
<i>Enterococcus faecalis</i> CEPA CLÍNICA			
Nombre científico	IC 50 (µg/mL)	IC 90 (µg/mL)	Actividad
<i>Peperomia galiodes</i>	31,058	60,787	Inactivo
<i>Otholobium mexicanum</i>	8,874	15,109	Ligeramente activo
<i>Zingiber officinale</i>	No es activo a las concentraciones probadas	No es activo a las concentraciones probadas	Inactivo
<i>Rosmarinus officinalis</i>	No es activo a las concentraciones probadas	No es activo a las concentraciones probadas	Inactivo

Tabla 5 IC50 - IC90 (µg/mL). Efecto de los extractos metanólicos de plantas medicinales frente a *Enterococcus* cepa clínica y cepas de referencia ATCC.

4.2.2. Extractos clorofórmicos

<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212			
Nombre científico	IC 50 (µg/mL)	IC 90 (µg/mL)	Actividad
<i>Peperomia galiodes</i>	28,049	61,724	Ligeramente activo
<i>Otholobium mexicanum</i>	8,571	15,795	Ligeramente activo
<i>Zingiber officinale</i>	No es activo a las concentraciones probadas	No es activo a las concentraciones probadas	Inactivo
<i>Rosmarinus officinalis</i>	No es activo a las concentraciones probadas	No es activo a las concentraciones probadas	Inactivo

<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299			
Nombre científico	IC 50 (µg/mL)	IC 90 (µg/mL)	Actividad
<i>Peperomia galiodes</i>	25,501	61,428	Ligeramente activo
<i>Otholobium mexicanum</i>	8,660	15,812	Ligeramente activo
<i>Zingiber officinale</i>	No es activo a las concentraciones probadas	No es activo a las concentraciones probadas	Inactivo
<i>Rosmarinus officinalis</i>	No es activo a las concentraciones probadas	No es activo a las concentraciones probadas	Inactivo
<i>Enterococcus faecalis</i> CEPA CLÍNICA			
Nombre científico	IC 50 (µg/mL)	IC 90 (µg/mL)	Actividad
<i>Peperomia galiodes</i>	8,248	15,075	Ligeramente activo
<i>Otholobium mexicanum</i>	2,050	3,630	Muy activo
<i>Zingiber officinale</i>	No es activo a las concentraciones probadas	No es activo a las concentraciones probadas	Inactivo
<i>Rosmarinus officinalis</i>	No es activo a las concentraciones probadas	No es activo a las concentraciones probadas	Inactivo

Tabla 6 IC50 - IC90 (µg/mL). Efecto de los extractos clorofórmicos de plantas medicinales frente a *Enterococcus faecalis* cepa clínica, y cepas de referencia ATCC.

4.2.1. Actividad antibacteriana

Con objetivo de aportar con información respecto a la actividad antibacteriana de plantas medicinales presentes en el Ecuador, se realizó un estudio *in vitro* mediante la técnica de microdilución en placa de las plantas *Otholobium mexicanum*, *Peperomia galioides*, *Zingiber officinale* y *Rosmarinus officinalis*. Para el presente estudio se consultaron diferentes fuentes bibliográficas sobre las plantas medicinales ya mencionadas y los metabolitos secundarios con propiedades antibacterianas presentes en las mismas.

En las tablas 5 y 6 se muestra la actividad de los extractos clorofórmicos y metanólicos de las hojas de *Peperomia galioides*, las hojas de *Otholobium mexicanum*, las raíces de *Zingiber officinale* y las hojas de *Rosmarinus officinalis* frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 y *Enterococcus faecalis* cepa clínica.

Para evaluar la actividad antibacteriana se utilizó la técnica de microdilución en placa donde se emplearon diferentes concentraciones de los extractos desde 64 $\mu\text{g/mL}$; 16 $\mu\text{g/mL}$; 4 $\mu\text{g/mL}$; 1 $\mu\text{g/mL}$ hasta 0.25 $\mu\text{g/mL}$ frente a cada una de las cepas bacterianas, se obtuvo el promedio de las determinaciones realizadas por cuadruplicado y expresados en IC50 e IC90; además, se utilizó una serie de diluciones de ampicilina para control con antibiótico.

Los resultados obtenidos de la actividad antimicrobiana de los extractos clorofórmicos de las hojas de *Otholobium mexicanum* frente a las tres cepas de estudio presentaron mejores valores a comparación con los extractos metanólicos de la misma planta. Se obtuvieron para las cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 y clínica valores de IC50 de 8,571 $\mu\text{g/mL}$, 8,660 $\mu\text{g/mL}$ y 2,050 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, siendo este último de mayor interés al considerarse como muy activo y los otros dos como ligeramente activos. Los IC50 obtenidos de los extractos metanólicos frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 y cepa clínica fueron de 8,665 $\mu\text{g/mL}$, 10,586 $\mu\text{g/mL}$ y 15,874 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, considerándose todos estos como ligeramente activos.

Estudios realizados por León-López (2014) demostraron que los extractos metanólicos de *Otholobium mexicanum* presentaron actividad antibacteriana moderada con una CMI de 62,5 $\mu\text{g/mL}$ frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; mientras que autores como Katsura et al., (2001) demostraron la actividad antibacteriana de esta planta frente a bacterias gram positivas como *Enterococcus faecalis* IFO 3989, *Enterococcus faecium* IFO 3826, *Streptococcus mutans* JCM 5175 y JCM 5175, aislando uno de sus metabolitos secundarios más importantes, el bakuchiol, y obteniendo una CMI de 1 a 4 $\mu\text{g/mL}$. Jerves et al., en 2014 también evaluaron la actividad antibacteriana del extracto metanólico y clorofórmico de *Otholobium mexicanum* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 obteniendo un valor de IC50 de 4,7 $\mu\text{g/mL}$ y 3,3 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente; estos resultados también sirvieron de referencia para iniciar el presente estudio ya que *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* son bacterias gram positivas y consideradas alguna vez dentro de la misma familia.

Comparando los resultados, más específicos con los de Katsura et al., (2001), se pudo determinar que hay una similitud con los obtenidos en esta investigación. La diferencia entre ambos resultados se basa en que, Katsura et al., (2001) los obtiene mediante el

cálculo de CMI y en este trabajo mediante el cálculo de IC50. Este último es más preciso y adecuado para interpretación de resultados (Lechuga, 2018), ya que en la CMI los resultados son semicuantitativos y el IC50 es netamente cuantitativo. Además, Katsura et al., (2001) aísla el bakuchiol y evalúa directamente su actividad frente a las bacterias ya mencionadas.

Por otra parte, los resultados que se obtuvieron del extracto de las hojas de *Peperomia galioides* tanto clorofórmico como metanólico presentaron una actividad muy variada, el extracto clorofórmico presentó una gran actividad inhibitoria, con un IC50 de 8,248 µg/mL frente a la cepa clínica; en cambio, el extracto metanólico tuvo un comportamiento diferente frente a las tres cepas de *Enterococcus faecalis* en donde se observó una actividad antimicrobiana con un IC50 de 30,081 µg/mL para *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y de 31.048 µg/mL frente a la cepa clínica, determinando así una ligera actividad del extracto metanólico frente a una actividad significativa del extracto clorofórmico.

Jerves et al., en 2014 evaluaron la actividad antibacteriana de diversas plantas medicinales del Sur del Ecuador, entre una de ellas, *Peperomia sp.*, y determinaron un IC50 de 6.6 µg/ml del extracto clorofórmico y un IC50 de 10,6 µg/ml del extracto metanólico frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Al consultar diferentes fuentes bibliográficas, pudimos observar que no existen ensayos publicados dirigidos con el objetivo de determinar la actividad antibacteriana de *Peperomia galioides* frente a *Enterococcus faecalis* mediante la técnica de microdilución o el cálculo de CMI. Sin embargo, los estudios realizados por Jerves et al (2014) fueron una premisa para evaluar la actividad antibacteriana de esta planta frente a *Enterococcus faecalis* ya que ambas son bacterias gram positivas y por lo tanto podría verse un efecto similar, mismo que se observó en la presente investigación.

