

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO



Proyecto Final de Investigación previo a la obtención del Título de Licenciada en Ciencias de la Salud en Laboratorio Clínico e Histopatológico

TRABAJO DE TITULACIÓN

“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE Y BACTERICIDA EN EXTRACTOS OBTENIDOS DE ALGAS Y LÍQUENES ADQUIRIDOS EN LA ZONA DE LA LAGUNA DE OZOGOCHÉ EN EL PERÍODO JUNIO – OCTUBRE DEL 2016”.

AUTORA

Cepeda Paca Marcia Alexandra

TUTOR

Lic. Gisnella Cedeño

Riobamba – Ecuador

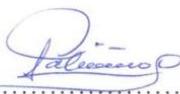
2017

REVISIÓN DEL TRIBUNAL

Los miembros del tribunal de graduación del Proyecto de Investigación de título: “Determinación de la Actividad Hemoaglutinante y Bactericida en extractos obtenidos de Algas y Líquenes adquiridos en la zona de la Laguna de Ozogoché en el Periodo Junio – Octubre del 2016”, presentado por Cepeda Paca Marcia Alexandra, dirigido por la Lic. Gisnella María Cedeño Cajas, una vez escuchada la defensa oral y revisado el informe final del proyecto de investigación con fines de graduación escrito en el cual se ha constatado el cumplimiento de las observaciones realizadas, remite la presente para uso y custodia en la biblioteca de la Facultad de Ciencias de la Salud de la UNACH. Para constancia de lo expuesto firman:

.....
DRA. PATRICIA NIÑO O.

Presidente del Tribunal (nombre)

.....


Firma

.....
Lic. Gisnella Cedeño
.....

Miembro del Tribunal (nombre)

.....


Firma

.....
Dra. Liliana Braya B.
.....

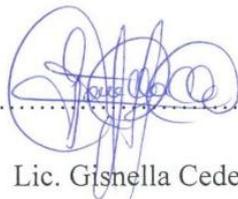
Miembro del Tribunal (nombre)

.....


Firma

DECLARACIÓN DEL TUTOR

Yo, Gisnella Cedeño docente de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico en calidad de tutor del proyecto de tesis con el tema: “Determinación de la Actividad Hemoaglutinante y Bactericida en extractos obtenidos de Algas y Líquenes adquiridos en la zona de la Laguna de Ozogoche en el Periodo Junio – Octubre del 2016”, propuesto por la Srta. Cepeda Paca Marcia Alexandra, egresadas de la carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico de la Facultad de Ciencias de la Salud, luego de haber realizado las debidas correcciones, certifico que se encuentran aptas para la defensa pública del proyecto. Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad facultando a la interesada hacer uso del presente para los trámites correspondientes.

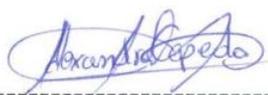


Lic. Gisnella Cedeño Cajas.

DOCENTE DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO

AUTORÍA DE INVESTIGACIÓN

Yo, Marcia Alexandra Cepeda Paca, soy responsable de todo el contenido de este trabajo investigativo, los derechos de autoría pertenecen a la UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO.



Marcia Cepeda.

AUTORA

CI: 060461133-5

DEDICATORIA

Dedico esta tesina principalmente a Dios, por haberme dado fortaleza para continuar y permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida. Lograr mis objetivos con toda humildad que de mi corazón puede emanar. A mi madre Juana Paca por su apoyo incondicional y ser el pilar fundamental en mi vida diaria demostrándome su cariño ya que ha sabido formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores, lo cual me ha ayudado a salir adelante en los momentos más difíciles que he atravesado durante mi periodo de estudios. A mi familia en general por estar siempre conmigo, ya que ellos han sabido apoyarme moralmente para continuar y nunca renunciar en el transcurso de mi carrera universitaria, por compartir momentos de alegría, tristeza y demostrarme que siempre podré contar con ellos.

Marcia Alexandra Cepeda Paca.

AGRADECIMIENTO

A la UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO por darme la oportunidad de estudiar y ser una profesional. A mi tutor de proyecto de grado, PhD. Gerardo Medina por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación ha logrado en mí que pueda terminar mis estudios con éxito. También me gustaría agradecer a la Doctora Liliana Araujo por brindarme su colaboración en una parte de mi investigación, de igual forma a los docentes de Investigación de la Facultad de Ingeniería que me abrieron las puertas de sus instalaciones para poder realizar mi trabajo experimental. Por ellos muchas gracias y que Dios los bendiga.

Marcia Alexandra Cepeda Paca.

ÍNDICE GENERAL.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO	I
REVISIÓN DEL TRIBUNAL	II
DECLARACIÓN DEL TUTOR	III
AUTORÍA DE INVESTIGACIÓN	IV
DEDICATORIA	V
AGRADECIMIENTO	VI
ÍNDICE GENERAL	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE CUADROS	X
ÍNDICE DE ANEXOS	XI
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIII
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I	3
1 PROBLEMATIZACIÓN	3
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	3
1.3 JUSTIFICACIÓN	4
1.4 OBJETIVOS	5
1.4.1 OBJETIVO GENERAL	5
1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
CAPITULO II	6
2 ESTADO DEL ARTE RELACIONADO A LA TEMÁTICA	6
2.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS	6
2.2 ALGAS	6
2.3 LÍQUENES	8
2.4 EXTRACTOS	10
2.5 ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE	10
2.6 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	12
CAPÍTULO III	16
3. METODOLOGÍA	16

3.1 TIPOS DE INVESTIGACIÓN.....	16
3.2 TIPO DE ESTUDIO.....	16
3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA	16
3.3.1 POBLACIÓN: LA POBLACIÓN DE ESTUDIO SON LAS ALGAS Y LÍQUENES EXISTENTES EN LA ZONA DE LA LAGUNA DE OZOGOCHÉ.....	16
3.3.2 MUESTRA: LOS EXTRACTOS OBTENIDOS EN METANOL, HEXANO Y ACUOSO DE LAS ALGAS Y LÍQUENES RECOLECTADOS EN LA ZONA DE LA LAGUNA DE OZOGOCHÉ.	16
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.4.1 MATERIALES BIOLÓGICOS:.....	16
3.4.1.1 ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE: EXTRACTOS ACUOSOS DE ALGAS Y LÍQUENES QUE FUERON COLECTADOS DE LA LAGUNA DE OZOGOCHÉ.	16
3.4.1.2 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA: EXTRACTOS DE METANOL Y HEXANO DE ALGAS Y LÍQUENES FUERON COLECTADOS DE LA LAGUNA DE OZOGOCHÉ.	16
3.4.2 MÉTODOS:	17
3.4.2.1 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS.	17
3.4.2.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.	17
3.4.2.3 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO.	17
3.4.2.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	18
3.4.2.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE.....	20
3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
CAPITULO IV.....	29
4 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	29
4.1 CONCLUSIONES.....	29
4.2 RECOMENDACIONES.....	29
5 BIBLIOGRAFÍA.....	30
6 ANEXOS.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1 Clasificación de las algas.....	7
Figura N° 2 Clasificación de las algas.....	8
Figura N° 3 Clasificación de Líquenes.....	9
Figura N° 4 Aglutinación.....	12
Figura N° 5 Ensayo de la actividad antimicrobiana, microdilución en placa de 96 pocillos.	20

ÍNDICE DE CUADROS

Tabla N° 1 Actividad de los Extractos Metanólicos frente a <i>Staphylococcus Aureus</i> (ATTC 6538P).....	21
Tabla N° 2 Actividad de los Extractos Hexanólicos frente a <i>Staphylococcus Aureus</i> (ATTC 6538P).....	22
Tabla N° 3 Actividad de los Extractos Metanólicos frente a <i>Escherichia Coli</i> (ATTC 10536).....	23
Tabla N° 4 Actividad de los Extractos Hexanólicos frente a <i>Escherichia Coli</i> (ATTC 10536).....	24
Tabla N° 5 Actividad de los Extractos Acuosos frente al grupo sanguíneo “A” Rh (+).	26
Tabla N° 6 Actividad de los Extractos Acuosos frente al grupo sanguíneo “B” Rh (+).	26
Tabla N° 7 Actividad de los Extractos Acuosos frente al grupo sanguíneo “O” Rh (+).	27

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N° 1 LAGUNA DE OZOGOICHE.....	33
Anexo N° 2 COLECTA DE LAS MUESTRAS DE LÍQUENES EN LA ROCA DE LOS ALREDEDORES DE LA LAGUNA DE OZOGOICHE.	33
Anexo N° 3 MUESTRAS OBTENIDAS DE LA COLECTA EN LA LAGUNA DE OZOGOICHE Y SUS ALREDEDORES.	33
Anexo N° 4 AREA DE BALANZA PARA PESAR LAS MUESTRAS OBTENIDAS.	34
Anexo N° 5 ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS EN EXTRACTOS LIQUIDOS.	34
Anexo N° 6 SECADO DE LAS MUESTRAS EN SOLVENTES ORGANICOS (METANOL Y HEXANO).	34
Anexo N° 7 ESTUFA CON LAS MUESTRAS EN PROCESO DE SECADO PARA OBTENER EL EXTRACTO.	35
Anexo N° 8 EXTRACTOS DE ALGAS Y LIQUENES CON DMSO EN TUBO EPENDOR.....	35
Anexo N° 9 MICRO DILUCIÓN SERIADA EN PLACA DE 96 POCILLOS CON LA PIPETA MULTICANAL.	35
Anexo N° 10 ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE DE LOS EXTRACTOS DE ALGAS Y LIQUENES.	36

RESUMEN

Este proyecto de investigación tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana en extractos de algas y líquenes, determinar la presencia de lectinas realizando la actividad hemoaglutinante de las algas como de los líquenes. Durante el período Junio-Octubre 2016, se trabajó con ocho extractos liquénicos y cuatro de algas: Metanol, Hexano y Acuoso, obtenidos por sequedad, trituración y reflujo. La actividad antimicrobiana se realizó a través del método de microdilución en medio líquido en placas de 96 pocillos, utilizando los extractos disueltos en Dimetilsulfóxido (DMSO) y diluciones de estos, frente a microorganismos American Type Culture Collection (ATCC) de: *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Para la actividad hemoaglutinante se trabajó con el extracto acuoso y sus diluciones utilizando además una suspensión de hematíes al 5% de los grupos sanguíneos (A⁺, B⁺, O⁺). El efecto antimicrobiano fue estimado mediante la determinación de la CMB y CMI, mientras que la presencia de lectinas se valoró de acuerdo a la intensidad de aglutinación que sufrieron los hematíes. Se concluye que los extractos, a las concentraciones ensayadas mostraron acción antimicrobiana frente a las dos cepa en estudio siendo la de mayor actividad sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, la actividad mas baja sobre *Escherichia Coli* puede deberse a la composición de su pared celular que es más compleja. Sin embargo, se obtuvo CMB de 800ppm particularmente en el caso del extracto *Peltigera sp*, también se determinó que hay lectinas siendo parte de la composición de las algas y los líquenes.

