

# UCUENCA

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

“Estandarización del método de bioautografía directa como estrategia para la evaluación de extractos naturales como antimicrobianos frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*”.

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico.

Autores:

Daniela Alejandra Aguirre Loaiza

CI: 0704707223

Correo electrónico: [danyaguirre03@hotmail.com](mailto:danyaguirre03@hotmail.com)

Christian Javier Coraizaca Guzmán

CI: 0105546212

Correo electrónico: [coraizaca51@gmail.com](mailto:coraizaca51@gmail.com)

**Tutor:**

Dr. Fabián León Tamariz, PhD.

CI: 0102311610

**Cuenca, Ecuador**

12-octubre-2022

## RESUMEN

La bioautografía directa es un método rápido y sencillo que presenta como ventaja la detección de la actividad antimicrobiana sobre placas cromatográficas, permitiéndonos así observar de una manera directa las fracciones que presentan dicha actividad. El presente trabajo consistió en la estandarización del método de **bioautografía directa** empleando extractos vegetales tanto polares como apolares con actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Además, para la cromatografía de capa fina (TLC) se utilizaron eluyentes acordes a la polaridad de los extractos vegetales, los cuales a su vez también fueron compatibles con los antibióticos gentamicina y ampicilina, usados como controles. Mediante esta técnica se pudo observar el crecimiento de *S. aureus* en las placas de TLC, sin embargo, tras varios ensayos no se logró visualizar a *E. coli*, por lo cual, se decidió implementar el método de **bioautografía por inmersión o recubrimiento** obteniendo como resultado el crecimiento de ambas bacterias y la visualización de las zonas de inhibición para los antibióticos y ciertos extractos mediante el empleo de reveladores como el MTT y la resazurina. No obstante, debido a la inestabilidad que presenta este método por todas las variables que deben ser controladas, no se pudo cumplir con el objetivo de estandarizar la bioautografía como herramienta de evaluación del potencial antibacteriano de extractos naturales.

**Palabras clave:** Bioautografía. *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus*. antimicrobianos. TLC. Extractos vegetales.

## ABSTRACT

Direct bioautography is a fast and simple method that has the advantage of detecting antimicrobial activity on chromatographic plates, allowing us to directly observe the fractions showing such activity. The present work consisted of the standardization of the **direct bioautography** method, by using both, polar and nonpolar plant extracts, with antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. In addition, for thin layer chromatography (TLC), eluents were used according to the polarity of the plant extracts, which in turn were also compatible with the antibiotics gentamicin and ampicillin, used as positive controls. By means of this technique, it was possible to observe the growth of *S. aureus* in the TLC plates, however, after several tests, it was not possible to visualize the *E. coli* growth, therefore, it was decided to implement the bioautography method by **immersion or coating**, obtaining as a result the growth of both, bacteria and the visualization of the inhibition zones for the antibiotics and certain extracts by means of the use of MTT and resazurin. However, due to the instability of this method because of the different variables that must be controlled, the objective of standardizing bioautography as a tool for evaluating the antibacterial potential of natural extracts was not achieved.

**Keywords:** Bioautography. *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus*. antimicrobials. TLC. Plant extracts.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN .....	2
ABSTRACT .....	3
DEDICATORIA .....	14
AGRADECIMIENTO .....	15
INTRODUCCIÓN .....	16
OBJETIVOS .....	17
Objetivo general .....	17
Objetivos específicos .....	17
1. MARCO TEÓRICO .....	18
1.1. Resistencia antimicrobiana .....	18
1.2. Mecanismos de resistencia .....	18
1.2.1. Inactivación del antibiótico por enzimas .....	19
1.2.1.1. Betalactamasas .....	19
1.2.1.2. AmpC .....	19
1.2.1.3. Carbapenemasas .....	20
1.2.2. Alteración del sitio diana del antibiótico .....	20
1.2.3. Barreras de permeabilidad y bombas de expulsión .....	21
1.3. Microorganismos de estudio .....	21
1.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	21
1.3.2. <i>Escherichia coli</i> .....	22
1.4. Plantas medicinales .....	23
1.4.1. Compuestos fitoquímicos .....	24
1.4.1.1. Metabolitos primarios .....	24
1.4.1.2. Metabolitos secundarios .....	24
1.5. Metodologías para la evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana de compuestos de origen vegetal .....	25
1.5.1. Método de difusión .....	25
1.5.2. Métodos de dilución .....	25
1.5.3. Bioautografía .....	26
1.5.3.1. Bioautografía de contacto .....	27
1.5.3.2. Bioautografía por inmersión o recubrimiento .....	28

1.5.3.3. Bioautografía directa.....	29
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
2.1. Materiales y reactivos .....	32
2.2. Metodología .....	32
2.2.1. Recolección de plantas .....	32
2.2.1.1. <i>Otholobium mexicanum</i> .....	32
2.2.1.2. <i>Matthiola incana</i> .....	32
2.2.1.3. <i>Baccharis latifolia</i> .....	32
2.2.1.4. <i>Lophosoria quadripinnata</i> .....	33
2.2.2. Procesamiento de muestras .....	33
2.2.2.1. Lavado y secado .....	33
2.2.2.2. Muestra fresca.....	33
2.2.3. Obtención de los extractos metanólicos y clorofórmicos .....	34
2.2.3.1. Percolación.....	34
2.2.3.1.1. Extractos metanólicos .....	34
2.2.3.1.2. Extractos clorofórmicos.....	34
2.2.4. Secado y liofilización y de extractos .....	34
2.2.4.1. Secado.....	34
2.2.4.2. Liofilización .....	35
2.2.5. Cromatografía en capa fina (TLC).....	35
Extractos metanólicos.....	37
Extractos clorofórmicos .....	37
2.2.5.1. Determinación de fases móviles.....	38
2.2.5.2. Reveladores.....	38
2.2.6. Preparación de los microorganismos.....	39
2.2.7. Bioautografía.....	39
2.2.7.1. Bioautografía directa.....	39
2.2.7.2. Bioautografía por inmersión o recubrimiento.....	39
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	41
3.1. Recolección de plantas.....	41
3.2. Obtención de extractos metanólicos y clorofórmicos .....	41

3.3. Cromatografía en capa fina (TLC) .....	41
3.3.1. Determinación de fases móviles.....	41
3.4. Preparación de los microorganismos .....	42
3.5. Bioautografía.....	42
3.5.1. Bioautografía directa .....	42
3.5.2. Bioautografía por inmersión o recubrimiento .....	43
3.6. Discusión.....	55
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	58
4.1. Conclusiones .....	58
4.2. Recomendaciones.....	59
REFERENCIAS .....	60
ANEXOS.....	65

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Esquema bioautografía de contacto.....	28
<b>Figura 2</b> Esquema bioautografía por inmersión o recubrimiento. ....	29
<b>Figura 3</b> Esquema bioautografía directa.....	30
<b>Figura 4</b> Representación gráfica de placas de TLC con sus diferentes medidas y compuestos. ....	37
<b>Figura 5</b> Visualización de crecimiento e inhibición para <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> con antibióticos (ampicilina y gentamicina).....	44

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Concentraciones de los diferentes compuestos usados en la TLC.....	36
<b>Tabla 2</b> Resultados bioautografía para extractos polares.....	45
<b>Tabla 3</b> Resultados bioautografía para extractos apolares.....	50



## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1</b> <i>Otholobium mexicanum</i> recolectada en la granja de la Universidad de Cuenca en la comunidad de Nero. ....	65
<b>Anexo 2</b> <i>Matthiola incana</i> adquirida en el mercado “10 de Agosto” de la ciudad de Cuenca.....	65
<b>Anexo 3</b> <i>Baccharis latifolia</i> recolectada en la facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca. ....	66
<b>Anexo 4</b> <i>Lophosoria quadripinnata</i> recolectada en la granja de la Universidad de Cuenca en la comunidad de Nero. ....	66
<b>Anexo 5</b> Fase móvil: acetato de etilo:ácido fórmico: ácido acético: agua (100:15:15:26 v:v:v:v).....	67
<b>Anexo 6</b> Fase móvil: cloroformo:metanol:hidróxido de amonio (65:24:4 v:v:v).....	68
<b>Anexo 7</b> Ensayo de bioautografía directa. Placas de TLC con y sin crecimiento en <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> respectivamente.....	69
<b>Anexo 8</b> Ensayos de bioautografía por inmersión o recubrimiento con estándares fitoquímicos, antibióticos y extractos en fase polar y apolar con <i>S. aureus</i> .....	69
<b>Anexo 9</b> Ensayos de bioautografía por inmersión o recubrimiento con estándares fitoquímicos, antibióticos y extractos en fase polar y apolar con <i>E. coli</i> . ....	69

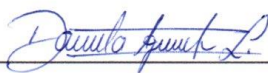
## Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

---

Daniela Alejandra Aguirre Loaiza en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Estandarización del método de bioautografía directa como estrategia para la evaluación de extractos naturales como antimicrobianos frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*", 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, 12 de octubre de 2022



---

Daniela Alejandra Aguirre Loaiza

C.I: 0704707223

## Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Daniela Alejandra Aguirre Loiza, autor/a del trabajo de titulación "Estandarización del método de bioautografía directa como estrategia para la evaluación de extractos naturales como antimicrobianos frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 12 de octubre de 2022



Daniela Alejandra Aguirre Loiza

C.I: 0704707223

## Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

---

Christian Javier Coraizaca Guzmán en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Estandarización del método de bioautografía directa como estrategia para la evaluación de extractos naturales como antimicrobianos frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*", 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, 12 de octubre de 2022



Christian Javier Coraizaca Guzmán

C.I.: 0105546212

## Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Christian Javier Coraizaca Guzmán, autor/a del trabajo de titulación "Estandarización del método de bioautografía directa como estrategia para la evaluación de extractos naturales como antimicrobianos frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 12 de octubre de 2022



Christian Javier Coraizaca Guzmán

C.I: 0105546212

## DEDICATORIA

A mis padres, Celso y Tania por ser mi ejemplo a seguir, mi apoyo incondicional y por enseñarme que todo lo que me propongo lo puedo conseguir.

A mi hermano, Celso Andrés por ser mi mayor motivación y el impulso que necesito para nunca rendirme.

A mis abuelitos y tías quienes han sido un pilar fundamental en mi vida y han sabido guiarme con todos sus consejos y sus enseñanzas.

A esa persona que nunca permitió que me dé por vencida, Jesús Adrián gracias por ser mi soporte y mi apoyo durante todos estos años.

Daniela Alejandra

A mi madre Sandra que ha sido mi apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida además de ser ejemplo a seguir y por estar presente a lo largo de mi crecimiento tanto personal como profesional.

A mis tías por estar presentes siempre en mi vida y darme consejos para ayudarme a superar los obstáculos que se me han presentado y poder superarlos.

A Vanessa quien es mi hogar.

Christian Javier

## AGRADECIMIENTO

Queremos dar un extenso agradecimiento a nuestro docente y tutor, apreciado Dr. Fabián León PhD. quien, con sus conocimientos supo inculcar en nosotros el interés por este bonito trabajo de titulación, y quien gracias a su perseverancia, dedicación y paciencia ha sido un guía fundamental durante el desarrollo del presente trabajo.

A nuestras queridas Doctoras Jéssica, Salomé y Andrea por toda su colaboración desinteresada, sus consejos y enseñanzas para la realización del mismo.

A nuestras familias y compañeros, quienes nos han apoyado desde siempre.

A la Universidad de Cuenca por habernos brindado una educación de calidad y permitirnos conocer personas que nos acompañarán por el resto de la vida.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha visto la necesidad de investigar sobre nuevos agentes antimicrobianos a partir de extractos naturales, esto debido a la alta tasa de resistencia hacia los antibióticos generado por el uso inadecuado, prolongado o incluso por condiciones naturales de los mismos, lo cual es considerado un problema de salud pública a nivel mundial (Rodríguez Pava et al., 2017).

Según Antonelli (2020) la lista de especies vegetales más completa y actualizada, registra alrededor de 350.000 plantas vasculares, de las cuales el 7% (aproximadamente 26.000) tienen usos medicinales documentados. Se conoce alrededor de 100.000 compuestos naturales producidos por plantas, conocidos como metabolitos secundarios de los cuales se estima que un amplio porcentaje tiene una bioactividad promisorio frente a microorganismos (Domingo & López-Brea, 2003).

El aislamiento de metabolitos secundarios y la caracterización de su bioactividad requieren de mejoras en las técnicas de identificación y tamizaje. Para determinar la actividad antimicrobiana de compuestos de origen vegetal se requieren equipos sumamente costosos y difíciles de adquirir, los cuales consumen gran cantidad de tiempo y recursos para laboratorios de prestaciones medias, además, el tiempo empleado para la identificación de estos compuestos resulta muy largo. Adicionalmente, muchos métodos que evalúan actividad antimicrobiana alcanzan a valorar extractos totales o compuestos puros, sin considerar la complejidad de las mezclas de metabolitos secundarios y sus interacciones, como es el caso de los extractos naturales. Un método que resuelve varias de las limitantes antes mencionadas logrando la separación de los metabolitos presentes en un extracto natural, y al mismo tiempo evaluando su potencial antimicrobiano es la bioautografía (Abad & Cabezas, 2014; Colorado et al., 2007).