A pesar de haber encontrado en la literatura evidencia de la actividad antibacteriana de *Rosmarinus officinalis* frente a *Enterococcus faecalis*, se determinó que los extractos procesados no eran activos a las concentraciones probadas frente a las cepas empleadas del patógeno en cuestión, a excepción del extracto metanólico de *Rosmarinus officinalis* que presentó una ligera actividad con un IC50 de 20.234 µg/mL frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Moreno et al., (2006) describieron que la actividad antibacteriana de extractos metanólicos de *Rosmarinus officinalis* frente a bacterias específicamente gram positivas presentaron una CMI entre 2 y 15 µg/mL y frente a *E. faecalis* una CMI de 15 µg/mL; por otro lado los resultados obtenidos por Zampini et al., (2013) demostraron que el extracto metanólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* inhibió el crecimiento de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y 13 cepas de *Enterococcus faecalis* resistente a estreptomicina, gentamicina y ambas, (cepas obtenidas del Hospital Nicolás Avellaneda, Tucumán, Argentina) con un valor de CMI de 200 µg/mL. También Zampini et al., (2013) evaluaron la MBC (concentración mínima bactericida) del extracto metanólico rico en ácido carnósico y carnosol y del ácido carnósico frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 obteniendo valores de 400 µg/mL y 60 µg/mL respectivamente. Otros autores como Volcão et al. (2001), evaluaron la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* frente a *E. faecalis* y bacterias gram negativas obteniendo como resultado que este presenta mayor actividad frente a *E. faecalis* antes que las gram negativas. Todos estos resultados ratifican la actividad del extracto metanólico de *Rosmarinus officinalis* frente a *Enterococcus faecalis* sin embargo no son comparables con los obtenidos en el presente trabajo porque son expresados en CMI.

Para *Zingiber officinale* se determinó que es un extracto inactivo a las concentraciones probadas en este ensayo a pesar de que algunos estudios reporten su actividad. Guanoluiza en el 2017 reporta actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico del jengibre al 15% mediante la técnica de difusión en disco. Vásquez et al. en el 2001 evaluaron la actividad antibacteriana del aceite esencial del jengibre frente a cuatro bacterias gram positivas y una gram negativa, y al realizar la prueba de sensibilidad se determinó que *Enterococcus faecalis* era sensible a este aceite. Bernardes et al., en 2010 también demostraron la actividad antibacteriana del aceite esencial del jengibre frente a diferentes bacterias gram positivas, entre estas también citan a *E. faecalis*.

Estas diferencias en la actividad antibacteriana presentadas por los diferentes extractos podrían deberse a la técnica empleada y a las concentraciones probadas.

Por otro lado, se determinó que los extractos clorofórmicos, más aún los de *Otholobium mexicanum* como se aprecia en la Ilustración 12, presentaron en su mayoría una mejor actividad antibacteriana que los extractos metanólicos frente a las diferentes cepas, en

especial a la cepa clínica, esto básicamente porque su comportamiento puede ser diferente en relación a las cepas ATCC que son microorganismos de referencia certificados, al contrario de una cepa clínica en donde se desconoce completamente su comportamiento frente a los antimicrobianos. Esto también apoya la idea de que posiblemente los metabolitos secundarios causantes de la actividad antibacteriana (para el caso de *Otholobium mexicanum* y *Peperomia galioides*) frente a *Enterococcus faecalis* son de naturaleza lipofílica, como se pudo observar en algunos de los estudios tomados de referencia para la presente investigación.

Todo el conocimiento expuesto en el presente trabajo puede servir de base para futuras investigaciones donde se desee evaluar el potencial antibacteriano de los extractos de las plantas ya nombradas o de la misma familia, ya que: orientan al investigador al momento de seleccionar el solvente más apropiado para la extracción (por ejemplo: lipofílicos para *Otholobium mexicanum* y *Peperomia galioides* e hidrofílicos para *Rosmarinus officinalis*). Se ratifica también la importancia del uso de microtécnicas para la evaluación de la actividad antibacteriana de dichos extractos debido a su sensibilidad y especificidad para obtención de valores cuantitativos de inhibición expresados en IC50 e IC90 y la necesidad de aplicar cálculos bioestadísticos para expresar e interpretar los valores de IC50 de los extractos obtenidos.

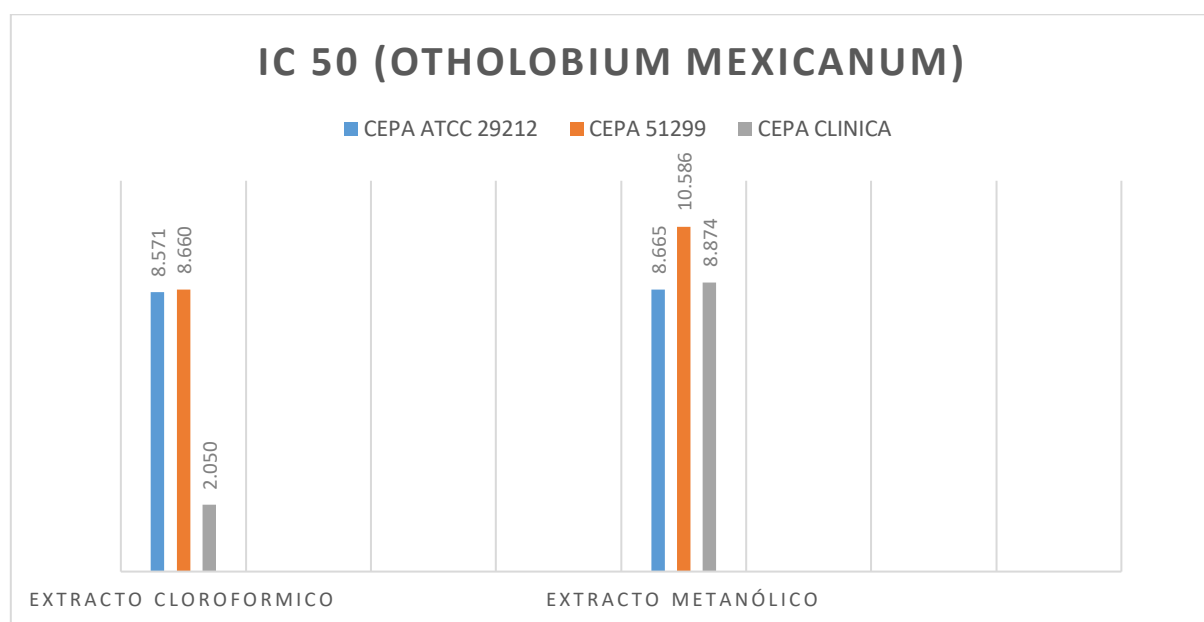


Ilustración 10 Gráfica de actividad antibacteriana IC 50 de *Otholobium mexicanum*.
Fuente: propiedad de los autores