Palabras Clave: Actividad antimicrobiana, Actividad Hemoaglutinante, Algas Líquenes

ABSTRACT

This research project aimed to evaluate the antimicrobial activity in algae and lichen extracts and determine the presence of lectins by performing hemagglutinating activity of algae and lichens. During the period June-October 2016, eight extracts of lichen and four algae were considered: Methanol, Hexane and Aqueous, obtained by dryness, crushing and reflux. The antimicrobial activity was carried out by means of the microdilution method in liquid medium in 96-well plates, using the extracts dissolved in Dimethylsulfoxide (DMSO) and dilutions of these, against American Type Culture Collection (ATCC) microorganisms of: *Staphylococcus aureus* and *Escherichia Coli*. For the hemagglutinating activity, the aqueous extract and its dilutions were also used using a 5% suspension of red blood cells (A⁺, B⁺, O⁺). The antimicrobial effect was estimated by the determination of CMB and CMI, while the presence of lectins was assessed according to the intensity of agglutination that the red cells suffered. It is concluded that the extracts at the concentrations tested showed antimicrobial action against the two strains studied being the most active on the growth of *Staphylococcus aureus*. The lowest activity on *Escherichia coli* may be due to the composition of its cell wall which is more complex. However, 800 ppm CMB was obtained particularly in the case of *Peltigera* sp extract, it was also determined that there are lectins being part of the composition of algae and lichens.

Key Words: Antimicrobial Activity, Hemoagglutinating Activity, Lichen Algae



Reviewed by Teneanda, Dennys Mgs.
LANGUAGE CENTER TEACHER



INTRODUCCIÓN

El presente proyecto de investigación, se basa fundamentalmente en la determinación de las actividades hemoaglutinante y bactericida en extractos obtenidos de algas y líquenes colectados en la zona de la Laguna de Ozogoche en el periodo Junio - Octubre del 2016.

Estudios han manifestado que las algas constituyen una de las más ricas y pródigas fuentes de recursos marinos que aún el hombre no ha sabido utilizar a plenitud. Como todos los seres vivos, estas plantas poseen una diversidad de compuestos químicos, como carbohidratos y lípidos, necesarios para realizar sus funciones energéticas, y proteínas que cumplen las más diversas funciones.

Entre el elevado número de sustancias con propiedades bioactivas, se cuentan las que producen aglutinación de eritrocitos animales, incluidos los del hombre. Éstas son comúnmente conocidas como lectinas, proteínas o glicoproteínas de origen inmune capaces de aglutinar células y/o precipitar glicoconjugados, ⁽¹⁾ además, estas moléculas están presentes en todos los organismos vivos: por ejemplo en virus y bacterias donde funcionan como sistemas de reconocimiento que les permiten encontrar y unirse a la célula blanco. ⁽²⁾ En los últimos años algunos investigadores han mostrado el rol de las lectinas en la mediación de la metástasis en el cáncer y en la apoptosis de células cancerígenas. Otras actúan como inmunomoduladores de la respuesta inmune ante el cáncer y activan la proliferación de linfocitos T. ⁽³⁾ Tienen la utilidad en el área de la inmunohematología, asociadas con transfusiones de sangre, debido a la identidad que presentan ante los azúcares específicos en la membrana de los eritrocitos clasificados como grupos sanguíneos A, B y O. ⁽⁴⁾

Uno de los temas más alarmantes en el mundo actual es la aparición de cepas microbianas resistentes a los antibióticos, lo que actualmente constituye, un problema de salud pública a nivel mundial. Ante esto, la comunidad científica promueve la búsqueda de nuevos principios activos con actividad antibacteriana, de fuentes naturales y en especial de plantas, dirigidos al control de bacterias patógenas y de las infecciones que ellas producen en el ser humano. ⁽⁴⁾

Frente a la gran diversidad de plantas y organismos existentes en el Ecuador y que requieren ser estudiados, el objetivo del presente proyecto de investigación fue evaluar la actividad

antibacteriana en extractos preparados con metanol y hexano de ocho líquenes y cuatro algas colectadas en la zona de la Laguna de Ozogoche, estimando la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB), para determinar la presencia de propiedades antibacterianas en estas especies vegetales, además también se prepararon extractos acuosos de dichas plantas para determinar la actividad hemoaglutinante y determinar la presencia de lectinas en los extractos de algas y líquenes.

CAPITULO I

1 PROBLEMATIZACIÓN

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades producidas por bacterias son actualmente un riesgo para la salud a nivel mundial debido a la resistencia de algunos microorganismos a los antibióticos convencionales usualmente utilizados por la población. El incremento en la utilización de los antibióticos, su mal uso y otros factores relacionados han dado lugar, en las últimas décadas, a la emergencia de cepas resistentes.⁽⁴⁾

Según la OMS (Organización Mundial de Salud) La resistencia a las fluoroquinolonas, una de las clases de fármacos antibacterianos más utilizadas en el tratamiento de las infecciones por *E. coli*, está muy extendida. Hoy día hay países de muchas partes del mundo en los que este tratamiento es ineficaz en más de la mitad de los pacientes, en el caso del *Staphylococcus aureus* se calcula que las personas infectadas por cepas resistentes a la meticilina tienen una probabilidad de morir un 64% mayor que las infectadas por cepas no resistentes.⁽⁵⁾

Según estudios realizados por Santana en el año 2009, en la ciudad de Riobamba, se han reportado casos de antibióticos que han sido usados en el tratamiento de enfermedades infecciosas y que han generado resistencia bacteriana tales como la ampicilina 73%; fosfomicina 48%; amoxicilina + ácido clavulánico 39%. Lo que ha creado la necesidad de buscar nuevas sustancias que permitan controlar enfermedades asociadas a microorganismos para mejorar la salud de la población.⁽⁴⁾

1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Mostrarán actividad bactericida y hemoaglutinante los extractos obtenidos de algas y líquenes adquiridos en la zona de la Laguna de Ozogoché-Ecuador, en el período Junio – Octubre del 2016 frente a las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*?

1.3 JUSTIFICACIÓN.

El presente trabajo de investigación sobre la determinación de la actividad hemoaglutinante y bactericida en extractos obtenidos de algas y líquenes es muy importante ya que servirá para ayudar a las/os estudiantes de la carrera de laboratorio clínico a que tengan mayor conocimiento sobre dicho tema. Por otro lado desde los tiempos más remotos de la existencia humana, las plantas han sido utilizadas en muchos hogares del país con fines terapéuticos pero muchos de ellos no han brindado la utilidad deseada. Por lo tanto se requiere realizar investigaciones específicas para dar a conocer si son válidas o no el uso de las Algas y los Líquenes en actividades farmacológicas mediante estudios y pruebas científicas.

Escherichia coli es una bacteria de tipo bacilo Gram-negativo pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, bacteria no esporulada y móvil que presenta una compleja estructura antigénica que vive en el intestino y causan problemas produciendo enfermedades como la diarrea del viajero, diarrea hemorrágica y a veces puede causar insuficiencia renal y hasta la muerte. *Staphylococcus aureus* es una bacteria inmóvil, esférica en forma de cocos, Gram-positiva, pertenece a la familia *Micrococcaceae*, crece en grupos similares a racimos de uvas, está presente en la nariz cerca del 30% de los adultos sanos y en la piel de cerca del 20% de estos. Las infecciones cutáneas son frecuentes, llegando incluso a propagarse a través del torrente sanguíneo e infectar órganos distantes. Esto ha llevado al uso y abuso de antibióticos en nuestro medio provocando que cada día aparezcan nuevas cepas resistentes que pueden ocasionar epidemias difíciles de controlar. Las lectinas y su participación en el cáncer han sido numerosos y demuestran que éstas pueden modular diversos procesos biológicos, tales como el crecimiento celular, la adhesión, acoplamiento, transformación maligna, metástasis y apoptosis, la presencia de las lectinas en líquenes ya se encuentra evidenciada en bibliografía, siendo estas glicoproteínas de origen fúngico, aunque su enfoque está dirigido más al mecanismo de reconocimiento que presentan como moléculas de señalización, y ya se ha tratado de elucidar su secuencia de aminoácidos, más no se ha probado como terapia contra el cáncer.

Por lo antes expuesto, esta investigación se realizó con el fin de analizar la actividad antibacteriana de los extractos orgánicos (metanol y hexano) de Algas y Líquenes frente a las bacterias de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* que son bacterias comunes en las infecciones. También la actividad hemoaglutinante de los extractos acuosos (solución salina) de Algas y Líquenes con los grupos sanguíneos más comunes que son A⁺, B⁺ y O⁺. Es por eso que se realizó el estudio de las actividades antes mencionadas con el propósito de determinar la presencia de sustancias con actividad bactericida y hemoaglutinante.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar la actividad Hemoaglutinante y Bactericida en extractos obtenidos de Algas y Líquenes colectados en la zona de la Laguna de Ozogoché en el período Junio – Octubre del 2016”.

1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✚ Recolectar muestras de Algas y Líquenes en la zona de la Laguna de Ozogoché.
- ✚ Identificar las especies de las Algas y Líquenes colectados en la zona para el estudio de las mismas.
- ✚ Obtener los extractos acuosos, metanólicos y hexanólicos de las Algas y Líquenes recolectados.
- ✚ Realizar la determinación de la actividad hemoaglutinante de las Algas y Líquenes, frente a los grupos sanguíneos: A⁺, B⁺ y O⁺.
- ✚ Evaluar la actividad antibacteriana de las Algas y Líquenes, frente a las bacterias: *Staphylococcus aureus* ATCC: 6538P y *Escherichia coli* ATCC: 10536.
- ✚ Determinar concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de las Algas y Líquenes frente a las cepas evaluadas.

CAPITULO II

2 ESTADO DEL ARTE RELACIONADO A LA TEMÁTICA

2.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Desde épocas prehispánicas se utilizaron las plantas como fuente de medicamentos, tanto para aliviar, como para curar ciertas afecciones de la salud humana. Poco a poco, a través del método de prueba y error, fue naciendo la Medicina Tradicional. Las plantas son maravillosos laboratorios vivientes, ya que por sí mismas deben elaborar diferentes tipos de sustancias que les sirvan como medios de defensa contra ataques de microorganismos, insectos o predadores permitiendo adaptarse al lugar donde se encuentran. Estas sustancias le sirven también al ser humano como antibiótico, antiviral, anti-inflamatorio, antiparasitario, anticancerígeno, insecticidas, etcétera. Sin embargo, se requiere de la investigación científica para determinar qué planta tiene tal o cual propiedad, en qué dosis y qué parte de la planta se debe usar para no causar problemas de intoxicación. Todos estos y algunos más, son datos importantes para poder consumir los productos herbolarios sin riesgos y tener mayor certeza de conseguir el efecto deseado.⁽⁶⁾

2.2 ALGAS

Las algas, que son familiares como las largas cintas marrones que se ven en las aguas costeras, el verdín que hay en los charcos y las manchas verdes que se observan sobre el suelo o las rocas. Casi todas las algas son acuáticas, aunque algunas se encuentran en el suelo o sobre los árboles cuando hay suficiente humedad. Si bien las algas suelen hallarse en aguas frías y templadas, las grandes marañas flotantes del alga parda Sargassum se encuentran en el mar subtropical de los Sargazos. Algunas especies de algas pardas crecen en las aguas antárticas.⁽⁷⁾

CARACTERÍSTICAS DE LAS ALGAS: Las algas son eucariontes fotoautótrofos relativamente simples que carecen de los tejidos (raíces, tallo y hojas) de las plantas. La identificación de las algas unicelulares y filamentosas requiere observación microscópica. La mayor parte de las algas se encuentran en las aguas oceánicas. Su localización depende de la disponibilidad de nutrientes, de las longitudes de onda de la luz y de las superficies sobre las cuales crecen.⁽⁷⁾

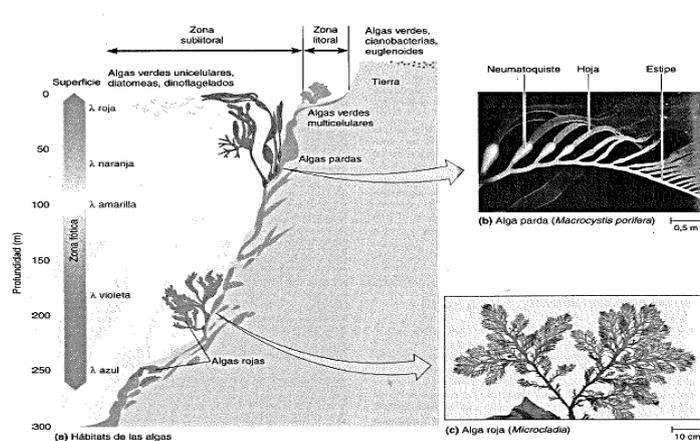
ESTRUCTURA GENERAL: Las algas muestran un amplio rango de formas de vida y de complejidad de estructuras. Sin embargo, varias características homogeneizadoras merecen

ser resaltadas. Las algas carecen de auténticas hojas, tallos y raíces como las de las plantas. El cuerpo en su conjunto es conocido como talo independientemente. El agua y los nutrientes, que están en contacto directo con todo el talo, son absorbidos directamente a través de la superficie sin necesidad de raíces. También en contraste con las hojas y los tallos de las plantas, el estipe y el rizoide generalmente carecen de tejidos especializados en el transporte de agua y nutrientes.⁽⁸⁾

CLASIFICACIÓN: Las algas se clasifican de acuerdo con sus secuencias de r-RNA, estructuras, pigmentos y otras cualidades. A continuación se describen algunos filos de algas.

