



Resumen

Para la validación de la microdilución, se comenzó con la recolección y secado de las plantas, luego se procedió a la obtención de sus respectivos extractos mediante la percolación y liofilización; una vez obtenidos, se usó como medio de cultivo Caldo tripticasa-soya (TS), probando en la macrotécnica, concentraciones tomadas como referencia de estudios ya realizados, para ver si eran aplicables en este ensayo; determinando las concentraciones de la solución madre para este trabajo y estableciendo la CIM (*S. aureus*) en los dos métodos (8 mg/ml), después colocamos volúmenes de TS correspondientes a 500µl (macrodilución) y de 100µl (microdilución), preparando la batería de diluciones con concentraciones en orden descendente, siendo las cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), los microorganismos inoculados, después de su incubación fueron leídos en el equipo correspondiente a cada método.

Presentándose dificultades al no haber la posibilidad de usar las lecturas realizadas en el espectrofotómetro (macrodilución) y el lector de placas (microdilución) con respecto a los extractos, ya que el color de los mismos interfería; y se resolvió realizar el conteo de colonias de las cepas, cultivándolas en agar tripticasa soya, se sembró 100ul de cada una de las diluciones del extracto tanto de la macrotécnica como la microtécnica.

Al final se concluyó, de los resultados obtenidos, que tanto la microdilución como la macrodilución son comparables, además de comprobar las ventajas y desventajas, demostramos que la microtécnica ahorra cantidad de material y tiempo, y a más de la reproducibilidad de sus resultados.

PALABRAS CLAVES:

Validación, Microdilución, Macrodilución, Extracto, Antibacteriano, Ajenjo, Malva Olorosa, Ortiga.



ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	1
CAPITULO 1	
Introducción.....	7
1.1 Técnicas para la determinación de Sensibilidad Antimicrobiana Macrodilución y Microdilución	
1.1.1 Fundamento	9
1.1.2 Macrodilución	9
1.1.3 Microdilución	10
1.2. MICROORGANISMOS: <i>Escherichia coli</i> y <i>Estafilococo aureus</i>	11
1.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	12
1.2.2. <i>Escherichia coli</i>	14
1.3. PLANTAS MEDICINALES	
1.3.1 ORTIGA (<i>Urtica urens</i> L.- Urticaeael)	18
1.3.2 AJENJO (<i>Artemisia absinthium</i> L),	19
1.3.3 MALVA OLOROSA (Pelargonium Odoratissimum)	20
CAPITULO 2	
MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1 Recolección y Secado	22
2.2 Preparación de los extractos	22
2.3 Microorganismos y medios	24
2.4 Métodos de determinación de sensibilidad antimicrobiana	
2.4.1 Preparación del Inóculo	24
2.4.2 Preparación de las diluciones del Inóculo	26
2.4.2.1. Cálculos del número de ufc/ml y del Porcentaje de Inhibición.....	27
2.4.3 Macrodilución	29
2.4.4 Microdilución.....	34
2.5 Análisis estadístico	37



CAPITULO 3

3. Resultados y Discusión 38

CAPITULO 4

4. Conclusiones 48

CAPITULO 5

5. Recomendaciones 49

BIBLIOGRAFÍA.....50

ANEXOS

ANEXO 1. CARACTERIZACIÓN BOTÁNICA

ANEXO 2. FLUJOGRAMA DE LA MACROTÉCNICA DE LOS EXTRACTOS

ANEXO 3.FLUJOGRAMA DE LA MICROTÉCNICA DE LOS EXTRACTOS

ANEXO 4.FLUJOGRAMA DE LA MACROTÉCNICA DE LOS ANTIBACTERIANOS

ANEXO 5.FLUJOGRAMA DE LA MICROTÉCNICA DE LOS ANTIBACTERIANOS

Glosario



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN PARA LA ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE PLANTAS (ORTIGA, AJENJO,
MALVA OLOROSA)”**

**Tesis previa a la obtención del
Título de Bioquímico Farmacéutico**

AUTORAS:

**Carmen Susana Carmilema Sánchez
Rosa Ángela Delgado Delgado**

DIRECTORA: Dra. Lourdes Jerves A.

ASESOR: Dr. Fabián León T.

Cuenca- Ecuador

2010



DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres Arturo Delgado y Gladys Delgado, los seres que dieron todo su esfuerzo y dedicación para que esto sea posible. Esta tesis les pertenece a ustedes que son la bendición más grande en mi vida.

También se la dedico a Diego Álvarez por su apoyo incondicional en todo momento.

Por último no está demás mencionar que este trabajo lleva toda la colaboración de Susy, Gaby y Fernanda.

ROSY

Dedico esta tesis a mi madre Rosa Carmilema, ya que gracias a ella he podido cumplir con uno de mis sueños; a mi hermana Nathaly Carmilema, por su apoyo incondicional, Angélica, Johnny y Rafael por estar siempre conmigo.

SUSY



AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro más sincero agradecimiento a las entidades y personas que hicieron posible la elaboración de esta tesis, entre las cuales podemos nombrar a la Dra. Lourdes Jerves como nuestra Directora, al Dr. Fabián León que nos brindó su apoyo como nuestro asesor, a la Dra. Isabel Wilches Directora del Proyecto de Plantas Medicinales VLIR, al permitirnos el uso de sus laboratorios para nuestra tesis; también a la Universidad de Cuenca por facilitarnos el local y el material requerido entre ellos el Laboratorio de Atención al Público; a la Dra. Luz María Samaniego, Dra. Alexandra Vásquez y la Dra. Paulina Escobar por brindarnos su apoyo y su espacio de trabajo; al Dr. Fausto Zaruma y al Ing. Vladimiro Tobar por brindarnos sus conocimientos en Estadística.

Y por último pero de forma muy especial estamos en deuda con los seres cuyo apoyo ha sido incondicional Dios, nuestros padres, hermanas, nuestras mejores amigas Gabriela Rodas y Fernanda Alvarado y a Diego Álvarez por su gran amor y paciencia.



CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de los antimicrobianos, ha constituido la clave esencial para combatir las infecciones bacterianas, que a lo largo de la historia, han causado la muerte de millones de seres humanos. Sin embargo, con el tiempo, se han ido presentando inconvenientes dignos de considerar, como la propagación de bacterias patógenas y los múltiples mecanismos de resistencia creados por los microorganismos al tratamiento con antibacterianos; como ejemplo, podemos citar una determinada variedad de estafilococo que es capaz de expresar la enzima penicilinasasa que inactiva a la penicilina, produciendo de esta manera, resistencia al fármaco.⁽¹⁾

El incremento de la resistencia bacteriana a los antibacterianos, se ha convertido en un problema creciente para la sanidad humana y animal a nivel mundial; de allí, la importancia de realizar las pruebas de sensibilidad antibacteriana, que permiten una valoración previa de la efectividad del medicamento respecto al microorganismo, abreviando los tiempos de respuesta por parte del laboratorio, con técnicas capaces de detectar el desarrollo bacteriano en una suspensión o su inhibición, siendo una herramienta de gran utilidad en la terapia exitosa de un paciente infectado.

De acuerdo a lo mencionado al comienzo de la introducción, con el avance de los estudios, producto de años de investigación, hemos heredado una serie de técnicas; dos de ellas, la macrodilución en tubo de ensayo, y derivada de ésta, la microdilución. Ambas técnicas tienen como finalidad determinar la concentración más baja de antibacteriano, requerida para inhibir el crecimiento bacteriano.

Comparada con la técnica de macrodilución, la microdilución presenta claras ventajas por su sencillez, rapidez, economía por el uso de micro volúmenes; sin embargo, las dos permiten disponer de una serie de diluciones con



concentración decreciente, que posibilitan una adecuada interpretación de la sensibilidad, sensibilidad intermedia y resistencia del microorganismo frente al tratamiento farmacológico.

En cuanto al desarrollo de resistencia a los antibacterianos, una opción que en la actualidad se estudia, es el empleo de extractos de plantas medicinales.

Con este trabajo, logramos un aporte, no sólo determinando en el caso de los extractos de ortiga, ajeno y malva olorosa la concentración mínima inhibitoria (CIM) de los mismos, sino además, validando la microdilución con respecto a la macrodilución, como una técnica útil para investigaciones de actividad antibacteriana con extractos de plantas.

De las cuales dos tienen actividad antibacteriana probada, como es el caso del ajeno, en el que en un estudio realizado por el Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM) en el año 2001, usando la técnica de macrodilución reveló actividad antibacteriana frente a cepas de *E. coli* y *S. aureus*, utilizando una concentración de 13-26 mg/ml de extracto fluido con etanol al 70%; mientras que la malva olorosa no presenta un registro de estudio de poseer actividad antibacteriana.²⁰



1.1 TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA: MACRODILUCIÓN Y MICRODILUCIÓN

1.1.1 Fundamento

El principal objetivo de cualquier prueba de sensibilidad antibacteriana es predecir cuál será el resultado de un tratamiento. En muchas ocasiones los resultados se expresan, para un patógeno aislado y analizado, de forma cualitativa como por ejemplo:

Sensible: cuando el compuesto inhibe el crecimiento microbiano.

Resistente: cuando el antibacteriano no será eficaz

Intermedio: cuando la efectividad de aquel compuesto dependerá de su localización o de la dosificación utilizada.

Partiendo de este principio y gracias a las constantes investigaciones se han desarrollado las técnicas de dilución en caldo, que se pueden utilizar para medir cuantitativamente la actividad in vitro de un antibacteriano frente a un microorganismo. Estas pruebas consisten en la preparación de una serie de tubos (Macrodilución), pocillos o placas (Microdilución) con caldo a los que se les agrega el antibacteriano en distintas concentraciones, luego se inoculan cada uno con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio, los cuales después de su incubación, nos permiten detectar el desarrollo bacteriano o la inhibición en la suspensión, mediante valoración de la turbidez del medio; tomando como puntos críticos determinantes en el resultado final la cantidad de inóculo, pureza del mismo y el tiempo de incubación.⁽²⁾

1.1.2 MACRODILUCIÓN

De acuerdo al fundamento anterior, se establece a la macrodilución como uno de los métodos utilizados para definir la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del antibacteriano, la misma que puede determinarse mediante observación directa sin ayuda de ningún aparato óptico.

Es una técnica en la que se prueba la actividad inhibitoria de una sustancia o medicamento sobre una suspensión normalizada de bacterias frente a varias



concentraciones del agente antibacteriano, mediante diluciones seriadas que reducen la concentración progresivamente, en un medio líquido estandarizado. La técnica necesita de tubos de dilución con un contenido mínimo de 1ml. ⁽²⁾ Este procedimiento tiene algunas ventajas como: la posibilidad de lograr el cultivo estandarizado de la mayoría de microorganismos y también nos permite reproducir resultados. Pero por otro lado, resulta engorroso, por la cantidad de material, de manipulación y del trabajo requerido para preparar los tubos de dilución en caldo, razón por la que no es muy utilizada en los laboratorios clínicos. ^(3, 4, 5)

1.1.3 MICRODILUCIÓN

La microdilución es una técnica basada en la actividad inhibitoria, se realiza en una placa de poli-estireno que contiene 96 celdillas. Una placa puede contener de 7 a 8 diluciones de 12 diferentes agentes antibacterianos, usando una celdilla como control positivo (caldo+inóculo), otra como control negativo (sólo caldo) y también una para el control de la estabilidad del antibacteriano usando una concentración ya conocida. La mayoría de los sistemas tienen un volumen de 0.1ml en cada celdilla.

La utilización de micropipetas y de placas de microtitulación facilitó el desarrollo de dicho método, que interpreta el crecimiento bacteriano en los diferentes pocillos por medio de un autoanalizador (mediciones por turbidez o fluorescencia).

Con este método, los resultados son más rápidos, dando la posibilidad de un cambio oportuno de terapia antibacteriana, lo que se traduce en una importante reducción de los costos totales en cuanto a días de hospitalización y exámenes de laboratorio, también confiere un control de estandarización y reproducibilidad de los resultados.

A diferencia de la macrodilución, se disminuyen las horas de trabajo en los laboratorios ya que se realizan en menor tiempo, por ello no requiere de tanto personal. ^(3, 4, 5)

La microdilución, actualizada por el National Committee for Clinical Institute (NCCIS), permite un informe selectivo de los antibacterianos. ^(3, 4, 5)



Pero al igual que la macrodilución presenta desventajas, como que los paneles o tarjetas vienen determinadas por el fabricante, también están las discrepancias con los métodos convencionales. Además de que las lactamasas inducibles en bacilos gram negativos requieren de una incubación más prolongada que la necesaria en la macrotécnica para expresar la resistencia. (3, 4, 5)

1.2 MICROORGANISMOS: *Escherichia coli* y *Estafilococo aureus*

Escherichia coli y *Staphylococcus aureus*, son bacterias que usualmente causan infecciones en la comunidad en general a nivel hospitalario, razón por la cual se han realizado estudios en nuestro país, en los que se demuestra la presencia de estos microorganismos como agentes causantes de diversas infecciones, donde las cepas son cada vez más resistentes a los tratamientos. Entre estas investigaciones tenemos por ejemplo el estudio realizado por el Dr. Jaramillo y colaboradores (2002) en 427 pacientes, provenientes de los hospitales Carlos Andrade Marín, Enrique Garcés y del Hospital Quito 1 de la Policía Nacional, cuyos resultados revelaron que el 14% de los pacientes presentaban infección de vías respiratorias bajas, infecciones cutáneas y de tejidos blandos, e infección de vías urinarias, identificándose con más frecuencia, a *S aureus*, como el agente patógeno.

Otro estudio dirigido por el Dr. E. Garzón (2005), en el Servicio de Neonatología del Hospital Gineco-Obstétrico Isidro Ayora (HGOIA), que también señala a la misma bacteria como la responsable del 49.2% de las infecciones nosocomiales bacterianas, que se relacionaban con el inadecuado cumplimiento de las normas de asepsia, la investigación se desarrolló en 415 niños cuyo diagnóstico era infección; la más común fue la del tracto urinario, que se mostró en el 33.4% de los mismos.