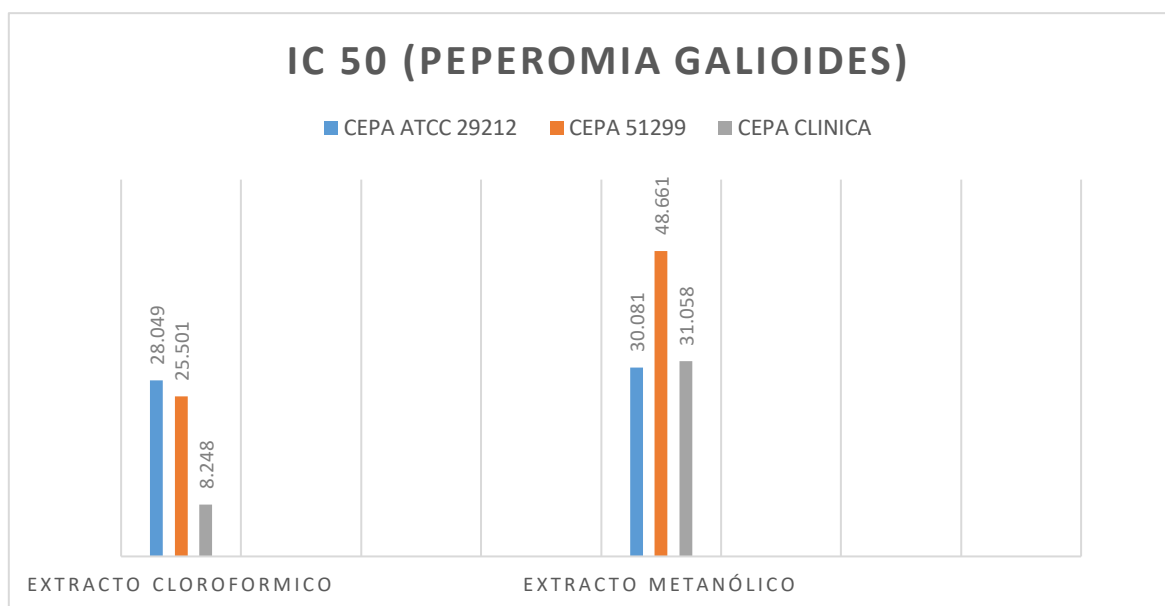


Ilustración 11 Gráfica de actividad antibacteriana IC 50 de *Peperomia galioides*. Fuente: propiedad de los autores

COMPARACIÓN DE VALORES DE IC50 DE LOS EXTRACTOS DE LAS PLANTAS ESTUDIADAS

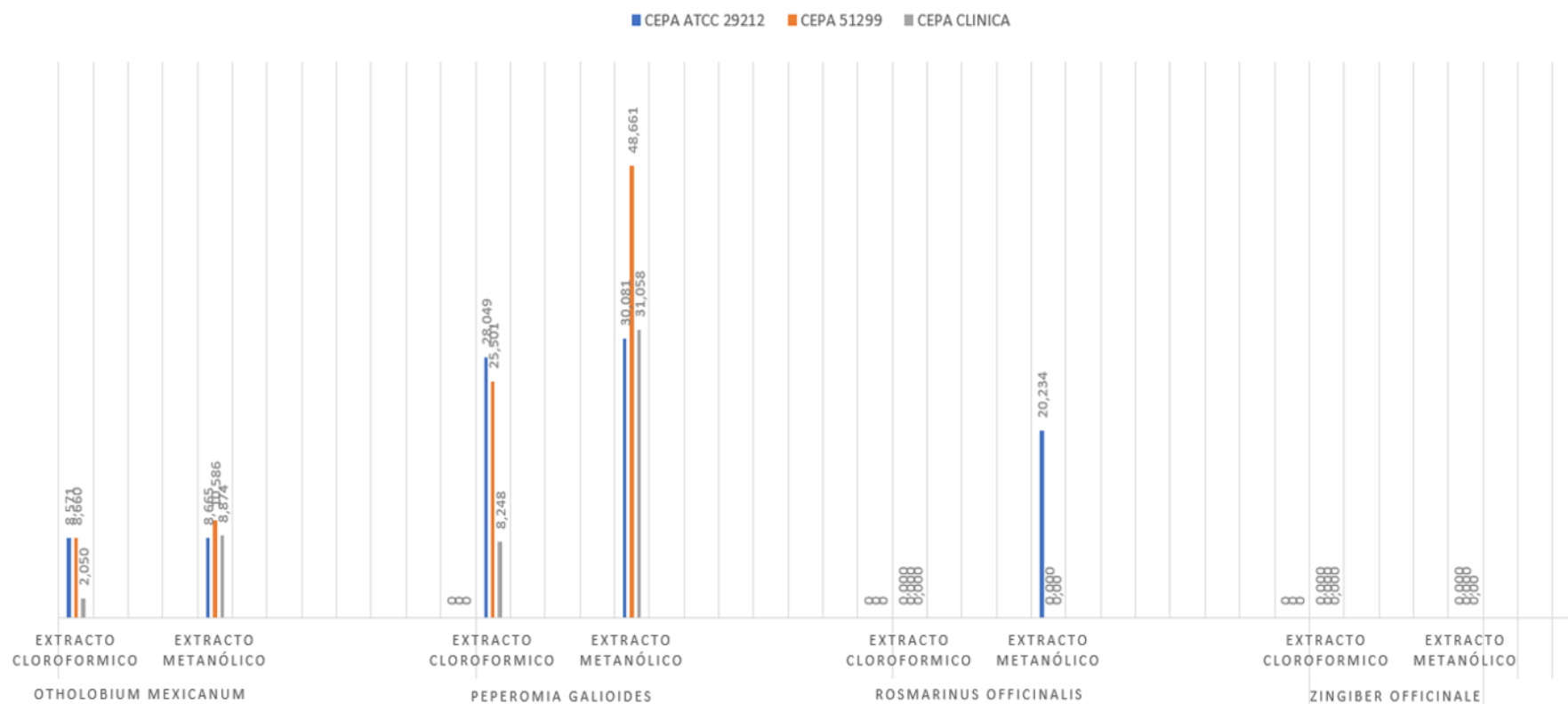


Ilustración 12 Comparación de los valores de IC50 de diferentes extractos de las plantas medicinales utilizadas en la presente investigación.
Fuente: Propiedad de los autores

4.3. Control de antibióticos.

Se realizó control de antibiótico frente a las 3 cepas de estudio, utilizando ampicilina a una concentración de 1g/4mL. Los resultados se pueden observar en los ANEXOS 15, 16 y 17.

Los puntos de corte establecidos por el Manual CLSI, 2021, se pueden apreciar en el ANEXO 14.

Para las cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y ATCC 51299 resistente a la vancomicina, se cumplió con lo establecido en la guía CLSI, 2021. En el caso de la cepa clínica, resultó ser resistente frente a la ampicilina.

4.4. Rendimientos

Se evaluó el rendimiento de los extractos clorofórmicos y metanólicos (partiendo de 10 gramos de materia seca) de las 4 plantas utilizadas en la presente investigación. Se presenta a continuación los cálculos realizados para obtener 1 gramo de extracto seco:

- EXTRACTOS CLOROFÓRMICOS

	Extracto seco (gr)	Materia seca (gr)
CONGONA	1,086 (obtenidos tras concentración al vacío)	10
	1	X = 9

Para obtener 1 gr de extracto clorofórmico seco de congona se debe partir de 9 gr de materia seca. La relación es de **9 : 1**.

	Extracto seco (gr)	Materia seca (gr)
TRINITARIA	0,9409 (obtenidos tras concentración al vacío)	10
	1	X = 10

Para obtener 1 gr de extracto clorofórmico seco de trinitaria se debe partir de 10 gr de materia seca. La relación es de **10 : 1**.



	Extracto seco (gr)	Materia seca (gr)
JENGIBRE	0,5132 (obtenidos tras concentración al vacío)	10
	1	X = 19

Para obtener 1 gr de extracto clorofórmico seco de jengibre se debe partir de 19 gr de materia seca. La relación es de **19 : 1**.

	Extracto seco (gr)	Materia seca (gr)
ROMERO	1,5723 (obtenidos tras concentración al vacío)	10
	1	X = 6

Para obtener 1 gr de extracto clorofórmico seco de romero se debe partir de 6,36 gr de materia seca. La relación es de **6 : 1**.

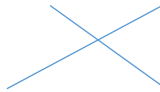
Tras los cálculos realizados se determinó que el romero presentó mejor rendimiento, ya que para obtener 1 gramo de extracto seco se necesita menor cantidad de materia seca inicial (6 gr), seguido por la congona (9 gr), trinitaria (10 gr) y jengibre (19 gr).