Mediante este trabajo de titulación se pretendió estandarizar el método de bioautografía directa mediante el uso de extractos con diferente polaridad para así poder determinar su actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.



## OBJETIVOS

### Objetivo general

Estandarizar un método de bioautografía directa como herramienta de evaluación del potencial antibacteriano de extractos naturales.

### Objetivos específicos

- Establecer los criterios técnicos y prácticos para el cultivo de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* como microorganismos base para la bioautografía.
- Optimizar la concentración y volumen de extractos naturales a ser evaluados como posibles antibacterianos a través de la bioautografía.
- Seleccionar las fases móviles idóneas para el adecuado corrimiento y separación de los extractos problema y los controles respectivos sobre las placas cromatográficas.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Resistencia antimicrobiana

La resistencia antimicrobiana es uno de los principales problemas de salud a nivel hospitalario, siendo la causante de alrededor de 700 000 muertes anuales. La Organización Mundial de la Salud (OMS) advierte que para el año 2050 esta cifra aumente considerablemente teniendo un total de 10 millones de muertes al año. Solo en América Latina se estima que alrededor del 50% de las infecciones contraídas a nivel hospitalario en la unidad de cuidado intensivo (UCI) son causadas por microorganismos que presentan tendencia a ser drogorresistentes (Yu et al., 2021).

La resistencia antimicrobiana se la puede definir como aquel microorganismo que al ser sometido a un agente antimicrobiano en concentraciones mayores a las dosis terapéuticas es capaz de multiplicarse (García C, 2003). Las bacterias tienen una gran capacidad para adaptarse a su medio por lo cual a lo largo del tiempo han ido desarrollando diferentes mecanismos que les ha permitido resistir frente a los diferentes antimicrobianos (Fernández Riverón et al., 2003).

Existen dos tipos de resistencia, la resistencia natural o extrínseca, cuando las bacterias no presentan o carecen de una diana o sitio de acción para los antibióticos, y la resistencia adquirida, la cual es considerada de mayor relevancia desde el punto de vista clínico, esta se puede dar a partir de mutaciones en las que hay cambios en la secuencia de las bases de los cromosomas. Se transmite de forma vertical de generación en generación y se puede también dar por la transmisión de material genético extracromosómico o por transmisión de forma horizontal gracias a los plásmidos, integrones y transposones (Fernández Riverón et al., 2003).

### 1.2. Mecanismos de resistencia

En relación a los mecanismos de resistencia, existen una gran variedad, pero de entre todos ellos, hay tres destacados: Inactivación de antibióticos por enzimas,

alteración del sitio diana de antibióticos y barreras de permeabilidad (Fernández Riverón et al., 2003).

## **1.2.1. Inactivación del antibiótico por enzimas**

Las bacterias tienen la capacidad de producir enzimas que actúan sobre los antibióticos inactivándolos. Estas enzimas pueden ser de origen plasmídico, inducibles o de origen extracelular, en los Gram positivos, mientras que, en los Gram negativos, su origen es plasmídico o por parte de transposones. Entre las enzimas de mayor importancia están las betalactamasas, que son producidas por una gran cantidad de bacterias y cuya acción consiste en hidrolizar el anillo betalactámico inhibiendo la acción del antibiótico. También se conocen las enzimas modificadoras de aminoglucósidos, las cuales tienen la capacidad de modificar a estos antibióticos mediante diferentes reacciones como son la acetilación, adenilación y fosforilación (Acosta-Vargas, 2018).

### **1.2.1.1. Betalactamasas**

Son enzimas que tienen la capacidad de hidrolizar el anillo betalactámico, siendo considerado el mecanismo de mayor resistencia antibiótica. Existen betalactamasas de espectro extendido (BLEE), debido a diferentes mutaciones que producen esta expresión, y son capaces de producir resistencia a penicilinas, cefalosporina, aztreonam; pero no tienen ningún efecto sobre los carbapenémicos ni cefamicina. Sin embargo, con el uso de inhibidores enzimáticos, los cuales poseen una mayor afinidad hacia estas enzimas, como el ácido clavulánico y sulbactam, es posible combatir esta resistencia. Los genes que son capaces de codificar estas enzimas se pueden encontrar en el cromosoma de las bacterias o en plásmidos (Acosta-Vargas, 2018).

### **1.2.1.2. AmpC**

También conocidas como sin-betalactamasas, se las puede encontrar en diferentes enterobacterias además de bacilos Gram negativos no fermentadores, como *Pseudomona aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*. Estas enzimas son capaces de resistir la inhibición producida por el ácido clavulánico. Presentan resistencia a penicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación, además se ha reportado que en un cierto porcentaje que estas enzimas pueden actuar sobre las cefalosporinas de tercera

generación dando como resultado una falla terapéutica. Este tipo de enzimas, en su mayoría se encuentra codificada por los cromosomas bacterianos, sin embargo, también puede ser mediada por plásmidos (Acosta-Vargas, 2018).

### **1.2.1.3. Carbapenemasas**

También son enzimas de la familia de las betalactamasas, las cuales otorgan resistencia a los antibióticos carbapenémicos como imipenem, meropenem, doripenem, ertapenem. Las enzimas van a ser codificadas por cromosomas bacterianos, o también pueden estar presentes en elementos genéticos móviles. Se las ha clasificado en dos grupos: metalo-betalactamasas y carbapenemasas de serina (Acosta-Vargas, 2018).

### **1.2.2. Alteración del sitio diana del antibiótico**

Considerado otro mecanismo de resistencia, consiste en la modificación de sitios específicos como la pared celular, subunidades 50s y 30s ribosomales, entre otros. Este mecanismo es principalmente utilizado por bacterias Gram positivas (Tafur et al., 2008).

Las proteínas unidoras de penicilinas se consideran responsables de la transpeptidación en la formación de la pared celular, el cual se considera un proceso de vital importancia. Al existir alteraciones estructurales en estas proteínas, la afinidad de los antibióticos betalactámicos disminuye, impidiendo así la destrucción de su pared celular, y dando como resultado la supervivencia de la bacteria (Tafur et al., 2008).

La irrupción de la síntesis de proteínas es otro sitio de acción en donde pueden actuar diferentes antibióticos, el cual consiste en afectar diferentes componentes nucleares en la replicación del ADN y transcripción del ARN. Las quinolonas tienen la capacidad de atacar la enzima topoisomerasa I, misma que interviene desdoblado el ADN, mientras que existen otros fármacos como los aminoglucósidos, tetraciclinas, clindamicina, macrólidos y el cloranfenicol, los cuales inhiben la síntesis de proteínas, y atacan los ribosomas. Si existen alteraciones en el sitio de unión de los antibióticos, esto puede ocasionar resistencia hacia los mismos. La resistencia se puede dar por diferentes alteraciones cromosómicas o también, pueden ser asociados a genes que son transmitidos por plásmidos (Tafur et al., 2008).

### 1.2.3. Barreras de permeabilidad y bombas de expulsión

Las bacterias han desarrollado mecanismos que consisten en diferentes mutaciones a nivel de las porinas. Estas proteínas se encuentran en la pared celular, y tienen la capacidad de impedir la entrada de antibióticos como los betalactámicos, o incluso pueden alterar los sistemas de transporte, en el caso de los aminoglucósidos. Además, han desarrollado bombas de expulsión, las cuales son dependientes de energía, y tienen la capacidad de expulsar o eliminar los antibióticos, impidiendo la llegada a su sitio de acción. La principal función es la de tener concentraciones mínimas de un tóxico dentro de la bacteria. Estas bombas pueden ser específicas para un fármaco o inespecíficas (Tafur et al., 2008).

## 1.3. Microorganismos de estudio

### 1.3.1. *Staphylococcus aureus*

Los estafilococos pertenecen a un extenso grupo de bacterias Gram positivas que miden aproximadamente entre 0,5 y 1,5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Una de las principales características que distingue a estas bacterias es la forma en la que se agrupan, ya sea en pares, tétradas, cadenas cortas o asemejando a racimos de uva (Zendejas-Manzo et al., 2014).

El género *Staphylococcus* abarca más de 50 especies y 28 subespecies, *S. aureus* es el más relevante desde el punto de vista clínico. Esta bacteria se encuentra en la microbiota comensal humana de la mucosa nasal en el 20-40% de la población en general, y es considerado como uno de los patógenos bacterianos más agresivos y extendidos que causa una gran cantidad de infecciones cutáneas no complicadas y cientos de infecciones invasivas mucho más graves alrededor de todo el mundo (Cheung et al., 2021).

Las infecciones por *S. aureus* resultan problemáticas debido a la recurrente resistencia a los antibióticos que esta bacteria presenta. El *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) es la cepa más importante clínicamente, no obstante, la

resistencia a otros antibióticos también se encuentra muy extendida como, por ejemplo, la resistencia a los antibióticos betalactámicos tradicionales (penicilina y derivados). Además, *S. aureus* puede mostrar, a menudo en forma combinada, resistencia a casi todos los antibióticos disponibles (Cheung et al., 2021).

### **1.3.2. *Escherichia coli***

*Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo, móvil, no formador de esporas que mide aproximadamente entre 0,5 y 3 µm de largo. Esta bacteria perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, puede colonizar inofensivamente el intestino humano, o a su vez ser el causante de infecciones intestinales o extraintestinales, incluidas enfermedades invasivas graves como bacteriemia y sepsis (Bonten et al., 2020).

En la actualidad, se conoce sobre seis tipos de cepas de *E. coli* patógenas intestinales; estas se clasifican dependiendo de sus mecanismos de patogenicidad y propiedades de virulencia, causando enfermedades gastrointestinales como la diarrea. Las cepas intestinales incluyen a: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (ECEA), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* productora de toxina Shiga (ECTS) y *E. coli* enterohemorrágica (ECEH). Además de las cepas intestinales, varias cepas de *E. coli* están involucradas en enfermedades extraintestinales como, por ejemplo, *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC) (Paitan, 2018).

La resistencia antimicrobiana causada por diferentes bacterias, especialmente por *E. coli* se debe al desarrollo de diferentes mecanismos como la inactivación de los antibióticos y las enzimas modificadoras, las beta-lactamasas, la alteración de la permeabilidad y las mutaciones de las porinas, las bombas de flujo, las mutaciones del sitio de unión y de la diana y el "bypass" de la vía metabólica (Paitan, 2018). Entre los antibióticos a los que *E. coli* presenta alta resistencia destacan: ampicilina (beta-lactámico), trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, cloranfenicol, ácido nalidíxico entre otros (Mosquito et al., 2014).

## 1.4. Plantas medicinales

Desde tiempos ancestrales, el ser humano ha acudido a la naturaleza con el fin de satisfacer todas y cada una de sus necesidades, por ejemplo, alimentación, vestimenta, medios de transporte y de una u otra forma, el empleo de recursos naturales para construir lugares donde refugiarse e incluso con el pasar de los años y con el fin de tratar sus dolencias la preparación de medicinas (Prieto-González et al., 2004). Dentro de estos recursos naturales utilizados por el hombre, las plantas han ocupado un papel fundamental (Kuklinski, 2000).

Para la aplicación y el conocimiento sobre las plantas en la preparación de medicinas, las antiguas generaciones consumían o utilizan las especies que les sentaban bien, y rechazaban los que les producía molestias o daño. Este accionar les permitió adquirir todo tipo de conocimientos sobre las plantas medicinales, y poderlo transmitir de generación en generación (Kuklinski, 2000).

Actualmente, se continúan usando las plantas y sus extractos con el fin de curar o tratar diversas patologías. Su empleo tiene un futuro muy prometedor, ya que existen muchos factores que favorecen su uso como; el aumento de la resistencia antimicrobiana hacia algunos productos sintéticos, la presencia de efectos secundarios no deseables y el exagerado costo de algunos medicamentos obtenidos por vía sintética (Gallegos Zurita, 2017).

En el año 2001, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que aproximadamente el 80% de la población mundial utiliza conocimientos tradicionales para tratar enfermedades debido a las propiedades y efectividad que estas exhiben en enfermedades infecciosas. En tal sentido, se ha podido demostrar que las plantas son una fuente potencial de principios activos para el incremento de nuevos fármacos y que tienen un efecto positivo contra muchas enfermedades, debido a que sintetizan compuestos que tienen importantes actividades biológicas, como, por ejemplo, antimicrobianos (Hernández Moreno et al., 2021).

## **1.4.1. Compuestos fitoquímicos**

Según Kuklinski (2000) se entiende por principios activos, aquellas sustancias con actividad farmacológica ya sea beneficiosa o perjudicial sobre un organismo vivo. Se pueden clasificar en dos grupos: metabolitos primarios y secundarios.