Incluso en el trabajo de monitorización de la resistencia bacteriana realizado por el laboratorio de Microbiología del Hospital Vozandes de Quito, a cargo de la Dra. J. Zurita, se vio, que en pacientes ambulatorios del 75 al 95% de los casos de infección del tracto urinario (ITU) no complicada y en el 23% de las mujeres con infección vaginal, la bacteria responsable fue *E. coli*. (6, 7, 8, 9)

1.2.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es un coco grampositivo que pertenece a la familia Micrococcaceae; su forma es esférica con un diámetro medio de 0,8 a 1µm, carece de movilidad y se lo puede encontrar aislado, en parejas, tétradas, cadenas cortas o en forma de racimo de uvas; además, tiene la capacidad de crecer en condiciones aerobias y anaerobias. ⁽¹⁰⁾

Posee una cápsula y una capa de polisacárido extracelular, factor de agregación y otras proteínas adhesinas de superficie, ácido teicoico, y ribitol propio de especies con residuos de N-acetil glucosamina. ⁽¹¹⁾

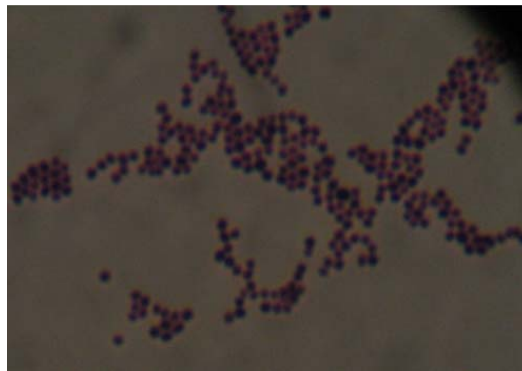


Figura 1. *S. aureus*, tinción de Gram

Crece en medios de cultivo como agar chocolate, agar sangre, caldo infusión cerebro-corazón y caldo tioglicolato, agar lipasa-manitol-salado (*S. aureus* producen una zona amarilla ácida alrededor de la colonia y además una zona opaca por precipitación de lípidos debido a la lipovitelinalipasa), agar columbia, agar alcohol feniletílico, agar Scheleifer- Kraner. El tiempo de incubación luego de la siembra, es de 18-24 h a 37 °C, excepto cuando se usan los medios selectivos, en los que se espera de 48-72 h antes de descartarse como negativo. ^(12,13)

Este microorganismo puede ser aislado del aire, de las aguas, del suelo; forma parte de la flora normal de la piel y de las superficies mucosas en el ser humano y animales; también está presente en el intestino, incluso en el lactante, luego de las primeras horas de vida. Del 50 al 60% de las personas



albergan al *S. aureus* en la rinofaringe, y en el 10% de las mujeres está presente en la vagina. ^(14,15)

La patología del estafilococo va a depender de la producción de proteínas de superficie que intervienen en la adhesión de las bacterias a los tejidos del organismo anfitrión, y también, de las proteínas extracelulares como toxinas específicas y enzimas hidrolíticas. ⁽¹⁰⁾. Dentro de las cuales podemos nombrar las siguientes:

- Toxinas citolíticas (hemolisinas): que dañan la membrana del eritrocito, se observa un halo de hemólisis completa (β hemólisis) alrededor de las colonias. ^(10,11)
- Toxinas exfoliativas A y B: que son proteasas séricas que rompen puentes intercelulares del estrato granuloso de la epidermis. ^(10,11)
- Enterotoxinas A, B, C, D, E, G, H e I: que estimulan la liberación de linfocitos T, citocinas, mediadores inflamatorios en los mastocitos, aumentando el peristaltismo intestinal y la pérdida de líquidos (nauseas y vómitos). ^(10,11)
- Toxina-1 del síndrome del shock tóxico TSST-1: que estimula la proliferación de linfocitos T y liberación de citocinas, produciendo la destrucción celular de las células endoteliales. ^(10,11)

Además, *S. aureus* elabora las siguientes enzimas, que le permite sobrevivir y proliferar en el hospedero:

1. Coagulasa: protege a los microorganismos de la fagocitosis y posee dos formas:
 - Ligada: unida a la pared del estafilococo que convierte el fibrinógeno en fibrina insoluble. ^(10,11)
 - Libre: forma fibrina insoluble al reaccionar con el factor del plasma para originar una estafilotrombina. ^(10,11)
2. Catalasa: cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. ^(10,11)
3. Hialuronidasa: hidroliza los ácidos hialurónicos, los mucopolisacáridos, favoreciendo la diseminación del *S. aureus* en los tejidos. ^(10,11)



4. Fibrinolisisina: disuelve los coágulos de fibrina.^(10,11)
5. Lipasas: hidrolizan los lípidos, para garantizar la supervivencia de los estafilococos en las zonas sebáceas del organismo. .^(10,11)
6. Nucleasa: se desconoce la función de esta enzima en la patogenia de la infección.^(10,11)

Las infecciones provocadas por el estafilococo son numerosas y pueden evolucionar bajo dos formas: agudas o crónicas y recidivantes. La transmisión de la infección puede hacerse de persona a persona por contacto directo con lesiones estafilocócicas, a través de secreciones de la nariz y de vías respiratorias superiores, por gotitas de fluye, y por vía hemática, pueden producirse focos infecciosos a distancia y bacteriemia. Es el agente causal de los siguientes focos de supuración: impétigo, forúnculo, ántrax, abscesos, flemones, pleuresías, peritonitis, artritis, osteomielitis, absceso perinefrítico, absceso pulmonar.^(10,11) Puede infectar a cualquier organismo susceptible y contaminar las áreas de terapia intensiva, neonatología y quemados. Los profesionales y personas que se encuentran al cuidado del paciente, deben mantener la limpieza de manos, usar mascarillas, cuidar del aseo personal del cuerpo y protegerse con ropas estériles. Cada clínica u hospital debería tener una bitácora de cuáles son las bacterias más persistentes.⁽¹⁶⁾

En el tratamiento, esta bacteria puede ser sensible a la ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina, piperacilina, sulbactam + ampicilina, acido clavulanico + amoxicilina, piperacilina + tazobactam, clindamicina y cefalosporinas. Cuando presentan resistencia a la oxacilina, meticilina, eritromicina, nafticilina, penicilinas, y aminoglucósidos, se usa vancomicina.

(10, 14,17)

1.2.2. *Escherichia coli*

Dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, se encuentra el género *Escherichia* que se compone de cinco especies de las que, *E. coli*, es la más frecuente y la



más relevante desde el punto de vista clínico. Forma parte de la flora normal del intestino grueso de los animales de sangre caliente.

Es un bacilo gram negativo flagelado, con un tamaño intermedio entre 0,3 a 1 μm de ancho por 1 a 6 μm de largo. Es anaerobio facultativo, fermenta la glucosa, lactosa, reduce el nitrato, es catalasa positiva y oxidasa- negativa. ^(10, 11,14)

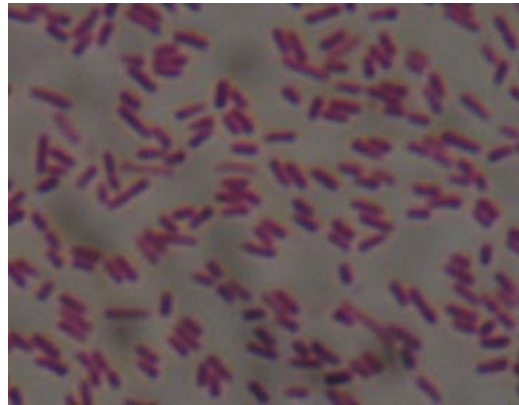


Figura 2. *E. coli*, tinción de Gram.

Posee grandes cantidades de lipoproteínas y lipopolisacáridos, que representan hasta el 80 % del peso seco de la pared celular. Contiene pilis de naturaleza proteica y antígenos como el somático O y el flagelar H, que son utilizados para la serotipificación. ^(10, 11,14)

Para su aislamiento, se puede emplear cualquiera de los siguientes medios de cultivo, con un tiempo de incubación de 18-24 h a 37 °C:

- **CLED:** es un medio de color ligeramente verdoso, en el cual las colonias son color amarillo, cabe aclarar que este medio es empleado únicamente para urocultivo. ^(10,13)
- **Agar sangre:** crecen colonias pequeñas, grises y brillantes, generalmente no produce hemólisis. ^(10,13)
- **MacConkey:** crecen colonias rojas, luego se tornan rosados, se distinguen las colonias fermentadoras de lactosa de las no fermentadoras de lactosa. ^(10,13)



- **EMB:** permite la diferenciación de las colonias fermentadoras de lactosa de las no fermentadoras, se desarrollan colonias de color azul a negro con centros oscuros y brillo metálico iridiscente. ^(10,13)

Presenta una amplia variedad de factores de virulencia que se dividen en dos categorías:

- **Adhesinas:** que le proporciona capacidad de adherencia, permaneciendo en el aparato urinario o en el aparato digestivo, y,
- **Exotoxinas:** que produce un espectro variado que incluyen las toxinas Shiga (Stx-1, Stx-2), las toxinas termoestables (STa, STb) y las toxinas termolábiles (LT-I y LT-II). Se consideran importantes las hemolisinas (HlyA) en la patogenia de la enfermedad producida por *E. coli* uropatógena.

Las muestras se obtienen según el sitio de infección ya que *E. coli* es la causante de enfermedades como bacteriemia, infección del aparato urinario, gastroenteritis, meningitis neonatal, infecciones intraabdominales, etc. ^(10,13)

Las enfermedades producidas por *E. coli* en el tracto urinario, pueden tener su origen en factores físicos, anatómicos y metabólicos. ⁽¹⁵⁾

- En el aspecto físico: catéteres, sondas, torunda, el uso de tampones, duchas vaginales, relaciones sexuales que introducen bacterias a la uretra. ⁽¹⁵⁾
- En el aspecto anatómico: las alteraciones que causan estrechez del tracto urinario, afectan el reflejo y vaciamiento de la vejiga de la orina. ⁽¹⁵⁾
- En el aspecto metabólico: cálculos urinarios. ⁽¹⁵⁾

E. coli, es el microorganismo causante de más del 60% de las infecciones del tracto urinario; este problema afecta en un 30% más al género femenino, que al género masculino. En mujeres aumenta la incidencia de infecciones desde la edad escolar en 1% hasta los 65 años, que llega al 10%. ⁽¹⁵⁾

También, *E. coli* puede causar enfermedades intestinales. El siguiente cuadro resume los tipos de gastroenteritis causados por sus diferentes clases:



Tabla 1⁽¹⁰⁾. GASTROENTERITIS POR *E. coli*.

GASTROENTERITIS POR <i>E. coli</i>.		
Microorganismos	Lugar de acción	Enfermedad
<i>E. coli</i> enteropatógena (ECEP)	Intestino delgado	Diarrea infantil en países subdesarrollados; diarrea acuosa y vómitos, heces no sanguinolentas.
<i>E. coli</i> enterotoxígena (ECET)	Intestino delgado	Diarrea del viajero; diarrea infantil en países subdesarrollados; diarrea acuosa, vómitos, espasmos abdominales, náuseas, febrícula.
<i>E. coli</i> enterohemorrágica (ECEH)	Intestino grueso	Inicialmente diarrea acuosa, seguida de diarrea sanguinolenta con espasmos abdominales, con o sin fiebre, puede progresar a síndrome hemolítico urémico
<i>E. coli</i> enteroinvasiva (ECEI)	Intestino grueso	Enfermedad en los países subdesarrollados, fiebre, espasmos, diarrea acuosa, puede progresar a disentería sanguinolenta.
<i>E. coli</i> enteroagregativa (ECEA)	Intestino delgado	Diarrea infantil en países subdesarrollados, diarrea del viajero, acuosa persistente, vómitos, deshidratación, febrícula.

Para su tratamiento, se puede administrar trimetoprim –sulfametoxazol, ampicilina, amoxicilina, imipenen, meropenem, ertapenem, cefalexina, cefazolina, cefapirina, cefradina, amikacina, nitrofurantoina, ofloxacina, norfloxacin, gentamicina, a los cuales podría mostrarse sensible. Presenta una tendencia a desarrollar resistencia al metronidazol. ^(10,17)



1.3 PLANTAS MEDICINALES

La fitoterapia ha sido utilizada desde tiempos antiguos y su capacidad curativa se manifiesta por la existencia de herbarios desde la época de los sumerios, asirios, babilonios y fenicios; por lo cual, el estudio de los componentes de las plantas medicinales se centra en las sustancias que ejercen una acción farmacológica sobre el ser humano o los seres vivos en general, por ejemplo: los fenoles simples, los derivados de fenoles (flavonoides, flavonas, flavonoles, quinonas, taninos y cumarinas), alcaloides, aceites esenciales, saponinas, terpenoides, lectinas y polipéptidos, presentan actividad antibacteriana como resultado de un proceso evolutivo de selección para adquirir una defensa mejorada frente al ataque de microorganismos, insectos y otros animales.

Apoyándonos en este fundamento y basándonos en rangos de CIM, obtenidos en un ensayo realizado en el ajeno con valores entre 16-23mg/ml, se escogieron los extractos de malva olorosa, ortiga y ajeno para la validación de la microdilución. ^(18, 19)

1.3.1 ORTIGA (*Urtica urens* L.- Urticaeae, Ortiga menor, Pica menos, Hierba del ciego, Ortiga anual)



Figura 3. Ortiga

La ortiga nativa de Europa, es una planta dioica con raíces rastreras y tallos fuertes, erectos, sus hojas son grandes, lanceoladas, serradas, dotadas de dos estipulas de color verde y cubiertas de pelos urticantes. Tiene flores en agrupaciones axilares monoica, flores masculinas y femeninas en la



agrupación. Perianto verde, tetralobado. ⁽²¹⁾. Los tallos más o menos tetrágonos o alomados miden de 7- 45 cm de altura pero puede llegar a alcanzar hasta 60 cm. El fruto es un pequeño aquenio, verdoso amarillento con un diámetro de 2mm. ⁽²²⁾

Es utilizada como diurético, en dietas hiposódicas, previene resfriados e inflamaciones de la garganta, a nivel intestinal, vesical y renal, en infecciones del aparato urinario, dermatosis y candidiasis, artritis, reumatismo, afecciones bucales y quemaduras, hemorroides, contra hemorragias internas y externas, hemofilia, la gota. ⁽²³⁾

Sus principios activos son mucílagos, glucósidos, y aminas (histamina y tiramina), saponósidos triterpénicos, flavonoides: lamiósido; ácidos fenolcarboxilílicos: rosmarínico; glucósido iridoide: lamalbósido; trazas de aceite esencial; betaína (estaquidrina). ⁽²⁴⁾

Posee taninos catéquicos (5-10%) a los que debe su acción tónica, astringente y antiinflamatoria. Además contiene flavonoides de la colina (glucósidos del quercetol y kaenferol) y ácidos fenólicos, que le confieren una acción antiséptica, vasoconstrictora y hemostásica. ⁽²⁴⁾

1.3.2 AJENJO (*Artemisia absinthium L.-Compositae*, Incienso ajenjo (Cuba), Wormwood (EEUU), Abrotamo macho (Argentina), Hierba Santa, Alosna, asenso, Artemisa amarga)



Figura 4. Ajeno.

