

# UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO



## FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

### CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO

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

#### TRABAJO DE TITULACIÓN

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS METANÓLICOS DE *Tanacetum* spp FRENTE A CEPAS ATCC. UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO. ABRIL-JULIO 2018

**Autora:** Priscila Jacqueline Cushquicushma Chisaguano

**Tutor:** Mgs. Félix Falconí Ontaneda

**Riobamba – Ecuador**

**2018**

## REVISIÓN DEL TRIBUNAL

Los miembros del tribunal de graduación del proyecto de investigación de título: “Actividad antibacteriana de extractos metanólicos de *Tanacetum* spp frente a cepas ATCC. Universidad Nacional de Chimborazo. Abril-julio 2018”, presentado por Priscila Jacqueline Cushquicushma Chisaguano y dirigido por: Mgs. Félix Falconí Ontaneda, 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. Liliana Araujo Baptista Ph.D.**

Presidente del Tribunal

Firma

**Dr. Celio García Ramírez**

Miembro del tribunal

Firma

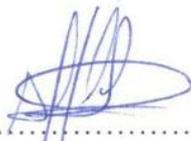
**Lcda. Elena Brito**

Miembro del tribunal

Firma

## **DECLARACIÓN DEL TUTOR**

Yo, Félix Falconí Ontaneda docente de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico en calidad de Tutor del proyecto de investigación con el tema: “Actividad antibacteriana de extractos metanólicos de *Tanacetum* spp frente a cepas de ATCC. Universidad Nacional de Chimborazo. Abril-julio 2018”, propuesto por Priscila Jacqueline Cushquicushma Chisaguano, egresada 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 encuentra apta para la defensa pública del proyecto. Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad facultando a los interesados hacer uso del presente para los trámites correspondientes.



.....  
Mgs. Félix Falconí Ontaneda

**Docente de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico**

## **AUTORIA DE LA INVESTIGACIÓN**

La responsabilidad del contenido de este Proyecto de Graduación, corresponde exclusivamente a la autora Priscila Jacqueline Cushquicushma Chisaguano con cédula de identidad número 060465770-0 y el Director del Proyecto Mgs. Félix Falconí Ontaneda; y el patrimonio intelectual de la misma a la Universidad Nacional de Chimborazo.



Priscila Jacqueline Cushquicushma Chisaguano

C.I 060465770-0

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a la Universidad Nacional de Chimborazo por darme la oportunidad de haber estudiado en esta noble institución y poder ser una futura profesional en el ámbito de salud.

De igual manera a mi tutor Mgs. Félix Falconí quien con su esfuerzo y dedicación me guió y encaminó para realizar la presente investigación.

## **DEDICATORIA**

Dedico con mucho amor y cariño a Dios que día a día ilumina mi vida, y en momentos de debilidad no me deja caer.

A mis padres por todo su esfuerzo y sacrificio para darme una oportunidad de estudiar una carrera para mi futuro.

A mi esposo e hija por ser mi fuente de motivación e inspiración para poder superarme cada día y así poder luchar para que la vida nos depare un futuro mejor.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	1
OBJETIVOS .....	3
Objetivo general .....	3
Objetivos específicos .....	3
Antecedentes Históricos .....	4
Importancia de las Plantas Medicinales .....	4
Principios Activos de las Plantas Medicinales .....	4
<i>Tanacetum</i> spp.....	5
Rotaevaporación .....	6
Cepas de Interés Clínico .....	7
<i>Escherichia coli</i> .....	7
<i>Staphylococcus aureus</i> .....	8
<i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	8
Métodos de Determinación de Actividad Antibacteriana.....	9
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN .....	11
TIPO DE INVESTIGACIÓN .....	11
COHORTE .....	11
CARÁCTER.....	11
DETERMINACIÓN DE LA POBLACIÓN Y MUESTRA .....	11
TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS .....	12
PROCEDIMIENTOS DE LA INVESTIGACIÓN .....	12
Preparación de las Muestras .....	12
Obtención de las Partes de la Planta Obtenidas por Maceración con Metanol .....	12
Filtración de los Extractos Metanólicos .....	13

Obtención de los Extractos Metanólicos de las Partes de las Flores, Hojas y Tallos de la Planta <i>Tanacetum</i> spp.....	13
Determinación de la Actividad Antibacteriana de Extractos Metanólicos de la Planta <i>Tanacetum</i> spp. frente a Cepas Bacterianas ATCC.....	13
Preparación del Preinóculo.....	13
Preparación del Inóculo.....	13
Preparación de la Solución Stock de los Extractos .....	14
Preparación de las Diferentes Concentraciones de los Extractos .....	14
Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	14
ANÁLISIS DE DATOS .....	15
RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	16
Actividad Antibacteriana de los Extractos .....	16
CONCLUSIONES.....	19
RECOMENDACIONES .....	20
BIBLIOGRAFÍA .....	21
ANEXOS .....	26

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Interpretación de Antibiograma de las Partes de los Extractos Metanólicos frente a Cepas Bacterianas ATCC de Interés Clínico.....	25
Tabla 2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los Extractos Metanólicos de las Flores frente a Cepas ATCC.....	26
Tabla 3. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los Extractos Metanólicos de las Hojas frente a Cepas ATCC.....	26
Tabla 4. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los Extractos Metanólicos de los Tallos frente a Cepas ATCC.....	27