### **1.4.1.1. Metabolitos primarios**

Se denominan metabolitos primarios a aquellos compuestos que resultan ser esenciales tanto para el crecimiento como el desarrollo de las plantas, por ejemplo, aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, los cuales se encuentran presentes en todas las plantas y desempeñan las mismas funciones (Ávalos García & Pérez-Urria Carril, 2009).

### **1.4.1.2. Metabolitos secundarios**

También denominados productos secundarios, metabolitos especializados o productos naturales. Los metabolitos secundarios a diferencia de los primarios no son esenciales para los organismos vegetales, pero presentan funciones internas en las plantas y también participan en la comunicación de estas con el ambiente. Los metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana son sintetizados como estrategia de las plantas para su protección cuando estas se encuentran expuestas a condiciones adversas, como, por ejemplo, el consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados), el ataque por microorganismos: virus, bacterias y hongos, etc. (Sepúlveda Jiménez, 2003).

Se han descrito varios grupos de productos secundarios entre ellos: terpenos y terpenoides (componentes de aceites esenciales), polifenoles (ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, taninos), alcaloides, poliacetatos, etc. (Ojitos-Ramos & Portal, 2017). Ciertos compuestos que pertenecen a los grupos de los alcaloides y los terpenoides, intervienen activamente matando directamente al microorganismo patógeno o impidiendo su invasión al resto de la planta. Al mismo tiempo, diversos alcaloides son neurotóxicos a insectos y vertebrados herbívoros (Sepúlveda Jiménez, 2003).



## 1.5. Metodologías para la evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de compuestos de origen vegetal

Las metodologías para la evaluación antibacteriana *in vitro*, se han considerado de gran relevancia para el avance de la ciencia, siendo uno de los primeros pasos a realizar en la búsqueda e investigación de nuevas drogas con posible actividad frente a estos microorganismos, muchas de las cuales, han sido de origen vegetal (Marín Castaño & Ramírez, 2009).

Existen diferentes métodos de evaluación farmacológica, los cuales se basan en diferentes principios, además de presentar diferentes sensibilidades, por lo cual los resultados se encuentran influenciados por el método que se use, y la solubilidad presentada en cada extracto o compuesto a evaluar. Estos métodos pueden ser clasificados en tres grupos: métodos de difusión, métodos de dilución y bioautografía (Marín Castaño & Ramírez, 2009).

### 1.5.1. Método de difusión

Este método está fundamentado en la concentración necesaria de una sustancia la cual se encuentra en un disco de papel, para inhibir el crecimiento bacteriano. Este disco es aplicado en la superficie de una placa de agar que contenga un medio adecuado, en la cual se encuentra sembrada la cepa de estudio de una manera homogénea sobre toda la superficie. La sustancia que se encuentra en el disco se va a extender hacia la superficie de la placa de agar y tras un periodo de incubación se podrá observar un halo de inhibición (Marín Castaño & Ramírez, 2009).

### 1.5.2. Métodos de dilución

El método de dilución en agar o caldo es de gran utilidad para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual es la concentración mínima de una sustancia que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de un microorganismo tras la incubación de 24 horas. Para la técnica de dilución en caldo se usan tubos de ensayo o microplacas, en los cuales se va a aplicar concentraciones crecientes del extracto vegetal a estudiar, para posteriormente, inocular el microorganismo y luego de una incubación de 24 horas se podrá observar la CMI (Marín Castaño & Ramírez, 2009).

En el caso de la dilución en agar, el extracto vegetal a probar tiene una concentración conocida, y es incorporado al mismo, de tal manera que se pueda usar una serie de placas con diferentes concentraciones, en las cuales, luego se inocula el agente microbiano y posterior a un periodo de incubación de 24 horas, se puede observar si existe el crecimiento o no del microorganismo (Marín Castaño & Ramírez, 2009).

### **1.5.3. Bioautografía**

La bioautografía es considerado un método de cribado microbiológico útil para poder detectar la actividad microbiológica presente en mezclas o extractos complejos con múltiples componentes. El cribado según Choma & Grzelak (2011), se lo puede definir como el primer procedimiento que se aplica a una muestra analizada con el fin de establecer la presencia o ausencia de analitos determinados, en donde se realiza la separación de mezclas complejas de interés, mediante técnicas de cromatografía plana, buscando medir las propiedades antimicrobianas y antifúngicas de los analitos (Sánchez-García et al., 2016).

La génesis de esta técnica se remonta a 1946, en donde los científicos Goodall y Levi lograron combinar el método de la cromatografía en papel (PC) con la detección de bioautografía para la determinación de la acción de diferentes penicilinas. Posteriormente en 1961 Fisher, Lautner y Nicolaus lograron introducir la cromatografía en capa fina (TLC) en el mismo campo, y describieron el método como simple, reproducible y muy sensible. La primera revisión que se hizo fue en el año de 1973 por Betani, en donde el autor también calificó al método como rápido y versátil, sin embargo, también indicó que existen ciertas dificultades en la interpretación cuantitativa. A partir de ese momento, se ha logrado grandes avances en cuanto a la técnica para la estandarización, en donde se han analizado diferentes parámetros que puedan influir en la detección de la bioautografía. Los componentes necesarios para este método son: la placa cromatográfica en donde se van a sembrar los extractos vegetales y la cual servirá de soporte para el crecimiento bacteriano, la suspensión bacteriana que debe tener una concentración conocida y un revelador el cual nos permite diferenciar las zonas de inhibición que presentan los compuestos presentes en los extractos vegetales. Entre los

factores que pueden influir en el crecimiento bacteriano tenemos: la fase móvil, el aditivo, el microorganismo de prueba, las condiciones de las placas de TLC, las condiciones de vida de las bacterias de prueba y la detección post cromatográfica (Choma & Grzelak, 2011).

La bioautografía se puede dividir en: bioautografía de contacto, bioautografía por inmersión o recubrimiento y bioautografía directa (Choma & Jesionek, 2015).

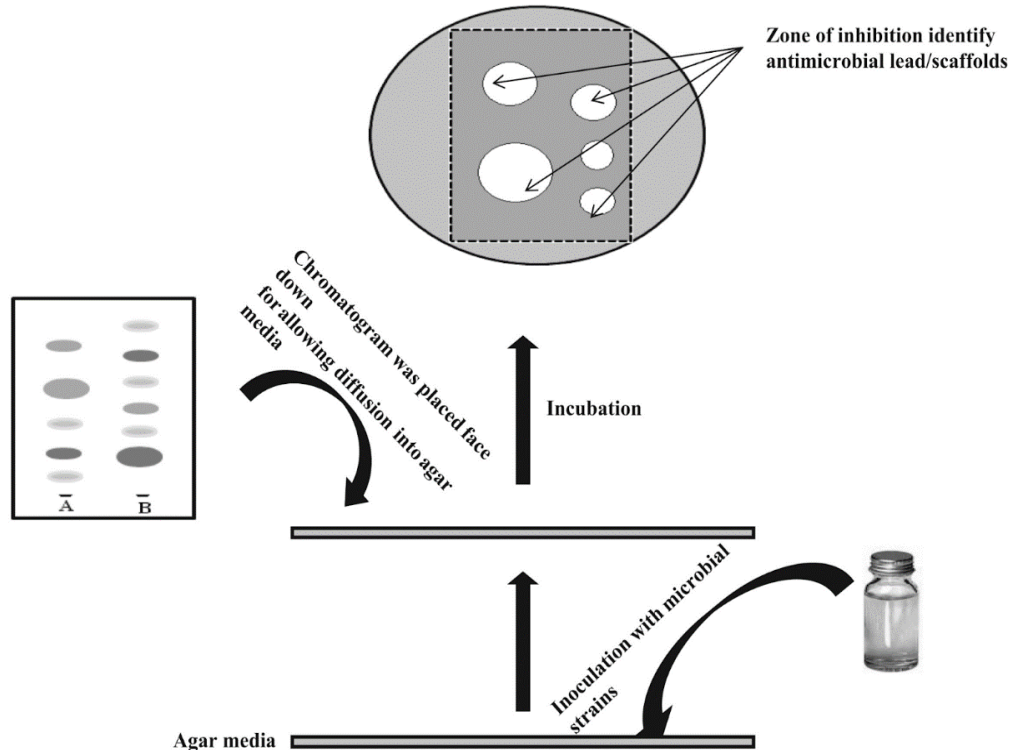
### **1.5.3.1. Bioautografía de contacto**

En la bioautografía de contacto los compuestos antimicrobianos de interés se van a difundir desde la placa de TLC que previamente ha sido eludida y exenta de restos de solventes, la placa es colocada boca a abajo sobre el agar que ya fue inoculado durante un periodo específico para poder permitir la difusión desde la placa hacia el agar. Se recomienda que la placa cromatográfica se encuentre en contacto con el agar por unas 2 horas para garantizar buenos resultados (Sánchez-García et al., 2016).

Posterior a esto, se debe retirar el cromatograma e incubar. Las zonas de inhibición que se pueden encontrar en el agar van a corresponder a las zonas en la placa cromatográfica en donde se encuentra la sustancia antimicrobiana de interés. Los tiempos de incubación pueden variar y van desde las 16 a las 24 horas (Dewanjee et al., 2015).

**Figura 1**

*Esquema bioautografía de contacto (Dewanjee et al., 2015).*



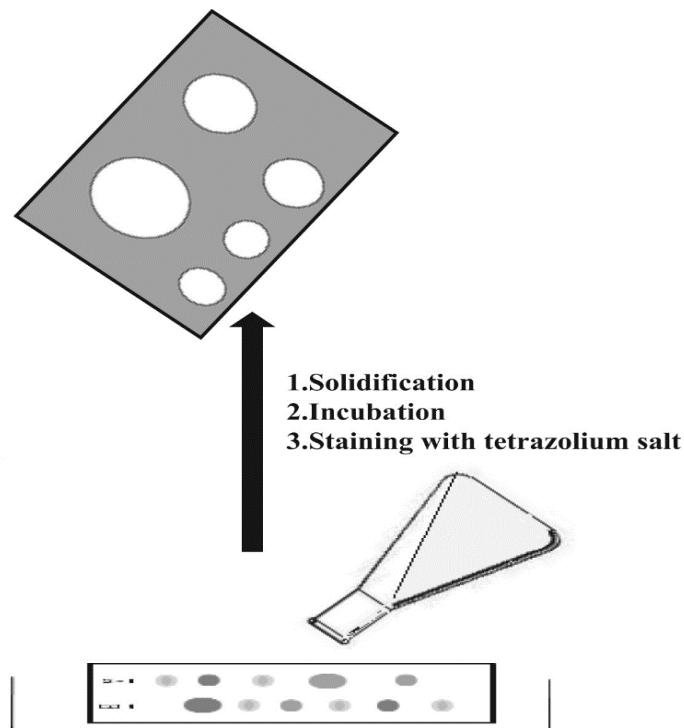
### 1.5.3.2. Bioautografía por inmersión o recubrimiento

Con respecto a la bioautografía por inmersión o recubrimiento, esta técnica es considerada como una combinación de la bioautografía de contacto y directa, la cual consiste en cubrir la placa cromatográfica con un medio de agar que se encuentre fundido e inoculado, se debe tomar en cuenta que la temperatura del agar se debe encontrar a 45°C esto con el fin de evitar que los microorganismos se inactiven, posterior a esto se incuba en un tiempo y temperatura adecuada y se pueden observar las zonas de inhibición sobre la placa cromatográfica lo cual nos indican la actividad antimicrobiana de los componentes analizados (Sánchez-García et al., 2016). Las zonas de inhibición se visualizan con la ayuda de sales de tetrazolio las cuales son reactivos que tienen la capacidad de detectar la actividad deshidrogenasa. Microorganismos metabólicamente

activos van a convertir estas sales en un compuesto coloreado de formazán (Dewanjee et al., 2015).