El ajeno proveniente de Europa meridional, Asia occidental y África del Sur, es una planta perenne, herbácea que alcanza hasta un metro de altura, aromática



de sabor amargo, muy ramificada, sus raíces son leñosas, pivotantes y ramificadas lateralmente, de hojas alternadas muy recortadas de color verde grisáceo en el haz y gris blanquecino en su envés; las situadas en la base inferior del tallo son pecioladas y tripinnatisectas, en tanto que las que están en la parte superior son sésiles y divididas en lóbulos anchos y obtusos, con flores pequeñas, tubulosas y amarillas en forma de racimos, agrupadas en capítulos terminales, las de la periferia son femeninas ,mientras que las del centro son hermafroditas , rodeadas de un involucre de brácteas verde-blanquecinas. El fruto es un aquenio de color grisáceo.⁽²¹⁾, crece con facilidad en lugares soleados y muy húmedos con tierra arcillosa bastante pesada, es poco exigente y crece hasta 1.600 metros de altitud.⁽²⁵⁾

Es utilizado como tónico para la vesícula biliar y el hígado, estomacal cura la flatulencia, alivia dolores gástricos e intestinales, estimulante de la formación de glóbulos blancos y rojos, febrífugo y emenagogo. ⁽²²⁾; como diurético combate la obesidad, diabetes, el reumatismo, mejora la circulación de la sangre y regulariza la menstruación también se usa de manera externa en dolores de cabeza y torceduras. ⁽²⁵⁾

Principios activos: absintina, absinta, felandreno, cadineo, tuyol, proazuleno, tuyona. Sus partes verdes contienen un glucósido, que es una lactona. ⁽²⁶⁾

1.3.3 MALVA OLOROSA (*Pelargonium Odoratissimum* – Geraniáceas, Malva silvestre o malva, Malva de Egipto, Malvarrosa)



Figura 5. Malva olorosa.



La malva olorosa originaria del Sur de África, es una planta aromática perenne, leñosa con el tiempo, tiene una raíz axonomorfa, bastante pulposa, el tallo es erguido de hasta 30 cm. Las hojas largamente pecioladas, pilosas con 5-7 lóbulos, redondeadas o cordado-ovaladas dentados en el borde, son de color verde oscuro que despiden un fuerte y dulce olor a manzana ⁽²⁷⁾. Las flores tienen un tono característico, que va desde el violeta rojizo al carmesí o granate pueden llegar a medir hasta 2,5 cm. de diámetro, sin aroma, sésiles, en umbelas densas, cortamente pedunculadas. El fruto es una cápsula que contiene semillas reniformes. ⁽²⁷⁾, esta planta crece en suelos bien secos, bien drenados, arcillosos, a pleno sol. ⁽²³⁾

Sus principios activos son mucílagos de naturaleza urónica, antocianósidos, malvina, geraniol, linanol, tiglato de geranio, citronelol, forminato de citronela e isometona, taninos, vitaminas A, B1, B2 y C. ⁽²⁸⁾

Tiene la propiedad de ser astringente, en el tratamiento de la diarrea, endulzante, en la industria de la perfumería y preparaciones cosméticas para el baño. ⁽²¹⁾



CAPITULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Recolección y Secado

Las plantas fueron recolectadas en Sayausí a continuación, se seleccionó las partes útiles de la planta, desechando partes rotas o con insectos para luego someterle a un proceso de lavado con agua corriente para eliminar impurezas como la tierra y dejando reposar con agua destilada (Destilador de agua automático FANEM modelo 724, Sao Paulo. Brasil) por diez minutos, se dejó al medio ambiente por 24h para luego secarla en la estufa Pro-3 (Cuenca, Ecuador) a una temperatura de 35 °C. Una vez secas fueron conservadas en bolsas de papel cerradas, en un lugar oscuro y fresco. ⁽²⁹⁾

2.2 Preparación de los extractos

El método de extracción que se usó fue la percolación, este es un sistema de hidrodifusión que comprende la extracción exhaustiva de la droga con el solvente, siempre renovado, se realizó en aparatos, denominados percoladores de cuerpo cilíndrico o cónico, provistos de un grifo en la parte inferior, para regular el flujo del solvente, la capa de la droga debe ser igual a 5 veces el diámetro medio del equipo. ^(30,31)

Basándose en la Farmacopea Alemana, con algunas modificaciones se inició el proceso pesando 20 g de droga (Balanza analítica Boeco, Alemana) la cual fue pulverizada utilizando una licuadora (Osterizer, modelo 465-41, México) hasta lograr un tamaño de partícula promedio de 5mm., se añadió Alcohol etílico al 70% en agua (Alcohol 99.6 %, J.T.Baker Ethyl, México, Lote E38C63) y se dejó humectar la droga pulverizada con el solvente por 12h para facilitar el paso del solvente y aumentar la porosidad de la pared celular que como consecuencia permite la difusión de las sustancias extraíbles hacia el exterior de la células. ^(30,31)

Pasado ese tiempo se cargó el percolador con el solvente durante 24h cerrando la llave que se encuentra en la parte inferior del percolador, para luego dejar caer gota a gota (20gotas/minuto) recolectando los primeros 15 ml



(fracción A), que se almacenaron en un tubo aparte (75 % del volumen del extracto con respecto al peso de la droga), después se recogió la fracción B adicionando poco a poco el solvente, hasta obtener un volumen cercano a 250 ml para ser usado en la liofilización.

Liofilización:

Una vez terminada la percolación, los 250 ml obtenidos anteriormente, se llevaron al rotavapor (HEIDOLPH-Modelo Laborota 4000 efficient-Alemania), a una temperatura de 40° C luego se adjunto la fracción A hasta su sequedad; agregando al extracto procesado, la cantidad de agua necesaria para obtener una concentración de 80% agua y 20% etanol (18ml etanol + 72ml de agua destilada distribuido en 3 tubos); después fueron congelados en el biofreezer (Dairei Freezer Para-45-dr, Dinamarca) a una temperatura de -80°C, pasos necesarios para poder realizar la liofilización en el liofilizador (LABCONCO – FREEZONE 2,5- Kansas, City, Missouri) en donde se procedió a la deshidratación del extracto por sublimación al vacío, para luego ser guardados en refrigeración, hasta la realización de las pruebas microbiológicas.³¹

En la siguiente tabla se indica los pesos de las drogas empleadas en la extracción, el peso liofilizado y el rendimiento.

Para obtener el rendimiento se empleo la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento de la droga} = \frac{\text{Peso de la droga liofilizada}}{\text{Peso de la droga seca}} \times 100$$

Tabla 2. Peso del extracto liofilizado y rendimiento de la droga

PLANTA	PESO DROGA	PESO EXTRACTO LIOFILIZADO	RENDIMIENTO DE LA DROGA
Malva olorosa	20g	5,2749g	26.37%
Ajenjo	20g	4,1257g	20.62%
Ortiga	20g	2,8986g	14.493%



2.3 Microorganismos y medios

- ✓ Se realizaron las pruebas por triplicado, se trabajó dentro de la cámara de flujo laminar (Calse I Delta Serie, LABCONCO CORPORATION-Kansas, City, Missouri 64132).
- ✓ Para medir la actividad antibacteriana de los extractos vegetales utilizamos las cepas *Escherichia coli* American Type Culture Collection (ATCC) 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, activadas en agar Trypticase soya (IMEDIA, India, Lote 0000051499) y teñidas con Gram para la identificación de cocos grampositivos y bacilos gramnegativos respectivamente sin olvidar las pruebas bioquímicas.
- ✓ Además se uso el Caldo tripticase-soya (Becton, Dickinson and Company Sparks, MD 211152 USA. Le pont de Claix, Lote 8177625, France) para la realización de las diluciones.

2.4 Método de determinación de actividad antibacteriana

El método utilizado para obtener la CIM fue la Dilución seriada en tubos de ensayo que consiste en atacar al microorganismo con agentes antimicrobianos en un medio líquido.

2.4.1 Preparación del Inóculo

1. Elaboramos el inóculo equivalente al patrón de 0.5 de la escala de McFarland) partiendo de un cultivo en fase exponencial, se tomo un tubo estéril con suero fisiológico y se adiciono una colonia de la bacteria a probar (*S. aureus* o *E. coli*).
2. Luego comparamos la turbidez, mediante la lectura en el espectrofotómetro (625 nm.), cuyo rangos estaban entre 0.08 – 0.10 DO.
3. Una vez realizada la lectura se procedió a preparar el inóculo, basándonos en los siguientes cálculos.



Cálculos para Inóculo usado en la Macrotécnica

Se requirió que el inóculo contengan 50.000 células (ufc.) en 500 µl, para ello se realizó el siguiente cálculo:

Se determino el número de tubos a usar, esa cantidad se multiplicó por el volumen aplicado (500 µl).

Ejemplo:

N° de tubos usados para el extracto = 36

Volumen aplicado en la técnica = 500 µl

Volumen total usado en los tubos = 36 x 500 µl = 18.000 µl (18 ml)

500 µl (volumen que se tomo para la siembra)	50.000 células
18000 µl (volumen total que se uso para la siembra)	X
X = 1.800.000 células	

1.000.000 células	1000 µl Inóculo (patrón de McFarland)
1.800.000 células	X
X= 1800µl (1.8 ml) Inóculo	

Por lo tanto para poder llegar a la concentración de 50.000 células se tomo 1.8 ml del Inóculo y se añadió 16.2 ml de Caldo TSA.

18 ml inóculo	1800.000 células
0.5 ml (500 µl)	X
X= 50.000 células (ufc)	

Cálculos para Inóculo usado en la Microtécnica

En la microdilución se requirió que el inóculo contengan 50.000 células (ufc) en 100 µl, para ello se realizó el siguiente cálculo:

Se determino el número de pocillos a usar, esa cantidad se multiplicó por el volumen aplicado (100 µl).



Ejemplo:

N° de pocillos usados para los extractos = 30

Volumen aplicado en la técnica = 100 µl

Volumen total usado en la placa de microdilución = 30 x 100 µl = 3000 µl

0.1 ml (volumen que se tomo para la siembra) 50.000 células

3 ml (3000 µl) (volumen total que se uso para la siembra) **X**

$$X = 1'500.000 \text{ células}$$

1.000.000 células

1 ml (patrón de McFarland)

1.500.000 células

X

$$X = 1.5 \text{ ml Inóculo}$$

Por lo tanto para poder llegar a la concentración de 50.000 células se tomo 1.5 ml del Inóculo y se añadió 1.5 ml de Caldo TSA

3 ml (3000 µl) inóculo

1,500.000 células

0.1 ml (100 µl) inóculo

X

$$X = 50.000 \text{ células (ufc)}$$

2.4.2 Preparación de las diluciones del Inóculo para control de crecimiento a las 24 horas.

Del inóculo empleado se realizo las siguientes diluciones para establecer el número de microorganismos presentes en el inóculo de cada tubo.

1. Preparamos las diluciones correspondientes a 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000 y 1/100.000, en todos los tubos colocamos 900µl de agua estéril.

2. En el primer tubo (1/10) inoculamos 100µl de la preparación anterior (2.4.4.1), y seguidamente homogenizamos, luego se toma 100 µl de la misma dilución y se coloca en el siguiente tubo (1/100) repitiendo el mismo proceso hasta la última dilución (1/100.000).



Nota: Esta preparación se realizó dentro de los 15 minutos.

3. Una vez preparada las diluciones se procede a sembrar 100 µl de cada uno en Agar tripticosa soya (TSA).
4. El tiempo de incubación es de 16 a 20 h., a 35 °C.
5. Se procede al conteo de colonias de cada dilución para la realización de los cálculos correspondientes.