- **EXTRACTOS METANÓLICOS**

	Extracto seco (gr)	Materia seca (gr)
CONGONA	2,3123 (obtenidos tras lío-filización)	10
	1	X = 4

Para obtener 1 gr de extracto metanólico seco de congona se debe partir de 4 gr de materia seca. La relación es de **4 : 1**.



	Extracto seco (gr)	Materia seca (gr)
TRINITARIA	2,3286 (obtenidos tras liofilización)	10
	1	X = 4
		

Para obtener 1 gr de extracto metanólico seco de trinitaria se debe partir de 4 gr de materia seca. La relación es de **4 : 1**.

	Extracto seco (gr)	Materia seca (gr)
JENGIBRE	2,1892 (obtenidos tras liofilización)	10
	1	X = 4
		

Para obtener 1 gr de extracto metanólico seco de jengibre se debe partir de 4 gr de materia seca. La relación es de **4 : 1**.

	Extracto seco (gr)	Materia seca (gr)
ROMERO	2,6058 (obtenidos tras liofilización)	10
	1	X = 3
		

Para obtener 1 gr de extracto metanólico seco de romero se debe partir de 3 gr de materia seca. La relación es de **3 : 1**.

Tras los cálculos realizados se determinó que el romero presentó mejor rendimiento, ya que para obtener 1 gramo de extracto seco se necesita menor cantidad de materia seca inicial (3 gr), seguido por trinitaria (4 gr), congona (4 gr) y jengibre (4 gr).

Comparando los resultados obtenidos se determinó que los extractos metanólicos presentaron mejor rendimiento que los extractos clorofórmicos ya que se necesita menor cantidad de materia seca inicial para obtener 1 gr de extracto seco final. También se observó que en ambos casos el romero presentó el mejor rendimiento.

CAPÍTULO 5

5.1. CONCLUSIONES

Se comprobó la hipótesis planteada en base a cada uno de los objetivos establecidos en la presente investigación. Se evidenció que los extractos clorofórmicos y metanólicos de *Peperomia galioides* y *Otholobium mexicanum* demostraron una mejor actividad antibacteriana frente a cepas de referencia como *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 y una cepa clínica de *Enterococcus faecalis* a comparación de *Rosmarinus officinalis* y *Zingiber officinale*.

Los extractos clorofórmicos de *Otholobium mexicanum* y *Peperomia galioides* evaluados frente a la cepa clínica de *Enterococcus faecalis*, demostraron una actividad significativa y relevante. No obstante, los resultados obtenidos con los extractos metanólicos de *Otholobium mexicanum* frente a las diferentes cepas de *Enterococcus faecalis* también evidenciaron actividad antibacteriana importante.

El extracto metanólico de *Rosmarinus officinalis* mostró ligera actividad antibacteriana frente a la cepa ATCC 29212 de *Enterococcus faecalis*. El resto de extractos de *Rosmarinus officinalis* obtenidos en la presente investigación no son activos o completamente activos a las concentraciones empleadas.

En cuanto a los extractos metanólicos y clorofórmicos de *Zingiber officinale* no se evidenció actividad alguna frente a las cepas probadas y a las concentraciones empleadas. Todos estos resultados fueron validados por métodos bioestadísticos para establecer el IC50 e IC90.

5.2. RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, es importante realizar las siguientes recomendaciones:

Continuar la investigación de *Otholobium mexicanum* y *Peperomia galioides*, ya que sus extractos presentaron actividad significativa frente a las tres cepas de *Enterococcus faecalis* estudiadas.

Realizar estudios dirigidos a aislar e identificar los metabolitos secundarios responsables de la actividad antibacteriana de los extractos de *Otholobium mexicanum* y *Peperomia galioides*, con el fin de encontrar nuevas alternativas para la producción de antimicrobianos a partir de fuentes de origen natural que podrían tener aplicación dentro de la industria farmacéutica, veterinaria o agropecuaria.

Evaluar la citotoxicidad de los compuestos bioactivos.

Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos obtenidos en la presente investigación frente a otras bacterias gram positivas, ya que *E. faecalis* pertenece a este grupo y comparte características estructurales.



BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, E. (2007). In Estudio Fitoquímico Exploratorio de *Peperomia cuchumatana* Véliz y *Peperomia moralesii* Véliz (*Piperaceae*), Especies Endémicas de Guatemala. (p. 7). <https://biblioteca-farmacia.usac.edu.gt/tesis/Q178.pdf>
- Alos, J.-I. (2015, diciembre). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.*, 33(10), 692-699. 10.1016/j.eimc.2014.10.004
- Amaguaña, F., & Churuchumbi, E. (2018). Estandarización fitoquímica del extracto de caléndula. UPS. Obtenido de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16149/1/UPS-QT13324.pdf>
- Aulacio, P. (2002). Determinación de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos (antibiograma). http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Antibiograma.pdf
- Ávila, R., Navarro, A., Vera, O., Dávila, R. M., Melgoza, N., & Meza, R. (2011). Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): una revisión de sus usos no culinarios. *Ciencia y Mar*, 15(4), 23-26. <https://biblat.unam.mx/hevila/Cienciaymar/2011/no43/3.pdf>
- Bernardes, W., Lucarini, R., Tozatti, M., Souza, M., Andrade, M., Da Silva, A., . . . Cunha, W. (2010). Antimicrobial Activity of *Rosmarinus officinalis* against Oral Pathogens: Relevance of Carnosic Acid and Carnosol. *Chemistry & Biodiversity*, 7, 1838. doi:10.1002/cbdv.200900301
- Cañar, E., & Paguay, E. (2017). Estandarización de la técnica de microdilución de actividad antifúngica de extractos hidrofílicos y lipofílicos de plantas medicinales frente a *Cándida albicans* ATCC 90028. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/27351>
- Cantón, R., & Ruíz, P. (2013). Infecciones causadas por bacterias grampositivas multirresistentes (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus spp.*) Infections caused by multi-resistant Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Enterococcus spp.*). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.*, 31(8), 543-551. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.08.001>
- Carmilema, C., & Delgado, R. (2010). In “Validación del método de microdilución para la actividad antimicrobiana de extractos de plantas (ortiga, ajenojo, malva olorosa.

- Carrión, A., & García, C. (2010). In Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/2483>
- Chávez, J. P. (2017). Lista de Plantas Medicinales del Ecuador (y para qué sirven). Foros Ecuador. <http://www.forosecuador.ec/forum/aficiones/salud/117954-lista-de-plantas-medicinales-del-ecuador-y-para-que-sirven>
- CLSI. (2021). Zone diameter and MIC Breakpoints for *Enterococcus faecalis*.
- Colorado, J., Elkin, G., & Martínez, A. (2007). Desarrollo de la bioautografía directa como método de referencia para evaluar la actividad antimicrobiana de la gentamicina contra *Escherichia coli*. Medellín.
- Cos, P., Vlietinck, A. J., Berghe, D. V., & Maes, L. (2006). Anti-infective potential of bioautografía directa como método de referencia para evaluar la actividad antimicrobiana de la gentamicina contra *Escherichia coli*. Medellín. natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. Journal of Ethnopharmacology, 290-302. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.04.003>
- Cosme, I. (2008). El uso de plantas medicinales. Revista Intercultural, 13, 23-26. <https://cdigital.uv.mx/handle/123456789/8921>
- Díaz, M., Rodríguez, C., & Zhurbenko, R. (2010). Fundamental features on the *Enterococcus genus* as a very important pathogen at present time. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología., 48(2), 147-161. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032010000200006
- Flores, E., Saenz, A., Castañeda, A., & Narro, R. (2019). Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): su origen, importancia y generalidades de sus metabolitos secundarios. In TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. (Vol. 23, pp. 1-10). <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.266>
- Gallegos, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. Anales de la Facultad de Medicina, 77(4) 237-331. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832016000400002