- ❖ **Las algas pardas, o kelp:** son macroscópicas; algunas alcanzan longitudes de 50 m. En su mayor parte se encuentran en las aguas costeras y presentan una velocidad de crecimiento excepcional.
- ❖ **Las algas rojas:** casi todas poseen tallos ramificados delicados y pueden vivir a profundidades mayores que las otras algas. Los tallos de algunas algas rojas forman cubiertas similares a costras que recubren las rocas y las conchas y caparazones. El agar utilizado en los medios microbiológicos se extrae de muchas de estas algas.
- ❖ **Las algas verdes:** tienen paredes celulares de celulosa, contienen clorofila y almacenan almidón, al igual que las plantas. Se cree que dieron origen a plantas terrestres. Casi todas las algas verdes son microscópicas, aunque pueden ser unicelulares o multicelulares.⁽⁸⁾
- ❖ **Las diatomeas:** son algas unicelulares o filamentosas con paredes celulares complejas que están formadas por pectina y una capa de sílice. Los patrones distintivos de las paredes constituyen una herramienta útil para la identificación de las diatomeas. Las diatomeas almacenan la energía capturada por la fotosíntesis en la forma de aceite.

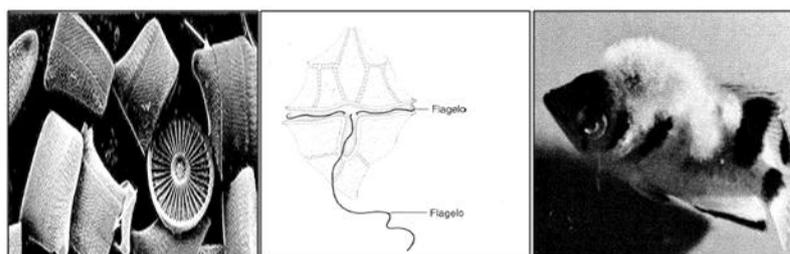
Figura N° 1 Clasificación de las algas.



Fuente: Tortora G, Funke B, Case C. *Introducción a la Microbiología*. (9na edición).

- ❖ **Los dinoflagelados:** son algas unicelulares que reciben el nombre colectivo de plancton, u organismos que flotan libremente. Su estructura rígida se debe a la celulosa incluida en la membrana citoplasmática. Algunos dinoflagelados producen neurotoxinas.
- ❖ **Los oomicetos:** se asemejan a los hongos zigomicetos en la fase asexual. Sus paredes celulares de celulosa siempre plantean el interrogante acerca de su relación con las algas y los análisis recientes del DNA han confirmado que los oomicetos están más estrechamente relacionados con las diatomeas y los dinoflagelados que con los hongos. Muchos de los oomicetos terrestres son parásitos de las plantas.⁽⁸⁾

Figura N° 2 Clasificación de las algas.



Fuente: Tortora G, Funke B, Case C. Introducción a la Microbiología. (9na edición).

Las algas constituyen fuentes ricas en diversos compuestos bioactivos, cuyo potencial farmacológico continúa en expansión. Los estudios sobre la química de productos naturales marinos han sido dirigidos principalmente al descubrimiento de nuevas sustancias con valor farmacéutico, bioquímico, bactericida, antiviral, fungicida, antitumoral, anticoagulante, antiinflamatorio e insecticida.⁽¹⁾

2.3 LÍQUENES.

Un líquen es una combinación de un alga verde (o una cianobacteria) y un hongo. Los líquenes se ubican en el Reino Fungí y se clasifican según el tipo de hongo que los acompaña, con más frecuencia un ascomiceto. Los dos organismos establecen una relación de mutualismo en la cual ambos miembros se benefician.⁽⁹⁾

CARACTERÍSTICA DE LOS LÍQUENES: Son microorganismos únicos, con características diferentes al alga y al hongo que lo constituyen, son formas de vida estables, se encuentran en todos los hábitats terrestres, no son plantas semejantes a musgos y no se parecen a las especies de hongos conocidas hasta el momento.⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾

Segregan ácidos orgánicos que desgastan por medios químicos las rocas y acumulan los nutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas. Encontrados también en árboles, estructuras de hormigón y tejados, los líquenes son algunos de los organismos de crecimiento más lento de la Tierra.⁽⁹⁾

ESTRUCTURA DE LOS LÍQUENES: Para mantenerse en el sustrato los líquenes presentan varias estructuras de adherencia, las ricinas son manojos de hifas, cortos, duros, de color negro, que crecen por la cara ventral de los líquenes foliosos y los cilios que son filamentos largos y crecen sobre los márgenes del talo. Los líquenes fruticosos presentan un disco de fijación, que es por donde se adhieren al sustrato, este disco es una estructura muy fuerte, pues ellos logran sostenerse, aún en condiciones de vientos muy fuertes.⁽¹²⁾

CLASIFICACIÓN DE LOS LÍQUENES: Los líquenes pueden agruparse en tres categorías morfológicas. Los líquenes costrosos crecen pegados o incrustados sobre el sustrato, los líquenes foliáceos se asemejan a hojas y los líquenes fruticulosos presentan proyecciones similares a dedos. El tallo o cuerpo del liquen se forma cuando las hifas del hongo crecen alrededor de las células del alga para formar la médula.⁽¹³⁾

Figura N° 3 Clasificación de Líquenes.



crustáceo

foliáceo

fruticuloso

Fuente: http://www.darwinfoundation.org/datazone/checklists/media/rapid_guides/2013_Bungartz_et_al_Liquenes_GuiaRapidaCompleto_Version3_1.pdf

Las hifas del hongo se proyectan por debajo del cuerpo del liquen para formar rizoides o discos de fijación. Además las hifas forman una corteza o cubierta protectora sobre la capa, el alga y a veces también debajo de ella. Después de su incorporación al tallo del liquen el alga sigue creciendo y las hifas pueden incorporarse a las células nuevas del alga.⁽¹³⁾

Los líquenes acumulan alta concentración de metabolitos que almacenan en su talo, muchos de los cuales están involucrados en su actividad antimicrobiana. Entre los metabolitos liquénicos que se presentan en estos organismos están aminoácidos, azúcares, ácidos grasos, lactonas macrocíclicas, aromáticos monocíclicos, quinonas, cromonas, xantonas, terpenoides,

esteroides y carotenoides. Entre los metabolitos hasta ahora aceptados como típicamente liquénicos se encuentran solamente dépsidos, depsidonas, depsonas, dibenzofuranos y ácidos úsnicos, que también se encuentran en hongos. La actividad farmacológica conocida de las sustancias liquénicas puede clasificarse en actividad antibiótica, antitumoral-mutagénica, inhibidora del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) inhibidora enzimática y, finalmente, actividad analgésica y antipirética.⁽¹⁰⁾

2.4 EXTRACTOS

Para aprovechar las sustancias activas de una planta, se recurre frecuentemente a los extractos. El proceso de extracción consiste en incorporar las sustancias activas de una planta a un solvente, que generalmente suele ser agua o alcohol; se puede realizar en frío o en caliente, y el producto resultante puede ser una solución concentrada o espesa en función de la sustancia de origen, o espesarse por propio interés en base a la aplicación que se le vaya a dar.⁽¹⁴⁾

PROCESOS DE EXTRACCIÓN: Los procesos de extracción más simples empleados se dividen de acuerdo al disolvente utilizado en:

- Extracción con agua: son procesos simples de extracción con agua, en el que se agrega agua caliente o fría al material molido y luego se filtra.
- Extracción con solventes orgánicos: son procesos en el cual se puede utilizar cualquier recipiente con tapa que no sea atacado con el disolvente; en éste se colocan el material vegetal molido con el disolvente y tapado se deja en reposo por un período de 2 a 14 días con agitación esporádica. Luego se filtra el líquido, se exprime el residuo, se recupera el solvente en un evaporador rotatorio y se obtiene el extracto.⁽¹⁴⁾

2.5 ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE.

A finales del siglo XIX, se encontró en la naturaleza la presencia de proteínas que tenían la capacidad de aglutinar eritrocitos. Estas proteínas fueron llamadas hemaglutininas o fitohemaglutininas, porque fueron encontradas originalmente en extractos de plantas.⁽¹³⁾ La hemaglutinación es la aglutinación de los hematíes o glóbulos rojos. Se trata de una respuesta biológica común frente a determinados microorganismos, como los virus, y se emplea rutinariamente en técnicas de tipado de grupos sanguíneos o en la determinación de cargas virales.⁽¹⁾

Entre el elevado número de sustancias con propiedades bioactivas, se cuentan las que producen aglutinación de eritrocitos de animales, incluidos los del hombre. Éstas son comúnmente conocidas como lectinas: proteínas o glicoproteínas capaces de aglutinar células y/o precipitar glicoconjugados, además, de la utilidad que tienen en el área de la inmunohematología, asociadas con transfusiones de sangre, debido a la identidad que presentan ante los azúcares específicos en la membrana de los eritrocitos clasificados como grupos sanguíneos A, B y O.⁽¹⁾

Las lectinas se definen como proteínas de origen no inmune que tienen especificidad por residuos de carbohidratos, monosacáridos, glicoproteínas o glicolípidos terminales o subterminales, con los que forman uniones no covalentes selectivas y reversibles, característica que les confiere la propiedad de reconocer, aglutinar células o precipitar glicoconjugados,⁽¹⁵⁾ las lectinas han llamado la atención de numerosas investigaciones debido a las diversas funciones que pueden realizar, incluyendo la antiproliferación, la antitumorogénesis, como inmunomoduladores, antifúngicos y antivirales. Tienen efectos potentes sobre la proliferación y diferenciación de diferentes células animales incluyendo linfocitos, osteoblastos y condrocitos. Sus propiedades mitogénicas permiten que se utilicen en estudios que tienen como base la proliferación de linfocitos en cultivos. Además, las lectinas son capaces de activar a los receptores de interleucina 2 (IL-2), una citosina importante en la activación de la proliferación de linfocitos T.⁽²⁾

Antígeno: Es una sustancia que desencadena la formación de anticuerpos y puede causar una respuesta inmunitaria. Los antígenos son usualmente proteínas o polisacáridos. Cada antígeno está definido por su anticuerpo, los cuales interactúan por complementariedad espacial.⁽¹⁶⁾