## Figura 2

*Esquema bioautografía por inmersión o recubrimiento (Dewanjee et al., 2015).*



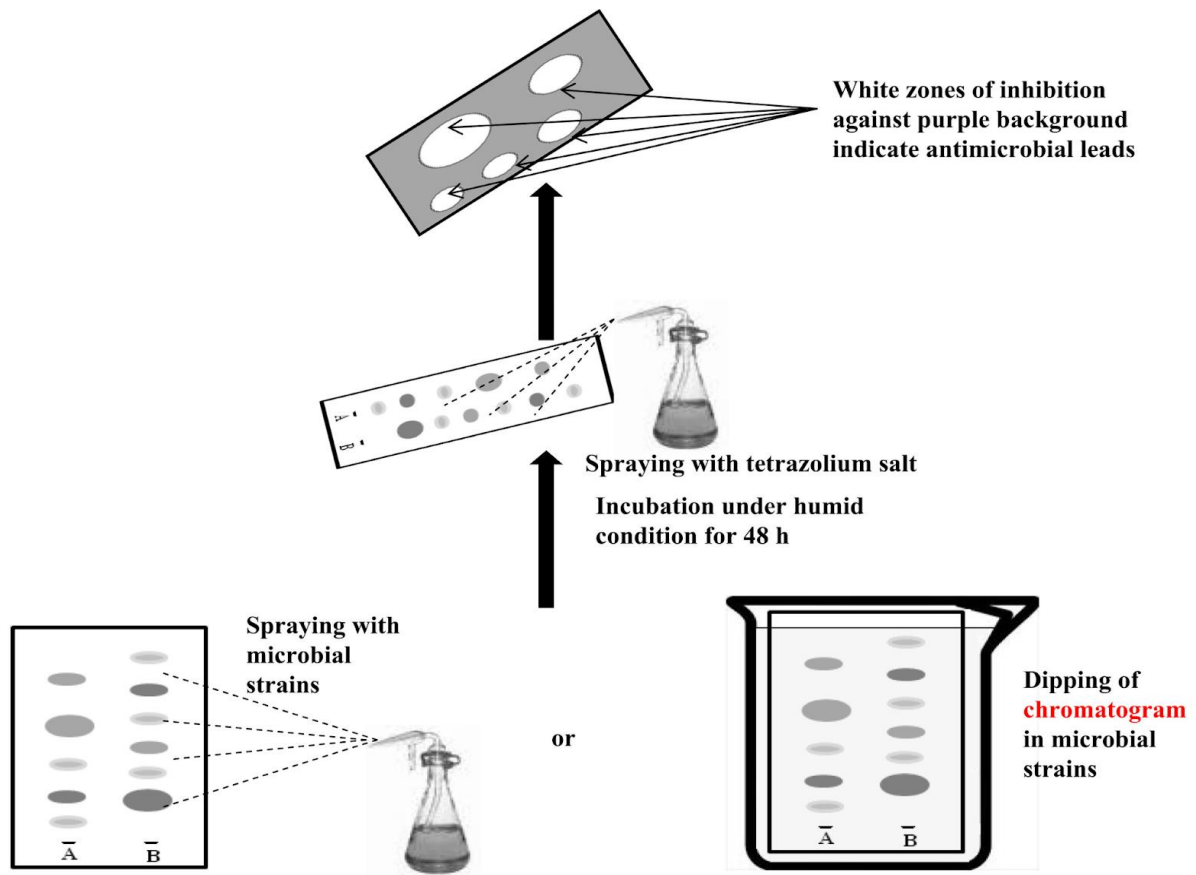
### 1.5.3.3. Bioautografía directa

Entre estos tres métodos el más empleado es la bioautografía directa, en este método la placa de TLC previamente desarrollada, es decir, eluida y sin restos de solventes, es rociada o sumergida en una suspensión en donde se encuentra el microorganismo de interés, pudiendo tratarse de bacterias u hongos, que debe encontrarse en crecimiento activo y en un caldo de cultivo apropiado (Queiroz et al., 2002). Como paso posterior, la placa es incubada en una atmósfera húmeda y bajo las condiciones requeridas para el desarrollo del microorganismo empleado (37°C durante 24 horas), lo que nos permitirá observar el crecimiento del microorganismo. No obstante,

en los lugares donde no hay crecimiento se forman las zonas de inhibición, las cuales corresponden a los compuestos antimicrobianos buscados (Choma & Grzelak, 2011). Para poder visualizar estas zonas de inhibición, al igual que en el caso de la bioautografía por inmersión o recubrimiento se utilizan las sales de tetrazolio (Dewanjee et al., 2015).

### Figura 3

*Esquema bioautografía directa (Dewanjee et al., 2015).*



Sin duda este método presenta varias ventajas y entre ellas destacan; los tiempos de estudio, gastos, equipos y número de muestras a analizar, ya que, los tiempos destinados a la identificación se acortan, hay una reducción significativa de gastos para la investigación, los equipos empleados son básicos evitando así el uso de elementos

complejos para la determinación y se puede analizar un gran número de muestras al mismo tiempo, siendo este un método ideal para laboratorios que no cuenten con equipos sofisticados (Abad & Cabezas, 2014; Colorado, Galeano & Martínez, 2007).

Por lo tanto, el interés del presente trabajo es la estandarización del método de bioautografía directa pues al ser una herramienta útil y beneficiosa para el análisis preliminar de extractos vegetales con posible potencial antibacteriano evita el empleo de equipos costosos, técnicas complejas y disminuye los tiempos invertidos en el análisis siendo de gran utilidad para laboratorios de prestaciones medias.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Materiales y reactivos

El cloroformo para análisis, acetato de etilo para análisis, ácido fórmico para análisis, ácido acético para análisis, hidróxido de amonio para análisis y el revelador polietilenglicol productos naturales (difenil-boril-oxietilamina al 1% en metanol y polietilenglicol-4000 al 5% en etanol) se obtuvieron de Merck (Darmstad, Alemania).

El metanol  $\geq 99,8\%$  para análisis, los reveladores anisaldehído-ácido sulfúrico, Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT), resazurina (PrestoBlue Cell Viability Reagent) y los estándares fitoquímicos quercetina y umbeliferona se adquirieron de Sigma-Aldrich (Estados Unidos).

### 2.2. Metodología

#### 2.2.1. Recolección de plantas

Las plantas medicinales a ser analizadas fueron seleccionadas y recolectadas en base a la información y resultados obtenidos dentro de las investigaciones del Grupo de Plantas Medicinales y Productos Naturales del Departamento de Biociencias de la Universidad. Las especies recolectadas corresponden a:

##### 2.2.1.1. *Otholobium mexicanum*

El ejemplar de *O. mexicanum* fue recolectado en las siguientes coordenadas: 2°57'30"S 79°6'33"O situadas junto al potrero N° 38 de la granja perteneciente a la Universidad de Cuenca en la comunidad de Nero (ver anexo 1).

El ejemplar fue codificado como **Coraizaca001**.

##### 2.2.1.2. *Matthiola incana*

El espécimen fue adquirido en el mercado "10 de agosto" de la ciudad de Cuenca, proveniente de huertos de la parroquia San Joaquín (ver anexo 2).

El ejemplar fue codificado como **Aguirre002**.

##### 2.2.1.3. *Baccharis latifolia*

La recolección de esta planta se realizó en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca con coordenadas 2°54'02"S 79°00'32"O (ver anexo 3).



El ejemplar fue codificado como **Aguirre001**.

#### **2.2.1.4. *Lophosoria quadripinnata***

La especie *L. quadripinnata* fue recolectada en las siguientes coordenadas: 2°57'29"S 79°6'27"O situadas en la granja perteneciente a la Universidad de Cuenca en la comunidad de Nero (ver anexo 4).

El ejemplar fue codificado como **Coraizaca002**.

Al finalizar la recolección de especies, se procedió a seleccionar las hojas de *Otholobium mexicanum*, *Baccharis latifolia* y *Lophosoria quadripinnata*, mientras que para *Matthiola incana* se utilizaron sus flores.

### **2.2.2. Procesamiento de muestras**

#### **2.2.2.1. Lavado y secado**

El lavado fue realizado con agua potable a fin de eliminar cualquier residuo existente de tierra o polvo presente en la planta, posteriormente las muestras fueron sumergidas por 10 minutos en agua destilada. El secado se llevó a cabo en un horno de secado (PRO-3, Cuenca, Ecuador) sobre papel periódico, mismo que se colocó sobre una malla metálica de acero inoxidable previamente sanitizada a una temperatura de 37°C durante 24 horas. Finalmente, se realizó la trituración con ayuda de una licuadora Oster en ciclos de 5 segundos activos y 10 segundos de reposo.

#### **2.2.2.2. Muestra fresca**

Para la obtención del extracto metanólico de *Baccharis latifolia* se empleó muestra fresca. Se siguió el procedimiento de lavado empleado en el apartado 2.2.2.1., sin embargo, para su trituración se utilizaron tijeras estériles con las cuales se pudo llegar a un tamaño adecuado.

## **2.2.3. Obtención de los extractos metanólicos y clorofórmicos**

### **2.2.3.1. Percolación**

#### **2.2.3.1.1. Extractos metanólicos**

Para la obtención de los extractos de *Otholobium mexicanum*, *Matthiola incana* y *Lophosoria quadripinnata* se pesaron 10 g de muestra seca previamente triturada, y se procedió a colocarlas en frascos de vidrio herméticos protegidos de la luz para su humectación. Se colocó 20 mL de metanol durante un tiempo aproximado de 12 a 15 horas. En el caso de *Baccharis latifolia*, se omitió este paso pues se empleó muestra fresca.

Una vez terminado el proceso de humectación, se procedió a la percolación utilizando un embudo de decantación y metanol  $\geq 99,8\%$  para análisis (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) como solvente se dejó en maceración por 24 horas. Transcurrido este tiempo, se reguló el goteo a XX gotas/minuto, se recogió la primera fracción (7,5 mL) en un tubo tapa rosca (fracción A) y se colocó un balón de fondo redondo en el cual se siguió recolectando el extracto hasta lograr el agotamiento de la droga (fracción B). Para *Baccharis latifolia* se colocó directamente la muestra fresca triturada en el embudo de decantación y se procedió con la percolación.

#### **2.2.3.1.2. Extractos clorofórmicos**

Se pesaron 10 g de muestra correspondientes a cada planta seca previamente triturada. Se procedió a humectarlas con cloroformo de forma similar a lo descrito bajo el punto 2.2.3.1.1. Para la preparación de los extractos, se procedió de la misma forma que con el metanol.

## **2.2.4. Secado y liofilización y de extractos**

### **2.2.4.1. Secado**

Los extractos vegetales metanólicos obtenidos en el balón de fondo redondo durante la percolación fueron acoplados al Rotavapor Laborota 4000 Efficient de Heidolph (Schwabach, Alemania) para la eliminación completa del solvente. El residuo

adherido a las paredes del balón, se redisolvió en la fracción A del percolado con ayuda de un baño de ultrasonido Cole-Parmer 8893 (Illinois, Estados Unidos). El residuo obtenido se colocó en un tubo tapa rosca y se eliminó el solvente con una corriente continua de N<sub>2</sub>. Para los extractos clorofórmicos se utilizó un concentrado a vacío RapidVap de Labconco (Kansas, Estados Unidos). Los extractos fueron transferidos a tubos tapa rosca previamente pesados, se almacenaron a -20°C hasta análisis.

#### 2.2.4.2. Liofilización

Los extractos que con anterioridad fueron sometidos a la eliminación del solvente se redisolviaron en 20 mL de agua destilada, se transfirieron a tubos de liofilización previamente pesados y etiquetados. Los tubos se sometieron a congelación con ayuda del biofreezer Fisher Scientific R134A (Massachusetts, Estados Unidos) a -80°C, cada 10 minutos se los hacía rotar hasta formar una película alrededor de las paredes del tubo. Se dejaron en congelación durante 24 horas.

Transcurrido este tiempo se retiraron los tubos del biofreezer, se envolvieron en papel aluminio y se los colocó durante 24 horas en el liofilizador FreeZone 2.5 de LABCONCO (Kansas, Estados Unidos) a una temperatura y presión de -50°C y 0,080 mBar respectivamente. Una vez obtenido el extracto liofilizado se lo transfirió a un tubo tapa rosca y se procedió a pesarlo. Los extractos fueron almacenados en un biofreezer Fisher Scientific Isotemp (Estados Unidos) a -20°C hasta el análisis.

#### 2.2.5. Cromatografía en capa fina (TLC)

Las placas de TLC Sílica gel 60 F<sub>254</sub> soporte de vidrio de Merck (Darmstadt, Alemania) de 8 cm x 10 cm fueron activadas durante 1 hora a 100°C. Los volúmenes a emplear para la siembra de los extractos metanólicos, clorofórmicos, antibióticos y estándares fitoquímicos fue de 5 µL.

En la **Tabla 1** se especifica la concentración de los compuestos usados:

**Tabla 1**

Concentraciones de los diferentes compuestos usados en la TLC.