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Rotavapor .....	7
Figura 2. Fracciones Maceradas de la Planta <i>Tanacetum</i> spp .....	27

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo la determinación de la actividad antibacteriana de extractos metanólicos de la especie *Tanacetum* spp. frente a cepas ATCC tales como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los extractos metanólicos se obtuvieron de las partes de la planta colectada es decir flores, hojas y tallos estas fueron sometidas a un proceso de secado, pulverización y maceración en metanol durante 72 horas y luego el metanol fue separado por rotaevaporación. Las pruebas de actividad antibacteriana se realizaron bajo la directriz de la técnica de antibiograma basado en Kirby Bauer y las normas del Clinical & Laboratory Standards Institute M100 28<sup>th</sup> (CLSI) con el uso de los controles respectivos. Se cargaron discos de sensibilidad con concentraciones de 100000, 50000, 25000, 12500, 6250 µg/mL de cada uno de las diferentes partes de la planta. Los extractos presentaron diferente actividad antibacteriana frente a las cepas en estudio, siendo así la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las flores para *E. coli* y *S. aureus* de 25000 µg/mL, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* 100000 µg/mL. La CMI del extracto de las hojas para *E. coli* y *S. aureus* resulto en 50000 µg/mL; *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* no mostró inhibición. El extracto obtenido de los tallos no mostró actividad antibacteriana frente a las bacterias en estudio a las concentraciones ensayadas. Se confirmó por medio de siembra en placas muestras de cada uno de las diferentes concentraciones para verificar la presencia o no de colonias bacterianas.

Palabras claves: *Tanacetum* spp. actividad antibacteriana, extractos metanólicos.

## ABSTRACT

The objective of this research was to determine the antibacterial activity of methanolic extracts of the species *Tanacetum* spp. against ATCC strains such as *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. The methanolic extracts were obtained from the parts of the collected plant i.e. flowers, leaves and stems, these were subjected to a drying process, pulverization and maceration in methanol for 72 hours and then the methanol was separated by rotaevaporation. Antibacterial activity tests were performed under the antibiotic-based screening guideline and the Clinical & Laboratory Standards Institute standards M100 28th (CLSI) with the use of the respective controls. Discs of sensitivity were loaded with concentrations of 100000, 50000, 25000, 12500, 6250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of each of the different parts of the plant. The extracts presented different antibacterial activity against the strains under study, thus being the minimum inhibitory concentration (MIC) of the flowers for *E. coli* and *S. aureus* of 25000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* 100000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The MIC of the leaf extract for *E. coli* and *S. aureus* resulted in 50000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* showed no inhibition. The extract obtained from the stems showed no antibacterial activity against the bacteria under study at the concentrations tested. Samples from each of the different concentrations were confirmed by plating in order to verify the presence or absence of bacterial colonies.

Keywords: *Tanacetum* spp, antibacterial activity, methanolic extracts.



Translation reviewed by Narcisa Fuertes.

Language Center Teacher.

## INTRODUCCIÓN

El reino vegetal ofrece gran variedad de sustancias potencialmente útiles para tratar problemas de enfermedades humanas incluyendo las producidas por microorganismos infecciosos <sup>(1)</sup>. Las plantas medicinales son consideradas como una fuente potencial de nuevos tratamientos sobre todo si su contenido de fitoquímicos es de poco o nulo efecto tóxico. Ante esto, los estudios científicos promueven la búsqueda de nuevos principios activos con actividad antibacteriana por lo que, el empleo de plantas medicinales y de productos derivados de las mismas está aumentando de manera importante frente al problema de resistencia a los antibióticos comerciales <sup>(2)</sup>.

El conocimiento de las propiedades de las plantas medicinales se ha extendido de tal forma, que mucha gente las sigue utilizando como medicina alternativa y en ocasiones como apoyo a la llamada medicina tradicional, para evitar la utilización de antibióticos comerciales <sup>(3)</sup>. Para determinar la efectividad de estos, en los laboratorios clínicos se realizan las pruebas de antibiogramas que son de gran apoyo para los conocedores de medicina ancestral y así facilitarían el trabajo de estos <sup>(4)</sup>.

La importancia de las plantas medicinales se hace más patente en la actualidad en los países en vías de desarrollo. En Pakistán se estima que un 80% de las personas dependen de estas para curarse y un 40% en la China. En países tecnológicamente avanzados como los Estados Unidos se estima que un 60% de la población utiliza habitualmente plantas medicinales para combatir ciertas dolencias. En Japón hay más demanda de plantas medicinales que de medicinas oficiales <sup>(5)</sup>.

El tratamiento de enfermedades muy complejas puede requerir en algunos casos el apoyo de las propiedades medicinales de las plantas o de los derivados que ellas nos proporcionan como lo son los principios activos. La ingestión de vegetales con propiedades antioxidantes, como coles, rábanos, etc., o ciertas liliáceas, como el ajo o la cebolla, tienen la capacidad de contrarrestar la aparición de ciertas enfermedades degenerativas como el cáncer u otras enfermedades del aparato circulatorio <sup>(6)</sup>.