- Guanoluiza, S., & Hidalgo, P. (2018). In Efecto antimicrobiano del extracto, aceite esencial de jengibre (*Zingiber officinale*) sobre cepas de *Enterococcus faecalis*: Estudio in vitro. (pp. 5-8).
<https://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/odontologia/article/view/1103>
- Jawetz, Melnick, & Adelberg. (2016). Enterococos. In Microbiología Clínica (27a. ed., pp. 226-230).
- Jerves-Guerrero, D. (2017). In Determinación del tipo de mecanismo de resistencia de *Enterococcus spp* resistentes a la vancomicina por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en aislados de muestras clínicas.
<http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/14147>
- Katsura, H., Tsukiyama, R.-I., Suzuki, A., & Kobayashi, M. (2001). Actividades antimicrobianas in vitro del bakuchiol contra microorganismos orales. 10.1128 / AAC.45.11.3009-3013.2001
- Koneman. (2017). Diagnóstico Microbiológico.
- Kukso, F. (2016, julio 26). Para 2050 la resistencia a los antibióticos será la principal causa de muerte. Scientific American.
<https://www.scientificamerican.com/espanol/noticias/para-2050-la-resistencia-a-los-antibioticos-sera-la-principal-causa-de-muerte/>
- León-López, D. (2014). In Evaluación antimicrobiana y aislamiento de metabolitos secundarios de la especie vegetal *Otholobium mexicanum* J.W. Grimes.
<http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/9065/1/Leon%20Lopez%20Diana%20FIN%20DE%20TT.pdf>
- Lucana, M., & Huanca, R. (2014). Estructura bacteriana. Rev. Act. Clin. Med., 2589-2593.
http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2304-37682014001000001&script=sci_arttext
- Mollinedo, M., & González, C. (2014). Bacterias Gram negativas. Rev. Act. Clin. Med., 2609-2613.
http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-37682014001000005&lng=es.
- Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C., & Vojnov, A. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. 10.1080/10715760500473834
- Mukherjee, P. (2008). Quality Control of Herbal Drugs. New Delhi: Business Horizons.

- Pájaro, N., Granados, C., & Torrenegra, M. (2018). Actividad antibacteriana del extracto etanólico del peciolo de *Rheum rhabarbarum*. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, 47(1), 26-36. <http://dx.doi.org/10.15446/rcciquifa.v47n1.70656>
- Picazo, J. J. (2000). Procedimientos en Microbiología Clínica. <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>
- Pío-León, J. F., Díaz, S., López, M., Uribe, M., Willms, K., López, G., Montes, J., & Delgado, F. (2013). Actividad antibacteriana de extractos de frutos de nanchi (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth), arrayán (*Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied.) y ayale (*Crescentia alata* Kunth). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.*, 12(4), 356-364. <https://www.redalyc.org/pdf/856/85628141003.pdf>
- Ponce, J. J. (2019). Composición química, actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial de *Peperomia galioides* Kunth y actividad fotoprotectora in vitro en una emulsión dermocosmética. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/11528>
- Remington. (2000). Farmacia de Remington.
- Reyes, J., & Jerves, D. (2017). In Determinación del tipo de mecanismo de resistencia de *Enterococcus spp* resistentes a la vancomicina por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en aislados de muestras clínicas. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/14147>
- Rodríguez, C., García, S., Barberis, C., Saposnik, E., Weyland, B., Nastro, M., Losada, M., Perazzi, B., Almuzara, M., Foccoli, M., Vay, C., & Famiglietti, A. (2013). *Enterococcus spp.*: Resistencia antimicrobiana en infecciones intrahospitalarias. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. <https://www.redalyc.org/pdf/535/53526207018.pdf>
- Segovia, M., Carrasco, L., & Acosta, N. (2015). Las colecciones biológicas: Los tesoros escondidos de un país megadiverso. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 36(2), 83-85. 10.26807/remcb.v36i1-2.278
- Selles, M. (1992). Farmacia Galénica.
- Tituaña, G., Córdova, I., Tobar, M., & Lascano, A. (2018). Estudio del proceso de obtención de extractos de plantas medicinales. *Revista Caribeña de Ciencias Sociales*. <https://www.eumed.net/rev/caribe/2018/05/extractos-plantas->

medicinales.html //hdl.handle.net/20.500.11763/caribe1805extractos-plantas-medicinales

- Torre, L. d. l., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M., & Balslev, H. (2008). Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador. <https://bibdigital.rjb.csic.es/records/item/16016-enciclopedia-de-las-plantas-utiles-del-ecuador?offset=3>
- Torres, J., León, J., & Tomas, G. (2017). Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” frente a patógenos de origen clínico. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 37(1). http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562017000100004
- Valarezo, S. (2019). Actividad antimicrobiana de extractos de tallos y flores del *Hedyosmum* sp. recolectadas en el bosque Jacarón, Chimborazo. Octubre 2018-febrero 2019. <http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/5555>
- Vásquez, O., Alva, A., & Marreros, J. (2001). Revista Amazónica de Investigación Alimentaria. In extracción y caracterización del aceite esencial de jengibre (*Zingiber officinale*). (Vol. 1, pp. 38-42). <https://www.unapiquitos.edu.pe/pregrado/facultades/alimentarias/descargas/vol1/6.pdf>
- Volcão, L. (2011). Evaluación de la actividad antibacterial del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. en patógenos alimentarios. XX Congreso de iniciación científica, II Muestra Científica UFPEL 2011.
- World Health Organization. (2003). WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for Medicinal plants.
- Zampini, I., Arias, M., Cudmani, N., Ordoñez, R., Isla, M., & Moreno, S. (2013). Antibacterial potential of non-volatile constituents of *Rosmarinus officinalis* against 37 clinical isolates of multidrug-resistant bacteria. In Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas (Vol. 12 (2), pp. 201-208). <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85625780010>



ANEXO 1. Certificado de identificación taxonómica de las plantas medicinales utilizadas en la presente investigación.



Cuenca, 26 de marzo de 2021

La suscrita, Raffaella Ansaloni, directora del Herbario Azuay de la Universidad del Azuay, por petición de los interesados

CERTIFICA

Que, luego de la respectiva revisión, las plantas empleadas para la Tesis de Grado de los Señores Oliver José Ramírez Condoy y Fanny Marcela Redrován Berrezueta, titulada "Determinación de la actividad antibacteriana de extractos de plantas medicinales frente a *Enterococcus faecalis*" se han identificado de la siguiente manera.

Nombre común: Congona

Peperomia galioides Kunth de la familia botánica Piperaceae

Nombre común: Trinitaria

Otholobium mexicanum (L. f.) J.W. Grimes de la familia botánica Fabaceae

Raffaella Ansaloni, PhD.
Directora del Herbario Azuay
Universidad del Azuay
Email: ransaloni@uazuay.edu.ec
<https://herbario.uazuay.edu.ec/>

ANEXO 2. Porcentajes de inhibición de los extractos clorofórmicos de las plantas medicinales frente a *E. faecalis* ATCC 29212.

CEPA: *E. FAECALIS* ATCC 29212

CONCENTRACIÓN	64 ug/mL	16 ug/mL	4 ug/mL	1 ug/mL	0,25 ug/mL
CONGONA	92,791	21,672	13,445	8,403	0,442
	91,906	9,819	6,900	8,580	3,627
	91,552	34,321	9,819	10,172	0,885
	91,110	17,603	9,730	8,138	6,103
TRINITARIA	76,073	90,756	-7,077	4,777	7,430
	74,657	90,756	-2,388	4,600	4,688
	74,923	90,756	9,907	5,042	3,096
	73,773	91,110	-1,150	6,103	3,273
JENGIBRE	-10,172	-0,619	6,280	7,784	3,538
	-3,184	-1,238	3,892	11,765	4,246
	-0,796	1,504	4,511	4,954	9,376
	-2,565	1,061	2,831	3,096	3,892
ROMERO	5,175	16,364	4,522	8,998	5,641
	-8,252	3,683	1,445	4,149	2,937
	6,853	15,618	1,166	2,751	6,387
	38,555	15,152	0,140	-0,420	-0,979

ANEXO 3. Cálculo e interpretación de IC50 e IC90 de los extractos clorofórmicos de las plantas medicinales frente a *E. faecalis* ATCC 29212.