2.4.2.1. Cálculos del número de ufc/ml y del Porcentaje de inhibición

Cálculos para S. aureus

Fórmula para obtener ufc/ml

$$\frac{\text{Vol. que se tomó para la siembra}}{1000 \mu\text{l (1ml)}} \times \text{Número de colonias contadas en placa} = X$$

$$X = \text{ufc/ml}$$

$$\text{Ufc/ml} = \frac{1000\mu\text{l (1 ml)} \times \text{Numero de colonias contadas en la placa}}{\text{Volumen que se tomo para la siembra}}$$

Fórmula para determinar el Número de células usadas en el Inóculo / ml
 µfc/ml x la dilución = µfc/ml

Tabla 3

Macrotécnica				
Inóculo incubado 24h	S. aureus	Siembra 10ul		
Dilución	# de colonias	ufc/ml dilución 1/100.000	ufc/ml	
1/100.000	37	3700	370000000	3.7 x10⁸



Microtécnica				
Inóculo incubado 24h	S. aureus	Siembra 10ul		
Dilución	# de colonias	ufc/ml dilución 1/100.000	ufc/ml	
1/100000	19	1900	190000000	1.9×10^8

Fórmula para Calcular el porcentaje de inhibición

$$\frac{\text{Número de células contadas en el control positivo}}{\text{Número de células contadas en el tubo en estudio}} = 100\% \text{ de crecimiento}$$

$$X = \% \text{ de crecimiento}$$

$$\% \text{ de crecimiento} = \frac{\text{Número de células contadas en el tubo en estudio} \times 100\%}{\text{Número de células contadas en el control positivo}}$$

$$100 - \% \text{ de crecimiento} = \% \text{ de inhibición}$$

Cálculos para E. coli

Fórmula para obtener ufc/ml

$$\frac{\text{Vol. que se tomó para la siembra}}{1000 \mu\text{l (1ml)}} \times \text{Número de colonias contadas en placa} = X$$

$$X = \text{ufc/ml}$$

$$\text{Ufc/ml} = \frac{1000 \mu\text{l (1 ml)} \times \text{Número de colonias contadas en la placa}}{\text{Volumen que se tomo para la siembra}}$$

Fórmula para determinar el Número de células usadas en el Inóculo/ml.

$$\mu\text{fc/ml} \times \text{la dilución} = \mu\text{fc/ml.}$$



Tabla 6. Esquema de preparación de los controles en la macrodilución

Controles	Cantidad de caldo TS utilizado (ml)	Inóculo
Control negativo	1 ml	0 ml
Control positivo	0.5 ml	0.5 ml
Control DMSO (Solución madre)	0	0 ml
Control de esterilidad (Extracto de la planta)	0	0 ml

1. Luego sembramos en agar TSA 100ul de cada tubo, y se incubó por el tiempo de 20 h a 35 °C.
2. Finalmente se realizó el conteo de las colonias para hacer el respectivo cálculo.
3. Para el control positivo de actividad antibacteriana usamos ampicilina en ampolla colocando 0,5 ml con 0,5ml del inóculo en una relación 1:1 trabajando con concentraciones de 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. Basándonos en los cálculos obtenidos y en los datos de la tabla 7.

$$\begin{array}{r}
 2000\mu\text{g} \\
 \times \\
 \hline
 \end{array}
 \begin{array}{r}
 1 \text{ ml} \\
 0.4 \text{ ml} \\
 \hline
 \end{array}$$

$X = 800 \mu\text{g}$

$$\begin{array}{r}
 3.124\text{ml} \\
 1\text{ml} \\
 \hline
 \end{array}
 \begin{array}{r}
 800 \mu\text{g} \\
 \times \\
 \hline
 \end{array}$$

$X = 256 \mu\text{g/ml}$



Tabla 7. Cuadro de diluciones del Antibacteriano para el Control positivo

Concentración inicial (μg o UI / ml)	ml de Caldo TS	Concentración Parcial (μg o UI / ml)	Añadir inóculo 1:1	Concentración Final (μg o UI / ml)
0,4 ml de 2000	2,724	256	1:1	128
0.5 ml de 256	0,5	128	1:1	64
0.5 ml de 128	0,5	64	1:1	32
0.5 ml de 64	0,5	32	1:1	16
0.5 ml de 32	0,5	16	1:1	8
0.5 ml de 16	0,5	8	1:1	4
0.5 ml de 8	0,5	4	1:1	2
0.5 ml de 4	0,5	2	1:1	1
0.5 ml de 2	0,5	1	1:1	0.5
0.5 ml de 1	0,5	0.5	1:1	0.25

En el caso de los antibacterianos:

1. Para obtener una significativa comparación de la macrodilución con la microdilución se determino la actividad antibacteriana de los siguientes Antibacterianos: Amikacina, Ciprofloxacina, Ceftriazona, Cefazolina, Gentamicina y Ampicilina inyectables, colocando 0,5 ml con 0,5ml del inóculo en una relación 1:1 trabajando con concentraciones de 12.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 6.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 3.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Obtenidas en los siguientes cálculos.

Preparación de Solución Madre de 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Ejemplo: Ampicilina

Concentración: 1000 mg de ampicilina/4 ml de agua destilada

Solución madre: 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$



$$\frac{1 \text{ ml}}{0.4 \text{ ml}} = \frac{256 \mu\text{g}}{X}$$

$$X = 102.4 \mu\text{g}$$

$$\frac{102.4 \mu\text{g}}{X} = \frac{2 \text{ ml}}{1 \text{ ml}}$$

$$X = 51.2 \mu\text{g}$$

Tabla 8. Cuadro de diluciones del Antibacteriano en Macrodilución

Concentración inicial (μg o UI / ml)	ml de Caldo TS	Concentración Parcial (μg o UI / ml)	Añadir inóculo 1:1	Concentración Final (μg o UI / ml)
0,4 ml de 256	1.600	51,2	1:1	25.6
0,5ml de 51,2	0,5	25,6	1:1	12.8
0,5ml de 25,6	0,5	12,8	1:1	6.4
0,5ml de 12,8	0,5	6,4	1:1	3.2
0,5ml de 6,4	0,5	3,2	1:1	1.6
0,5ml de 3,2	0,5	1,6	1:1	0.8
0,5ml de 1,6	0,5	0,8	1:1	0.4
0,5ml de 0,8	0,5	0,4	1:1	0.2
0,5ml de 0,4	0,5	0,2	1:1	0.1
0,5ml de 0,2	0,5	0,1	1:1	0,05

2. Se dejó incubar por de 16 a 20 h a 35 °C.

3. Por último se leyó en el espectrofotómetro a 625 nm. (32, 33, 34, 35, 36,37, 38)



2.4.4 Microdilución

Procedimiento

1. Antes de empezar con la técnica, se determinó la ubicación de los extractos, con sus respectivas diluciones, así como también del control del Antibacteriano a usar en la placa para microdilución (96 pocillos estériles).
2. Se procedió de la misma manera que en la macrodilución pero con los siguientes cálculos obtenidos y las tablas 9 y 10.

Cálculos para la Preparación de la Solución Madre para Microtécnica

16 mg/ml (Concentración de la Solución Madre del extracto)

16mg de Extracto 1000 µl

50mg de Extracto **X1**

X1= 3.125 ml volumen total

50mg de Extracto + 500 µl de DMSO + 2.625 ml Caldo TS=3.125ml
volumen total

Microdilución

1000 µl dilución total 16 mg (Solución Madre del extracto)

100 µl dilución total **X2**

X2 = 1,6 mg/100 µl (Solución Madre del extracto)

Tabla 9. Esquema de preparación de la microdilución en los extractos de las Plantas

Concentración inicial (mg / 100 ul)	Caldo TS	Concentración Parcial (mg / 100ul)	Añadir inóculo 1:1 (100 µl)	Concentración Final (mg/ 100ul)
100 µl de 16	0ul	1,6	1:1	0.8
100 µl de 16	100 µl	0,8	1:1	0.4
100 µl de 0,8	100 µl	0,4	1:1	0.2
100 µl de 0,4	100 µl	0,2	1:1	0.1



Tabla 10. Esquema de preparación de los controles en la microdilución

Controles	Cantidad de Caldo TS utilizada (µl)	Inóculo
Control negativo	200 µl	0 µl
Control positivo	100 µl	100 µl
Control DMSO (Solución madre)	0 µl	0 µl
Control de esterilidad (Extracto de la planta)	0 µl	0 µl

3. Se hizo la siembra de las diluciones y controles en Agar TSA en un volumen de 100 µl en el mismo tiempo y temperatura que la macrotécnica
4. Se realizó el conteo de las colonias para proceder con los cálculos.

En el caso de los antibacterianos:

Las concentraciones y el procedimiento, fueron similares al de la macrodilución, se diferenció, en las cantidades utilizadas (100 µl) y en el aparato utilizado para su lectura (Microelisa) a 405 nm.

$$\begin{array}{r}
 2000\mu\text{g} \qquad 1 \text{ ml} \\
 \times \qquad \qquad 0.5 \text{ ml} \\
 \hline
 \mathbf{X= 1000 \mu\text{g}}
 \end{array}$$

$$\begin{array}{r}
 3.906\text{ml} \qquad 1000 \mu\text{g} \\
 1\text{ml} \qquad \qquad \mathbf{X} \\
 \hline
 \mathbf{X= 256 \mu\text{g/ml}}
 \end{array}$$

$$\begin{array}{r}
 1\text{ml} \qquad 256 \mu\text{g/ml} \\
 0.1 \text{ ml} \qquad \mathbf{X} \\
 \hline
 \mathbf{X= 25.6 \mu\text{g/ml}}
 \end{array}$$



Tabla 11. Cuadro de diluciones del Antibacteriano en Microdilución

Concentración inicial (μg o UI / ml)	ml de Caldo TS	Concentración Parcial (μg o UI /ml)	Añadir inóculo 1:1 (100 μl)	Concentración Final (μg o UI / 100 ul)
0,1ml de 256	0	25.6	1:1	12.8
0,1ml de 256	0,1	12.8	1:1	6.4
0,1ml de 12,8	0.1	6.4	1:1	3.2
0,1ml de 6,4	0.1	3.2	1:1	1.6
0,1ml de 3,2	0.1	1.6	1:1	0.8
0,1ml de 1,6	0.1	0,8	1:1	0.4
0,1ml de 0,8	0.1	0,4	1:1	0.2
0,1 ml de 0,4	0.1	0,2	1:1	0.1
0,1ml de 0,2	0.1	0,1	1:1	0,05

2.5 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados con los Antibacterianos se usó el método de t Student que evalúa si 2 grupos difieren de manera significativa con respecto a sus medias. El análisis estadístico ha sido realizado con un nivel de confianza del 0.05. Esto implica un número razonable de repeticiones (triplicado), aleatorización de las concentraciones en las unidades experimentales y un control para lograr una estimación válida del error experimental. ⁽⁴⁰⁾

Mientras que para los extractos solo se comparó en forma visual ya que los datos obtenidos son escasos.



CAPITULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIONES

La ciencia se desarrolla a gran velocidad, presentándose siempre la necesidad de recurrir a opciones que sigan su ritmo, el método de microdilución es el más práctico en estos momentos, por ello surge nuestro interés de confirmar todas cualidades que presenta frente a la macrodilución, debido a que cada vez el uso de esta técnica va en aumento. Nuestro trabajo en el laboratorio, consistió en un comienzo en determinar la concentración antimicrobiana de los extractos de las plantas empleadas, frente a las cepas de *S. aureus* y *E. coli*, usando la macrotécnica y la microtécnica, confirmando así que ambos métodos son comparables, a más de las ventajas que tiene la microdilución frente a la macrotécnica, debido que esta última es más laboriosa.

Así pues, para la validación de la microdilución nos basamos en varios documentos que nos dieron un rango de concentración con las cuales empezar, uno de ellos realizado por Guerra y colaboradores (Col.) en varias plantas usando la macrodilución, en el que le asignan al ajeno actividad antibacteriana en un rango de concentración comprendido entre 16 mg/ml y 23mg /ml para *S. aureus* y *E. coli*, sin embargo, en la práctica y en nuestras plantas las mismas cantidades no fueron aplicables, razón por la cual se probaron varias diluciones hasta que en 8 mg/ml, se evidenció la CIM de los extractos (*S. aureus*), existiendo una gran diferencia con el documento recopilado, lo cual puede deberse a variaciones como la procedencia, condiciones de crecimiento, manipulación.

Una vez obtenida la CIM, nos centramos en el objetivo principal citado anteriormente, las concentraciones aplicadas en ambas técnicas debían ser iguales, por lo que el procedimiento de la microdilución, fundamentado en la publicación planteada por José A. García Rodríguez y Col. (2000), fue adaptada a las necesidades de los extractos y a la capacidad volumétrica de la microplaca; por lo que se emplearon diluciones diez veces menos concentradas que las utilizadas en el primer ensayo, también el número de células del inóculo fue diez veces menor.



En las tablas 12 y 13, para el *S. aureus*, (macrotécnica y microtécnica), se puede apreciar al ver los resultados:

Tabla 12. Actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* usando la Técnica MACRODILUCIÓN

		# de colonias de <i>S. aureus</i> **			<i>S. aureus</i> ufc/ml °	ufc/ml <i>S. aureus</i> ***			% de inhibición, siembra 100ul, <i>S. aureus</i> °°			Media de % de inhibición °°°
Planta	Dilución mg/ml	Replicas *			Inóculo incubado 24h	Replica *			Replica *			
		1	2	3		1	2	3	1	2	3	
Malva olorosa Sayausí	8	0	0	0	3.7 x10 ⁸	0	0	0	100	100	100	100
	4	1	3	1	3.7 x10 ⁸	10	30	10	99,99999	99,99999	99,99999	99,9999955
	2	2	2	1	3.7 x10 ⁸	20	20	10	99,99999	99,99999	99,99999	99,9999955
	1	i	i	i	3.7 x10 ⁸	i	i	i	0	0	0	0
Ajenjo Sayausí	8	2	2	1	3.7 x10 ⁸	20	20	10	99,99999	99,99999	99,99999	99,9999955
	4	i	i	i	3.7 x10 ⁸	i	i	i	0	0	0	0
	2	i	i	i	3.7 x10 ⁸	i	i	i	0	0	0	0
	1	i	i	i	3.7 x10 ⁸	i	i	i	0	0	0	0
Ortiga Sayausí	8	1	0	0	3.7 x10 ⁸	10	0	0	99,99999	100	100	99,9999991
	4	i	i	i	3.7 x10 ⁸	i	i	i	0	0	0	0
	2	i	i	i	3.7 x10 ⁸	i	i	i	0	0	0	0
	1	i	i	i	3.7 x10 ⁸	i	i	i	0	0	0	0

*Número de ensayos repetidos. ° Inóculo incubado por 24 horas. ** Número de colonias contadas en caja. *** Número de colonias expresadas en ufc/ml. °° cálculo del porcentaje de inhibición en 100 µl de dilución de extracto incubado. °°°Media de porcentaje de inhibición. i: incontable

Tabla 13 Actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* usando la Técnica MICRODILUCIÓN

		# de colonias de <i>S. aureus</i> **			<i>S. aureus</i> ufc/ml °	ufc/ml <i>S. aureus</i> ***			% de inhibición, siembra 100ul, <i>S. aureus</i> °°			Media de % de inhibición °°°
Planta	Dilución mg/ml	Replicas*			Inóculo incubado 24h	Replica*			Replica*			
		1	2	3		1	2	3	1	2	3	
Malva olorosa Sayausí	8	1	0	0	1.9 x10 ⁸	10	0	0	99,99999	100	100	99,9999982
	4	0	1	0	1.9 x10 ⁸	0	10	0	100	99,9999	100	99,9999982
	2	0	1	1	1.9 x10 ⁸	0	10	10	100	99,999	99,999	99,9999965
	1	i	i	i	1.9 x10 ⁸	i	i	i	0	0	0	0
Ajenjo Sayausí	8	0	2	0	1.9 x10 ⁸	0	20	0	100	99,999	100	99,9999965
	4	i	i	i	1.9 x10 ⁸	i	i	i	0	0	0	0
	2	i	i	i	1.9 x10 ⁸	i	i	i	0	0	0	0
	1	i	i	i	1.9 x10 ⁸	i	i	i	0	0	0	0
Ortiga Sayausí	8	1	0	0	1.9 x10 ⁸	10	0	0	99,99999	100	100	99,9999982
	4	i	i	i	1.9 x10 ⁸	i	i	i	0	0	0	0
	2	i	i	i	1.9 x10 ⁸	i	i	i	0	0	0	0
	1	i	i	i	1.9 x10 ⁸	i	i	i	0	0	0	0

*Número de ensayos repetidos. ° Inóculo incubado por 24 horas. ** Número de colonias contadas en caja. *** Número de colonias expresadas en ufc/ml. °° cálculo del porcentaje de inhibición en 100 µl de dilución de extracto incubado. °°° Media de porcentaje de inhibición. i: incontable



En los extractos de *Pelargonium odoratissimum* (Malva Olorosa), *Artemisia absinthium* (Ajenjo) y *Urtica urens* (Ortiga), el conteo de colonias y su porcentaje de inhibición bacteriana (99,9 - 100%), entre las mismas concentraciones para ambas técnicas son similares, mostrando actividad inhibitoria contra este microorganismo en la mayor dilución (8mg/ml), esta propiedad se lo atribuye en la *Artemisia absinthium* a sus componentes como la α y β -tuyona, terpinen-4-ol, linalool, nerol, geraniol, α -pineno, 1,8-cineol, señalado en el estudio por Arfaioli, P y Bosetto, M (1995), en el *Pelargonium odoratissimum* a los principios activos como el (Z)-epoxyocimene y β -tuyona, indicado en la investigación realizada por la Dra. Maria Lis-Balchin y col. (1990) y en el caso de la *Urtica urens* el responsable puede ser uno de sus flavonoides (Patuletina) indicado en el estudio de Mosaad y col. (2004), pero estos datos solo se usarán como referencia, ya que no se profundizará más en los componentes responsables de la actividad antimicrobiana, porque solo fueron una base importante para realizar la comparación entre las técnicas.