Finalmente, no se debe olvidar el carácter preventivo que las plantas tienen con respecto a la aparición de enfermedades. En este sentido las plantas medicinales superan a los remedios químicos, que se aplican fundamentalmente cuando ya ha aparecido la enfermedad <sup>(7)</sup>. La medicina tradicional es una parte importante y con frecuencia subestimada de los servicios de salud. En algunos países, la medicina tradicional o medicina no convencional suele

denominarse medicina complementaria. Históricamente, la medicina tradicional se ha utilizado para mantener la salud, prevenir y tratar enfermedades, en particular enfermedades crónicas <sup>(8)</sup>.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO), se calcula que las dos terceras partes de la población mundial 4000 millones de personas recurren al uso de plantas medicinales. En América Latina existen alrededor de 250000 especies de plantas medicinales, de las cuales sólo se conoce en parte el 10%, lo que indica lo mucho por investigar y el gran potencial sobre futuros medicamentos. Ecuador es un país que posee gran biodiversidad y alberga una porción importante de éstos, el conocimiento y uso de las plantas medicinales es un componente importante de sus poblaciones indígenas <sup>(9)</sup>. Estudios realizados en Ecuador, en la provincia de Machala determinaron la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos obtenidos de diversas plantas medicinales utilizando la técnica de difusión en agar, frente a cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Todos los extractos analizados, reflejaron la importancia de estas especies en la producción de fitofármacos antibióticos <sup>(10)</sup>.

Estudios clínicos indican que la especie vegetal *Tanacetum* spp. inhibe la sobreproducción de serotonina y prostaglandina que ayudan contra las migrañas limitando la inflamación de los vasos sanguíneos en la cabeza, además de actuar como un tratamiento para las náuseas, la gota y la artritis. Tras realizarse estudios los científicos afirman que esta especie vegetal también reduce la fuerza de los ataques de asma y ayuda a superar la depresión <sup>(11)</sup>.

En nuestro país existen diversos recursos naturales que requieren ser estudiados; entre ellos están especies nativas, muy apreciadas por los pobladores debido a sus propiedades terapéuticas; en este contexto el objetivo del presente trabajo es determinar la actividad antibacteriana del extracto de la especie vegetal *Tanacetum* spp. sobre cepas bacterianas de ATCC, lo que representaría un aporte para disminuir la resistencia bacteriana a antibióticos comerciales que afectan la salud de los ciudadanos.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Determinar la actividad antibacteriana de extractos metanólicos de la especie *Tanacetum* spp. de la familia Asteraceae, comprada en el Mercado San Alfonso de la ciudad de Riobamba a los expendedores de plantas medicinales que crecen en Ecuador, frente a cepas bacterianas ATCC.

### **Objetivos específicos**

- Obtener los extractos metanólicos de las fracciones de las hojas, tallos y flores de la planta *Tanacetum* spp.
- Aplicar ensayos de actividad antibacteriana con los extractos obtenidos de las flores en bacterias ATCC.
- Emplear ensayos de actividad antibacteriana con los extractos obtenidos de las hojas en bacterias ATCC.
- Utilizar ensayos de actividad antibacteriana con los extractos obtenidos de los tallos en bacterias ATCC.

## **ESTADO DEL ARTE RELACIONADO A LA TEMÁTICA**

### **Antecedentes Históricos**

No se tiene ninguna certeza, sobre el inicio de la utilización de las plantas medicinales. Los descubrimientos fueron la mayor parte de las veces, producto de la casualidad. Nuestros antepasados tenían que buscar constantemente nuevos alimentos y para ello probaban todas las especies botánicas que les ofrecía la tierra que habitaban para comprobar si eran comestibles o no. Como consecuencia de esto; pudieron comprobar sí algunas eran comestibles, en cambio otras les producían efectos negativos incluso mortales. Todos estos conocimientos adquiridos se fueron propagando primero a través de la palabra y luego de los escritos <sup>(12)</sup>.

### **Importancia de las Plantas Medicinales**

Inicialmente las plantas fueron utilizadas por la gente para satisfacer sus necesidades nutricionales. En varias culturas humanas alrededor del mundo más de 35.000 especies de plantas se están utilizando para fines medicinales y para el cuidado médico primario, casi 80% de las poblaciones mundiales confían en estas medicinas tradicionales que incluyen el uso de extractos de la planta la mayor parte del tiempo <sup>(13)</sup>.

Las consideraciones que defienden el uso de las plantas medicinales y sus extractos o derivados en terapéutica, pueden afianzarse en las siguientes premisas:

- Trabajan en la reactivación de funciones o procesos orgánicos alterados.
- Estimulan las defensas de los organismos, no las remplazan ni las fuerzan a actuar.
- Refuerzan el funcionamiento óptimo de órganos y tejidos en funciones nutritivas y regenerativas.
- Eliminan toxinas o sustancias indeseables (depuración y limpieza) favoreciendo la circulación sanguínea <sup>(14)</sup>.

### **Principios Activos de las Plantas Medicinales**

Los principios activos son sustancias que se encuentran en las distintas partes u órganos de las plantas y que alteran o modifican el funcionamiento de órganos y sistemas del cuerpo humano y animal <sup>(15)</sup>. Para que las plantas medicinales nos proporcionen sus efectos debemos extraerles aquellos componentes que contienen sus principios activos. Existen plantas medicinales que pueden tomarse directamente, consumiéndolas como un alimento, y no

precisan de preparación especial. Se puede decir que se trata de alimentos con propiedades medicinales <sup>(16)</sup>.