Compuestos	Concentración	Controles, extractos y compuestos
<b>Antibióticos</b>		
Gentamax inyectable 280 mg/2 ml (Acromax, Ecuador).	5 mg/ml	Control positivo
Ampicilina (sódica) 1 g (Reyoung Pharmaceutical, China).	2,5 mg/ml	Control positivo
<b>Extractos metanólicos y clorofórmicos</b>		
<i>Otholobium mexicanum</i>	5 mg/ml	Extracto vegetal positivo
<i>Matthiola incana</i>		Extracto vegetal negativo
<i>Baccharis Latifolia</i>		Extracto vegetal positivo
<i>Lophosoria quadripinnata</i>		Extracto vegetal negativo
24RA (extracto metanólico)	5 mg/ml	Compuestos a ser analizados
Morales 15 (extracto clorofórmico)	5/10 mg/ml	
<b>Estándar fitoquímico</b>		
Quercetina	1 mg/ml	Estándar fitoquímico

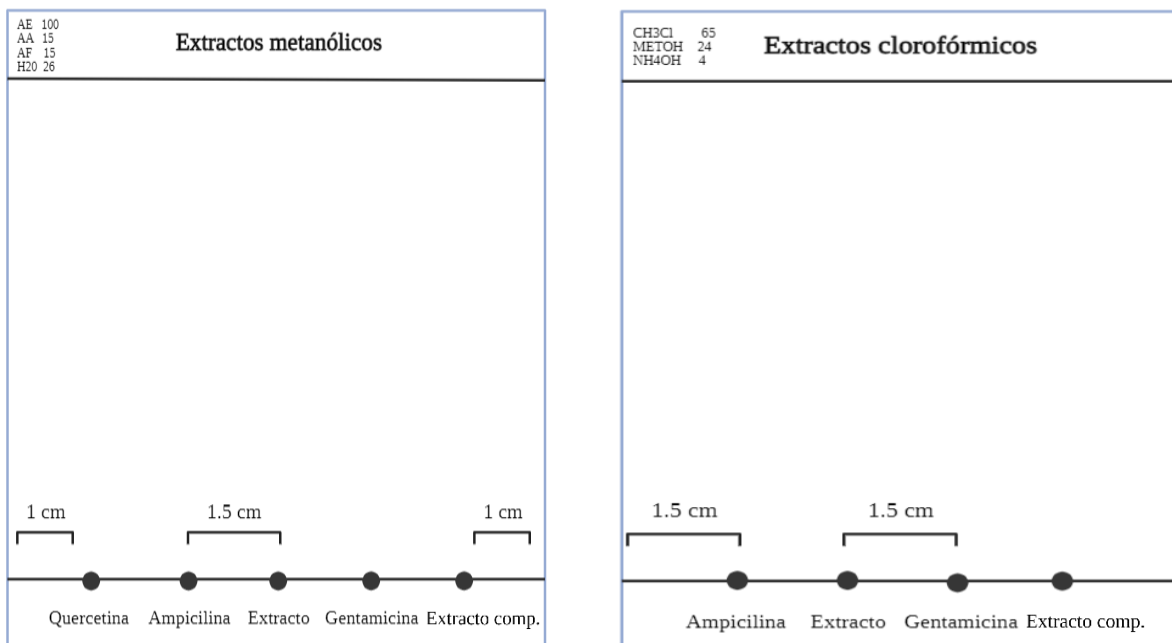
Una vez definidas las concentraciones, se procedió con la siembra de los diferentes compuestos.

**Extractos metanólicos:** en la línea de siembra se dejó una distancia de 1 cm desde los bordes y a partir de ellos se sembraron los compuestos, dejando una distancia de 1,5 cm entre los mismos. Se aplicó el siguiente orden para la siembra: quercetina (Q), ampicilina (A), extracto vegetal problema (positivo, negativo, o desconocido) (*O. mexicanum*, *M. incana*, *B. Latifolia*, *L. quadripinnata* y 24RA), gentamicina (G), y se dejó un puesto libre para la siembra del extracto completo posterior a la elución de la placa, a fin de tener un control de posible actividad en la mezcla de sus fito-componentes. La Figura 4 presenta el esquema de siembra.

**Extractos clorofórmicos:** En cada una de las placas cromatográficas se sembró los compuestos con una distancia de 1,5 cm de separación entre ellos. Se aplicó el siguiente orden para la siembra: ampicilina (A), extracto vegetal problema (positivo, negativo, o desconocido) (*O. mexicanum*, *M. incana*, *B. Latifolia*, *L. quadripinnata* y Morales 15), gentamicina (G), y se dejó un puesto libre para la siembra del extracto completo posterior a la elución de la placa, a fin de tener un control de posible actividad en la mezcla de sus fito-componentes. La Figura 4 presenta el esquema de siembra.

**Figura 4**

Representación gráfica de placas de TLC con sus diferentes medidas y compuestos.



## 2.2.5.1. Determinación de fases móviles

Se analizaron varias fases móviles para el desarrollo cromatográfico. Considerando la naturaleza polar y apolar de los solventes utilizados en la obtención de los extractos vegetales, se buscó la elución de los patrones de antibióticos, tanto en condiciones hidrofílicas, como para lipofílicas. Las placas de TLC con los extractos metanólicos fueron desarrolladas utilizando una fase móvil: acetato de etilo:ácido fórmico: ácido acético: agua (100:15:15:26 v:v:v), mientras que, para los extractos clorofórmicos se utilizó el sistema: cloroformo:metanol:hidróxido de amonio (65:24:4 v:v:v). Una vez que las placas fueron desarrolladas, se las dejó secar durante 24 horas para su posterior uso en la bioautografía.

## 2.2.5.2. Reveladores

Con la finalidad de tener una referencia sobre la composición fitoquímica de los extractos analizados, al mismo tiempo que se desarrollaron las placas para la bioautografía, se utilizaron placas de TLC Sílica gel 60 F<sub>254</sub> soporte de vidrio de 2 cm x 10 cm, en las cuales se sembraron los diferentes extractos metanólicos y clorofórmicos por separado, se dejó eluir cada una de las placas en sus respectivas fases móviles, y se procedió a sumergirlas con los reveladores: Poli-etilenglicol Productos Naturales para extractos metanólicos, y Anisaldehído-Ácido Sulfúrico para extractos clorofórmicos.

El revelador Poli-etilenglicol productos naturales está formado por dos reactivos; el primero es difenil-boril-oxietilamina al 1% en metanol, y el segundo es Poli-etilenglicol al 5% en etanol. Es empleado principalmente para la detección de compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, etc) en extractos vegetales. El revelador de anisaldehído-ácido sulfúrico, se prepara mezclando 0,5 mL de anisaldehído-ácido sulfúrico, 10 mL de ácido acético glacial, 85 mL de metanol y 5 mL de ácido sulfúrico, nos ayuda a detectar compuestos apolares del tipo terpenos, propilpropanoides, principios amargos y saponinas (Wagner & Bladt, 1996).

## 2.2.6. Preparación de los microorganismos

Los microorganismos usados fueron *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 los cuales fueron proporcionados por el Grupo de Plantas Medicinales y Productos Naturales del Departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca. Los microorganismos fueron sembrados en Agar Müller Hinton (Merck, Darmstadt, Alemania) e incubados a 37°C por 24 horas.

Una vez recuperados *E. coli* y *S. aureus* fueron cultivadas en caldo Tripticasa Soya (Becton, Dickinson and Company, Sparks, Estados Unidos) por separado. La concentración fue ajustada a  $1 \times 10^8$  UFC/mL, equivalente a 0,5 en referencia a la escala de turbidez de McFarland usando un espectrofotómetro GENESYS 10 UV (Thermo Scientific, Maryland, Estados Unidos) a una longitud de 625 nm.

## 2.2.7. Bioautografía

### 2.2.7.1. Bioautografía directa

Las placas cromatográficas previamente eluidas, tanto de los extractos metanólicos como clorofórmicos fueron sumergidas durante 10 segundos dentro de tubos cónicos estériles que contenían 20 mL del caldo Tripticasa Soya inoculado con *E. coli* y *S. aureus* descrito en el apartado 2.2.6. Una vez sumergidas las placas, fueron incubadas a 37°C durante 24 horas.

Posterior a la incubación, las placas fueron sumergidas en una solución acuosa de Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) (Sigma-Aldrich, Massachusetts, Estados Unidos) al 2% e incubadas nuevamente a 37°C por 2 horas. Se pudo observar una coloración violeta intensa con un halo de inhibición de fondo blanco en el lugar en donde se encontraron presentes los compuestos antimicrobianos.

### 2.2.7.2. Bioautografía por inmersión o recubrimiento

Las placas cromatográficas previamente eluidas, tanto de los extractos metanólicos como clorofórmicos fueron colocadas en cajas monopetri de plástico (GOSSELIN, Francia) de 150x15. Se prepararon 50 mL de Agar Müller Hinton para cada

dilución bacteriana, los cuales se mantuvieron en baño ultrasónico a una temperatura de 45°C con el fin de evitar la solidificación del medio. A continuación, se agregó 333 µL de caldo Tripticasa Soya con las respectivas bacterias descritas en el apartado 2.2.6, se vertió sobre las cajas Petri y se esperó aproximadamente 10 minutos hasta la solidificación del medio, posteriormente con ayuda de una espátula se cortó el agar y retiró las placas de TLC.

Una vez recortadas las placas del agar, fueron colocadas sobre papel aluminio e incubadas a 37°C durante 24 horas con presencia de humedad, para lo cual se colocó una bandeja metálica con 400 mL de agua destilada en la parte superior de la estufa MEMMERT INB 500 (Schwabach, Alemania).

Posterior a la incubación, las placas que contenían *E. coli* fueron sumergidas en una solución acuosa de MTT al 2% e incubadas nuevamente a 37°C por 30 minutos pudiéndose observar una coloración violeta con un halo de inhibición de fondo blanco en el lugar en donde se encontraron presentes los compuestos antimicrobianos. Las placas que contenían *S. aureus* fueron sumergidas en resazurina (PrestoBlue Cell Viability Reagent) (Madison, Estados Unidos) e incubadas nuevamente a 37°C por 30 minutos, pudiéndose observar una coloración rosada intensa con un halo de inhibición de fondo azul en el lugar donde se encontraron presentes los compuestos antimicrobianos.



## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Recolección de plantas

Luego del procesamiento (lavado, secado y triturado) de cada una de las muestras vegetales recolectadas, se logró obtener 20 g de muestra seca, cantidad suficiente para continuar el proceso de extracción.

### 3.2. Obtención de extractos metanólicos y clorofórmicos

Tanto los extractos metanólicos, como clorofórmicos se obtuvieron según lo descrito en el apartado 2.2.3 de la metodología. Los mismos se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  en el biofreezer con el fin de preservarlos hasta su uso.

### 3.3. Cromatografía en capa fina (TLC)

#### 3.3.1. Determinación de fases móviles

Para poder determinar la fase móvil adecuada tanto para los antibióticos como los extractos vegetales metanólicos y clorofórmicos se realizaron modificaciones a fases móviles estandarizadas por el Grupo de Plantas Medicinales y Productos Naturales del Departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca.

En el caso de antibióticos, y los extractos metanólicos se optó por la fase móvil acetato de etilo:ácido fórmico: ácido acético: agua (100:11:11:26 v:v:v:v) como composición inicial. Sin embargo, al no poder obtener una correcta elución de los antibióticos se realizaron diferentes modificaciones en los volúmenes de ácido acético, fórmico y agua. La fase móvil con el mejor resultado fue: acetato de etilo:ácido fórmico: ácido acético: agua (100:15:15:26 v:v:v:v), pudiéndose observar al antibiótico gentamicina en la línea de siembra y la ampicilina con un  $R_f=0,62$ . Los diversos resultados obtenidos se pueden observar en el Anexo 5.

En el caso de antibióticos y los extractos clorofórmicos, la fase móvil inicial fue cloroformo:metanol:agua (60:40:4 v:v:v), al igual que en el caso anterior, al no haber una correcta elución, se realizaron las siguientes modificaciones:

cloroformo:metanol:hidróxido de amonio (2:1:1 v:v:v); cloroformo:metanol:hidróxido de amonio (2:0,75:0,75 v:v:v); cloroformo:metanol:hidróxido de amonio (2:0,5:0,5 v:v:v); cloroformo:metanol:hidróxido de amonio (65:24:4 v:v:v). Se decidió utilizar esta última composición, en donde se obtuvo un  $R_f$  de 0,35 para la ampicilina, mientras la gentamicina permaneció en la línea de siembra. Los diferentes resultados se pueden observar en el Anexo 6.

Una vez establecidas las fases móviles, se procedió a la determinación de las concentraciones de antibióticos y extractos. Se determinó una concentración de 5 mg/mL y 2,5 mg/mL para gentamicina y ampicilina respectivamente. Para los extractos vegetales se empleó soluciones de 5 mg/mL para *O. mexicanum*, *M. incana*, *B. Latifolia*, *L. quadripinnata*, el extracto metanólico 24RA y 5/10 mg/mL para el aceite esencial Morales15.

### **3.4. Preparación de los microorganismos**

Transcurridas las 24 horas de incubación, se pudo observar el crecimiento bacteriano en las cajas con Agar Müller Hinton tanto para *E. coli* como para *S. aureus*. Además, con ayuda del espectrofotómetro se logró alcanzar la concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/mL, equivalente a 0,5 en referencia a la escala de turbidez de McFarland a una longitud de onda de 625 nm.

### **3.5. Bioautografía**

El método de bioautografía fue empleado para determinar la actividad antimicrobiana de cuatro especies vegetales (*O. mexicanum*, *M. incana*, *B. Latifolia*, *L. quadripinnata*) recolectadas en la provincia del Azuay, un extracto metanólico (24RA) y un aceite esencial (Morales15) proporcionados por el Grupo de Plantas Medicinales y Productos Naturales del Departamento de Biociencias de la Universidad.

#### **3.5.1. Bioautografía directa**

Para los primeros ensayos se utilizaron placas de TLC sin siembra de extractos ni antibióticos, las mismas que fueron sumergidas en el caldo de Tripticasa Soya con las

respectivas bacterias. Luego del período de incubación, al ser reveladas con MTT se observó una coloración violeta en la placa sumergida en *S. aureus*, mientras que en la placa que fue sumergida en *E. coli* no se observó ningún tipo de coloración, por lo tanto, no hubo crecimiento bacteriano.