Continuando con la presentación de los resultados del ensayo, en las tablas 14 y 15 se observan los resultados obtenidos para *E. coli*:

Tabla 14 Actividad antimicrobiana frente a *E. coli* usando la Técnica MACRODILUCIÓN

Planta	Dilución mg/ml	# de colonias de <i>E. coli</i> **			<i>E. coli</i> ufc/ml Inóculo incubado 24h	ufc/m <i>E. coli</i> ***			% de inhibición, siembra 100ul, <i>E. coli</i> °°			Media de % de inhibición °°°
		Replicas *				Replica *			Replica *			
		1	2	3		1	2	3	1	2	3	
Malva olorosa (Sayausí)	8	i	i	i	9 x10 ⁷	l	i	i	0	0	0	0
	4	i	i	i	9 x10 ⁷	l	i	i	0	0	0	0
	2	i	i	i	9 x10 ⁷	l	i	i	0	0	0	0
	1	i	i	i	9 x10 ⁷	l	i	i	0	0	0	0
Ajenjo (Sayausí)	8	i	i	i	9 x10 ⁷	l	i	i	0	0	0	0
	4	i	i	i	9 x10 ⁷	l	i	i	0	0	0	0
	2	i	i	i	9 x10 ⁷	l	i	i	0	0	0	0
	1	l	l	l	9x10 ⁷	l	l	l	0	0	0	0
Ortiga (Sayausí)	8	i	i	i	9 x10 ⁷	l	l	i	0	0	0	0
	4	i	i	i	9 x10 ⁷	l	i	i	0	0	0	0
	2	i	i	i	9 x10 ⁷	l	i	i	0	0	0	0
	1	i	i	i	9 x10 ⁷	l	i	i	0	0	0	0

*Número de ensayos repetidos. ° Inóculo incubado por 24 horas. ** Número de colonias contadas en caja. *** Número de colonias expresadas en ufc/ml. °° cálculo del porcentaje de inhibición en 100 µl de dilución de extracto incubado. °°° Media de porcentaje de inhibición. i: incontable



Tabla 15 Actividad antimicrobiana frente a *E. coli* usando la Técnica MICRODILUCIÓN

Planta	Dilución mg/ml	# de colonias de <i>E. coli</i> **			<i>E. coli</i> ufc/ml °	ufc/m <i>E. coli</i> ***			% de inhibición, siembra 100ul, <i>E. coli</i> °°		
		Replicas *				Replica *			Replica *		
		1	2	3	Inóculo incubado 24h	1	2	3	1	2	3
Malva olorosa (Sayausí)	8	i	i	i	4 x10 ⁷	i	i	i	0	0	0
	4	i	i	i	4 x10 ⁷	i	i	i	0	0	0
	2	i	i	i	4 x10 ⁷	i	i	i	0	0	0
	1	i	i	i	4 x10 ⁷	i	i	i	0	0	0
Ajenjo (Sayausí)	8	i	i	i	4 x10 ⁷	i	i	i	0	0	0
	4	i	i	i	4 x10 ⁷	i	i	i	0	0	0
	2	i	i	i	4 x10 ⁷	i	i	i	0	0	0
	1	i	i	i	4 x10 ⁷	i	i	i	0	0	0
Ortiga (Sayausí)	8	i	i	i	4 x10 ⁷	i	i	i	0	0	0
	4	i	i	i	4 x10 ⁷	i	i	i	0	0	0
	2	i	i	i	4 x10 ⁷	i	i	i	0	0	0
	1	i	i	i	4 x10 ⁷	i	i	i	0	0	0

*Número de ensayos repetidos. ° Inóculo incubado por 24 horas. ** Número de colonias contadas en caja. *** Número de colonias expresadas en ufc/ml. °° cálculo del porcentaje de inhibición en 100 µl de dilución de extracto incubado. °°° Media de porcentaje de inhibición. i: incontable

Vemos como se sigue validando la microdilución frente a la macrodilución, ya que en los dos métodos con las mismas concentraciones no reportan actividad antimicrobiana para *E. coli*, lo cual puede deberse a diferencias existentes en la estructura celular entre ambas bacterias.

En cuanto a la estadística, no fue posible aplicarla en el caso de las plantas, por la insuficiente cantidad de datos, por lo tanto su validación fue visual.

En la tabla 16 y 17 podemos distinguir que con respecto a los Antibacterianos que se repite el mismo fenómeno, en donde tampoco tuvieron gran diferencia entre sí.



Tabla 16 Actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*

Antibacteriano	Dilución	Espectro fotómetro	Macrotécnica	Microelisa	Microtécnica
	ug/ml	% Inhibición		% Inhibición	
Ampicilina	128	99,7254902	sensible	92,7132304	Sensible
Rango de sensibilidad	64	99,56862745	sensible	92,6460712	Sensible
=<0,25ug/ml	32	99,05882353	sensible	92,3270651	Sensible
	16	99,33333333	sensible	92,1423774	Sensible
	8	99,45	sensible	91,9912693	Sensible
	4	99,64705882	sensible	91,8233714	Sensible
	2	99,80392157	sensible	91,5883143	Sensible
	1	99,17647059	sensible	91,4036266	Sensible
	0,5	99,60784314	sensible	90,7991941	Sensible
	0,25	99,88235294	sensible	90,9503022	Sensible
	0,125	92,90196078	sensible	90,5473472	Sensible
Gentamicina	128	99,33333333	sensible	91,773002	Sensible
Rango de sensibilidad	64	99,76470588	sensible	91,6890531	Sensible
=<0,5ug/ml	32	99,45098039	sensible	91,4707858	Sensible
	16	99,7254902	sensible	91,2693083	Sensible
	8	99,56862745	sensible	91,2357287	Sensible
	4	99,56862745	sensible	91,1182001	Sensible
	2	99,52941176	sensible	90,8999328	Sensible
	1	99,09803922	sensible	90,3458697	Sensible
	0,5	99,1372549	sensible	90,3962391	Sensible
	0,25	98,58823529	sensible	89,842176	Sensible
	0,125	92,66666667	sensible	89,3384822	Sensible
Ciprofloxacina	128	99,80392157	sensible	92,259906	Sensible
Rango de sensibilidad	64	99,64705882	sensible	91,9576897	Sensible
=<8ug/ml	32	99,01960784	sensible	91,7562122	Sensible
	16	99,56862745	sensible	91,7226326	Sensible
	8	99,17647059	sensible	91,4875756	Sensible
	4	99,17647059	sensible	91,2189389	Sensible
	2	99,45098039	sensible	91,1182001	Sensible
	1	99,1372549	sensible	91,0174614	Sensible
	0,5	99,18823529	sensible	90,7488247	Sensible
	0,25	99,41176471	sensible	90,8663533	Sensible
	0,125	98,96862745	sensible	89,8757555	Sensible
Amikacina	128	99,80392157	sensible	93,0993956	Sensible
Rango de sensibilidad	64	99,7254902	sensible	92,8475487	Sensible
=<4/2ug/ml	32	99,60784314	sensible	92,8979181	Sensible
	16	99,76470588	sensible	92,6460712	Sensible



	8	99,64705882	sensible	92,3942243	Sensible
	4	99,52941176	sensible	92,1423774	Sensible
	2	97,21568627	sensible	92,0920081	Sensible
	1	44,39215686	Resistente	72,0416387	M. sensible
	0,5	22,941176471	Resistente	69,8401612	M. sensible
	0,25	-1,921568627	Resistente	61,7562122	M. sensible
	0,125	-4,392156863	Resistente	31,4372062	Resistente
Ceftriazona					
	128	99,33333333	sensible	91,8233714	Sensible
Rango de sensibilidad	64	99,21568627	sensible	91,6386837	Sensible
=<8ug/ml	32	99,41176471	sensible	91,5211551	Sensible
	16	99,49019608	sensible	91,3364674	Sensible
	8	99,52941176	sensible	91,3028878	Sensible
	4	99,64705882	sensible	91,2525185	Sensible
	2	99,17647059	sensible	90,9838818	Sensible
	1	39,7254902	Resistente	82,5473472	M. sensible
	0,5	15,921568627	Resistente	77,4298187	M. sensible
	0,25	2,509803922	Resistente	70,2787105	M. sensible
	0,125	-7,764705882	Resistente	69,7918066	M. sensible
Cefazolina					
	128	99,80392157	sensible	93,2001343	Sensible
Rango de sensibilidad	64	99,88235294	sensible	92,981867	Sensible
=<8 ug/ml	32	99,7254902	sensible	92,7635997	Sensible
	16	99,92156863	sensible	92,6964406	Sensible
	8	99,76470588	sensible	92,4949631	Sensible
	4	99,45098039	sensible	92,3270651	Sensible
	2	99,09803922	sensible	92,259906	Sensible
	1	99,68627451	sensible	92,1087979	Sensible
	0,5	99,52941176	sensible	91,8737408	Sensible
	0,25	97,76470588	sensible	91,1685695	Sensible
	0,125	48,94117647	Resistente	50,2115514	Resistente

En la siguiente tabla se observa resultados similares para *E. coli*.

Tabla 17 Actividad antimicrobiana frente a *E. coli*

Antibacteriano	Dilución	Espectro fotómetro	Macrotécnica	Microelisa	Microtécnica
	ug/ml	% Inhibición		% Inhibición	
Ampicilina	128	99,3112948	sensible	92,5243044	Sensible
Rango de sensibilidad	64	99,6786042	sensible	92,3566879	Sensible
=<0,25ug/ml	32	99,4490358	sensible	92,1387865	Sensible
	16	99,6786042	sensible	91,8538384	Sensible
	8	99,8117539	sensible	90,3117667	Sensible



	4	90,1129477	sensible	89,725109	Sensible
	2	73,2782369	sensible	76,4666443	Sensible
	1	-5,94306703	Resistente	42,5273215	Resistente
	0,5	-10,4315886	Resistente	39,7670131	Resistente
	0,25	-26,0275482	Resistente	34,3647335	Resistente
	0,125	-35,1698806	Resistente	31,0295005	Resistente
Gentamicina					
	128	98,989899	sensible	92,4237345	Sensible
Rango de sensibilidad	64	99,2194674	sensible	92,1723098	Sensible
=<0,5ug/ml	32	99,12764	sensible	91,8035535	Sensible
	16	99,2194674	sensible	91,0828025	Sensible
	8	99,3112948	sensible	91,3342273	Sensible
	4	99,7245179	sensible	90,9989943	Sensible
	2	51,6988062	M. sensible	76,6007375	Sensible
	1	24,0495868	Resistente	71,3878646	Sensible
	0,5	18,640955	Resistente	67,9182032	M. sensible
	0,25	7,5022957	Resistente	37,7271203	Resistente
	0,125	-32,4150597	Resistente	27,1940999	Resistente
Ciprofloxacina					
	128	99,8163453	sensible	92,876299	Sensible
Rango de sensibilidad	64	99,8163453	sensible	92,4069728	Sensible
=<8ug/ml	32	99,6786042	sensible	92,1890714	Sensible
	16	99,7704316	sensible	92,1052632	Sensible
	8	99,862259	sensible	91,7365069	Sensible
	4	99,7704316	sensible	91,4683205	Sensible
	2	99,8163453	sensible	91,4515588	Sensible
	1	99,6786042	sensible	91,3677506	Sensible
	0,5	99,9540863	sensible	91,2671807	Sensible
	0,25	99,7704316	sensible	91,1666108	Sensible
	0,125	99,8163453	sensible	91,1666108	Sensible
Amikacina					
	128	98,9439853	sensible	92,6583976	Sensible
Rango de sensibilidad	64	97,8420569	sensible	92,541066	Sensible
=<4/2ug/ml	32	97,9338843	sensible	92,0717399	Sensible
	16	97,4747475	sensible	91,3845122	Sensible
	8	96,5564738	sensible	91,2001341	Sensible
	4	96,1432507	sensible	89,5239692	Sensible
	2	59,5041322	M. sensible	72,6131411	M. sensible
	1	26,2020202	Resistente	56,8521623	M. sensible
	0,5	-3,2323232	Resistente	38,0526316	Resistente
	0,25	-11,0835629	Resistente	28,1642642	Resistente
	0,125	-24,5270891	Resistente	16,5772712	Resistente



Ceftriazona	128	99,9081726	sensible	92,6248743	Sensible
Rango de sensibilidad	64	99,862259	sensible	92,4572578	Sensible
=<8ug/ml	32	99,9081726	sensible	92,3231646	Sensible
	16	99,9081726	sensible	92,0214549	Sensible
	8	99,9081726	sensible	91,3845122	Sensible
	4	99,9540863	sensible	91,0325176	Sensible
	2	98,5307622	sensible	89,9765337	Sensible
	1	97,5665748	sensible	88,1495139	Sensible
	0,5	59,8576676	M. sensible	69,4063024	M. sensible
	0,25	36,4554637	Resistente	61,3057325	M. sensible
	0,125	-28,3746556	Resistente	46,1884009	Resistente
Cefazolina					
Cefazolina	128	99,1735537	sensible	92,9601073	Sensible
Rango de sensibilidad	64	99,4949495	sensible	92,6416359	Sensible
=<8 ug/ml	32	97,8879706	sensible	92,5075427	Sensible
	16	98,6225895	sensible	92,2393564	Sensible
	8	97,7961433	sensible	90,6637613	Sensible
	4	98,8797062	sensible	88,7026483	Sensible
	2	99,3755739	sensible	86,1716393	Sensible
	1	98,8521579	sensible	79,9027824	Sensible
	0,5	19,4214876	Resistente	66,818639	M. sensible
	0,25	-19,6969697	Resistente	45,4106604	Resistente
	0,125	-18,2736455	Resistente	33,4830707	Resistente

Al efectuar las lecturas correspondientes, mostraron un rango de diferencia entre ambos equipos, lo cual puede deberse a la ley de Beer-Lambert que cita: *“La cantidad de luz absorbida por un objeto depende de la distancia recorrida por la luz”*, la ley explica que hay una relación exponencial entre la transmisión de luz a través de una sustancia y la longitud del cuerpo que la luz atraviesa, por ello en la microdilución se cumple este enunciado ya que las ondas electromagnéticas chocan contra un mayor número de átomos y son absorbidos por estos.⁽³²⁾

Por esa razón para aprobar la teoría planteada en forma estadística, nos basamos en el porcentaje de inhibición con respecto a los Antibacterianos, ya que el color de los extractos y la precipitación que se formó al incubarse fue un impedimento para obtener lecturas reales, por lo tanto con ellos se realizó una comparación visual.