	IC90 (ug/mL)	IC50 (ug/mL)
CONGONA	60,611	27,793
	61,973	31,537
	61,639	23,392
	62,674	29,476
TRINITARIA	15,830	8,981
	15,821	8,723
	15,794	7,955
	15,735	8,627
JENGIBRE	No es activo a las concentraciones probadas	No es activo a las concentraciones probadas
ROMERO	No es activo a las concentraciones probadas	No es activo a las concentraciones probadas

	IC90 (ug/mL)	IC50 (ug/mL)	INTERPRETACIÓN IC50
CONGONA	61,724	28,049	LIGERAMENTE ACTIVO
TRINITARIA	15,795	8,571	LIGERAMENTE ACTIVO
JENGIBRE	No es activo a las concentraciones probadas	No es activo a las concentraciones probadas	INACTIVO
ROMERO	No es activo a las concentraciones probadas	No es activo a las concentraciones probadas	INACTIVO

ANEXO 4. Porcentajes de inhibición de los extractos clorofórmicos de las plantas medicinales frente a *E. faecalis* ATCC 51299

CEPA: *E. FAECALIS* ATCC 51299

CONCENTRACIÓN	64 ug/mL	16 ug/mL	4 ug/mL	1 ug/mL	0,25 ug/mL
CONGONA	93,395	31,947	6,507	7,485	5,039
	91,341	10,910	3,767	6,703	7,583
	91,830	39,286	-0,930	4,452	4,941
	90,753	29,892	6,213	0,734	4,550
TRINITARIA	74,315	90,851	3,767	4,159	5,528
	73,239	91,145	1,125	4,061	6,213
	72,456	90,068	-5,333	5,528	5,724
	73,826	91,047	-5,235	0,538	13,552
JENGIBRE	-17,661	-1,027	3,865	3,082	2,691
	-11,693	4,746	5,822	4,550	2,984
	-9,638	-0,930	3,376	6,115	3,180
	-9,051	0,538	4,648	13,454	3,474
ROMERO	3,865	5,333	6,996	7,192	2,006
	16,683	2,202	0,832	5,039	4,843
	46,037	-2,202	4,354	5,528	-0,049
	24,217	-2,104	-0,049	4,843	5,333

ANEXO 5. Cálculo e interpretación de IC50 e IC90 de los extractos clorofórmicos de las plantas medicinales frente a *E. faecalis* ATCC 51299.

	IC90 (ug/mL)	IC50 (ug/mL)
CONGONA	59,281	24,044
	62,538	31,385
	60,983	21,279
	62,912	25,295
TRINITARIA	15,785	8,350
	15,720	8,491
	15,984	8,938
	15,761	8,860
JENGIBRE	No es activo a las concentraciones probadas	No es activo a las concentraciones probadas
ROMERO	No es activo a las concentraciones probadas	No es activo a las concentraciones probadas

	IC90 (ug/mL)	IC50 (ug/mL)	INTERPRETACIÓN IC50
CONGONA	61,428	25,501	LIGERAMENTE ACTIVO
TRINITARIA	15,812	8,660	LIGERAMENTE ACTIVO
JENGIBRE	No es activo a las concentraciones probadas	No es activo a las concentraciones probadas	INACTIVO
ROMERO	No es activo a las concentraciones probadas	No es activo a las concentraciones probadas	INACTIVO

ANEXO 6. Porcentajes de inhibición de los extractos clorofórmicos de las plantas medicinales frente a *E. faecalis* (cepa clínica).

CEPA: *E. FAECALIS* CEPA CLÍNICA

CONCENTRACIÓN	64 ug/mL	16 ug/mL	4 ug/mL	1 ug/mL	0,25 ug/mL
CONGONA	90,726	95,407	-0,420	1,082	0,729
	90,991	93,729	7,794	3,555	0,994
	92,846	95,937	-1,479	2,495	-2,009
	88,518	91,080	1,524	6,734	7,706
TRINITARIA	77,672	94,576	99,096	0,927	2,463
	75,593	94,486	97,198	-1,605	8,972
	75,141	93,130	98,373	-1,424	1,198
	73,876	88,791	92,949	1,017	1,107
JENGIBRE	-10,135	-11,195	5,410	13,182	6,469
	-10,841	-5,454	2,672	4,791	2,937
	-12,431	-7,397	-0,243	4,615	4,438
	-11,018	-5,012	2,672	6,911	-1,038
ROMERO	-10,576	-11,813	-1,038	8,236	4,791
	-14,109	-12,254	1,788	9,119	4,173
	-12,519	-7,750	1,082	7,971	11,062
	-13,579	-8,192	0,287	3,908	4,791

ANEXO 7. Cálculo e interpretación de IC50 e IC90 de los extractos clorofórmicos de las plantas medicinales frente a *E. faecalis* (cepa clínica).

	IC90 (ug/mL)	IC50 (ug/mL)
CONGONA	14,796	8,295
	15,066	7,902
	14,704	8,322
	15,735	8,471
TRINITARIA	3,518	2,000
	3,616	2,063
	3,561	2,043
	3,826	2,093
JENGIBRE	No es activo a las concentraciones probadas	No es activo a las concentraciones probadas
ROMERO	No es activo a las concentraciones probadas	No es activo a las concentraciones probadas

	IC90 (ug/mL)	IC50 (ug/mL)	INTERPRETACIÓN IC50
CONGONA	15,075	8,248	LIGERAMENTE ACTIVO
TRINITARIA	3,630	2,050	MUY ACTIVO
JENGIBRE	No es activo a las concentraciones probadas	No es activo a las concentraciones probadas	INACTIVO
ROMERO	No es activo a las concentraciones probadas	No es activo a las concentraciones probadas	INACTIVO

ANEXO 8. Porcentajes de inhibición de los extractos metanólicos de las plantas medicinales frente a *E. faecalis* ATCC 29212.

CEPA: *E. FAECALIS* ATCC 29212

CONCENTRACIÓN	64 ug/mL	16 ug/mL	4 ug/mL	1 ug/mL	0,25 ug/mL
CONGONA	94,130	8,875	14,186	7,011	2,353
	91,428	18,192	14,652	6,639	9,620
	94,349	11,857	15,490	7,198	10,552
	93,664	15,490	8,130	12,509	2,725
TRINITARIA	82,564	92,261	-2,657	3,869	2,657
	83,497	92,914	-1,259	3,124	2,471
	82,937	92,727	-3,310	-0,047	-0,606
	83,776	92,634	-7,879	-1,072	1,911
JENGIBRE	15,863	9,620	11,204	16,702	10,459
	22,199	11,670	13,068	11,111	17,633
	12,322	10,832	9,807	5,241	1,887
	12,136	11,204	5,427	12,975	9,993
ROMERO	89,744	34,825	-1,445	0,979	1,259
	69,697	48,904	-1,166	2,751	-5,548
	76,503	43,310	-4,615	0,513	-0,606
	92,354	43,892	-0,606	4,709	-2,191

ANEXO 9. Cálculo e interpretación de IC50 e IC90 de los extractos metanólicos de las plantas medicinales frente a *E. faecalis* ATCC 29212.

	IC90 (ug/mL)	IC50 (ug/mL)
CONGONA	59,843	31,228
	62,293	29,215
	59,489	30,374
	59,974	29,505
TRINITARIA	15,483	8,631
	15,328	8,507
	15,382	8,635
	15,429	8,887
JENGIBRE	No es activo a las concentraciones probadas	No es activo a las concentraciones probadas
ROMERO	No es activo a las concentraciones probadas	23,468
		17,213
		21,158
		19,096

	IC90 (ug/mL)	IC50 (ug/mL)	INTERPRETACIÓN IC50
CONGONA	60,400	30,081	INACTIVO
TRINITARIA	15,406	8,665	LIGERAMENTE ACTIVO
JENGIBRE	No es activo a las concentraciones probadas	No es activo a las concentraciones probadas	INACTIVO
ROMERO	No es activo a las concentraciones probadas	20,234	LIGERAMENTE ACTIVO

ANEXO 10. Porcentajes de inhibición de los extractos metanólicos de las plantas medicinales frente a *E. faecalis* ATCC 51299.