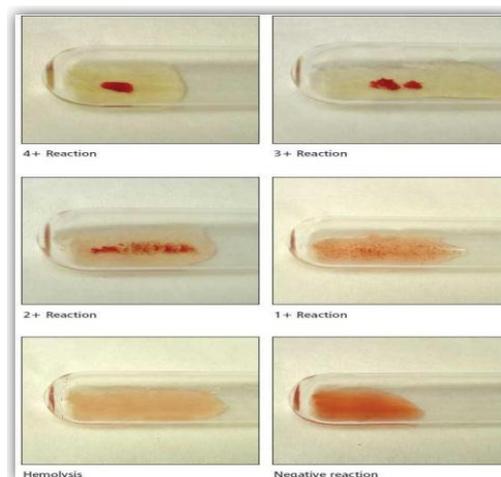
Anticuerpo: Puesto que los anticuerpos se dan de forma libre en el torrente sanguíneo, se dice que son parte del sistema inmunitario humoral, contribuyen a la inmunidad de tres formas distintas: neutralización, opsonización y (lisis).⁽¹⁶⁾

Funciones Los anticuerpos se unen a sus antígenos específicos y ayudan a eliminar los antígenos del organismo etiquetándolos para su absorción por los macrófagos. Cuando la materia extraña está dentro de una célula, en el caso de los virus y los parásitos de la sangre, la célula mostrará un antígeno al que el anticuerpo se adherirá. Esto marca la célula para la destrucción de modo que el organismo invasor también se destruye antes de reproducirse.⁽¹⁶⁾

Tipos de Reacciones:

- ✓ **Neutralización:** mediante anticuerpos específicos se pueden neutralizar toxinas, virus o enzimas. Los anticuerpos neutralizantes requieren un solo tipo de combinación con el antígeno para poder actuar
- ✓ **Precipitación:** la reacción de precipitación ocurre cuando se combina un anticuerpo por lo menos divalente, con un antígeno soluble y esto conlleva a la formación de agregados que precipitan.
- ✓ **Aglutinación:** cuando un antígeno articulado reacciona con su anticuerpo específico (divalente por lo menos) se observa la formación de grumos o agregados que precipitan esto se conoce como aglutinación en estas reacciones el determinante antigénico está sobre la superficie de una partícula o de una célula.⁽¹⁶⁾

Figura N° 4 Aglutinación



Fuente: <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/1154/1/UNACH-EC-LAB.CLIN-2013-0029..pdf>

2.6 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

La actividad microbiana del microalga se ha atribuido a compuestos pertenecientes a varias clases químicas, incluyendo indoles, terpenos, acetogeninas, fenoles, ácidos grasos e hidrocarburos volátiles halogenados. Sin embargo, debido muchas veces a su complejidad química y a la falta de estudios o registros previos, se puede concluir que la búsqueda de nuevos agentes activos es todavía incipiente.⁽¹⁷⁾

Las bacterias son células procarióticas, muy pequeñas (menos de 5 micras de diámetro) con una estructura interna sencilla en comparación con las células eucarióticas. Casi todas las células procarióticas están rodeadas por una pared celular rígida, que las protege y les da su

forma característica. La mayor parte de las células procarióticas toman la forma de bastoncillos (bacilos), esferas (cocos), o hélices que parecen “garabatos” (espirilos).⁽¹⁸⁾

Varios tipos de antibióticos, incluida la penicilina, combaten las infecciones bacterianas al obstruir la síntesis de la pared celular, lo que ocasiona el rompimiento de las bacterias. Algunas bacterias pueden moverse, impulsadas por flagelos.⁽¹⁸⁾

Staphylococcus aureus: Es una bacteria inmóvil, esférica en forma de cocos, Gram-positiva, de 0.8 a 1 micras de diámetro, pertenece a la familia *Micrococcaceae*, crece en grupos similares a racimos de uvas. La mayor parte del tiempo habita en el cuerpo sin causar daño, principalmente suele estar en la piel y en las membranas mucosas, pero cuando penetra en los tejidos, puede ocasionar una amplia gama de infecciones debido a la producción de toxinas. En ocasiones, puede entrar en el torrente sanguíneo desde el sitio de la infección y alcanzar otros tejidos distantes.⁽¹⁷⁾

Escherichia coli: Es un bacilo Gram-negativo que mide de 0,5 a 1 micra de ancho y 3 a 5 micras de largo, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, bacteria no esporulada y móvil que presenta una compleja estructura antigénica. Forma parte de la microflora normal del intestino del hombre y los animales de sangre caliente. Se trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, el agua, vegetales y gran variedad de animales. Su contagio se da mediante transmisión oro-fecal o hídrico-fecal, y es un importante agente nosocomial.⁽¹⁷⁾

2.6.1 Mecanismo de acción de los antibióticos: Los antibióticos actúan inhibiendo diversos procesos metabólicos que son esenciales para la supervivencia de los microorganismos. La especificidad de acción depende de que el fármaco bloquee una enzima o sustrato no presente en las células eucariotas humanas o suficientemente distintas.⁽¹⁹⁾

Bacteriostáticos: Inhiben el crecimiento del microorganismo como el Cloranfenicol.

Concentración Mínima Inhibitoria: es la mínima cantidad de antimicrobiano que es capaz de impedir el crecimiento de un microorganismo en unas condiciones normalizadas.

Bactericida: Matan a los microorganismos sin necesidad de destruirlos o lizarlos como la Penicilina.

Concentración Mínima Bactericida: es la mínima cantidad de antibiótico capaz de destruir el 99,9% de una muestra inoculada en condiciones estandarizadas.

Bacteriolíticos: Matan a los microorganismos por lisis como la Polimixina.⁽²⁰⁾

Antimicrobianos que inhiben la síntesis de pared celular: Entre estos tenemos las penicilinas naturales y sintéticas, las cefalosporinas, la cycloserina, bacitracina y la vancomicina. La inhibición de la síntesis del péptidoglicano es letal para la bacteria, ya que normalmente, durante la síntesis de la pared celular, el proceso de adición de componentes se acompaña de digestión autolítica de la materia ya existente, por lo que, en presencia de un inhibidor de la síntesis, la digestión enzimática continúa, debilitándose la pared, con lo que se permite que en presencia de un medio hipotónico, los líquidos ingresen, hinchando la bacteria y produciendo la "lisis osmótica" de la misma.⁽²¹⁾

Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos: Entre estos tenemos al ácido nalidíxico, la rifampicina, la griseo fulvina, las sulfas y el trimethoprím. El ácido nalidíxico produce bloqueo enzimático a nivel de la "grasa" (necesaria para la síntesis del ácido dexosirribonucleico-ADN). La rifampicina lo hace a nivel de la "ARN polimerasa" (enzima que normalmente inicia la síntesis de ácido ribonucleico mensajera) (ARNm).⁽²¹⁾

Antimicrobianos que actúan a nivel de membrana celular: La organización química de la membrana celular de bacterias y humanos es muy parecida, por esta razón, los antimicrobianos que ejercen sus efectos deletereos sobre los microbios a este nivel, producen también efectos tóxicos importantes en los tejidos del hombre, limitando su uso terapéutico. Ejemplo de este grupo es la nistatina (usada sólo en forma tópica por lo ya mencionado), la anfotericina y las polimixinas. Estas últimas producen "aperturas" en la membrana mediante las cuales se produce un intercambio anormal de iones, con trastorno de la homeostasis celular y muerte.⁽²¹⁾

Resistencia a antimicrobianos: La emergencia y extensión de cepas bacterianas resistentes a los agentes terapéuticos convencionalmente usados para su erradicación, es un problema de importancia creciente, dentro y fuera de nuestro país. Se ha asociado con el abuso de la terapia antimicrobiana múltiple.⁽²¹⁾

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA

3.1 TIPOS DE INVESTIGACIÓN

Para la elaboración del presente trabajo se realiza una investigación de tipo descriptiva, la cual nos conduce a la investigación explicativa, experimental y aplicada.

3.2 TIPO DE ESTUDIO

El estudio realizado es de carácter transversal ya que se lo realiza en un solo momento durante un periodo determinado.

3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

3.3.1 POBLACIÓN: La población de estudio son las algas y líquenes existentes en la zona de la Laguna de Ozogoche.

3.3.2 MUESTRA: Los extractos obtenidos en metanol, hexano y acuoso de las algas y líquenes recolectados en la zona de la Laguna de Ozogoche.

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1 Materiales Biológicos:

3.4.1.1 Actividad hemoaglutinante: Extractos Acuoso de Algas y Líquenes que fueron colectados de la Laguna de Ozogoche.

Material que será utilizado en el análisis:

- ✓ Tubos de ensayo de 5ml, Tubos de ensayo de 40ml, Solución Salina al 0.9%, Sangre de tipos A, B y O, Pipetas Automáticas de 10-100ul y 100-1000ul, Puntas Amarillas y Azules, Gradilla, Estufa a 37°C, Centrifuga,

3.4.1.2 Actividad Antibacteriana: Extractos de Metanol y Hexano de Algas y Líquenes fueron colectados de la Laguna de Ozogoche.

Material que será utilizado en el análisis:

- ✓ Solución Salina al 0.9%, DMSO (DimetilSulfoxido), Agar Nutritivo, Agar Tripticosa de Soya, Caldo Nutritivo, Agua Destilada, Cajas Petri, Micro placas de 96 pozos, Campana de Flujo Laminar, Estufa a 37°C, Pipetas Automáticas de 10-100ul, 100-1000ul y 5ml, Mechero, Gradilla, Tubos de ensayo, Matraces de 25ml, Puntas Amarillas y Azules, Botella de tapa rosca.

Cepas a trabajar: *Staphylococcus aureus* ATCC: 6538P, *Escherichia Coli* ATCC: 10536.

3.4.2 Métodos:

3.4.2.1 Recolección de las muestras.

Las muestras de algas y líquenes fueron recolectadas en la zona de la Laguna de Ozogоче, ubicada geográficamente en la provincia de Chimborazo, cantón Alausi, parroquia Achupallas.

Algas: Las algas se recolectaron en el interior de la Laguna de Ozogоче, para esto se utilizó prendas específicas para ingresar a la laguna y extraer algunos tipos de algas.

Líquenes: Los líquenes fueron recolectados algunos en la orilla de dicha laguna, otros en las rocas de su alrededor utilizando una espátula que nos facilitó desprender el liquen de la roca.

Luego de su recolección las muestras fueron transportadas al laboratorio y almacenadas en refrigeración hasta su utilización.

3.4.2.2 Preparación de las muestras.

Limpieza: En esta fase se retiró todas las impurezas que se encuentren asociadas al alga o al liquen y colocarlo en bolsas limpias y separadas para obtener solo la muestra y así poder procesarla.

Secado: Para esto se pesó la muestra fresca y una vez pesada se colocó en canastillas hechas de papel aluminio para cada muestra y se puso en la estufa a 34°C para evitar que se degraden algunos elementos de las muestras, los líquenes fueron secados durante 93 horas mientras que las algas se secaron durante 165 horas.

Triturado: Una vez que las muestras estaban secas se pesó la muestra seca y se procedió a moler lo más fino posible en un triturador o en una licuadora con el envase adecuado, muestra por muestra.

3.4.2.3 Preparación del extracto.

En esta fase se procedió a dividir en tres partes iguales el total de cada muestra y se prepararon tres tipos de extractos un extracto acuoso y dos orgánicos.

Acuoso.