### **Consideraciones generales de la planta**

**Familia Asteraceae:** Es de las familias de plantas con flores con mayor número de especies (más de 20.000 especies y 1.100 géneros), y de mayor distribución en todo el mundo. La mayoría son especies herbáceas anuales o perennes y algunas son arbustos o árboles. Esta familia contiene especies de importancia económica como el girasol (*Helianthus annuus* L.), comestibles como la lechuga (*Lactuca sativa* L.), ornamentales como las dalias, alimentarias como el estragón (*Artemisia dracunculus* L.) y medicinales como la manzanilla (*Chamaemelum nobile*) <sup>(17)</sup>.

Es parte de la familia más representativa del páramo ecuatoriano (Asteraceae), pertenece a la tribu Senecioneae una de las tribus que contribuyen a la mayor diversidad de dicha familia en los altos Andes. En el páramo la tribu está representada por algunos géneros importantes como *Senecio*, *Pentacalia* y *Lasiocephalus*. Hierbas o subarbustos hasta de 0,8 m, flexuosos, con grueso indumento aracnoideo, gris-blanquecino sobre todo en las partes jóvenes, glabrescentes con la edad, los tallos con costillas notorias <sup>(18)</sup>.

### ***Tanacetum* spp.**

Es una especie vegetal conocida con el nombre común de Santa María, se le atribuyen propiedades diuréticas, aperitivas, digestivas, espasmolíticas, vermífugas, coleréticas y emenagogas <sup>(19)</sup>.

### **Acciones Farmacológicas**

Entre las acciones más destacables a nivel popular, la que más fama tiene es la que ejerce sobre los gusanos intestinales. Según se cuenta, esta hierba, administrada convenientemente, consigue paralizar la actividad vital de los gusanos y, aunque no llega a acabar con su vida facilita enormemente su expulsión si se emplea junto con algún purgante. Otra de las acciones que se le atribuyen es la de descargar el hígado, es decir, que actúa como colerético. Sin embargo, estas acciones no están todo lo estudiadas que debieran, por lo que conviene manejarla con cuidado. Su empleo se debe dejar en manos de profesionales, pues en la actualidad existen remedios mejores, sobre todo para expulsar lombrices intestinales <sup>(20)</sup>.

### **Usos y Características:**

- De las hojas de la hierba de Santa María se extrae un aceite que tiene propiedades insecticidas.

- Las tisanas de esta planta son muy apreciadas, atribuyéndoles un efecto astringente, antiséptico, antiespasmódico, carminativo, colagogo y sedante.
- Se ha descrito un efecto protector hepático de los extractos alcohólicos de esta planta en algunos experimentos en animales de laboratorio.
- Las hojas secas, molidas o trituradas se conservan en recipientes herméticos. Pueden consumirse frescas para aromatizar ensaladas o sopas.
- Tienen un olor de menta-citronelada que conserva durante mucho tiempo y un sabor ligeramente amargo <sup>(21)</sup>.

### **Actividad Antibacteriana**

Se refiere a la capacidad de impedir la proliferación de bacterias que pueden provocar infecciones graves o incluso la muerte de los seres humanos. Hay una amplia diversidad de familias y grupos de antibacterianos de interés clínico. Los mecanismos por los que los compuestos con actividad antibacteriana inhiben el crecimiento o causan la muerte de las bacterias son muy variados. Atendiendo a su efecto antibacteriano se han clasificado tradicionalmente en bactericidas (ejercen una acción letal para la bacteria) o bacteriostáticos (solo inhiben transitoriamente el crecimiento bacteriano) <sup>(22)</sup>.

### **Técnica de extracción de solventes**

#### **Rotaevaporación**

El método de rotaevaporación se realiza mediante el equipo rotavapor es el aparato que, mediante una destilación a vacío, permite la evaporación rápida del disolvente de una disolución, recuperando el soluto (líquido o sólido). Generalmente se utiliza una trompa o una bomba de membrana o de vacío <sup>(23)</sup>. Es importante conocer el punto de ebullición del disolvente que se va a eliminar para no sobrecalentar el baño de agua. Si el producto que se quiere aislar es líquido, también debería conocerse su punto de ebullición, para evitar evaporarlo junto con disolvente <sup>(24)</sup>.



Figura 1 Rotavapor

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular y Genética

## Cepas de Interés Clínico

La Organización Mundial de la Salud (OMS) publica los patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos, en la que se incluyen las bacterias más peligrosas para la salud humana. El grupo de prioridad crítica incluye las bacterias multirresistentes que son especialmente peligrosas en hospitales, residencias de ancianos y entre los pacientes que necesitan ser atendidos con dispositivos como ventiladores y catéteres intravenosos. Entre tales bacterias se incluyen las siguientes: *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y varias enterobacteriáceas como *Klebsiella*, *S. aureus*, *E. coli*, *Serratia*, y *Proteus*. Son bacterias que pueden provocar infecciones graves y a menudo letales, como infecciones de la corriente sanguínea y neumonías. Tales como: <sup>(25)</sup>.