El análisis estadístico que se empleó, en el caso de los Antibacterianos fue el test de student, usando el contraste t para datos emparejados, que permite comparar dos métodos diferentes aplicados para la misma muestra, tomando en cuenta los errores aleatorios y sistemáticos que pueden presentar los datos obtenidos, ayudando a determinar si la hipótesis nula es aceptada o rechazada.

Entendiendo, en nuestro caso como hipótesis alternativa (H_i) al planteamiento de que la microtécnica es comparable con la macrotécnica y en la Hipótesis nula (H_o) todo lo contrario, es decir que la microtécnica no tiene comparación con la macrotécnica.

Por lo tanto:

H_o = Si t experimental (Estadístico t) $\geq t$ crítico (Valor crítico de t) \Rightarrow hay diferencias entre las dos técnicas.

H_i = Si t experimental (Estadístico t) $\leq t$ crítico (Valor crítico de t) \Rightarrow no hay diferencias entre las dos técnicas.

De acuerdo a lo planteado, desde las tablas 18 a la 23, el t experimental es menor o igual al t crítico, rechazamos la H_o .

PRUEBA T PARA MEDIAS DE DOS MUESTRAS EMPAREJADAS

Tabla 18

AMPICILINA		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Estadístico t	-13,5205438	1,80910006
P($T \leq t$) una cola	4,7215E-08	0,05027488
Valor crítico de t (una cola)	1,8124611	1,8124611

Tabla 19

GENTAMICINA		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Estadístico t	-16,75746112	1,80896145
P($T \leq t$) una cola	6,00E-09	0,05028625
Valor crítico de t (una cola)	1,8124611	1,8124611



Tabla 20

CIPROFLOXACINA		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Estadístico t	-50,8508252	-45,6991672
P(T<=t) una cola	1,0457E-13	3,0303E-13
Valor crítico de t (una cola)	1,8124611	1,8124611

Tabla 21

AMIKACINA		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Estadístico t	1,429650269	1,80181894
P(T<=t) una cola	0,091653312	0,05087514
Valor crítico de t (una cola)	1,8124611	1,8124611

Tabla 22

CEFTRIAZONA		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Estadístico t	1,603858011	0,50768858
P(T<=t) una cola	0,069913494	0,31134044
Valor crítico de t (una cola)	1,8124611	1,8124611

Tabla 23

CEFAZOLINA		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Estadístico t	-8,247576551	0,89087615
P(T<=t) una cola	4,50364E-06	0,19696246
Valor crítico de t (una cola)	1,8124611	1,8124611

Ejemplo: en la ampicilina para *S. aureus* (tabla 18), vemos que el valor del t experimental o estadístico es= -13,5205438 y del t crítico es= 1,8124611, siendo menor el t estadístico al t crítico, este fenómeno se repite en todas las tablas analizadas, lo que indica que las dos técnicas, tanto en la práctica como en la estadística son comparables.



CAPITULO 4

CONCLUSIONES

Sustentándonos en todo lo recopilado en nuestro trabajo, la microdilución fue más efectiva no solo por sus ventajas sino también por la estructuración de la microplaca, posee una tapa con un diseño ideal que produce un vacío, protegiendo las muestras de una posible contaminación externa e interna, a más de que la mayoría de placas disponibles tienen 96 pocillos (12x8), podemos estudiar con cada una de ellas, y para el mismo microorganismo 8 antimicrobianos y 11 diluciones (la última columna se suele utilizar como control de crecimiento) o viceversa.

Entonces de acuerdo a lo evidenciado, nos quedamos con la microdilución porque es más rápida, sencilla y la cantidad de material utilizado asegura una mejor condición de esterilidad que en la macrodilución, lo que concuerda con los trabajos de investigación consultados (José A y col., 2001).

Tanto la microdilución como la macrodilución para determinar la actividad antibacteriana y establecer la concentración mínima inhibitoria, son comparables. Lo pudimos observar en las plantas ensayadas que presentaron resultados que de forma visual, confirma la hipótesis planteada como en el caso de la Malva olorosa que presenta inhibición en la mayoría de las concentraciones (8, 4, 2 mg/ml).

Afirmación respaldada por los resultados obtenidos en el caso de los antibacterianos por el test de Student, que valida la microtécnica frente a la macrotécnica, porque no existe variación representativa entre ellas.



CAPITULO 5

RECOMENDACIÓN

- ✓ De acuerdo a nuestra experiencia la microtécnica es una técnica más rápida y menos laboriosa, al aplicar esta técnica nos daría mayor oportunidad de realizar investigaciones de plantas de nuestro país al disminuir el costo y tiempo empleado.
- ✓ Eliminar la interferencia de la clorofila mediante el uso de acetato de plomo que lo precipita separándola del extracto.
- ✓ Separar los componentes presentes en los extractos por cromatografía y determinar cuál o cuáles son las fracciones con actividad antibacteriana.



Referencias Bibliográficas:

1. **R. Taroco, V. Seija, R. Vignoli**, Métodos de Estudio de la Sensibilidad Antibiótica, 2008, págs. 663-670, (En línea) (Citado el: 21/05/2008) higiene.edu.uy/seimc.org.
2. **Marie B. Coyle**, Pruebas de la CIM, págs. 53-62, (En línea) (Citado el: 05/01/2009), paho.org.
3. **NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL INSTITUTE (NCCIS)** (2002). Document M31-A2. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals, Approved Standard, Second Edition. document M31-A2. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 1987-1898, USA, pág. 80 (En línea) (Citado el: 05/01/2009).
4. **Dra. Jeannete Zurita, Ivonne Herrera, Emilia Vázquez, Gonzalo Cárdenas, Yolanda Espinosa, Richard Dauce**, AISLAMIENTOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS CON GEN MEC-A, CEPA EMERGENTE DE LA COMUNIDAD EN INFECCIONES EN NIÑOS Y ADOLESCENTE EN QUITO-ECUADOR, 2005, artículo, (En línea) (Citado el: 05/01/2009), Zuritalaboratorios.com.
5. **Dra. Jeannete Zurita**, Resistencia bacteriana, un problema cada vez más frecuente en el tratamiento de infecciones de vías urinarias, 2006, artículo, (En línea) (Citado el: 05/01/2009), saluddealtura.com.
6. **Sheyla Mosquera**, Bacterias de Hospital, La revista "El Universo", Pág. 32, Guayaquil – Ecuador (Citado el: 23/10/08).
7. **Patrick R. Murray, Ken S. Rosenthal, Michael A. Pfaller**, MICROBIOLOGIA MEDICA, Quinta edición, Elsevier, Madrid, España, 2006, Págs. 221-236; 323-338.
8. **Jawetz, Melnick y Adelberg** - Microbiología Médica - 17 a Edición – editorial El manual moderno – México, 1995, Págs. 157-176.
9. **Jorge Tulio Rodríguez, David Prado Cohrs**; MICROBIOLOGIA: LO ESENCIAL Y LO PRACTICO; PRIMERA EDICION, Organización Panamericana de Salud, Washington D.C., EE.UU. ,2006, Págs. 54-56



10. **J. Vandepitte and J. Verhaegen, K. Engbaer, P. Rohner, P. Piot, C. Cheuck**, BASIC LABORATORY PROCEDURES, 2th edition, World Health Organization, Geneva, 2003, Págs. 88-97.
11. **Alberto Delgado-Iribarren M. Silvia Amich, Santiago Prieto, María Luisa Salve**, LABORATORIO CLINICO MICROBIOLOGIA, Interamericana MC GRAW-HILL, Madrid, España, 1993, Págs. 176-183.
12. **Man Wilson Salazar Delgado**, MANUAL DE PRACTICAS DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA; Universidad Central de Ecuador , Facultad de Ciencias Medicas, Quito- Ecuador
13. **Dr. Carlos G. Malbrán**, METODOS ESTANDARIZADOS PARA LA DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA EN BACTERIAS AISLADAS DE ANIMALES: TEST DE DIFUSION POR DISCOS Y TEST DE DILUCION, 2001 ,1-32, publicación del INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS, (En línea) (Citado en: 05/01/2009), cdc.com.
14. Microsoft ® **Encarta ® 2007**. © 1993-2007 Microsoft Corporation.
15. **F. Baquero, J. González, D. Martínez, V. Olmo, A. Orero, J. Prieto**, Importancia de la cobertura antimicrobiana y de las resistencias bacterianas en la elección de Antibacterianos en Pediatría, artículo de la revista esp., 2009, págs. 38 -42, (En línea)(Citado el: 14/02/2009), Quimioter, seq. es.
16. **Marta Guerra Ordóñez, Lic. Dinorah Torres Idavoy y Lic. Leticia Martínez Pol3**,“VALIDACIÓN DEL USO TRADICIONAL DE PLANTAS MEDICINALES CULTIVADAS EN CUBA”, Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM), 2001; (2), págs.48-51; (En línea)(Citado el:14/02/2009) , bvs.sld.cu,
17. **Jorge Vidal**, CURSO DE BOTANICA, Primera edición, Editorial STELLA, Buenos Aires, Argentina, 2003, Págs. 377-378,437.
18. **Ana Luiza Guimaro**, ENCICLOPEDIA PLANTAS QUE CURAN, Conselho editoriales, 1984.Pág. 37.
19. **Montserrat Ríos, Michael J. Koziol, Henrik Borgtoft y Gabriela Granda**, PLANTAS UTILES DEL ECUADOR APLICACIONES, RETOS



- Y PERSPECTIVAS, Herbario, qca, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador, 2007, Págs. 36,46.
20. **Laura Yepes Cayuela**, LA ORTIGA UNA PLANTA CON DOS CARAS, 2007, trabajo de investigación de la Escuela Isabel de Villena, (En línea)(Citado el: 25/07/2008), botanical - online
21. **N.T.Gill, K.C.Veail**, BOTANICA AGRICOLA, Primera edición, Editorial Acribia, Zaragoza, España, 1965, Págs.492-494.
22. **Maria Rosa TeixidoValls**, FLORA MEDICINAL TOXICA, AROMATICA, CONDIMENTICIA-1ra edición –AEDOS-Madrid, España, 1975, Pág. 46.
23. Artemisa amarga, 2009, artículo,(En línea) (Citado el:22/05/2008), hipernatural.com
24. **Carlos E. Cerón Martínez**, Plantas Medicinales de los Andes ecuatorianos, publicación de Escuela de Biología de la Universidad Central del Ecuador, 2006, Págs. 285-293, (En línea)(Citado el:26/10/2008), beisa.dk.
25. **Nikolai Sharapin**, FUNDAMENTOS DE TECNOLOGÍA DE PRODUCTOS FITOTERAPÉUTICOS, Editorial CYTED, 2000, Págs. 45-47, (En línea) (Citado el: 22/01/2009),books.google.com.ec.
26. **Mónica Diana Romero Márquez**, PLANTAS AROMATICAS “Tratado de Aromaterapia Científica”, Editorial Kier, 2004,Págs.63-70,(En línea)(Citado el: 22/01/2009), books.google.com.ec
- 27.7: DAB 8 – **Deutsche Arzneimittelbuch**, 8 Ed. 1978 (En línea)(Citado el: 22/01/2009).
28. **Maria Elena Álvarez, Gustavo Isaza, Harold Mauricio Echeverry**, EFECTO ANTIBACTERIANO in vitro de Austroeupatorium inulaefolium H.B.K.(Salvia amarga) y Ludwigia Polygonoides H.B.K.(Clavo de Laguna), 2005,Págs.46-55, (En línea) (Citado el:14/02/2009),biosalud.ucaldas.edu.com
29. **Maguna, Fabiana P., -Romero, Ana M. –Garro, Oscar A., Okulik, Nora B.**, Actividad antimicrobiana de un grupo de terpenoides, 2006, comunicación científica y tecnológica, (En línea)(Citado el:22/01/2009), unne.edu.ar.