- ✓ Codificar los envases que se van a utilizar para este extracto.
- ✓ Colocar la muestra molida en el envase.
- ✓ Poner solución salina al 0.9% sobrepasando la muestra en el envase.
- ✓ Cerrar bien los envases y dejar 24 horas en refrigeración.

- ✓ Después de las 24 horas sacar los envases de refrigeración y filtrar en otro envase el contenido para obtener el extracto deseado.
- ✓ Una vez filtrada las muestras cerrar los envases y congelarlos para evitar que se contaminen hasta el momento de utilizarlo.

Orgánicos (Metanol y Hexano).

- ✓ Codificar los envases que se van a utilizar para estos extractos.
- ✓ Colocar la muestra triturada en el envase.
- ✓ Poner el solvente sobrepasando la muestra en el envase.
- ✓ Cerrar bien los envases para evitar que se evaporen y dejar 4 días al ambiente en un lugar oscuro.
- ✓ Después de los 4 días sacar los envases y filtrar en otro envase el contenido para obtener el extracto deseado.
- ✓ Una vez filtrada las muestras cerrar los envases y mantener en refrigeración para que no se contaminen mientras se realiza la liofilización.
- ✓ Rotular tubos eppendorf y colocar en una gradilla para liofilizar los extractos en la estufa a 34°C tanto del Metanol como del Hexano y obtener el extracto deseado.

3.4.2.4 Evaluación de la Actividad Antimicrobiana.

Para este ensayo se utilizaron dos bacterias (*S. aureus* y *E. coli*) los extractos se disolvieron en DMSO a una concentración de 100.000 ppm (ug/ml) solución concentrada (Stock) que se utilizaron en los ensayos. Se disolvió 0,1g del extracto en 1000ul de DMSO o 0,05g del extracto en 500ul de DMSO.⁽²²⁾

Preparación del material previo al ensayo.

- ✓ Esterilización de puntas amarillas y azules, eppendorf de 1.5ml, botellas de 80ml de tapa rosca, matraces de diferente volumen y 2 tubos de 12ml con tapa rosca.
- ✓ Preparación de tubos con 4,5ml y 4,95ml de solución salina y esterilización.
- ✓ Realización del medio de cultivo (agar nutritivo en cajas monopenetri y caldo nutritivo en un envase de tapa rosca)

Preparación de la bacteria *Staphylococcus Aureus* y *Escherichia Coli*

- ✓ **Pre inóculo:** Rotular un matraz pequeño, Colocar 20ml de TSA, Con un aza estéril inocular la bacteria de la caja petri con el cultivo la cantidad suficiente (mínimo 3 colonias) y poner en el matraz que esta con el TSA, Homogenizar y dejarlo en agitación e incubación a 37°C durante 18 horas.
- ✓ **Inóculo:** Rotular 3 tubos con solución salina de 4,5ml esterilizados previamente con -1,-2 y -3 para hacer las diluciones seriadas, Absorber 500ul del pre inóculo,

colocar en el tubo que esta rotulado -1 y agitar, Absorber 500ul del tubo -1, colocar en el tubo -2 y agitar, Absorber 500ul del tubo -2, colocar en el tubo -3 y agitar, Codificar 2 tubos esterilizados de tapa rosca con -4 y colocar 9ml de caldo nutritivo en cada uno, Absorber 1000ul del tubo -3, colocar en cada uno de los tubos -4 para completar 10.000ul de inóculo en cada tubo.

✓ **Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB)**

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y bactericidas (CMB) se determinaron por el método de microdilución en medio líquido en placas de 96 pocillos (antibiograma), ensayando los extractos metanolicos y hexanolicos de algas y líquenes a una concentración máxima de 6400 µg/ml. Se depositaron 200 µl del extracto en el medio de cultivo (caldo nutritivo) a doble concentración de la requerida para el ensayo en los pocillos de la columna 2 y 100 µl de medio en los restantes, para llevar a cabo diluciones seriadas a mitades. Estas placas fueron inoculadas con 100 µl de una suspensión del microorganismo a ensayar, realizada a partir de pre-inóculos preparados, de modo que quedara a una densidad celular inicial de $1-5 \times 10^5$ UFC./ml.

Cada ensayo fue realizado por duplicado y como control positivo se inocularon pocillos en las mismas condiciones pero carentes de producto y con dimetil sulfoxido (DMSO) a una concentración equivalente a la máxima utilizada en los cultivos problemas, en ningún caso la concentración de DMSO superó la máxima tolerable por cada bacteria. El control negativo (blanco control), se preparó añadiendo 200 µl de medio a los pocillos de la columna 1.

Tras 24 horas de incubación a 37 °C en agitación orbital se determinó la turbidez de los cultivos. De aquellos pocillos en los que no se observó crecimiento visible, se tomaron alícuotas (100 µl) para efectuar un recuento de viables en placas de agar nutritivo con el fin de establecer la CMI (mínima concentración de producto a la cual no hubo crecimiento) y CMB (mínima concentración de producto que produjo la muerte del 99,9% de la población inicial)

Figura N° 5 Ensayo de la actividad antimicrobiana, microdilución en placa de 96 pocillos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	⊠	x	o	o	o	x	o	o	o	x	o	o
B	⊠	x	o	o	o	x	o	o	o	x	o	o
C	⊠	x	o	o	o	x	o	o	o	x	o	o
D	⊠	x	o	o	o	x	o	o	o	x	o	o
E	⊠	x	o	o	o	x	o	o	o	x	o	o
F	⊠	x	o	o	o	x	o	o	o	x	o	o
G	⊠	x	o	o	o	x	o	o	o	x	o	o
H	⊠	x	o	o	o	x	o	o	o	x	o	o

100ul 100ul 100ul 100ul

X= muestra 200ul.
 O= C.N 100ul.
 ⊠= control negativo.
 ⊠= control positivo.

Fuente: Alexandra Cepeda.

3.4.2.5 Evaluación de la Actividad Hemoaglutinante.

Para medir la hemoaglutinación de los extractos procedemos a realizar la obtención y lavado de glóbulos rojos de acuerdo a la siguiente metodología: se extrajo sangre de diferentes tipos (A,B,O) aproximadamente 5ml, se realizó el lavado de las células rojas con solución salina al 0.9%, se centrifugo a 1500 rpm durante 10 minutos para sedimentar los glóbulos rojos y se desechó el sobrenadante, este procedimiento se repitió dos o tres veces según sea necesario hasta que el sobrenadante este totalmente claro, una vez que estén lavadas realizo una dilución 1/20 de las células con solución salina al 0.9% en tubos estériles y trabajamos con esta dilución, se colocaron 200ul del extracto en un tubo de vidrio y luego se procedió a realizar diluciones (1/8 y 1/32) y sobre cada dilución se adicionaron 100ul de solución de glóbulos rojos, se agito suavemente y la mezcla se dejó en reposo a 37°C en la estufa durante una hora, luego se determinó el resultado, de acuerdo al siguiente criterio cualitativo: Aglutinación muy alta +++++; aglutinación alta ++++; aglutinación media ++; aglutinación débil + y ausencia de aglutinación -.

3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En la presente investigación se realizaron estudios de la actividad hemoaglutinante y antibacteriana de los extractos obtenidos de Algas y Líquenes, colectadas en los alrededores de la zona de la Laguna de Ozogoché en la provincia de Chimborazo, cantón Alausi, parroquia de Achupallas – Ecuador.

Mediante las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana realizada por el método de microdilución, se logró comprobar que los extractos obtenidos en solventes orgánicos (metanol y hexano), inhibieron el crecimiento de dos cepas bacterianas (Tablas y Figuras 1, 2, 3 y 4) mientras que algunos de los extractos acuosos obtenidos de las muestras mostraron actividad hemoaglutinante (Tablas 5, 6 y 7) por lo que confirma la importancia y beneficios de las sustancias químicas que componen tanto a las Algas como a los Líquenes.

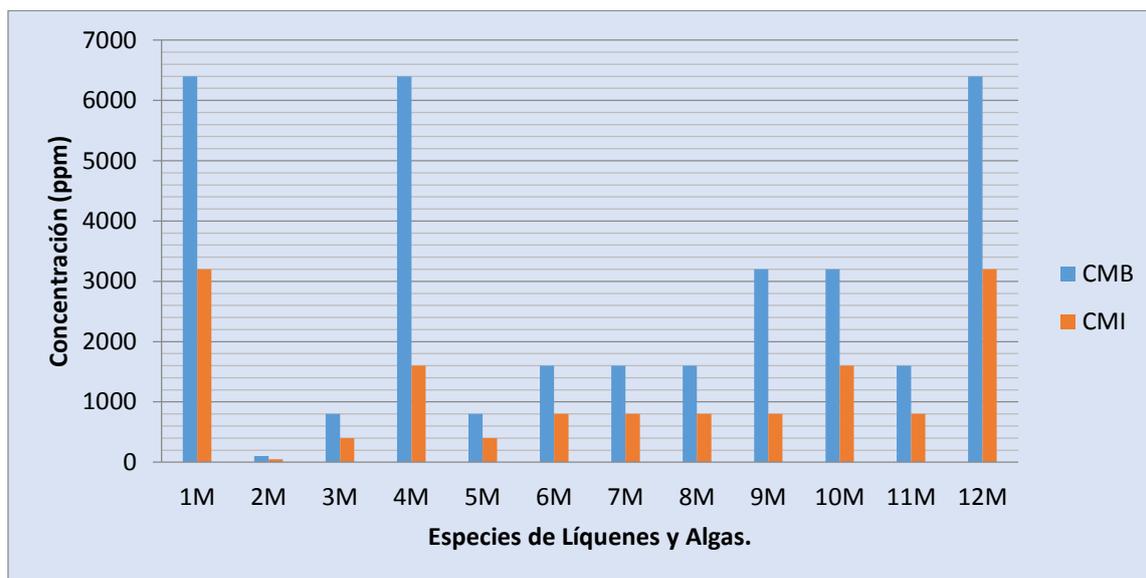
Ensayo de la Actividad Antibacteriana.

La evaluación de la actividad antibacteriana frente al *Staphylococcus Aureus*, mostró que el extracto de *Peltigera sp* en Metanol, presentó la más importante actividad bactericida, con un valor de CMB de 100ppm y una CMI entre 50 y 100ppm, mientras que el extracto metanólico de *Parmelia sp 1*, mostró los valores de actividad más bajos: CMB de 6400ppm y una CMI entre 800 y 1600ppm (Tabla y Figura 1).

Tabla N° 1 Actividad de los Extractos Metanólicos frente a *Staphylococcus Aureus* (ATTC 6538P).

Extractos.	CMB	CMI
1M (<i>Cladonia sp</i>)	6400ppm	3200-6400ppm
2M (<i>Peltigera sp</i>)	100ppm	50-100ppm
3M (<i>Parmelia sp1</i>)	800ppm	200-400ppm
4M (<i>Parmelia sp2</i>)	>6400ppm	800-1600ppm
5M (<i>Cora sp</i>)	800ppm	400-8000ppm
6M (<i>Parmelia sp3</i>)	1600ppm	800-1600ppm
7M (<i>Parmelia sp4</i>)	1600ppm	800-1600ppm
8M (<i>Usnea sp</i>)	1600ppm	800-1600ppm
9M (<i>Vallisneria sp</i>)	3200ppm	400-800ppm
10M (<i>Egeria sp1</i>)	3200ppm	800-1600ppm
11M (<i>Egeria sp2</i>)	1600ppm	400-800ppm
12M (<i>Ceratophyllum sp</i>)	6400ppm	1600-3200ppm

Figura 1. Actividad de los Extractos Metanólicos frente a *Staphylococcus Aureus* (ATTC 6538P).