### *Escherichia coli*

Es una bacteria Gram negativa que se encuentra normalmente en el intestino del ser humano y de los animales de sangre caliente. Es causante de enteritis por diferentes mecanismos. Estas cepas poseen factores de virulencia que la hacen, entero patógenas como son adhesinas específicas, tienen sistemas para la penetración intracelular y producción de toxinas. Es causante de las mayorías infecciones de las vías urinarias (IVU) en la mujer. Así mismo, puede causar cistitis, meningitis, mastitis, septicemia, colecistitis, peritonitis, neumonía y bacteriemia <sup>(26)</sup>.

### ***Staphylococcus aureus***

Es una bacteria Gram positiva que posee características particulares de virulencia y resistencia a algunos antibióticos como por ejemplo la meticilina. En los humanos causa una amplia variedad de enfermedades infecciosas. En algunas ocasiones el *S. aureus* puede entrar en el torrente sanguíneo desde el sitio de la infección y alcanzar otros tejidos distantes, como el cerebro o los pulmones. Las enfermedades más frecuentes que produce es Osteomielitis, Conjuntivitis, Artritis, Sinusitis, Meningitis, Otitis media, Bronquitis, Cistitis, Prostatitis <sup>(27)</sup>.

### ***Klebsiella pneumoniae***

Es una bacteria Gram negativa, es un patógeno oportunista colonizador de piel y mucosas de pacientes hospitalizados que pueden presentar infecciones invasoras como bacteriemias o septicemias. Es el agente causal de infecciones del tracto urinario, neumonías, sepsis, infecciones de tejidos blandos e infecciones de herida quirúrgica. Usualmente las manos contaminadas del personal son el vehículo responsable de brotes epidémicos <sup>(28)</sup>.

### ***Pseudomonas aeruginosa***

Es una bacteria Gram negativa habitante común de agua, suelos y plantas. En los hospitales puede ser encontrada en respiradores, humidificadores, vertederos, duchas, piscinas de hidroterapia y ocasionalmente en las manos de los trabajadores de la salud. *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista, responsable de infecciones, principalmente nosocomiales. Particularmente los pacientes con inmunosupresión, así como aquellos que han sufrido quemaduras severas, neutropenia inducida por quimioterapia o presentan enfermedades pulmonares subyacentes están propensos a desarrollar la infección <sup>(29)</sup>.

### **Mecanismos de resistencia bacteriana frente a los antibióticos**

La resistencia antimicrobiana es un problema continuo y en aumento. Los fenómenos de resistencia antimicrobiana son variados, destacando entre ellos cuatro mecanismos principales:

Enzimas hidrolíticas: Las bacterias sintetizan enzimas que hidrolizan al antimicrobiano, destruyendo su acción antibacteriana, sin tener posibilidad de actuar sobre el microorganismo.

Modificación del sitio activo: La modificación de un aminoácido genera un blanco diferente y así disminuye la afinidad de unión por el antimicrobiano <sup>(30)</sup>.

Disminución de la permeabilidad de la pared celular al ingreso del antimicrobiano: Cambios en el diámetro y/o número de porinas pueden bloquear el ingreso del antimicrobiano a la bacteria <sup>(30)</sup>.

Bombas de flujo: Transporta al antimicrobiano hacia el exterior de la célula sin modificaciones, pero sin acción antimicrobiana. Existen bombas de eflujos multidrogas en la pared bacteriana que permiten la expulsión de drogas como los antimicrobianos. Estos genes explican la resistencia a macrólidos en estos patógenos y a fluoroquinolonas. Para combatir este tipo de resistencia se encuentran en estudio la asociación de inhibidores de bombas de eflujo junto con el antimicrobiano <sup>(30)</sup>.

### **Métodos de Determinación de Actividad Antibacteriana**

**Antibiograma:** es la prueba microbiológica que se realiza para determinar la susceptibilidad (sensibilidad o resistencia) de una bacteria a un grupo de antibióticos. Las técnicas de antibiograma son las utilizadas en el laboratorio de microbiología para estudiar la actividad de los antimicrobianos frente a los microorganismos responsables de las infecciones. El antibiograma mide la sensibilidad de una cepa bacteriana que se sospecha es la responsable de una infección a uno o varios antibióticos. El antibiograma sirve para orientar las decisiones terapéuticas individuales además de seguir la evolución de las resistencias bacterianas <sup>(31)</sup>.

**Método de Kirby Bauer:** El método Kirby-Bauer (método de difusión en agar) es empleado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico. Este método comprende lo que se denomina un antibiograma o prueba de susceptibilidad bacteriana frente a drogas específicas. En el método de Kirby Bauer, el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar, sobre el cual se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antibiótico. Las placas se incuban por 16-18 horas a 35- 37°C. Durante la incubación, el antibiótico difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco. En un punto determinado, la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir al germen en estudio. El diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I, o R) de acuerdo a tablas publicadas por la CLSI <sup>(32)</sup>.

**Concentración Mínima Inhibidora (CMI)** es la medida de la sensibilidad de una bacteria a un antibiótico. Es la mínima cantidad de antimicrobiano que es capaz de impedir el crecimiento de un microorganismo en unas condiciones normalizadas. Es el método habitual

utilizado en los laboratorios de Microbiología Clínica. Para llevarlo a cabo es necesario utilizar cepas control (de referencia) con el fin de que los resultados sean reproducibles y comparables. Este método nos ofrece información sobre la sensibilidad de las bacterias S (sensible), I (intermedia) y R (resistente) <sup>(33)</sup>.