30. **Adriana Daud Thoene^I; Natalia Habib Intersimone^{II}; Alicia Sánchez Riera^{III}**, Actividad antimicrobiana de extractos alcohólicos de hojas y corteza de *Polylepis australis* Bitter (queñoa), 2008, artículo de la revista , (En línea)(Citado el: 22/01/2009), bvs.sld.cu
31. **Maria Consuelo Díaz Baez, Gustavo Daniel Bulus Rossini, Yolanda Pica Granados**, Métodos Estadísticos para el Análisis de Resultados de Toxicidad, 2004, Págs.11-16, ensayo de toxicología, (En línea) (Citado el: 22/01/2009), idrc.ca/fr/ev.
32. **Cecilia Perret**, revista chilena de infectología, scielo.cl/scielo (2002).
33. **Miguel Sogorb, Eugenio Vilanova**, Técnicas analíticas de contaminantes químicos, 2004, Págs. 85 – 88 Libro (En línea) (Citado el: 26/03/2010), books.google.com.ec.



Bibliografía:

1. **Maria Rosa TeixidoValls**, FLORA MEDICINAL TOXICA, AROMATICA, CONDIMENTICIA-1ra edición –AEDOS-Madrid, España, 1975, Págs. 46, idrc.ca/fr/ev.
2. **Montserrat Ríos, Michael J. Koziol, Henrik Borgtoft y Gabriela Granda**, PLANTAS UTILES DEL ECUADOR APLICACIONES, RETOS Y PERSPECTIVAS, Herbario, qca, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador, 2007, Págs. 36,46.
3. **Jorge Vidal**, CURSO DE BOTANICA, Primera edición, Editorial STELLA, Buenos Aires, Argentina, 2003, Págs. 377-378,437.
4. **N.T.Gill, K.C.Veail**, BOTANICA AGRICOLA, Primera edición, Editorial Acribia, Zaragoza, España, 1965, Págs.492-494.
5. **Konemann, Tandem**, GUIA ILUSTRADA DE PLANTAS, Primera edición, Randon House, Australia, Págs. 114, 647, 910.
6. **Jawetz, Melnick y Adelberg** - Microbiología Médica - 17 a Edición – editorial El manual moderno – México, 1995
7. **Patrick R. Murray, Ken S. Rosenthal, Michael A. Pfaller**, MICROBIOLOGIA MEDICA, Quinta edición, Elsevier, Madrid, España, 2006, Págs. 221-236; 323-338.
8. **Alberto Delgado-Irribarren M. Silvia Amich, Santiago Prieto, Maria Luisa Salve**, LABORATORIO CLINICO MICROBIOLOGIA, Interamericana MC GRAW-HILL, Madrid, España, 1994, Págs. 176-183.
9. **Jorge Tulio Rodríguez, David Prado Cohrs**; MICROBIOLOGIA: LO ESENCIAL Y LO PRACTICO; PRIMERA EDICION, Organización Panamericana de Salud, Washington D.C., EE.UU., 2006, Págs. 54-56.
10. **J. Vandepitte and J. Verhaegen, K. Engbaer, P. Rohner, P. Piot, C. Cheuck**, BASIC LABORATORY PROCEDURES, 2tha edition, World Health Organization, Geneva, 2003, Págs. 88-97.
11. **Plantas Medicinales**, Ajenjo, página informativa, 2006,(En línea)(Citado el: 20/11/2008), iqb.es.
12. **NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL INSTITUTE (NCCIS) (2002)**. Document M31-A2. Performance Standards for Antimicrobial Disk and



Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals, Approved Standard, Second Edition, document M31-A2. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA, Págs. 80.

13. **R. Taroco, V. Seija, R. Vignoli**, Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica, pág.663, (En línea) (Citado el: 21/05/2008) <http://www.seimc.org>.
14. U.E.P., Artemisa amarga, 2008, página informativa, (En línea) (Citado el: 22/05/2008), hipeernatural.com.
15. **Botanical, Propiedades de la Ortiga**, 1999-2009, página informativa, (En línea) (Citado el: 25/07/2008), botanical-online.com.
16. **M. Moraes R., B. Øllgaard, L. P. Kvist, F. Borchsenius & H. Balslev** Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos, publicación, beisa.dk, 2006: págs.285-293, (En línea) (Citado el: 26/10/2008).
17. **Ecovisiones**, Ajenjo, página informativa, 2007 (En línea) (Citado el: 26/10/2008), ecovisiones.cl.
18. **Hierbitas**, Ajenjo, página informativa, 2007, (En línea) (Citado el: 28/11/2008), hierbitas.com.
19. **Dr. Carlos G. Malbran**, Métodos Estandarizados para la determinación de la sensibilidad Antimicrobiana en Bacterias Aisladas de Animales: Test de Difusión por Discos y Test de Dilución, publicación, 2001, 2-34, (En línea)(Citado el: 05/01/2009), cdc.gov.
20. **R. Taroco, V. Seija, R. Vignoli**, Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica, publicación, 2008, Págs.663-671, (En línea) (Citado el: 05/01/2009), higiene.ed.
21. **Dra.Elizabeth Palavecino Rosales**, Interpretación de los Estudios de Susceptibilidad Antimicrobiana, boletín, 1997, vol.23N°3 ,(En línea) (Citado el: 04/01/2009), escuela.med.puc.cl.
22. **Liliana Jordá Vargas, Andrea Vila, Alejandra Lanza, Pablo Bonvehi, Javier Nazar, Analía Mikietuk, Roxana Labat, Jorgelina Smayevsky** Utilidad del sistema VITEK en la identificación bacteriana y estudios de sensibilidad antimicrobiana, artículo, v.39 n.1 La Plata ene./mar. 2005, (En línea) (Citado el: 04/01/2009), scielo.php.



23. **Patricia Garcia C.**, Ventajas y problemas de los métodos automatizados de estudio de susceptibilidad in Vitro, artículo de revista, 2002, Págs.96-99, (En línea) (Citado el: 05/01/2009), scielo.clc.
24. **www.pediatria.org.ec/index.php?option=com_content&task=view&id=120&Itemid=1 - 32k** – (En línea) (Citado el: 05/01/2009).
25. **Bates SJ, Trostle J., Cevallos WT, Hubbard A., Eisenberg JNS**, Las enfermedades diarreicas relacionadas con las redes sociales y la configuración geográfica de las comunidades en el Ecuador rural. (pdf). American Journal of Epidemiology, artículo, 2007, Págs. 166 (9): 1088-1095, (En línea) (Citado el: 04/01/2008), usfq.edu.ec.
26. **Maria Cristina Arango Mejia**, PLANTAS MEDICINALES, CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA DE PLANTAS MEDICINALES, libro, 2006, Págs, 3-246, (En línea) (Citado el: 28/01/2009), books.google.com.ec.
27. **Nikolai Sharapin**, FUNDAMENTOS DE TECNOLOGÍA DE PRODUCTOS FITOTERAPÉUTICOS, LA PERCOLACION DE LA DROGA, libro, 2000, Págs. 46-247, (En línea) (Citado el: 22/01/2009), books.google.com.ec.
28. **Mónica Diana Romero Márquez**, Editorial Kier, PLANTAS AROMATICAS “Tratado de Aromaterapia Científica”, Método de Percolación de la Planta, libro, 2004, Págs. 63-217, (En línea) (Citado el: 22/01/2009), books.google.com.ec.
29. 7: DAB 8 – **Deutsche Arzneimittelbuch**, 8 Ed. 1978 (En línea) (Citado el: 22/01/2009).
30. **Maguna, Fabiana P.-Romero, Ana M.-Garro, Oscar A.- Okulik, Nora B.**, Actividad antimicrobiana de un Grupo de Terpenoides, resumen, 2006, (En línea) (Citado el: 22/01/2009), unne.edu.arf.
31. **Adriana Daud Thoene; Natalia Habib Intersimone; Alicia Sánchez Riera**, Actividad antimicrobiana de extractos alcohólicos de hojas y corteza de *Polylepis australis* Bitter (queñoa), artículo, 2008, (En línea) (Citado el: 22/01/2009), bvs.sld.cu.
32. **Maria Consuelo Díaz Baez, Gustavo Daniel Bulus Rossini, Yolanda Pica** Granados, Capítulo 5. Métodos Estadísticos para el Análisis de Resultados de Toxicidad, artículo, 2007, (En línea) (Citado el: 22/01/2009)



33. **María Elena Álvarez L., Gustavo Isaza M., Harold Mauricio Echeverri L.,** EFECTO ANTIBACTERIANO in Vitro de *Austroeupatorium inulaefolium* H.B.K. (*Salvia amarga*) y *Ludwigia polygonoides* H.B.K., (*Clavo de laguna*), artículo, 2005, Págs. 46-51, (En línea) (Citado el: 14/02/2009), biosalud.ucaldas.edu.
34. **Lic. Marta Guerra Ordóñez, 1 Lic. Dinorah Torres Idavoy² y Lic. Leticia Martínez Pol³,**“VALIDACIÓN DEL USO TRADICIONAL DE PLANTAS MEDICINALES CULTIVADAS EN CUBA”, Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM), 2001; (2):Págs.48-51; (En línea) (Citado el: 14/02/2009)



Cuenca, 5 de mayo de 2010

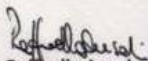
Yo, Raffaella Ansaloni, Directora del Herbario Azuay (HA) de la Universidad del Azuay

CERTIFICO

Que las 3 especies de plantas medicinales objeto de estudio para la tesis de las Señoritas **Susana Carmilema y Rosa Ángela Delgado**, titulada "Validación del método de microdilución para la actividad antimicrobiana de extractos de plantas (ortiga, ajeno, malva olorosa)" fueron caracterizadas botánicamente basándose en las colecciones existentes en este herbario, así como en la bibliografía especializada acerca de las mencionadas especies.

Particular que pongo en su conocimiento para los fines pertinentes.

Atentamente,


Dra. Raffaella Ansaloni



Adjunto: Listado de plantas



ANEXO 1. CARACTERIZACIÓN BOTÁNICA



CARACTERIZACIÓN BOTÁNICA

La caracterización botánica de las plantas se realizó en el Herbario Azuay (HA) de la Universidad del Azuay.

Nombre común	Nombre científico	Familia
Ortiga	<i>Urtica urens L.</i>	URTICACEAE
Ajenjo	<i>Artemisia absintium L.</i>	ASTERACEAE
Malva olorosa	<i>Pelargonium odoratissimum L.</i>	GERANIACEAE

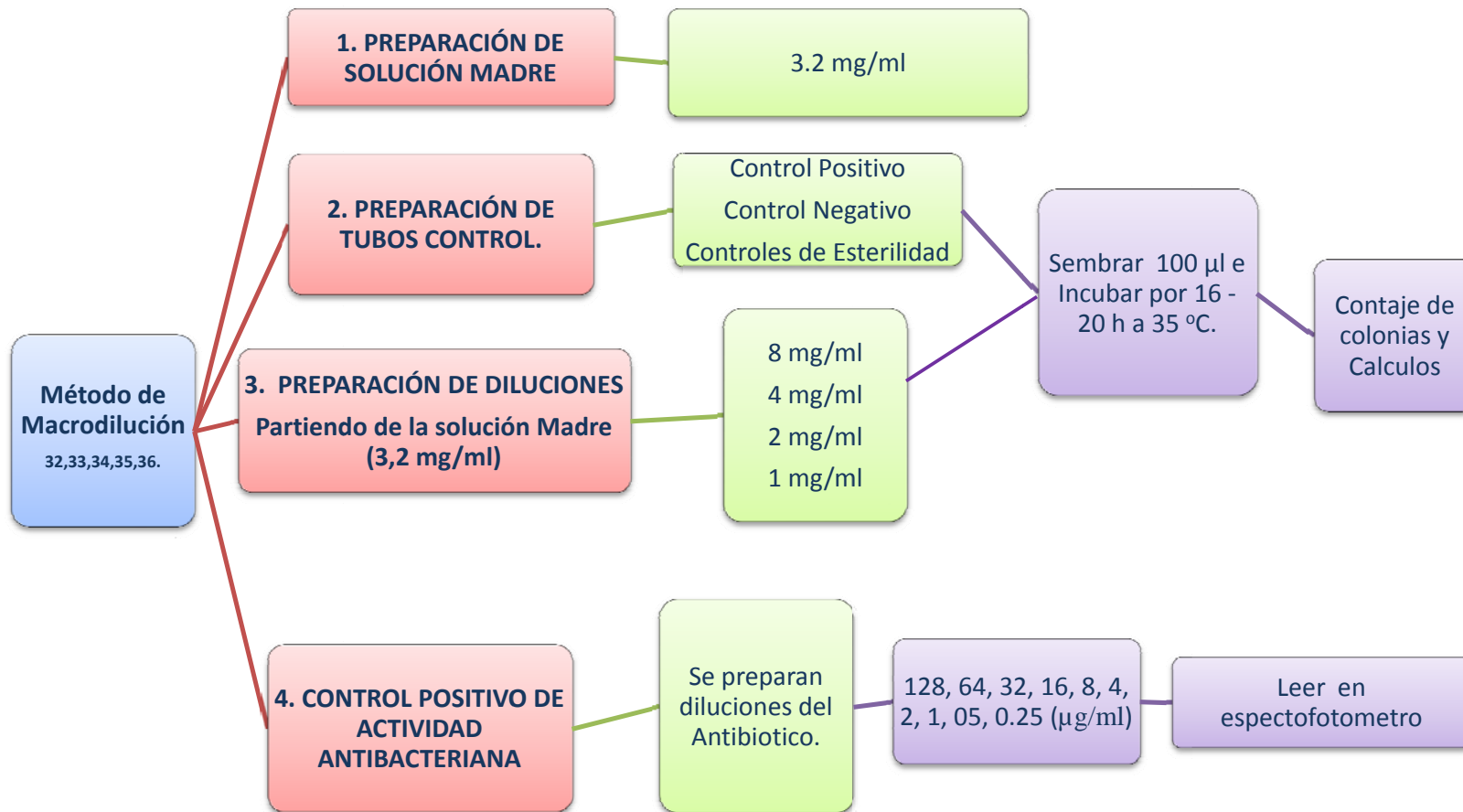
Como ejemplo, a continuación se realiza la descripción botánica del ajeno (*Artemisia absintium L.*):

“Es una planta de color blanquecino, por el vello canoso y espeso que cubre los tallos y hojas, cuyo contorno es redondeado, profundamente dividido en segmentos que llegan a la vena principal y vuelven a dividirse en lóbulos prolongador u obtusos. La raíz es fibrosa y dura, larga. El tallo es blanquecino y se endurece mucho en época de floración, sus ramas son delgadas, flexibles y finas. Las flores se agrupan en racimos que contiene de 30 a 40 cabezuelas en forma de plato hemisférico plano por arriba, con color amarillo y de 3 a 5 mm de diámetro.”