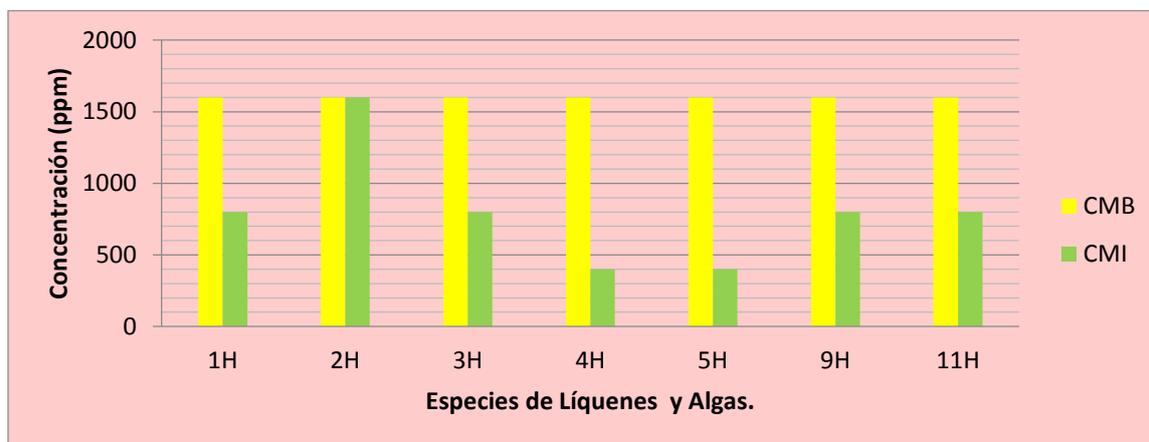
1M (*Cladonia sp.*), 2M (*Peltigera sp.*), 3M (*Parmelia sp1.*), 4M (*Parmelia sp2.*), 5M (*Cora sp.*), 6M (*Parmelia sp3.*), 7M (*Parmelia sp4.*), 8M (*Usnea sp.*), 9M (*Vallisneria sp.*), 10M (*Egeria sp1.*), 11M (*Egeria sp2.*) y 12M (*Ceratophyllum sp.*).

Con respecto a los extractos hexanólicos la evaluación de la actividad antibacteriana frente al *Staphylococcus Aureus*, mostró que el extracto de *Cora sp.*, posee una CMB de 1600ppm y una CMI entre 200 y 400ppm siendo esta la más relevante, mientras que el extracto de *Peltigera sp.*, obtuvo una CMB y CMI mayor a 1600ppm (Tabla y Figura 2).

Tabla N° 2 Actividad de los Extractos Hexanólicos frente a *Staphylococcus Aureus* (ATTC 6538P).

Extractos.	CMB	CMI
1H (<i>Cladonia sp.</i>)	>1600ppm	800-1600ppm
2H (<i>Peltigera sp.</i>)	>1600ppm	>1600ppm
3H (<i>Parmelia sp1.</i>)	>1600ppm	400-800ppm
4H (<i>Parmelia sp2.</i>)	>1600ppm	200-400ppm
5H (<i>Cora sp.</i>)	1600ppm	200-400ppm
9H (<i>Vallisneria sp.</i>)	>1600ppm	800-1600ppm
11H (<i>Egeria sp2.</i>)	1600ppm	800-1600ppm

Figura 2. Actividad de los Extractos Hexanólicos frente a *Staphylococcus Aureus* (ATTC 6538P).



1H (*Cladonia sp*), 2H (*Peltigera sp*), 3H (*Parmelia sp1.*), 4H (*Parmelia sp2.*), 5H (*Cora sp*), 9H (*Vallisneria sp*), 11H (*Egeria sp2*)

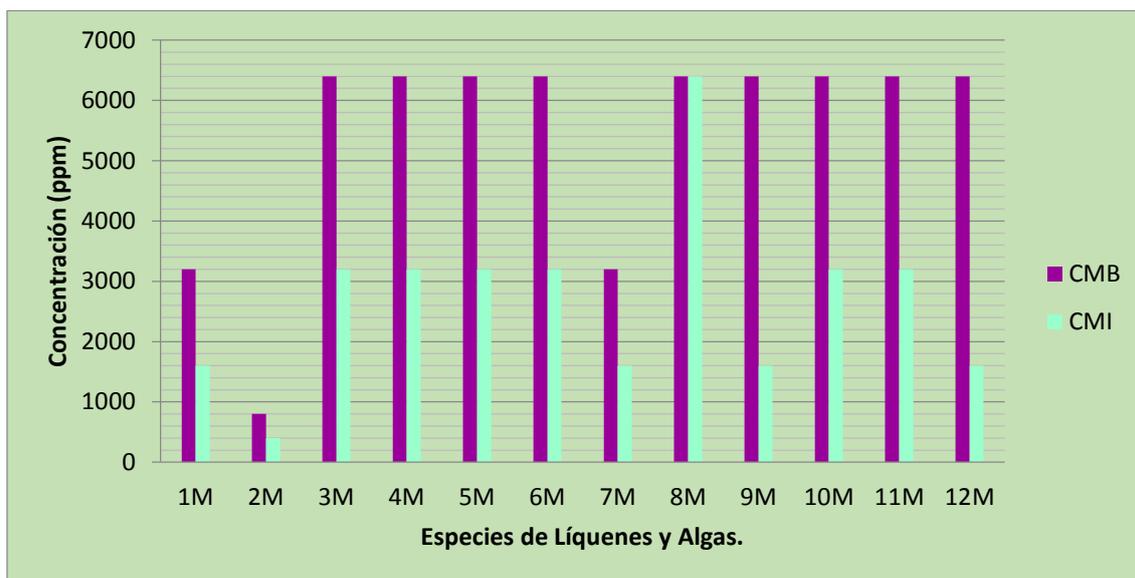
Vaillant D en el 2014 al igual que nosotros reporta actividad bactericida *in vitro* para metabolitos obtenidos a partir de la especie *Peltigera leucophebia* y especies del genero *Usnea*.

La evaluación de la actividad antibacteriana frente a la *Escherichia Coli*, mostró que el extracto de *Peltigera sp* en Metanol, presento la más alta actividad bactericida, con un valor de CMB de 800ppm y una CMI entre 400 y 800ppm, mientras que el extracto metanolico de *Usnea sp*, mostró los valores de actividad más bajos, CMB y CMI mayor a 6400ppm (Tabla y Figura 3).

Tabla N° 3 Actividad de los Extractos Metanólicos frente a *Escherichia Coli* (ATTC 10536).

Extractos.	CMB	CMI
1M (<i>Cladonia sp</i>)	3200ppm	1600-3200ppm
2M (<i>Peltigera sp</i>)	800ppm	400-800ppm
3M (<i>Parmelia sp1</i>)	>6400ppm	1600-3200ppm
4M (<i>Parmelia sp2</i>)	>6400ppm	3200-6400ppm
5M (<i>Cora sp</i>)	6400ppm	3200-6400ppm
6M (<i>Parmelia sp3</i>)	6400ppm	3200-6400ppm
7M (<i>Parmelia sp4</i>)	3200ppm	1600-3200ppm
8M (<i>Usnea sp</i>)	>6400ppm	>6400ppm
9M (<i>Vallisneria sp</i>)	>6400ppm	1600-3200ppm
10M (<i>Egeria sp1</i>)	>6400ppm	3200-6400ppm
11M (<i>Egeria sp2</i>)	>6400ppm	3200-6400ppm
12M (<i>Ceratophyllum sp</i>)	>6400ppm	1600-3200ppm

Figura 3. Actividad de los Extractos Metanólicos frente a *Escherichia Coli* (ATTC 10536).



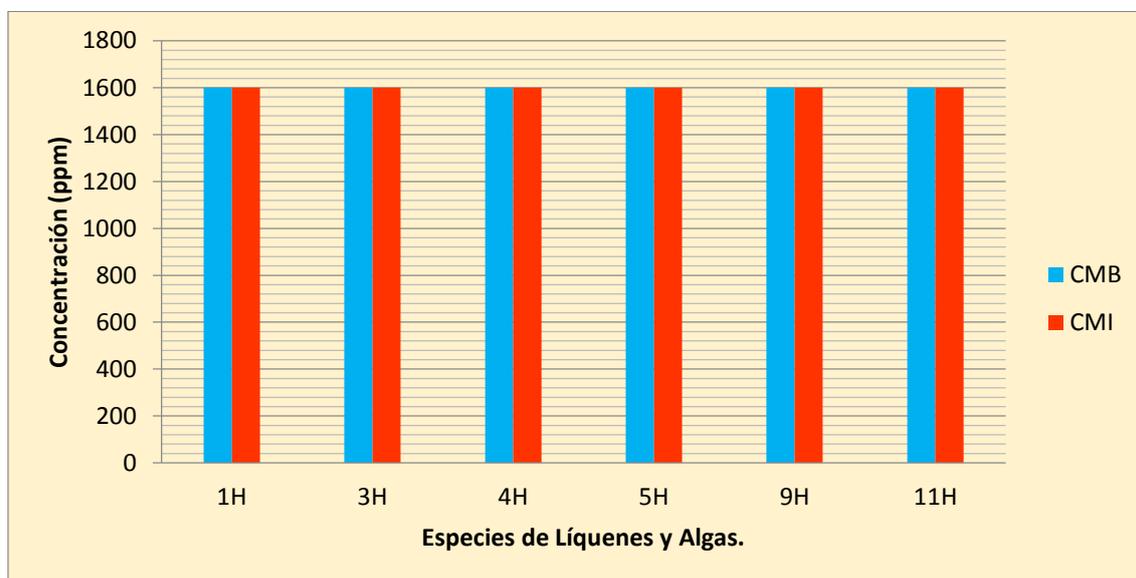
1M (*Cladonia sp*), 2M (*Peltigera sp*), 3M (*Parmelia sp1.*), 4M (*Parmelia sp2.*), 5M (*Cora sp*), 6M (*Parmelia sp3*), 7M (*Parmelia sp4*), 8M (*Usnea sp*), 9M (*Vallisneria sp*), 10M (*Egeria sp1*), 11M (*Egeria sp2*) y 12M (*Ceratophyllum sp*).

Con respecto a los extractos hexanólicos la actividad antibacteriana frente a la *Escherichia Coli*, mostró que el extracto de *Cladonia sp*, *Parmelia sp 1*, *Parmelia sp 2*, *Cora sp*, *Vallisneria sp* y *Egeria sp2*, posee una CMB y CMI mayor a 1600ppm (Tabla y Figura 4).

Tabla N° 4 Actividad de los Extractos Hexanólicos frente a *Escherichia Coli* (ATTC 10536).

Extractos.	CMB	CMI
1H (<i>Cladonia sp</i>)	>1600ppm	>1600ppm
3H (<i>Parmelia sp1</i>)	>1600ppm	>1600ppm
4H (<i>Parmelia sp2</i>)	>1600ppm	>1600ppm
5H (<i>Cora sp</i>)	>1600ppm	>1600ppm
9H (<i>Vallisneria sp</i>)	>1600ppm	>1600ppm
11H (<i>Egeria sp2</i>)	>1600ppm	>1600ppm

Figura 4. Actividad de los Extractos Hexanólicos frente a *Escherichia Coli* (ATTC 10536).



1H (*Cladonia sp*), 3H (*Parmelia sp1.*), 4H (*Parmelia sp2.*), 5H (*Cora sp*), 9H (*Vallisneria sp*), 11H (*Egeria sp2*).