Al probar el mismo método, pero sembrando los antibióticos, los resultados fueron iguales ya que en *S. aureus*, aunque hubo crecimiento la inhibición no se pudo observar con claridad mientras que en *E. coli* no se pudo observar crecimiento ni inhibición. Los resultados se presentan en el Anexo 7.

Aunque se probaron diferentes condiciones, como el tiempo de inmersión de las placas, la concentración de la suspensión bacteriana, presencia y ausencia de humedad durante la incubación, aumento en la viscosidad del caldo de cultivo o aumento/disminución del tiempo de incubación, los resultados fueron iguales, es decir, hubo crecimiento en *S. aureus*, pero no se logró el crecimiento en *E. coli*, por lo tanto, se tomó la decisión de cambiar la bioautografía directa por la de inmersión o recubrimiento.

### **3.5.2. Bioautografía por inmersión o recubrimiento**

A diferencia de la bioautografía directa en este método se procedió a verter el Agar Müller Hinton sobre las placas de TLC con los antibióticos y extractos. En primera instancia se probaron placas que solo contenían los antibióticos con el fin de poder determinar los parámetros idóneos para este método dando los siguientes resultados:

- Volumen de agar: 50 mL de Müller Hinton vertidos en cajas monopetri de 150 x 15; Humedad: 400 mL de agua destilada en bandeja de aluminio durante la incubación de las placas; Incubación: 24 horas; Temperatura: 37°C.

Una vez determinadas las condiciones, se usaron placas con antibióticos previamente eluidas dando como resultado la visualización de crecimiento e inhibición para *S. aureus* y *E. coli* como se muestra en la Figura 5.

**Figura 5**

Visualización de crecimiento e inhibición para *S. aureus* y *E. coli* con antibióticos (ampicilina y gentamicina).




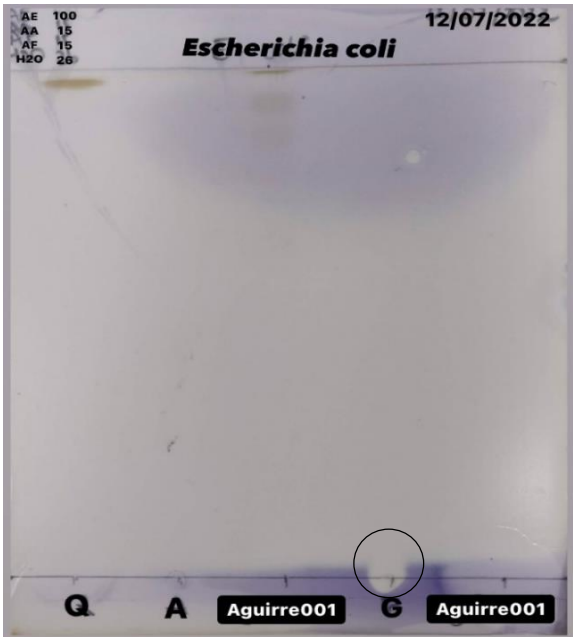

**A:** ampicilina, **G:** gentamicina

Al tener un crecimiento satisfactorio de ambos microorganismos, se procedió a usar placas con estándares fitoquímicos (quercetina y umbeliferona), antibióticos (ampicilina y gentamicina) y extractos de acción/inacción conocidos (24RA, Morales15, 40D, DE01, GeL HP36, HP60) que fueron proporcionados por el Grupo de Plantas Medicinales y Productos Naturales del Departamento de Biociencias de la Universidad obteniendo de igual manera un resultado satisfactorio (ver anexos 8 y 9).

Finalmente, se utilizaron placas con estándar fitoquímico (quercetina), antibióticos (ampicilina y gentamicina), extractos (Aguirre001, Aguirre002, Coraizaca001, Coraizaca002 y 24RA) y un aceite esencial (Morales15). En paralelo se hizo el análisis fitoquímico de cada uno de los extractos por separado obteniendo los resultados que se presentan en las **Tablas 2 y 3**.

**Tabla 2**

*Resultados bioautografía para extractos polares*

<b>Bioautografía <i>Staphylococcus aureus</i></b> <b>(1)</b>	<b>Bioautografía <i>Escherichia coli</i></b> <b>(2)</b>	<b>Placas TLC</b> <b>reveladas</b> <b>(3)</b>	<b>Resultado</b>
			<p>El extracto metanólico <b>Aguirre001</b> no presenta actividad antimicrobiana.</p>

**Q:** quercetina, **A:** ampicilina, **G:** gentamicina

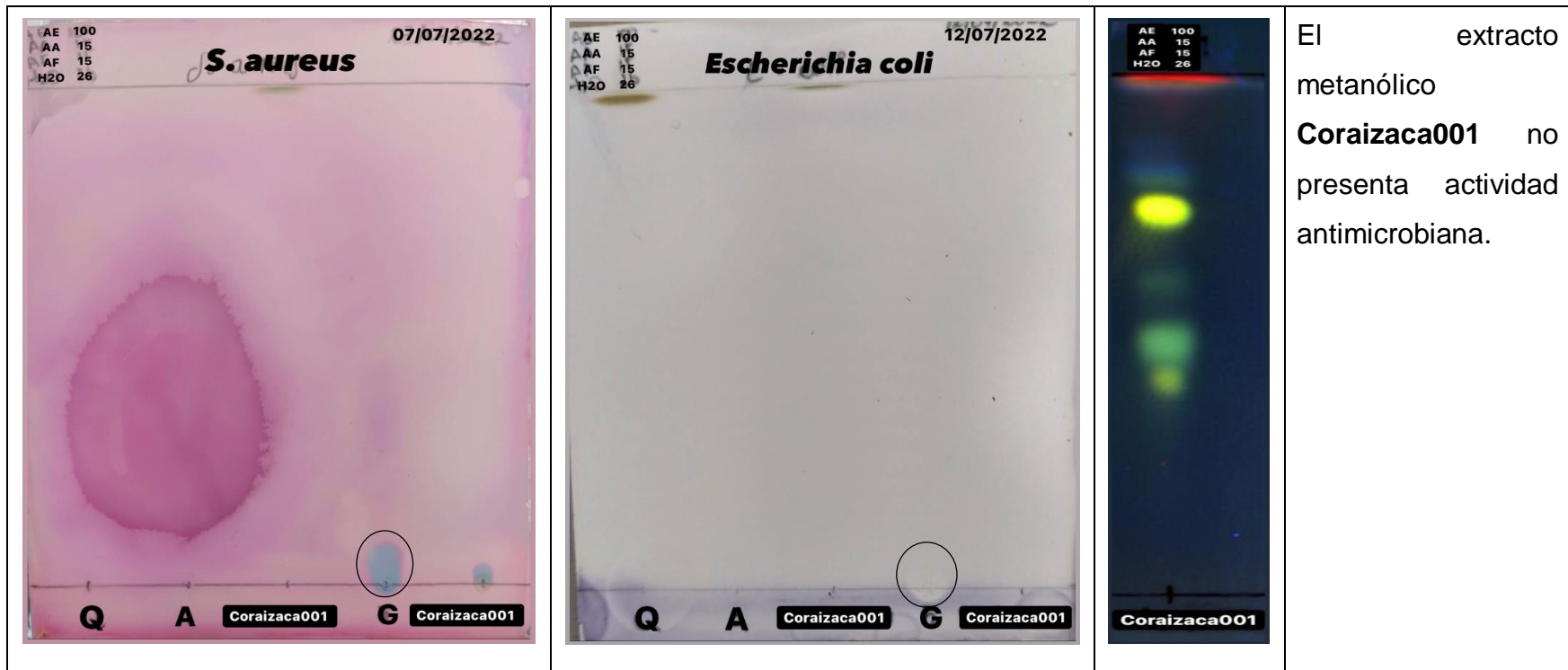
**\*1:** Placa de *S. aureus* revelada con resazurina, **2:** Placa de *E. coli* revelada con MTT, **3:** Placa revelada con Poli-etilenglicol Productos Naturales y observada en  $\lambda$  366.

**\*\*Fase móvil:** acetato de etilo:ácido fórmico: ácido acético: agua (100:15:15:26 v:v:v:v)



El extracto metanólico Aguirre002 no presenta actividad antimicrobiana.

Q: quercetina, A: ampicilina, G: gentamicina



El extracto metanólico **Coraizaca001** no presenta actividad antimicrobiana.

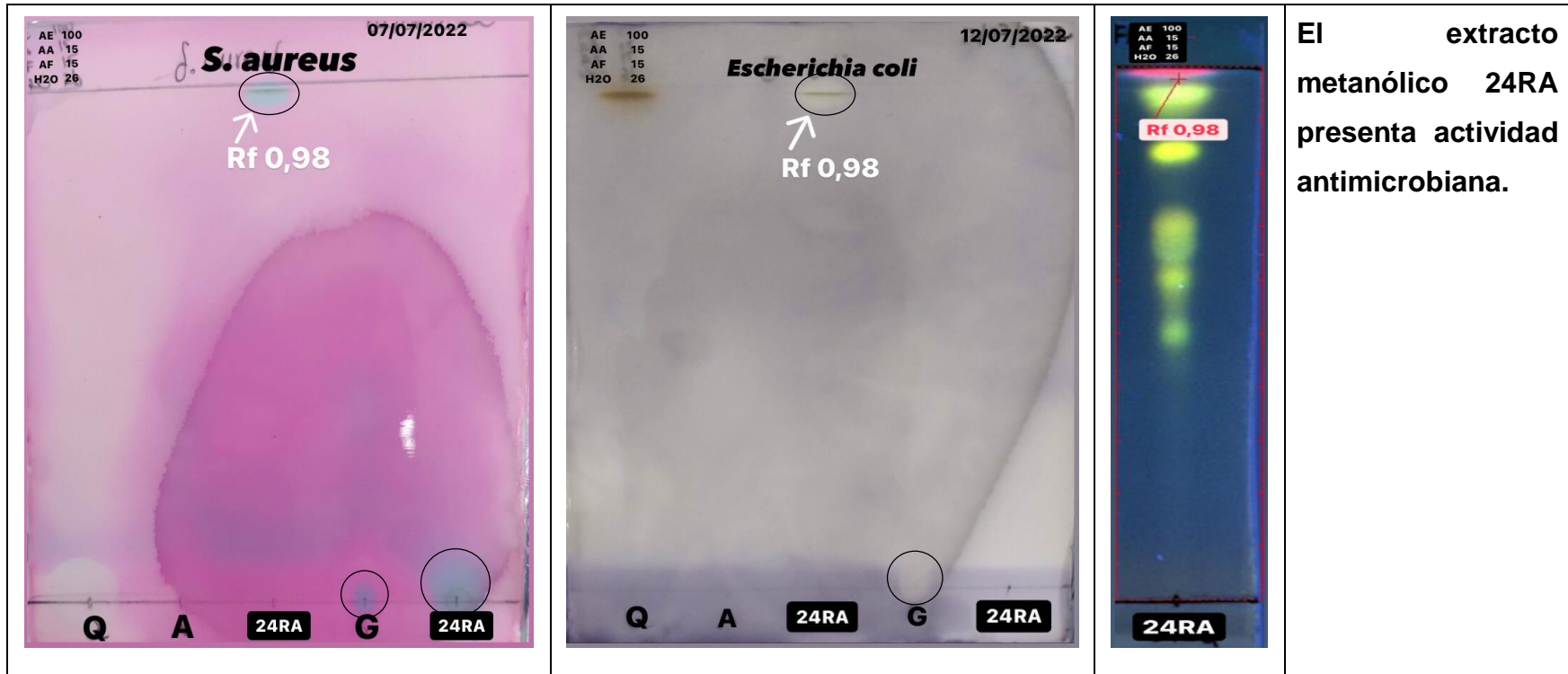
Q: quercetina, A: ampicilina, G: gentamicina



El extracto metanólico **Coraizaca002** no presenta actividad antimicrobiana.