CEPA: *E. FAECALIS* ATCC 51299

CONCENTRACIÓN	64 ug/mL	16 ug/mL	4 ug/mL	1 ug/mL	0,25 ug/mL
CONGONA	82,317	-68,726	58,842	-37,838	-27,336
	73,668	-39,691	-83,243	-4,788	-11,583
	73,977	-47,104	-88,803	-34,440	-35,058
	72,432	-59,151	-82,934	-37,838	-3,552
TRINITARIA	22,703	77,375	-31,351	76,757	0,154
	42,780	85,714	-24,556	-13,436	59,768
	40,000	81,081	-19,923	-13,436	24,247
	59,768	79,846	-16,216	-29,498	33,514
JENGIBRE	-20,232	3,552	5,405	-1,081	-7,259
	-27,027	-9,730	-4,170	1,699	-3,861
	-26,409	-7,259	-10,347	-8,803	-5,714
	-13,436	-11,274	-11,892	-14,981	-3,243
ROMERO	-256,834	-18,996	-6,641	-7,568	-13,127
	-56,988	-11,583	-6,950	-0,463	-1,699
	-153,050	-45,251	-16,216	-10,347	-13,127
	-105,483	-55,444	-13,127	-18,378	23,320

ANEXO 11. Cálculo e interpretación de IC50 e IC90 de los extractos metanólicos de las plantas medicinales frente a *E. faecalis* ATCC 51299.

	IC90 (ug/mL)	IC50 (ug/mL)
CONGONA	No es activo a las concentraciones probadas	47,573
		47,906
		48,636
		50,529
TRINITARIA	No es activo a las concentraciones probadas	11,286
		10,212
		10,444
		10,401
JENGIBRE	No es activo a las concentraciones probadas	No es activo a las concentraciones probadas
ROMERO	No es activo a las concentraciones probadas	No es activo a las concentraciones probadas

	IC90 (ug/mL)	IC50 (ug/mL)	INTERPRETACIÓN IC50
CONGONA	No es activo a las concentraciones probadas	48,661	INACTIVO
TRINITARIA	No es activo a las concentraciones probadas	10,586	LIGERAMENTE ACTIVO
JENGIBRE	No es activo a las concentraciones probadas	No es activo a las concentraciones probadas	INACTIVO
ROMERO	No es activo a las concentraciones probadas	No es activo a las concentraciones probadas	INACTIVO

ANEXO 12. Porcentajes de inhibición de los extractos metanólicos de las plantas medicinales frente a *E. faecalis* (cepa clínica).

CEPA: *E. FAECALIS* CEPA CLÍNICA

CONCENTRACIÓN	64 ug/mL	16 ug/mL	4 ug/mL	1 ug/mL	0,25 ug/mL
CONGONA	95,131	16,300	6,469	3,130	4,892
	93,369	4,892	-0,116	-2,435	1,090
	91,885	15,650	4,521	4,336	2,574
	91,885	4,336	4,428	1,739	2,666
TRINITARIA	85,599	95,954	-10,115	1,196	-2,371
	83,859	93,866	-10,115	-2,632	0,674
	86,382	95,780	-7,244	-3,415	8,593
	83,859	91,603	-11,856	-2,023	-0,457
JENGIBRE	-6,701	-1,136	3,408	10,735	-2,527
	-6,608	-2,435	2,295	0,533	-1,785
	0,348	-3,362	-5,866	-1,600	-2,249
	-0,951	-0,858	5,170	-3,455	-0,951
ROMERO	-13,564	-8,648	-2,435	0,255	-0,394
	-22,467	-7,999	-3,918	0,812	0,070
	-9,576	-9,576	0,255	1,646	2,852
	-15,511	-6,330	1,461	3,408	1,090

ANEXO 13. Cálculo e interpretación de IC50 e IC90 de los extractos metanólicos de las plantas medicinales frente a *E. faecalis* (cepa clínica).

	IC90 (ug/mL)	IC50 (ug/mL)
CONGONA	58,478	28,940
	60,709	32,439
	61,843	29,881
	62,118	32,972
TRINITARIA	14,802	8,776
	15,169	8,915
	14,803	8,642
	15,660	9,163
JENGIBRE	No es activo a las concentraciones probadas	No es activo a las concentraciones probadas
ROMERO	No es activo a las concentraciones probadas	No es activo a las concentraciones probadas

	IC90 (ug/mL)	IC50 (ug/mL)	INTERPRETACIÓN IC50
CONGONA	60,787	31,058	INACTIVO
TRINITARIA	15,109	8,874	LIGERAMENTE ACTIVO
JENGIBRE	No es activo a las concentraciones probadas	No es activo a las concentraciones probadas	INACTIVO
ROMERO	No es activo a las concentraciones probadas	No es activo a las concentraciones probadas	INACTIVO

ANEXO 14. Diámetro de zona y puntos de corte frente a *Enterococcus* spp. (CLSI 2021).Table 2D. *Enterococcus* spp. (Continued)

Table 2D. <i>Enterococcus</i> spp. (Continued)										
Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm			Interpretive Categories and MIC Breakpoints, µg/mL				Comments
			S	I	R	S	SDD	I	R	
PENICILLINS										
A A	Penicillin Ampicillin	10 units 10 µg	≥ 15 ≥ 17	— —	≤ 14 ≤ 16	≤ 8 ≤ 8	— —	— —	≥ 16 ≥ 16	(6) The results of ampicillin susceptibility tests should be used to predict the activity of amoxicillin. Ampicillin results may be used to predict susceptibility to amoxicillin-clavulanate, ampicillin-sulbactam, and piperacillin-tazobactam among non-β-lactamase-producing enterococci. Ampicillin susceptibility can be used to predict imipenem susceptibility, providing the species is confirmed to be <i>E. faecalis</i> . (7) Enterococci susceptible to penicillin are predictably susceptible to ampicillin, amoxicillin, ampicillin-sulbactam, amoxicillin-clavulanate, and piperacillin-tazobactam for non-β-lactamase-producing enterococci. However, enterococci susceptible to ampicillin cannot be assumed to be susceptible to penicillin. If penicillin results are needed, testing of penicillin is required. (8) <i>Rx</i> : Combination therapy with ampicillin, penicillin, or vancomycin (for susceptible strains only), plus an aminoglycoside, is usually indicated for serious enterococcal infections, such as endocarditis, unless high-level resistance to both gentamicin and streptomycin is documented; such combinations are predicted to result in synergistic killing of the <i>Enterococcus</i> . For strains with low-level penicillin or ampicillin resistance when combination therapy with a β-lactam is being considered, also see additional testing and reporting information in Table 3J. ⁴ (9) Penicillin or ampicillin resistance among enterococci due to β-lactamase production has been reported very rarely. Penicillin or ampicillin resistance due to β-lactamase production is not reliably detected with routine disk or dilution methods but is detected using a direct, nitrocefin-based β-lactamase test. Because of the rarity of β-lactamase-positive enterococci, this test does not need to be performed routinely but can be used in selected cases. A positive β-lactamase test predicts resistance to penicillin as well as amino- and ureidopenicillins (see Glossary I).

For Use With M02 and M07

M100, 30th ed.