- Sensible, si existe una buena probabilidad de éxito terapéutico en el caso de un tratamiento a la dosis habitual.
- Resistente, si la probabilidad de éxito terapéutico es nula o muy reducida. No es de esperar ningún efecto terapéutico sea cual fuere el tipo de tratamiento.
- Intermedia, cuando el éxito terapéutico es imprevisible. Se puede conseguir efecto terapéutico en ciertas condiciones (fuertes concentraciones locales o aumento de la posología) <sup>(33)</sup>.

## METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

### DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

En la presente investigación se utilizó el método inductivo con un procedimiento analítico, científico y explicativo, con el fin de alcanzar los objetivos propuestos.

**Método inductivo:** Se utilizó este método ya que permite el estudio de cada una de las bacterias para obtener resultados confiables que nos lleven a sacar conclusiones particulares de mi tema de investigación.

**Método analítico:** Permite analizar la actividad antibacteriana de los diferentes extractos metanólicos de las partes de la planta *Tanacetum* spp.

**Método explicativo:** Ayudó a determinar las causas y los efectos del tema de estudio.

### TIPO DE INVESTIGACIÓN

**Descriptiva:** Permite describir la situación del problema en estudio.

**Explicativa:** Se basa en el procesamiento de la información recolectada en textos, libros, folletos y artículos científicos que permitirán establecer las causas y los efectos de la evaluación antibacteriana de la especie *Tanacetum* spp.

**Observacional:** Se obtiene el dato de acuerdo al resultado que genera cada ensayo de actividad antibacteriana.

### COHORTE

**Transversal:** La investigación se realiza en un tiempo determinado.

### CARÁCTER

**Cualitativa:** Permiten clasificar directamente a un microorganismo como sensible o resistente utilizando la técnica del antibiograma.

**Cuantitativa:** Mediante la CMI se determina la medida de sensibilidad de una bacteria frente a los extractos metanólicos ensayados.

### POBLACIÓN Y MUESTRA

**Población:** En esta investigación se utilizó las partes de la planta *Tanacetum* spp. y bacterias ATCC para evaluar bajo técnicas de laboratorio, por lo tanto no se aplica el cálculo de población.

**Muestra:** Las partes de la planta *Tanacetum* spp. fueron conseguidas en junio de 2018 a través de personas dedicadas al expendio de plantas medicinales en el Mercado San Alfonso de la ciudad de Riobamba.

## TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

### Técnica

Observación y recolección de información.

### Instrumentos de recolección de datos

El procedimiento para la recolección de información que se adapta al diseño del estudio es la observación directa de los datos en el laboratorio, descrita como aquella que nos pone en contacto con los hechos, fenómenos y situaciones en el momento que acontecen y permite la búsqueda deliberada de datos necesarios para desarrollar el proceso investigativo.<sup>(59)</sup>

## PROCEDIMIENTOS DE LA INVESTIGACIÓN

### Preparación de las Muestras

Se separaron cada una de las partes de la planta *Tanacetum* spp. a estudiarse es decir: flores, hojas y tallos. Luego se pesó cada una de las partes de la planta obteniendo 250 g de flores, 198 g de hojas, 210 g de tallos, y se colocó en un secador de plantas durante una semana en la azotea de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Chimborazo (Anexo 1).

Con la utilización del molino analítico marca IKA A11 basic, se pulverizó cada parte de la planta a investigar y las muestras pulverizadas obtenidas se colocaron en frascos de vidrio cada una. Posteriormente se pesó cada una de las muestras pulverizadas obteniéndose 113,4 g de flores, 108,8 g de tallos y 129,9 g de hojas (Anexo 2).

### Obtención de las Partes de la Planta Obtenidas por Maceración con Metanol

En cada frasco contentivo las partes pulverizadas de la planta se colocan 500 mL de metanol y se dejó reposar por 72 horas al resguardo de la luz.



Figura 2 A: Fracción de las hojas, B: Fracción de las flores y C: Fracción de los tallos.  
Fuente: Laboratorio de Biología Molecular y Genética

### **Filtración de los Extractos Metanólicos**

Cada extracto metanólico de las partes de las flores, hojas y tallos se filtró con papel filtro y fueron colocados en frascos ámbar esterilizados para evitar contaminaciones y deterioro. (Anexo 3).

### **Obtención de los Extractos Metanólicos de las Partes de las Flores, Hojas y Tallos de la Planta *Tanacetum* spp.**

Para la obtención del extracto metanólico de las partes de las flores, hojas y tallos de la planta se utilizó el equipo rotavapor durante 3 horas a una temperatura de 40°C y una presión de 260 hectopascales (hPa). Los extractos obtenidos fueron almacenados a una temperatura de 4-6°C, en frascos herméticos y resguardados de la luz hasta su análisis (Anexo 4).

### **Determinación de la Actividad Antibacteriana de Extractos Metanólicos de la Planta *Tanacetum* spp. frente a Cepas Bacterianas ATCC.**

#### **Preparación del Preinóculo**

La preparación del preinóculo consistió en sembrar una o dos colonias de las distintas cepas bacterianas en estudio: *E. coli* ATCC 10536, *S. aureus* ATCC 6530, *K. pneumoniae* ATCC 10031, *P. aeruginosa* ATCC 27853, crecidas en medio sólido. Posteriormente, el preinóculo se incubó a 37°C durante 18 horas.