Q: quercetina, A: ampicilina, G: gentamicina



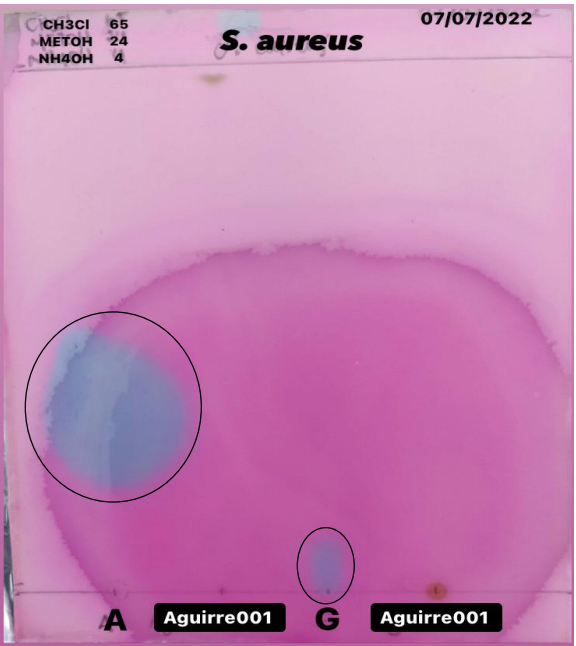
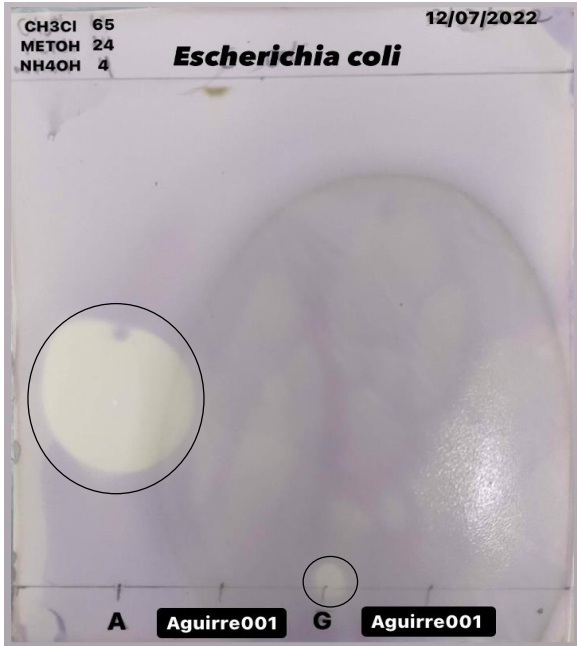



El extracto metanólico 24RA presenta actividad antimicrobiana.

Q: quercetina, A: ampicilina, G: gentamicina

**Tabla 3**

*Resultados bioautografía para extractos apolares*

<b>Bioautografía Staphylococcus aureus</b> <b>(1)</b>	<b>Bioautografía Escherichia coli</b> <b>(2)</b>	<b>Placas TLC</b> <b>reveladas</b> <b>(3)</b>	<b>Resultado</b>
			<p>El extracto clorofórmico <b>Aguirre001</b> no presenta actividad antimicrobiana.</p>

**A:** ampicilina, **G:** gentamicina

**\*1:** Placa de *S. aureus* revelada con resazurina, **2:** Placa de *E. coli* revelada con MTT, **3:** Placa revelada con Anisaldehído-Ácido Sulfúrico y observada en UV-Visible

**\*\*Fase móvil:** cloroformo:metanol:hidróxido de amonio (65:24:4 v:v:v)



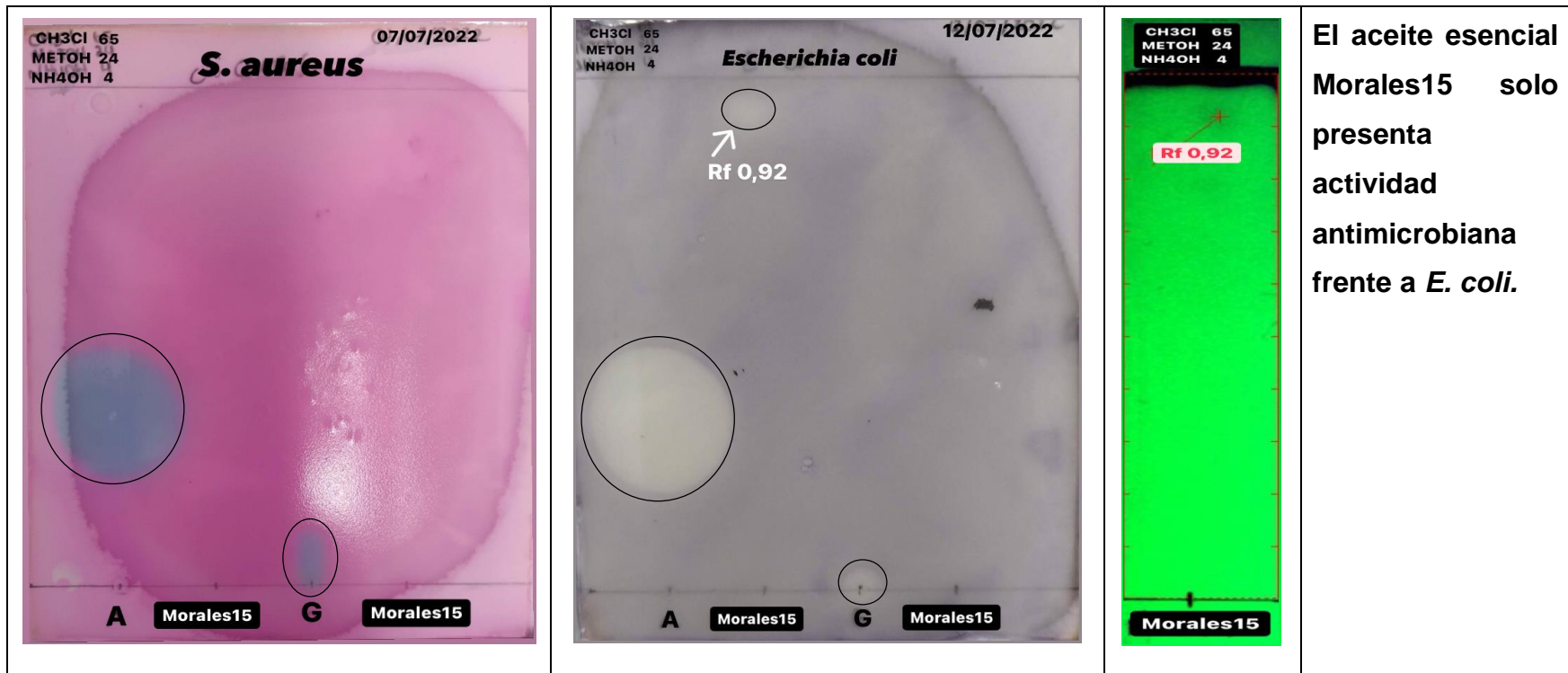
A: ampicilina, G: gentamicina



A: ampicilina, G: gentamicina



A: ampicilina, G: gentamicina



A: ampicilina, G: gentamicina

\*3: Observada en  $\lambda$  256

## 3.6. Discusión

Debido a la alta tasa de resistencia hacia los antibióticos que se ha generado en los últimos años se ha visto la necesidad de buscar nuevas técnicas que permitan la detección rápida y precisa de nuevos compuestos con potencial antibacteriano. Una técnica que cumple con esto es la bioautografía, la misma que es un método rápido, sencillo y económico que comprueba la actividad de diferentes extractos vegetales frente a una gran cantidad de cepas bacterianas como organismos de prueba. Sin embargo, Dewanjee et al. (2015) mencionan que este método presenta ciertas desventajas, como, por ejemplo, la dificultad en la visualización de las zonas de inhibición, el crecimiento de los microorganismos entre otros. Además, se encontraron otros factores que influyen como las fases móviles, la temperatura y tiempo de incubación de las placas de TLC, los microorganismos de estudio, etc., por lo que a pesar de que esta técnica resulte muy innovadora para laboratorios que no cuentan con equipos sofisticados, se deben realizar varios estudios y modificaciones, ya que como nos mencionan Rios et al. (1988), la bioautografía es una técnica difícil de estandarizar, pero una vez logrado este objetivo, es muy fácil de realizar y sumamente reproducible.

Para la estandarización del método de bioautografía directa frente a los microorganismos *E. coli* y *S. aureus*, los ensayos preliminares se basaron en las condiciones descritas por Colorado et al. (2007), sin embargo, al no obtener resultados óptimos se realizaron modificaciones a esta técnica como, el tiempo de inmersión en la suspensión bacteriana y la concentración del inóculo bacteriano, dando como resultado la óptima visualización de *S. aureus* sobre las placas de TLC; pero sin lograr la visualización de *E. coli*, razón por la cual se realizaron nuevamente algunas modificaciones como: la viscosidad del medio de cultivo, ya que como mencionan Grzelak et al. (2011), al obtener un caldo demasiado fluido, este puede deslizarse de la superficie de la placa de TLC, haciendo que el microorganismo no pueda adherirse a la superficie de las misma, mientras que si existe alta viscosidad será difícil cubrir por completo las placas de TLC. Otra de las condiciones que se tomó en cuenta fueron los tiempos de incubación de las placas de TLC, ya que

Grzelak et al. (2011) describen que cuando se deja incubar las placas por un tiempo muy corto, las bacterias no van a poder colonizar la superficie de la placa, mientras que, cuando se deja incubar demasiado tiempo las bacterias van a morir, por lo tanto, dejar poco o mucho tiempo va a evitar la visualización de las bacterias al ser reveladas. Y finalmente, la última condición que se modificó fue la humedad. Sánchez-García et al. (2016), afirman que cuando las placas son incubadas sin humedad, existe el riesgo de que estas se sequen completamente, y la sílica gel se desprenda de su soporte de vidrio. Sin embargo, aunque se realizaron todas las modificaciones descritas anteriormente no se pudo visualizar a *Escherichia coli*, por consiguiente, se decidió cambiar el método de bioautografía directa por el de inmersión o recubrimiento.

Según Dewanjee et al. (2015), la bioautografía por inmersión o recubrimiento se ha utilizado para distintos microorganismos entre ellos *E. coli* y *S. aureus* en los cuales se han observado buenos resultados. Con el fin de estandarizar este método, se siguieron las condiciones descritas por el autor antes mencionado, no obstante, al intentar reproducir el método se presentaron algunos inconvenientes como, por ejemplo, el crecimiento no homogéneo de las bacterias sobre las placas de TLC, el secado irregular del agar que cubría las placas durante la incubación, dificultades durante el revelado que no permitían la visualización de las zonas de inhibición, el espesor del agar que cubría las placas y la falta de humedad, por lo que se tuvieron que establecer algunos puntos importantes como condiciones de humedad ya que si no se disponía de humedad durante la incubación la sílica gel se desprendía del soporte de vidrio como se mencionó anteriormente. Determinar la cantidad de agar necesario para cubrir las placas de TLC es otra de las condiciones que deben ser establecidas debido a que si el volumen del mismo es muy grande las placas no se van a secar y esto va a impedir la visualización de las zonas de inhibición. Y finalmente, otra de las condiciones que se debe tener en cuenta es el tiempo de incubación ya que, aunque en la bibliografía se nos menciona que debe ser un lapso de tiempo entre 24 a 48 horas al pasar las 24 horas las bacterias empiezan a morir debido a que no cuentan con las condiciones necesarias para mantenerse viables.



Una vez determinadas estas condiciones Sánchez-García et al. (2016) nos menciona que a las placas de TLC se las debe exponer a indicadores de actividad enzimática como es el caso del MTT, estas sales actúan a nivel de la mitocondria detectando la actividad deshidrogenasa de los microorganismos dando como resultado una coloración violeta cuando estos se encuentran viables y manteniendo un color blanco en las zonas donde se encuentran los compuestos que presentan actividad antimicrobiana. Otro de los indicadores que se puede utilizar en este método es la resazurina la cual tiene la capacidad de detectar la viabilidad celular de los microorganismos debido a una reacción de oxido-reducción en el medio la cual va a provocar que en las zonas de inhibición se observe una coloración azul intensa, mientras que el resto de la placa se mantenga de color fucsia por la viabilidad de los microorganismos. Al desarrollar este método con todas las modificaciones y empleando los reveladores que sugiere Sánchez-García et al. (2016) se pudo visualizar a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* además de las zonas de inhibición producidas por algunos extractos, el aceite esencial y los antibióticos. Sin embargo, se considera que este método no es estable ya que, aunque todas las placas se encontraban bajo las mismas condiciones algunas presentaron un crecimiento poco uniforme ya que existen zonas con crecimiento y otras zonas sin crecimiento.

Los extractos y el aceite esencial que presentaron inhibición se muestran en las Tablas 2 y 3. Según León López (2014), menciona que *O. mexicanum* presenta en su composición monoterpenos, los mismos que han demostrado actividad frente a numerosos patógenos Gram positivos y Gram negativos, resultado que coincide con lo visualizado en el extracto Coraizaca001 apolar que corresponde a la planta *O. mexicanum*.

Debido a que el extracto vegetal 24RA y el aceite esencial Morales15 son sustancias con actividad antimicrobiana ya comprobada con anterioridad por el Grupo de Plantas Medicinales y Productos Naturales, como se esperaba el resultado fue positivo. En el caso del extracto vegetal 24RA debido a la coloración

azul que presentó al visualizar a una longitud de onda de 366 nm, se pudo deducir que se trata de un compuesto fenólico, mientras que Morales<sup>15</sup> es un aceite activo.

Según Benito Navarro & de la Cruz Tito (2019), afirman que la especie vegetal *Baccharis latifolia* codificada como Aguirre001 es una planta que presenta actividad antimicrobiana, no obstante, durante el desarrollo del presente ensayo no se pudo comprobar dicha actividad esto puede ser debido a que puede existir sinergismo entre compuestos presentes en el extracto y al momento de ser separados gracias a la cromatografía de capa fina el sinergismo desaparece.