En nuestro caso se observó mayor actividad antibacteriana de los extractos metanólicos del *Peltigera sp*, frente al *Staphylococcus aureus* que en la *Escherichia Coli*, de acuerdo a los resultados obtenidos por Manojlović y col. 2012, esto podría deberse a diferencias en la composición de la pared celular de ambas bacterias, siendo la pared de la *Escherichia Coli* más compleja (péptidoglicano, lipopolisacáridos y lipoproteínas) lo cual la hace poco permeable y difícil de atacar. Sin embargo en nuestro caso obtuvimos actividad bactericida contra *Escherichia Coli* particularmente en el caso del extracto *peltigera sp*.

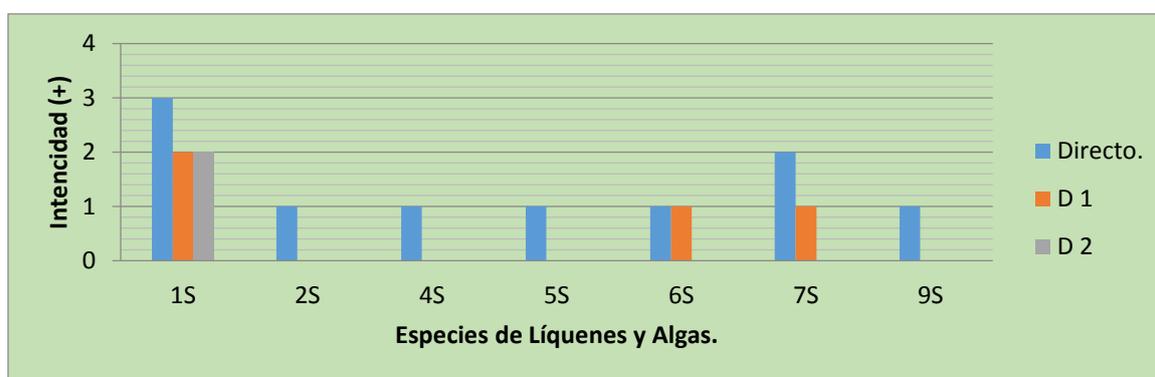
Ensayo de la Actividad Hemoaglutinante.

La evaluación de la actividad hemoaglutinante con respecto al grupo sanguíneo “A” Rh (+), mostró que el extracto acuoso de *Cladonia sp*, presentó la más alta actividad hemoaglutinante, con respecto a los otros extractos evaluados (Tabla y Figura 5). Según Castillo A, los estudios de lectinas liquénicas han sido enfocados al mecanismo de reconocimiento, más no al potencial efecto anticancerígeno, debido a sus propiedades específicas, las lectinas se han utilizado como herramientas en la bioquímica, biología celular, inmunología, genética y biomedicina con propósitos analíticos y preparativos, así como para el diagnóstico y terapia en el cáncer

Tabla N° 5 Actividad de los Extractos Acuosa frente al grupo sanguíneo “A” Rh (+).

Extractos.	Directo.	1/8	1/32
1S (<i>Cladonia sp</i>)	+++	++	++
2S (<i>Peltigera sp</i>)	+	-	-
4S (<i>Parmelia sp2</i>)	+	-	-
5S (<i>Cora sp</i>)	+	-	-
6S (<i>Parmelia sp3</i>)	+	+	-
7S (<i>Parmelia sp4</i>)	++	+	-
9S (<i>Vallisneria sp</i>)	+	-	-

Figura 5. Actividad de los Extractos Acuosa frente al grupo sanguíneo “A” Rh (+).



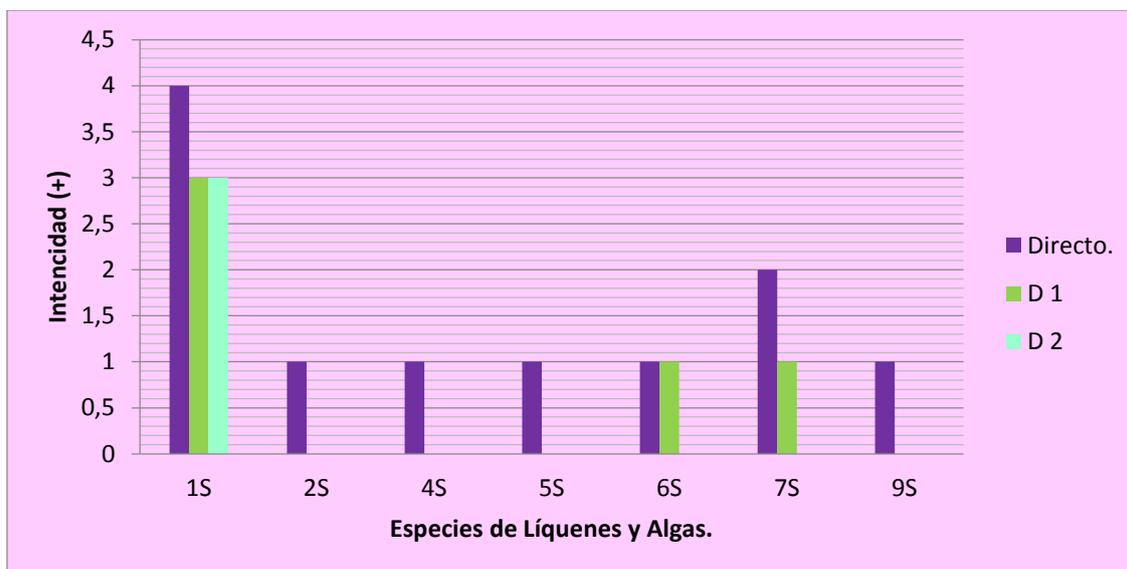
1S (*Cladonia sp*), 2S (*Peltigera sp*), 4S (*Parmelia sp2.*), 5S (*Cora sp*), 6S (*Parmelia sp3*), 7S (*Parmelia sp4*), 9S (*Vallisneria sp*).

La evaluación de la actividad hemoaglutinante con respecto al grupo sanguíneo “B” Rh (+), presentó que el extracto acuoso de *Cladonia sp*, tiene la más alta actividad hemoaglutinante, con respecto a los otros extractos evaluados (Tabla y Figura 6).

Tabla N° 6 Actividad de los Extractos Acuosa frente al grupo sanguíneo “B” Rh (+).

Extractos.	Directo.	1/8	1/32
1S (<i>Cladonia sp</i>)	++++	+++	++
2S (<i>Peltigera sp</i>)	+	-	-
4S (<i>Parmelia sp2</i>)	+	-	-
5S (<i>Cora sp</i>)	+	-	-
6S (<i>Parmelia sp3</i>)	+	+	-
7S (<i>Parmelia sp4</i>)	++	+	-
9S (<i>Vallisneria sp</i>)	+	-	-

Figura 6. Actividad de los Extractos Acuoso frente al grupo sanguíneo “B” Rh (+).



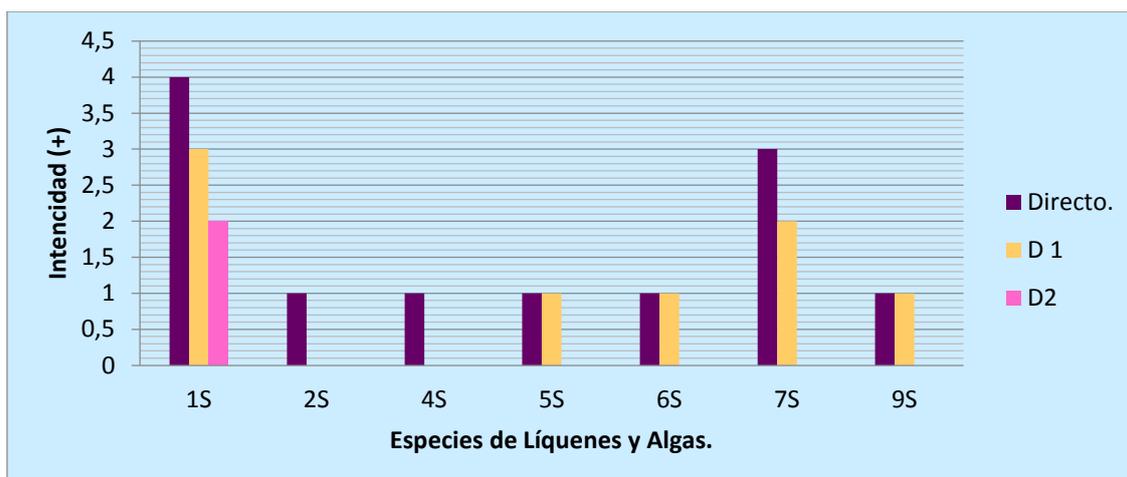
1S (*Cladonia sp*), 2S (*Peltigera sp*), 4S (*Parmelia sp2.*), 5S (*Cora sp*), 6S (*Parmelia sp3*), 7S (*Parmelia sp4*), 9S (*Vallisneria sp*).

La evaluación de la actividad hemoaglutinante con respecto al grupo sanguíneo “O” Rh (+), revelo que el extracto acuoso de *Cladonia sp*, mostró la más alta actividad hemoaglutinante, con respecto a los otros extractos evaluados (Tabla y Figura 6).

Tabla N° 7 Actividad de los Extractos Acuoso frente al grupo sanguíneo “O” Rh (+).

Extractos.	Directo.	1/8	1/32
1S (<i>Cladonia sp</i>)	++++	+++	++
2S (<i>Peltigera sp</i>)	+	-	-
4S (<i>Parmelia sp2</i>)	+	-	-
5S (<i>Cora sp</i>)	+	+	-
6S (<i>Parmelia sp3</i>)	+	+	-
7S (<i>Parmelia sp4</i>)	+++	++	-
9S (<i>Vallisneria sp</i>)	+	+	-

Figura 7. Actividad de los Extractos Acuósos frente al grupo sanguíneo “O” Rh (+).



1S (*Cladonia sp*), 2S (*Peltigera sp*), 4S (*Parmelia sp2.*), 5S (*Cora sp*), 6S (*Parmelia sp3*), 7S (*Parmelia sp4*), 9S (*Vallisneria sp*).

En nuestra evaluación obtuvimos mayor actividad hemoaglutinante de los extractos acuósos de la *Cladonia sp*, frente a los grupos sanguíneos “A” Rh (+), “B” Rh (+) y “O” Rh (+) presentando una actividad hemoaglutinante relevante con los tres tipos de sangre. Según Chicaiza M, los estudios realizados in vitro e in vivo sobre las lectinas y su participación en el cáncer han sido numerosos y demuestran que éstas pueden modular diversos procesos biológicos, tales como el crecimiento celular, la adhesión, acoplamiento, transformación maligna, metástasis y apoptosis, la presencia de las lectinas en líquenes ya se encuentra evidenciada en bibliografía, siendo estas glicoproteínas de origen fúngico, aunque su enfoque está dirigido más al mecanismo de reconocimiento que presentan como moléculas de señalización, y ya se ha tratado de elucidar su secuencia de aminoácidos, más no se ha probado como terapia contra el cáncer.

CAPITULO IV.