#### **Preparación del Inóculo**

Se preparó suspensiones bacterianas de *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*; las cuales fueron comparadas con el patrón de McFarland 0.5 que se utilizan como patrones de turbidez en la preparación de suspensiones de microorganismos. Las normas de turbidez se preparan mezclando productos químicos que generan precipitación para formar una solución de turbidez reproducible. El patrón de McFarland se prepara añadiendo ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) al 1% (0,36N) a una solución acuosa de cloruro de bario (Cl<sub>2</sub>Ba) al 1,175% (0,048 M) que produce la formación de un precipitado de sulfato de bario (BaSO<sub>4</sub>) suspendido. Para asegurar la densidad del estándar de McFarland así preparado puede ser verificado usando un espectrofotómetro con una celda de cuarzo de 1cm; para el estándar 0,5 de McFarland, la absorbancia a una longitud de onda de 625 nm puede estar entre 0,08 a 0,1 <sup>(34)</sup>.

McFarland equivale a 10<sup>6</sup>-10<sup>8</sup> UFC/mL crecidas sobre medio sólido Mueller Hinton en placas mono Petri (Anexo 5).

### **Preparación de la Solución Stock de los Extractos**

La solución stock de los extractos se prepararon con Dimetilsulfóxido (DMSO) a concentraciones de 100000 µg/mL, 50000 µg/mL, 25000 µg/mL, 12500 µg/mL y 6250 µg/mL para lo cual se pesó 400 µg de cada extracto y se añadió 3600 µL de DMSO en tres tubos diferentes para las tres partes de extractos metanólicos de la planta.

### **Preparación de las Diferentes Concentraciones de los Extractos**

Las concentraciones de los extractos metanólicos de las partes de flores, hojas y tallos de la planta se realizó en tubos eppendorf, a concentraciones de 100000 µg/mL, 50000 µg/mL, 25000 µg/mL, 12500 µg/mL y 6250 µg/mL. Se depositaron 250 µL de caldo Mueller Hinton, realizando dos replicas y 250 µL de la solución stock en la primera dilución, para llevar a cabo diluciones seriadas.

### **Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

Se aplicaron cinco diferentes concentraciones de 100000 µg/mL, 50000 µg/mL, 25000 µg/mL, 12500 µg/mL y 6250 µg/mL. En las cajas mono Petri previamente infundidas con el medio se colocaron cinco discos y en cada disco se colocó 20 µL de cada concentración. Se dejó en la incubadora a una temperatura de 37°C por 24 horas para su análisis. Estas diluciones fueron inoculadas con 20 µL de una suspensión de la bacteria a ensayar, realizada a partir de preinóculos preparados como se indicó anteriormente, de modo que quedara a una densidad celular inicial de  $10^6$ - $10^8$  UFC/mL. Cada ensayo fue realizado por duplicado y como control positivo se utilizó el antibiótico comercial Estreptomicina de 300 µg y como control negativo 20 µL de DMSO, en ningún caso la concentración de DMSO superó la máxima tolerable por cada bacteria.

La CMI se determinó por el método de Kirby Bauer que consiste en determinar la susceptibilidad *in vitro* de una cepa microbiana frente a antibióticos en medio Mueller Hinton tras 24 horas de incubación a 37 °C, se observó la presencia o ausencia de halos de inhibición.

## **ANÁLISIS DE DATOS**

Los resultados se interpretaron por medio de la formación de la longitud de diámetro de los halos de inhibición frente a las bacterias de interés clínico. Para el análisis de datos se utilizó Excel 2010 para realizar la tabulación y el correspondiente análisis para explicar los resultados.

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

### Actividad Antibacteriana de los Extractos

La actividad antibacteriana de los extractos de la planta *Tanacetum* spp. fue evaluada frente a cuatro cepas ATCC, mediante el método de Kirby Bauer el cual permitió determinar la CMI para cada una de las especies bacterianas estudiadas.

Los resultados mostraron actividad contra *E. coli* ATCC 10536 con una CMI de 100000  $\mu\text{g/mL}$  en extractos de flores y hojas, para *S. aureus* ATCC 6530 una CMI de 100000  $\mu\text{g/mL}$  en extractos de flores y 50000  $\mu\text{g/mL}$  en extractos de hojas mostrando actividad antibacteriana, para *K. pneumoniae* ATCC 10031 una CMI de 100000  $\mu\text{g/mL}$  en extractos de flores, para *P. aeruginosa* ATCC 27853 una CMI de 100000  $\mu\text{g/mL}$  en extractos de flores. Según la literatura consultada, este es el primer informe sobre la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de la planta *Tanacetum* spp. en el Ecuador.

**Tabla 4: Actividad Antibacteriana de los distintos Extractos Metanólicos frente a Cepas Bacterianas ATCC de Interés Clínico.**

Cepas ATCC	Extractos	Halo de inhibición (mm)
<i>E. coli</i>	Flores	14
	Hojas	13
	Tallos	8
<i>S. aureus</i>	Flores	13
	Hojas	12
	Tallos	10
<i>K. pneumoniae</i>	Flores	14
	Hojas	11
	Tallos	10
<i>P. aeruginosa</i>	Flores	13
	Hojas	12
	Tallos	12

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular y Genética

Los resultados obtenidos se interpretaron por la longitud del diámetro de los halos de inhibición. La actividad antibacteriana de las partes de la planta *Tanacetum* spp. de los extractos metanólicos fueron evaluados frente a bacterias ATCC de interés clínico. En la Tabla 4 se evidencia el diámetro de los halos de inhibición, el cual se obtuvo del promedio de tres ensayos al utilizar los distintos extractos de la planta.