ANEXO 15. Control de antibióticos para la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

LECTURAS OBTENIDAS

CONCENTRACIÓN	CONTROLES	1ra Réplica	2da Réplica	3ra Réplica
64 ug/mL	1,51	0,444	0,452	0,415
32 ug/mL	1,553	0,521	0,527	0,527
16 ug/mL	1,551	0,501	0,514	0,516
8 ug/mL	1,55	0,465	0,41	0,414
4 ug/mL	0,424	0,409	0,518	0,508
2 ug/mL	0,431	0,668	0,563	0,651
1 ug/mL	0,436	1,164	1,195	1,158
0,5 ug/mL	0,612	1,338	1,357	1,347

CÁLCULOS DE PORCENTAJES DE INHIBICIÓN

CONCENTRACIÓN	Promedio lectura de Controles.	1ra Réplica	2da Réplica	3ra Réplica	PROMEDIOS % DE INHIBICIÓN
64 ug/mL	1,541	102,980521	102,229524	105,702887	103,6376437
32 ug/mL		95,7521709	95,1889228	95,1889228	95,37667214
16 ug/mL		97,6296644	96,4092936	96,2215442	96,75350074
8 ug/mL		101,009153	106,17226	105,796761	104,326058
4 ug/mL	0,47575	106,266135	96,0337949	96,9725417	99,75749042
2 ug/mL		81,9525933	91,8094344	83,5484628	85,7701635
1 ug/mL		35,3907533	32,4806383	35,9540014	34,60846437
0,5 ug/mL		19,0565595	17,2729406	18,2116874	18,18039584

	CONTROL POSITIVO (CONTROL DE LA VIABILIDAD DE LA CEPA BACTERIANA)
	CONTROL NEGATIVO (ESTERILIDAD DEL MEDIO TSB)

ANEXO 16. Control de antibióticos para la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 51299.

LECTURAS OBTENIDAS

CONCENTRACIÓN	CONTROLES	1ra Réplica	2da Réplica	3ra Réplica
64 ug/mL	1,527	0,467	0,474	0,469
32 ug/mL	1,533	0,506	0,519	0,508
16 ug/mL	1,498	0,508	0,519	0,513
8 ug/mL	1,512	0,512	0,513	0,511
4 ug/mL	0,49	0,512	0,49	0,504
2 ug/mL	0,493	0,57	0,484	0,586
1 ug/mL	0,477	0,548	0,535	0,596
0,5 ug/mL	0,468	1,26	1,287	1,258

CÁLCULOS DE PORCENTAJES DE INHIBICIÓN

CONCENTRACIÓN	Promedio lectura de Controles.	1ra Réplica	2da Réplica	3ra Réplica	PROMEDIOS % DE INHIBICIÓN
64 ug/mL	1,5175	101,448576	100,772574	101,255432	101,1588605
32 ug/mL		97,6822791	96,4268469	97,4891357	97,19942057
16 ug/mL		97,4891357	96,4268469	97,0062772	96,97408659
8 ug/mL		97,1028489	97,0062772	97,1994206	97,10284887
4 ug/mL	0,482	97,1028489	99,2274264	97,8754225	98,06856591
2 ug/mL		91,50169	99,8068566	89,9565427	93,75502978
1 ug/mL		93,6262675	94,8816997	88,9908257	92,49959762
0,5 ug/mL		24,8672139	22,2597779	25,0603573	24,0624497

	CONTROL POSITIVO (CONTROL DE LA VIABILIDAD DE LA CEPA BACTERIANA)
	CONTROL NEGATIVO (ESTERILIDAD DEL MEDIO TSB)

ANEXO 17. Control de antibióticos para la cepa clínica de *Enterococcus faecalis*.

LECTURAS OBTENIDAS

CONCENTRACIÓN	CONTROLES	1ra Réplica	2da Réplica	3ra Réplica
64 ug/mL	1,545	0,948	0,922	0,935
32 ug/mL	1,548	0,708	0,761	0,69
16 ug/mL	1,598	0,84	0,844	0,893
8 ug/mL	1,607	0,824	0,837	0,849
4 ug/mL	0,484	0,843	0,823	0,842
2 ug/mL	0,48	0,806	0,77	0,734
1 ug/mL	0,429	1,237	1,19	1,212
0,5 ug/mL	0,421	1,193	1,191	1,265

CÁLCULOS DE PORCENTAJES DE INHIBICIÓN

CONCENTRACIÓN	Promedio lectura de Controles.	1ra Réplica	2da Réplica	3ra Réplica	PROMEDIOS % DE INHIBICIÓN
64 ug/mL	1,5745	55,8876004	58,2069581	57,0472792	57,04727921
32 ug/mL		77,2970562	72,5691347	78,9027654	76,25631876
16 ug/mL		65,5218555	65,1650312	60,793934	63,82694023
8 ug/mL		66,9491525	65,7894737	64,7190009	65,81920904
4 ug/mL	0,4535	65,2542373	67,0383586	65,3434434	65,87867975
2 ug/mL		68,5548617	71,7662801	74,9776985	71,76628011
1 ug/mL		30,1070473	34,2997324	32,3371989	32,24799286
0,5 ug/mL		34,0321142	34,2105263	27,6092774	31,95063931

	CONTROL POSITIVO (CONTROL DE LA VIABILIDAD DE LA CEPA BACTERIANA)
	CONTROL NEGATIVO (ESTERILIDAD DEL MEDIO TSB)

ANEXO 18. Fórmula para el cálculo de porcentaje de inhibición.

A partir de las absorbancias obtenidas por el lector de placas se calcularon los porcentajes de inhibición, de la siguiente manera:

$$\frac{(\text{lectura de la muestra en el pocillo} - \text{promedio de absorbancia de controles positivos})}{(\text{promedio de absorbancias controles negativos} - \text{absorbancia de la muestra en el pocillo})} * 100$$

EJEMPLO:

LECTURAS OBTENIDAS

CONCENTRACIÓN	CONTROLES	1ra Réplica	2da Réplica	3ra Réplica
64 ug/mL	1,545	0,948	0,922	0,935
32 ug/mL	1,548	0,708	0,761	0,69
16 ug/mL	1,598	0,84	0,844	0,893
8 ug/mL	1,607	0,824	0,837	0,849
4 ug/mL	0,484	0,843	0,823	0,842
2 ug/mL	0,48	0,806	0,77	0,734
1 ug/mL	0,429	1,237	1,19	1,212
0,5 ug/mL	0,421	1,193	1,191	1,265

Lecturas de la muestra en el pocillo de microplaca.

LECTURAS OBTENIDAS

CONCENTRACIÓN	Promedio lectura Controles	1ra Réplica	2da Réplica	3ra Réplica
64 ug/mL	Positivo	0,948	0,922	0,935
32 ug/mL	1,5745	0,708	0,761	0,69
16 ug/mL		0,84	0,844	0,893
8 ug/mL		0,824	0,837	0,849
4 ug/mL	Negativo	0,843	0,823	0,842
2 ug/mL	0,4535	0,806	0,77	0,734
1 ug/mL		1,237	1,19	1,212
0,5 ug/mL		1,193	1,191	1,265

CÁLCULOS DE PORCENTAJES DE INHIBICIÓN

CONCENTRACIÓN	Promedio lectura de Controles.	1ra Réplica	2da Réplica	3ra Réplica	PROMEDIOS % DE INHIBICIÓN
64 ug/mL	1,5745	55,8876004	58,2069581	57,0472792	57,04727921
32 ug/mL		77,2970562	72,5691347	78,9027654	76,25631876
16 ug/mL		65,5218555	65,1650312	60,793934	63,82694023
8 ug/mL		66,9491525	65,7894737	64,7190009	65,81920904
4 ug/mL	0,4535	65,2542373	67,0383586	65,3434434	65,87867975
2 ug/mL		68,5548617	71,7662801	74,9776985	71,76628011
1 ug/mL		30,1070473	34,2997324	32,3371989	32,24799286
0,5 ug/mL		34,0321142	34,2105263	27,6092774	31,95063931

CONTROL POSITIVO (CONTROL DE LA VIABILIDAD DE LA CEPA BACTERIANA)
 CONTROL NEGATIVO (ESTERILIDAD DEL MEDIO TSB)