4 Conclusiones y recomendaciones.

4.1 Conclusiones.

- Las Algas y los Líquenes fueron identificadas a través de fotografías y bibliografías por el PhD Gerardo Medina, y se les codifico con números del 1 al 8 a los líquenes y del 9 al 12 a las algas acompañadas con letras de acuerdo al solvente utilizado M (metanol) H (hexano) y S (solución salina).
- Las especies de algas y líquenes colectadas en la laguna de Ozogoché poseen moléculas con actividad antibacteriana, siendo la más importante la mostrada por el extracto metanólico de *Peltigera sp* en el cual se evidenció una concentración mínima bactericida (CMB) con un valor de 100ppm y una concentración mínima inhibitoria (CMI) entre 50 y 100ppm, frente a la cepa bacteriana *Staphylococcus Aureus*. Obteniéndose también una actividad menos relevante frente a la cepa bacteriana *Escherichia Coli*.
- La evaluación de la actividad hemoaglutinante mostro que todos los extractos presentaron actividad, siendo la más importante la encontrada en el extracto acuoso obtenido a partir de *Cladonia sp* frente a todos los grupos sanguíneos evaluados (“A”, “B” y “O” Rh +).

4.2 Recomendaciones.

- ❖ Realizar una investigación exhaustiva de las lectinas presentes en algas y líquenes del Ecuador, sería de gran aporte. Aislarlas, purificarlas y estudiar el efecto anticancerígeno sobre líneas celulares.
- ❖ Un estudio de la presencia de moléculas antimicrobianas en las algas de aguas frías y dulces, también ayudaría para obtener una información más clara y concisa en el tema.
- ❖ Determinar la actividad antimicrobiana frente a otras cepas de interés clínico, así como frente a hongos.
- ❖ Realizar un estudio de la actividad hemoaglutinante de las algas y los líquenes existentes en el Ecuador, porque no existe información sobre ello.

5 Bibliografía.

1. Charzeddine L, Fariñas M. Propiedades bioactivas de algas marinas del nororiente de Venezuela. Cumana - Venezuela. [Internet]. 2001 Jul [citado 18 Nov 2016]. Disponible en: <http://www.bionica.info/biblioteca/Charzeddine2001PropiedadesBioactivasDeAlgasMarinas.pdf>
2. Sanz V. Antirretrovirales de origen natural: lectinas. [Internet]. 2015. [citado 18 Dic 2016] Disponible en: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/VERONICA%20SANZ%20MADRO%C3%91AL.pdf>
3. Reyes B, Gallegos R. Lectinas Vegetales: Una Alternativa Terapéutica para el Cáncer. DCE. [Internet]. 2011. [citado 05 Ene 2016]; 19(5):179-182. Disponible en: <http://www.index-f.com/dce/19pdf/19-179.pdf>
4. García D. Evaluación in vitro de la actividad antibacteriana y antimicótica de los extractos de dos especies de plantas del género amaranthus aplicado sobre cepas de interés clínico en el periodo diciembre de 2013 – mayo de 2014. Riobamba - Ecuador. [Internet]. 2015. [citado 18 Nov 2016] Disponible en: <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/1305/1/UNACH-EC-LAB.CLIN-2015-0004.pdf>
5. Thomas G. El primer informe mundial de la OMS sobre la resistencia a los antibióticos pone de manifiesto una grave amenaza para la salud pública en todo el mundo [Internet]. 2014 [citado 14 Jul 2016]; Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/>
6. Hernández L. Plantas medicinales: fuente natural de medicamentos. Puebla-México. [Internet]. 2015. [citado 12 Dic 2016]. Disponible en: <http://blog.udlap.mx/blog/2015/02/plantasmedicinalesfuentenaturaldemedicamentos/>
7. Tortora G, Funke B, Case C. Introducción a la Microbiología. (9na edición). Buenos Aires: Medica Panamericana; 2007. Pp. 357-361.)
8. Castro P, Huber M. Biología Marina. (6ta edición). Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2007. Pp. 108,109.
9. Tortora G, Funke B, Case C. Introducción a la Microbiología. (9na edición). Buenos Aires: Medica Panamericana; 2007. Pp. 355.
10. Rodríguez O, Andrade W, Díaz F, Moncada B. Actividad antimicrobiana de líquenes de la cuenca alta del rio Bogotá. Bogotá - Colombia. [Internet]. 2015. [citado 12 Dic

- 2016]. Disponible en:
file:///C:/Users/Usuario/Desktop/tesis/UNAD.pdf%20liquenes.pdf
11. Perico L. Antioxidantes de los líquenes *Stereocaulon strictum* (Stereocaulaceae) y determinación de su potencial citotoxicidad. Bogotá-Colombia. [Internet]. 2011. [citado 19 Ene 2017]. Disponible en:
<http://www.bdigital.unal.edu.co/10563/1/192832.2011.pdf>
 12. Campos L, Uribe J, Aguirre J. SANTA MARÍA, LÍQUENES, HEPÁTICAS Y MUSGOS. (1era edición). Bogotá-Colombia: Panamericana Formas e Impresos; 2008. Pp. 13.
 13. Tortora G, Funke B, Case C. Introducción a la Microbiología. (9na edición). Buenos Aires: Medica Panamericana; 2007. Pp. 356.
 14. Gonzales A. OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS ETANOLICOS DE PLANTAS DEL AMAZONAS. Colombia. [Internet]. 2004 Abril [citado 11 Nov 2016]. Disponible en:
<http://www.bdigital.unal.edu.co/1173/1/angelaandregonzalezvilla.2004.pdf>
 15. Carrillo M. Utilización de lectinas en la inhibición de la adhesión de *Pasteurella multocida*. RMV. [Internet]. 2013. [citado 12 Ene 2016]; N°25:93-107. Disponible en:
<http://www.scielo.org.co/pdf/rmv/n25/n25a09.pdf>
 16. Tapia E. Valoración de la aloinmunización mediante la realización de las pruebas cruzadas al transfundir concentrados de glóbulos rojos empaquetados desleucocitados por centrifugación, de la unidad de cuidados críticos del hospital general docente de Riobamba. Riobamba-Ecuador. [Internet]. 2013 [citado 16 Dic 2016]. Disponible en:
<http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/1154/1/UNACH-EC-LAB.CLIN-2013-0029..pdf>
 17. Campoverde M, Pomaquiza G. Determinación de la actividad antibacteriana de euglena viridis y oscillatoria sp sobre *staphylococcus aureus* y *escherichia coli*. Cuenca - Ecuador. [Internet]. 2014 [citado 12 Dic 2016]. Disponible en:
<http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/5040/1/Tesis.pdf>
 18. Audesirk T, Audesirk G, Byers B. Biología ciencia y naturaleza. (2da edición). México: Pearson Educación; 2008. Pp. 75, 76.
 19. Martínez J, Sánchez F. Mecanismo de acción de los antibióticos. Barcelona-España. [Internet]. 2007 Sep. [citado 16 Ene 2017]. Disponible en:
<http://www.jano.es/ficheros/sumarios/1/0/1660/28/1v0n1660a13108119pdf001.pdf>

20. Toro C. Mecanismo de acción y resistencia a antibióticos. Chile. [Internet]. 2008 [citado 14 Ene 2017]. Disponible en: file:///C:/Users/ALEXA/Downloads/Antimicrobianos_Dra._Toro_.pdf
21. Morales M. Antimicrobianos: una revisión sobre mecanismos de acción y desarrollo de resistencia. [Internet][citado 16 Ene 2017]. Disponible en: <http://www.binasss.sa.cr/revistas/amc/v28n2/art3.pdf>
22. Araujo L, Moujir L, Rojas J, Rojas L, Carmona J. Chemical Composition and Biological Activity of Conyza bonariensis Essential Oil Collected in Mérida, Venezuela. NPC. [Internet]. 2013. [citado 22 Feb 2017]; 8(8):1175-1178. Disponible en: <http://europepmc.org/abstract/med/24079198>
23. Vaillant D, Gómez M, Romeu C, Ramirez R, Porras A. Actividad antifúngica de extractos de tres especies de Líquenes en Cuba. Agron Mesoam: [Internet]. 2015. [citado 22 Feb 2017]; 26(2):345-350. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15517/am.v26i2.19328>
24. Manojlović N, Ranković B, Kosanić M, Vasiljević P, Stanojković T. Chemical composition of three Parmelia lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites. Phytomedicine. [Internet]. 2012. [citado 26 Feb 2017]; 19(2012):1166-1172. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/232907169>
25. Castillo A. Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer. RIC. [Internet]. 2005. [citado 12 Ene 2016]; 57(1):55-64. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/ric/v57n1/v57n1a7.pdf>
26. Chicaiza M. “Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de diferentes extractos del liquen *parmelina tiliacea*”. Riobamba - Ecuador. [Internet]. 2015. [citado 18 Nov 2016] Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4540/1/56T00580%20UDCTFC.pdf>

6 Anexos.

Anexo N° 1 LAGUNA DE OZOGOCHÉ.



Fotografía: Laguna de Ozogoché Alausi-Ecuador.
Autor: Cepeda Marcia

Anexo N° 2 COLECTA DE LAS MUESTRAS DE LÍQUENES EN LA ROCA DE LOS ALREDEDORES DE LA LAGUNA DE OZOGOCHÉ.



Fotografía: Alrededor de la Laguna de Ozogoché Alausi-Ecuador.
Autor: Cepeda Marcia

Anexo N° 3 MUESTRAS OBTENIDAS DE LA COLECTA EN LA LAGUNA DE OZOGOCHÉ Y SUS ALREDEDORES.



Fotografía: Alrededor de la Laguna de Ozogoché Alausi-Ecuador.
Autor: Cepeda Marcia

**Anexo N° 4 AREA DE BALANZA PARA PESAR LAS MUESTRAS
OBTENIDAS.**



**Fotografía: Laboratorio de bioquímica de la Facultad de Ingeniería UNACH-Riobamba
Autor: Cepeda Marcia**

**Anexo N° 5 ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS EN EXTRACTOS
LIQUIDOS.**



**Fotografía: Laboratorio de bioquímica de la Facultad de Ingeniería UNACH-Riobamba
Autor: Cepeda Marcia**

**Anexo N° 6 SECADO DE LAS MUESTRAS EN SOLVENTES ORGANICOS
(METANOL Y HEXANO).**



**Fotografía: Laboratorio de bioquímica de la Facultad de Ingeniería UNACH-Riobamba
Autor: Cepeda Marcia**

**Anexo N° 7 ESTUFA CON LAS MUESTRAS EN PROCESO DE SECADO
PARA OBTENER EL EXTRACTO.**



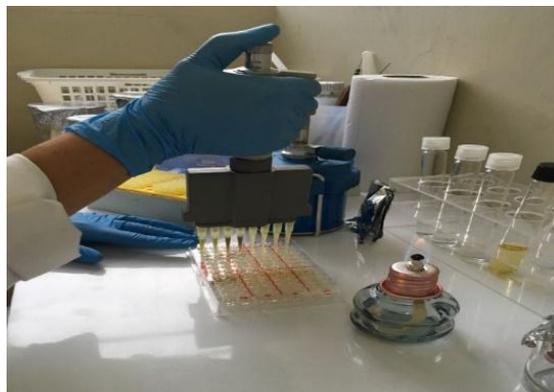
**Fotografía: Laboratorio de bioquímica de la Facultad de Ingeniería UNACH-Riobamba
Autor: Cepeda Marcia**

**Anexo N° 8 EXTRACTOS DE ALGAS Y LIQUENES CON DMSO EN TUBO
EPENDOR.**



**Fotografía: Laboratorio de investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud UNACH-Riobamba
Autor: Cepeda Marcia**

**Anexo N° 9 MICRO DILUCIÓN SERIADA EN PLACA DE 96 POCILLOS CON
LA PIPETA MULTICANAL.**



**Fotografía: Laboratorio de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud UNACH-Riobamba
Autor: Cepeda Marcia**

**Anexo N° 10 ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE DE LOS EXTRACTOS DE
ALGAS Y LIQUENES.**



**Fotografía: Laboratorio de bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud UNACH-Riobamba
Autor: Cepeda Marcia**