En el caso de Aguirre002 y Coraizaca002 que corresponden a *Matthiola incana* y *Lophosoria quadripinnata* respectivamente al ser plantas ornamentales no presentan ningún tipo de actividad antimicrobiana lo que se compró ya que el resultado para ambas especies fue negativo.

## 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 4.1. Conclusiones

Una vez finalizado el presente trabajo de titulación se puede concluir que:

A pesar de haber establecido las condiciones necesarias para el cultivo de ambos microorganismos, mediante la bioautografía directa no se pudo visualizar a *E. coli* por lo que se optó por cambiar del método directo al de inmersión o recubrimiento teniendo un resultado más satisfactorio.

Se pudieron establecer tanto las concentraciones de los antibióticos a ser sembradas sobre las placas cromatográficas, las cuales fueron de 2,5 mg/mL para ampicilina y 5 mg/mL, estándar fitoquímico a 1 mg/mL, extractos a 5 mg/mL y el aceite esencial a 5/10 mg/mL.

Se determinó las fases móviles idóneas para los distintos extractos vegetales, las cuales fueron acetato de etilo:ácido fórmico: ácido acético: agua (100:15:15:26 v:v:v:v) para extractos metanólicos y cloroformo:metanol:hidróxido de

amonio (65:24:4 v:v:v) para extractos clorofórmicos que permitieron el corrimiento y separación de los mismos.

No obstante, y aunque se logró cumplir con algunos de los objetivos propuestos el método de bioautografía directa no pudo ser estandarizado debido a que resulta ser un método muy inestable ya que existen muchas variables que deben ser controladas para obtener un resultado exitoso.

## **4.2. Recomendaciones**

Se debe tener en cuenta que el método de bioautografía puede ser de gran utilidad para futuras investigaciones por lo cual se recomienda:

- Controlar previamente cada una de las variables que intervienen en el método.
- Emplear extractos vegetales que hayan sido probados previamente y presenten una buena actividad antimicrobiana para corroborar con los resultados obtenidos en el método.
- Optimizar el método a partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo.

## REFERENCIAS

- Abad Dávila, J., & Cabezas Velasco, D. (2014). *Estudio de la actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial de las hojas Piper pubinervulum C. DC proveniente de Macas, Ecuador*. [Tesis de pregrado]. Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito.
- Ávalos García, A., & Pérez-Urria Carril, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*. 2(3): 119-145
- Antonelli, A. (2020). *Royal Botanic Gardens, Kew. State of the World's Plants and Fungi 2020*. <https://www.kew.org/sites/default/files/2020-10/State%20of%20the%20Worlds%20Plants%20and%20Fungi%202020.pdf>
- Acosta, R. G., & Vargas, C. M. (2018). Mecanismos de resistencia bacteriana. *Diagnóstico*, 57(2), 82-86.
- Benito Navarro, A., & de la Cruz Tito, F. (2019). *Actividad antioxidante y antimicrobiana in vitro de los extractos de Schkuhria pinnata y Baccharis latifolia*. [Tesis de pregrado]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Bonten, M., Johnson, J. R., van den Biggelaar, A. H. J., Georgalis, L., Geurtsen, J., de Palacios, P. I., Gravenstein, S., Verstraeten, T., Hermans, P., & Poolman, J. T. (2020). Epidemiology of *Escherichia coli* Bacteremia: A Systematic Literature Review. *Clinical Infectious Diseases*, 72(7), 1211–1219. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa210>
- Cheung, G. Y. C., Bae, J. S., & Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 12(1), 547–569. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688>

- Choma, I. M., & Grzelak, E. M. (2011). Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218(19), 2684–2691. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.069>
- Choma, I., & Jesionek, W. (2015). Effects-Directed Biological Detection. *Instrumental Thin-Layer Chromatography*, 279–312. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-417223-4.00011-x>
- Colorado, J., Galeano, E., & Martínez, A. (2007). Desarrollo de la bioautografía directa como método de referencia para evaluar la actividad antimicrobiana de la gentamicina contra *Escherichia coli*. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 14(1), 67-71.
- Dewanjee, S., Gangopadhyay, M., Bhattacharya, N., Khanra, R., & Dua, T. K. (2015). Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5(2), 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2014.06.002>
- Domingo, D., & López-Brea, M. (2003). Revisión de plantas con acción antimicrobiana. *Diciembre*, 16(4), 385–393. <https://seq.es/seq/0214-3429/16/4/385.pdf>
- Fernández Riverón, Fernando, López Hernández, Jorge, Ponce Martínez, Laida María, & Machado Betarte, Caridad. (2003). Resistencia bacteriana. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 32(1) Recuperado en 17 de julio de 2022, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0138-65572003000100007&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572003000100007&lng=es&tlng=es)
- Gallegos Zurita, M. (2017). *Las plantas medicinales: usos y efectos en el estado de salud de la población rural de Babahoyo – Ecuador –2015*. [Tesis doctoral]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

- García C, P. (2003). Resistencia bacteriana en Chile. *Revista chilena de infectología*, 20. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182003020100002>
- Grzelak, E. M., Majer-Dziedzic, B., & Choma, I. M. (2011). Development of a Novel Direct Bioautography–Thin-Layer Chromatography Test: Optimization of Growth Conditions for Gram-Negative Bacteria, *Escherichia coli*. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 94(5), 1567–1572. <https://doi.org/10.5740/jaoac.10-385>
- Hernández Moreno, L. V., Pabón Baquero, L. C., & Hernández-Rodríguez, P. (2021). Estudio fitoquímico y actividad antimicrobiana de plantas medicinales empleadas para el control de infecciones urinarias. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 16(1), 43–56. <https://doi.org/10.18359/rfcb.4896>
- Kuklinski, C. (2000). *Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Ediciones Omega, S.A.
- León López, D. (2014). *Evaluación antimicrobiana y aislamiento de metabolitos secundarios de la especie vegetal Otholobium mexicanum J.W Grimes*. [Tesis de pregrado]. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Marín Castaño, D., & Ramírez, L. S. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia Et Technica*, XV(42), 263-268. [fecha de Consulta 15 de Julio de 2022]. ISSN: 0122-1701. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84916714049>
- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J. L., & Ochoa, T. J. (2014). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(4). <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2011.284.430>
- Ojitos-Ramos, K., & Portal, O. (2017). Metabolitos secundarios de las Plantas. Una alternativa para el manejo de enfermedades en cultivos de interés

económico. ResearchGate. Recuperado 18 de julio de 2022, de [https://www.researchgate.net/publication/341295118\\_Metabolitos\\_secundarios\\_de\\_las\\_Plantas\\_una\\_alternativa\\_para\\_el\\_manejo\\_de\\_enfermedades\\_en\\_cultivos\\_de\\_interes\\_economico](https://www.researchgate.net/publication/341295118_Metabolitos_secundarios_de_las_Plantas_una_alternativa_para_el_manejo_de_enfermedades_en_cultivos_de_interes_economico)

Paitan, Y. (2018). Current Trends in Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 181–211. [https://doi.org/10.1007/82\\_2018\\_110](https://doi.org/10.1007/82_2018_110)

Prieto-González, S., Garrido-Garrido, G., González-Lavaut, J., & Molina-Torres, J. (2004). Actualidad de la Medicina Tradicional Herbolaria. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 35(1), pp. 19-36

Queiroz, E. F., Wolfender, J. L., Atindehou, K. K., Traore, D., & Hostettmann, K. (2002). On-line identification of the antifungal constituents of *Erythrina vogelii* by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, ultraviolet absorbance detection and nuclear magnetic resonance spectrometry combined with liquid chromatographic micro-frac. *Journal of Chromatography A*, 974(1), 123-134. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01224-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01224-4)

Rios, J. L., Recio, M. C., & Villar, A. (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of ethnopharmacology*, 23(2), 127-149. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741\(88\)90001-3](http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741(88)90001-3)

Rodríguez Pava, C. N., Zarate Sanabria, A. G., & Sánchez Leal, L. C. (2017). Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Colombia. *Nova*, 15(27), 119. <https://doi.org/10.22490/24629448.1963>

Sánchez-García, E., Castillo-Hernández, S. L., & García-Palencia, P. (2016). Actividad antimicrobiana. *Investigación en plantas de importancia médica*, 77–100. <https://doi.org/10.3926/oms.334>

- Sepúlveda Jiménez, G., Porta Ducoing, H., & Rocha Sosa, M. (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), 355-363
- Tafur, J. D., Torres, J. A. & Villegas, M. V. (2008). Mecanismos de resistencia a antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infectio*, 12(3), 227-232.
- Wagner, H., & Bladt, S. (1996). *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas, 2Nd Edition*. Springer.
- Yu, H., Han, X., & Quiñones Pérez, D. (2021). La humanidad enfrenta un desastre: la resistencia antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 20(3), e3850. Epub 16 de junio de 2021. Recuperado en 26 de julio de 2022, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1729-519X2021000300020&lng=es&tlng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2021000300020&lng=es&tlng=pt)
- Zendejas-Manzo, G. S., Avalos-Flores, H., & Soto-Padilla, M. Y. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomédica*, 25(3), 129-143.



## ANEXOS

***Anexo. 1 Otholobium mexicanum recolectada en la granja de la Universidad de Cuenca en la comunidad de Nero.***



***Anexo 2. Matthiola incana adquirida en el mercado “10 de Agosto” de la ciudad de Cuenca.***



**Anexo 3. *Baccharis latifolia* recolectada en la facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca.**



**Anexo 4. *Lophosoria quadripinnata* recolectada en la granja de la Universidad de Cuenca en la comunidad de Nero.**



**Anexo 5. Fase móvil: acetato de etilo:ácido fórmico: ácido acético: agua  
(100:15:15:26 v:v:v)**



**G:** gentamicina, **A:** ampicilina

**Anexo 6. Fase móvil: cloroformo:metanol:hidróxido de amonio (65:24:4  
v:v:v)**



**G: gentamicina, A: ampicilina**

**Anexo 7. Ensayo de bioautografía directa. Placas de TLC con y sin crecimiento en *E. coli* y *S. aureus* respectivamente.**



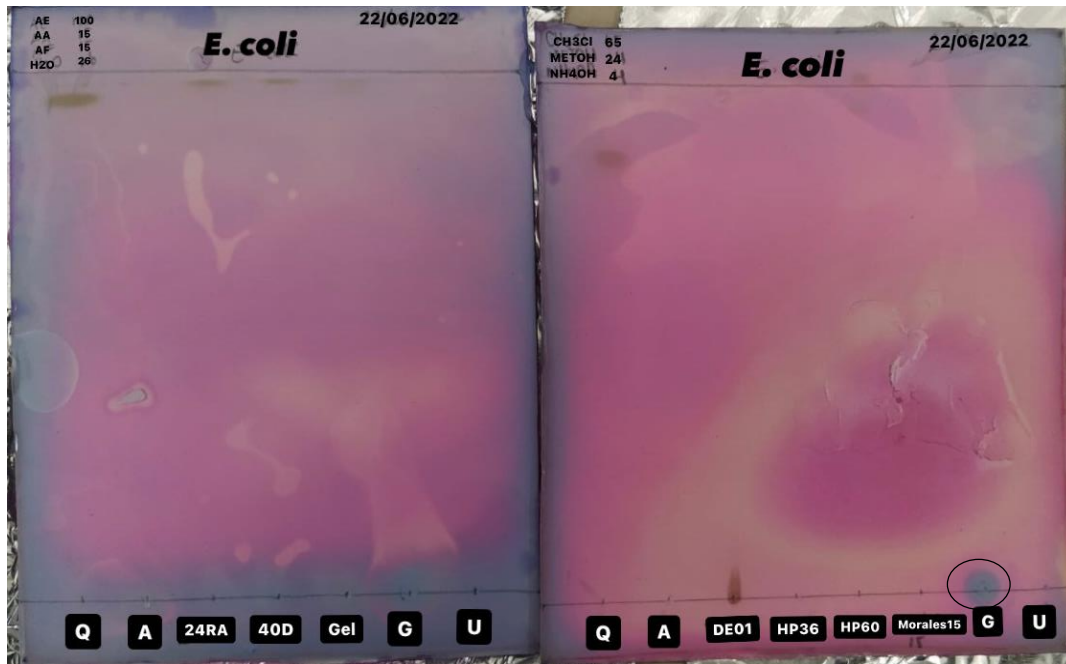
G: gentamicina, A: ampicilina

**Anexo 8. Ensayos de bioautografía por inmersión o recubrimiento con estándares, antibióticos y extractos en fase polar y apolar con *S. aureus***



Q: quercetina, A: ampicilina, G: gentamicina, U: umbeliferona

**Anexo 9. Ensayos de bioautografía por inmersión o recubrimiento con estándares, antibióticos y extractos en fase polar y apolar con *E. coli*.**



**Q:** quercetina, **A:** ampicilina, **G:** gentamicina, **U:** umbeliferona