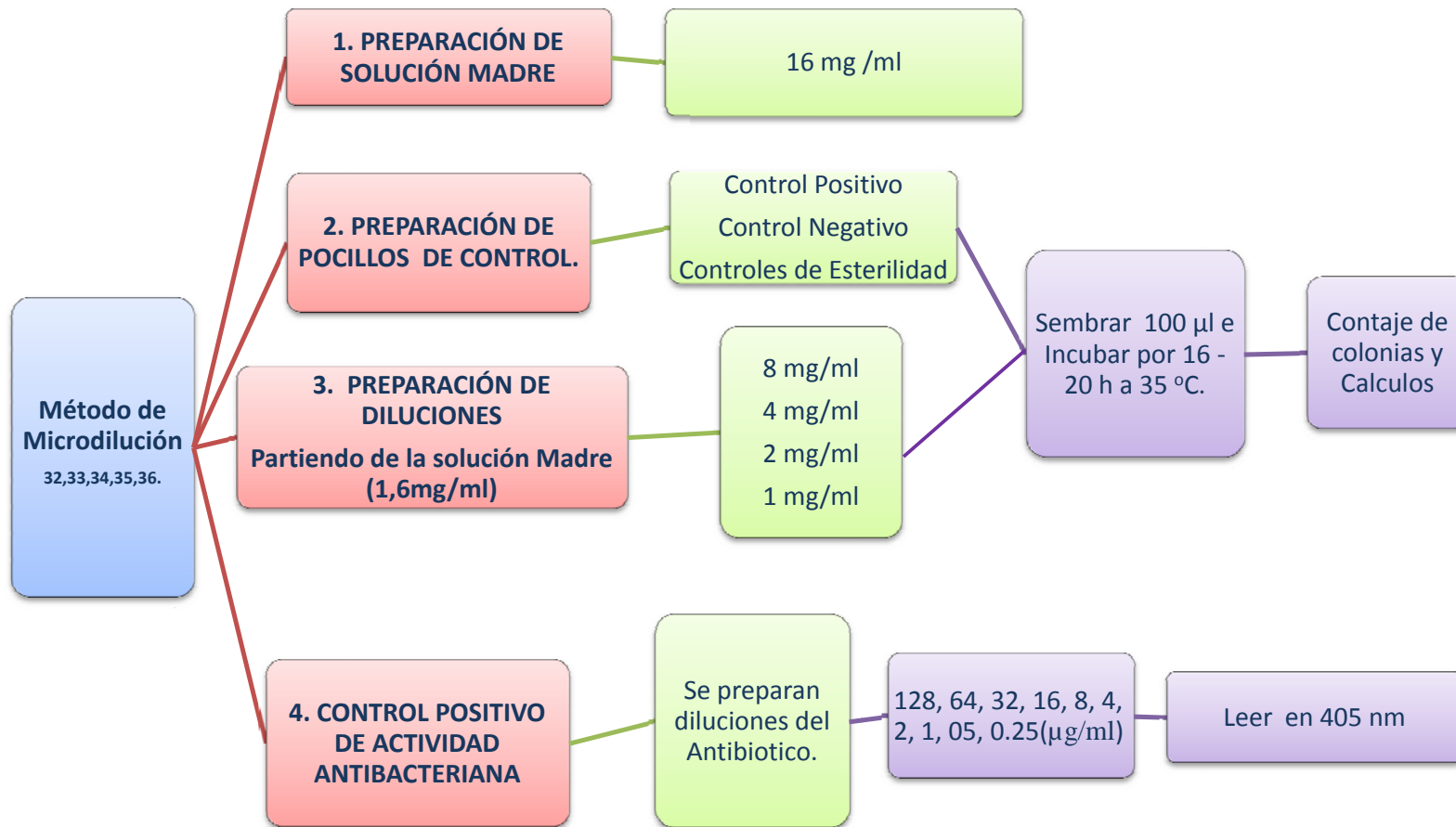


ANEXO 2. FLUJOGRAMA DE LA MACROTÉCNICA DE LOS EXTRACTOS



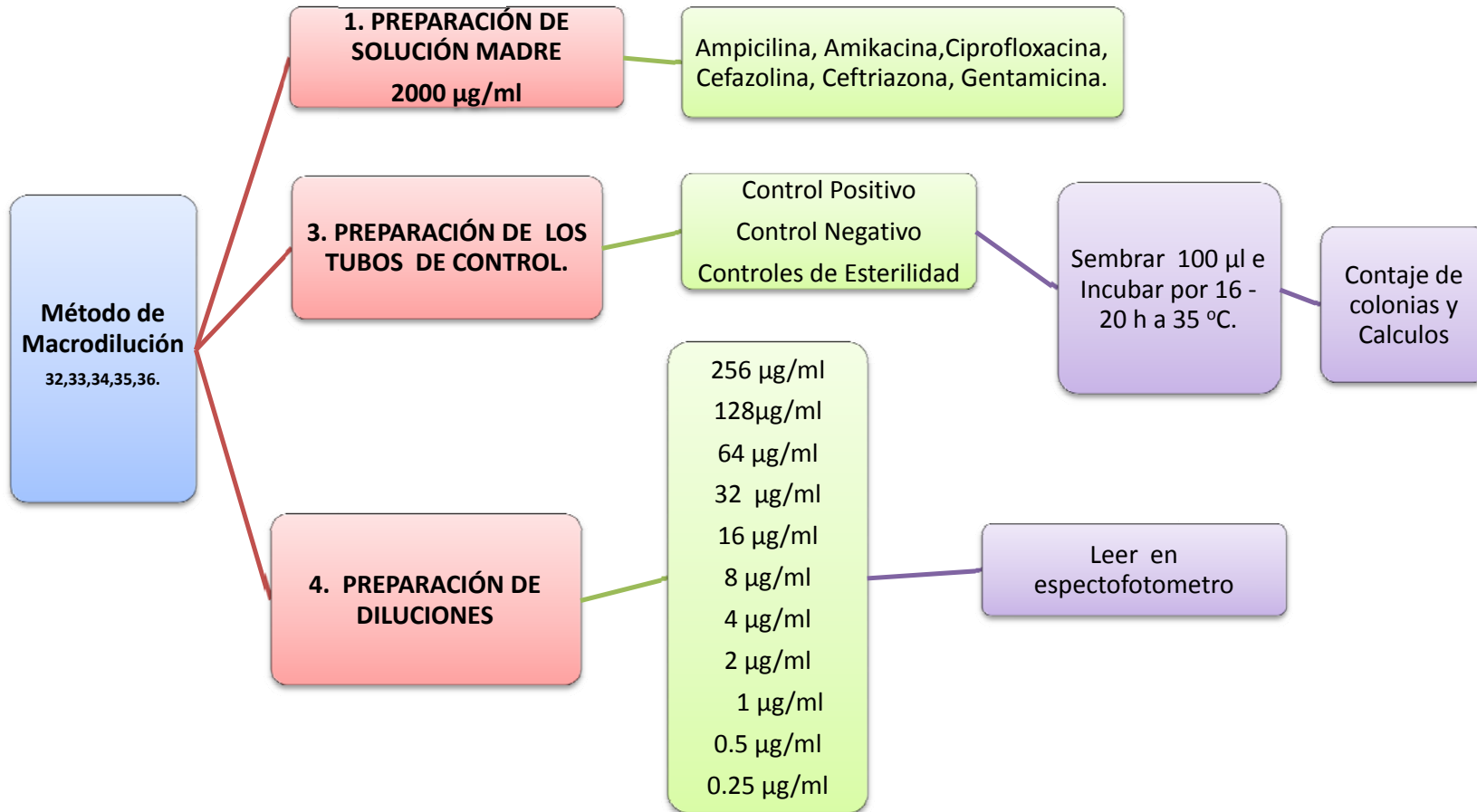


ANEXO 3. FLUJOGRAMA DE LA MICROTÉCNICA DE LOS EXTRACTOS



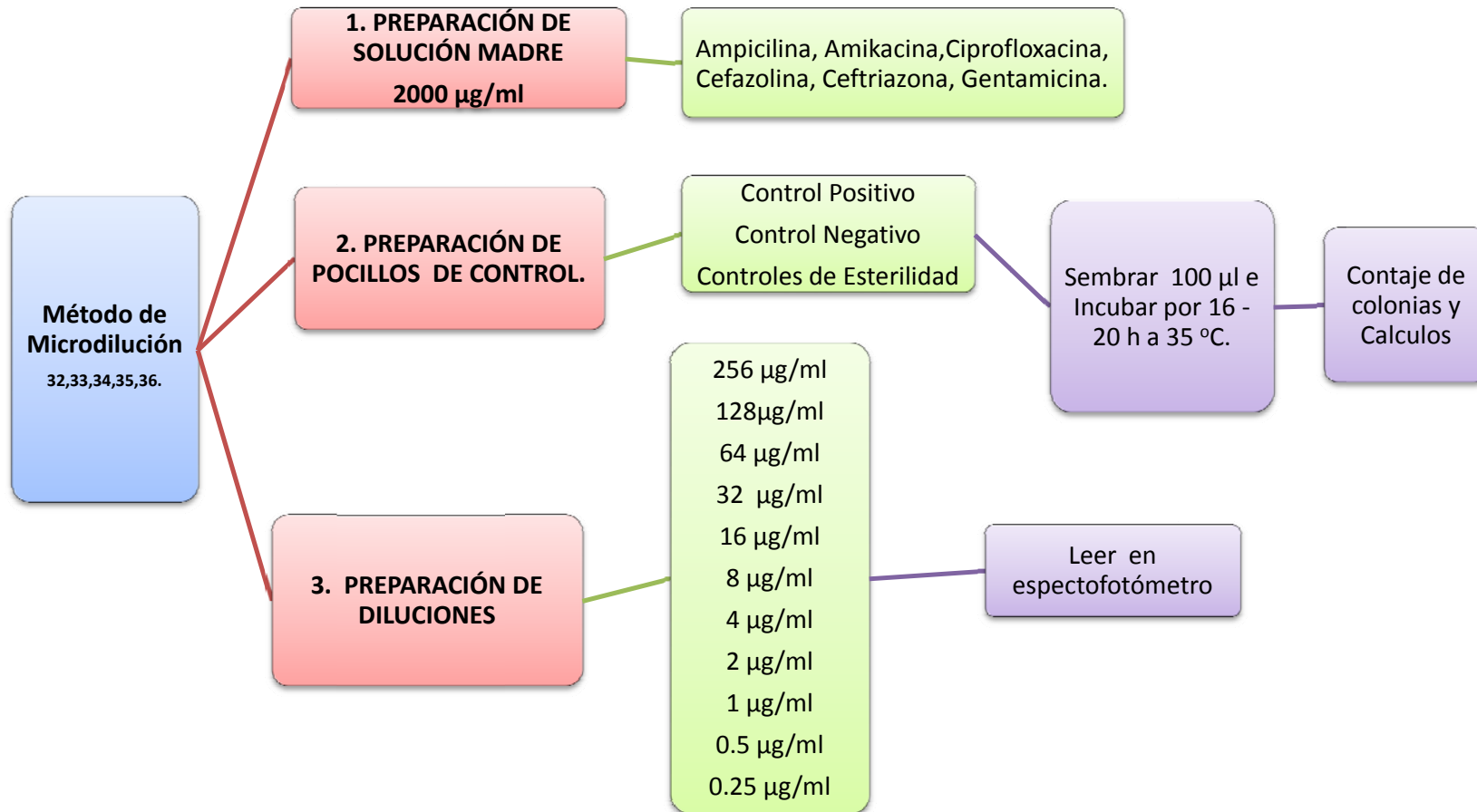


ANEXO 4. FLUJOGRAMA DE LA MACROTÉCNICA DE LOS ANTIBACTERIANOS





ANEXO 5.FLUJOGRAMA DE LA MICROTÉCNICA DE LOS ANTIBACTERIANOS





GLOSARIO

Alcaloides: significa semejante a los álcalis se aplica a un grupo de compuestos nitrogenados básicos de origen vegetal.

Aldehídos y cetonas: Son compuestos orgánicos que incorporan un grupo funcional carbonilo, $C = O$. El átomo de carbono de este grupo tiene dos átomos restantes que pueden ser ocupados por hidrógeno o alquilo o arilo. Si uno de los sustituyentes es el hidrógeno, el compuesto es un aldehído. Si no es el hidrógeno, el compuesto es una cetona.

Aminas: son derivados del amoníaco por reemplazo de uno o más átomos de hidrógeno por grupos alquilo, cicloalquilo o arilo.

Aquenio: es un fruto seco con una sola semilla.

Citronelol: derivado oxigenado de terpenos acíclicos de citronela, que se obtiene de varias esencias.

Dermatosis: es una enfermedad mediada por factores inmunitarios o sistémicos que se caracterizan por lesiones de corta duración.

Furúnculo: se da cuando la infección se encuentra en el folículo piloso, glándula sebácea o glándula sudorípara, causada por bloqueo del conducto de la misma.

Geraniol: es un derivado oxigenado de terpenos acíclicos que se encuentra en los aceites esenciales de rosa y otras esencias de flores.

Glucósidos: son sustancias que por hidrólisis producen un azúcar y un compuesto que puede ser azúcar u otra sustancia de naturaleza diferente.



Impétigo: es una infección de la piel causada por bacterias de la especie de estafilococo y estreptococo.

Lixiviación: Es un proceso en donde, un disolvente líquido se pone en contacto con un sólido pulverizado para que se produzca la disolución de uno de los componentes del sólido.

Meningitis: Es una irritación meníngea con cefalea, fotofobia, irritabilidad, alteración de consciencia y rigidez del cuello.

Osteomielitis: es una infección que aparece tras la siembra de bacterias en el hueso.

Polisacáridos: Son compuestos que están formados por muchas unidades de monosacáridos formando cadenas largas, se enlazan por uniones glicosídicas.

Quinonas: Son anillos aromáticos que contienen dos grupos hidroxilos en las posiciones orto o para los cuales se oxidan.

Taninos: es un grupo de sustancias de origen vegetal.

Terpenos: Son hidrocarburos, que contienen compuestos tales como alcoholes, aldehídos y cetonas (terpenoides), las fórmulas moleculares $(C_5H_8)_n$, se clasifican según el número de unidades de isopreno.