**Tabla 5: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los Extractos Metanólicos de las Flores frente a Bacterias ATCC**

Extracto metanólico de la fracción de las flores	
Bacterias ATCC	CMI (µg/mL)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	25000
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6530	25000
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	100000
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853	100000

**Fuente:** Laboratorio de Biología Molecular y Genética

La actividad antibacteriana de las partes de la planta *Tanacetum* spp de los extractos metanólicos fueron evaluados frente a bacterias ATCC. En la Tabla 5 se evidencia la CMI que mostró en los extractos de las flores, la cual fue *E. coli* 25000 µg/mL, *S. aureus* 25000 µg/mL, *K. pneumoniae* 100000 µg/mL y *P. aeruginosa* 100000 µg/mL.

**Tabla 6: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los Extractos Metanólicos de las Hojas frente a Cepas ATCC**

Extracto metanólico de la fracción de las hojas	
Bacterias ATCC	CMI (µg/mL)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	50000
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6530	50000
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	SA
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853	SA

**SA:** Sin actividad

**Fuente:** Laboratorio de Biología Molecular y Genética

La actividad antibacteriana de las partes de la planta *Tanacetum spp* de los extractos metanólicos fueron evaluados frente a bacterias ATCC. En la Tabla 6 se evidencia la CMI que mostró en los extractos de las hojas, la cual fue *E. coli* 50000 µg/mL, *S. aureus* 50000 µg/mL, mientras que no hubo actividad para *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*.

**Tabla 7: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los Extractos Metanólicos de los Tallos frente a Cepas ATCC**

Extracto metanólico de la fracción de los tallos	
Bacterias ATCC	CMI (µg/mL)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	SA
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6530	SA
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	SA
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853	SA

**SA:** Sin actividad

**Fuente:** Laboratorio de Biología Molecular y Genética

La actividad antibacteriana de las partes de la planta *Tanacetum spp.* de los extractos metanólicos fueron evaluados frente a bacterias ATCC. En la Tabla 6 se evidencia que la parte metanólica de los tallos no mostró ninguna actividad antibacteriana.

Se realizó una búsqueda exhaustiva y no se pueden comparar estos resultados ya que no hay información de la planta en estudio.

Según la revisión bibliográfica realizada, este es el primer estudio que muestra la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de *Tanacetum spp.* de Ecuador. Con estos resultados, se espera contribuir al estudio de especies del género *Tanacetum*, de los cuales muchos se utilizan desde la antigüedad por la población ecuatoriana; por lo que se sugiere ampliar el estudio de la actividad antimicrobiana del aceite esencial frente a otros agentes patógenos con el fin de conocer su espectro de acción. De este modo ayudar para tratar, guiar, promover la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos, como menciona la OMS para combatir el creciente problema mundial de la resistencia a los antimicrobianos <sup>(35)</sup>

## CONCLUSIONES

- Se obtuvieron los extractos metanólicos de las partes de las flores, hojas y tallos de la planta *Tanacetum* spp. mediante el equipo rotavapor, además se obtuvo el rendimiento a partir del peso seco de las partes de la planta partiendo de 11,8 g del extracto de las flores se obtuvo un rendimiento de 4,7%, de 12,4 g del extracto de las hojas se obtuvo un rendimiento de 6,3 % y de 10,6 g de tallos se obtuvo un rendimiento de 5,1%.
- Se aplicó ensayos de actividad antibacteriana tales como antibiograma y concentración mínima inhibitoria con los extractos obtenidos de las flores en bacterias ATCC obteniendo una concentración mínima inhibitoria de *E. coli* 25000 µg/mL, *S. aureus* 25000 µg/mL, *K. pneumoniae* 100000 µg/mL y *P. aeruginosa* 100000 µg/mL. Dando como conclusión que la actividad antibacteriana es nula ya que los valores de CMI se encuentran en un rango superior a 100000 µg/mL.
- Se emplearon ensayos de actividad antibacteriana tales como antibiograma y concentración mínima inhibitoria con los extractos obtenidos de las hojas en bacterias ATCC de interés clínico, se determinó la CMI frente a las bacterias: *E. coli* y *S. aureus* 50000 µg/mL, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* no se evidenció halos de inhibición. Dando como conclusión que la actividad antibacteriana es nula ya que los valores de CMI se encuentran en un rango superior a 1000 µg/mL.
- Se utilizaron ensayos de actividad antibacteriana tales como antibiograma y concentración mínima inhibitoria con los extractos obtenidos de los tallos en bacterias ATCC de interés clínico a partir de este procedimiento se determinó la CMI frente a las bacterias: *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*; el efecto de los extractos de las partes de los tallos de la planta *Tanacetum* spp. sobre las bacterias de interés clínico no se evidencio halos de inhibición en ninguna de las bacterias en estudio.

## RECOMENDACIONES

- Utilizar las partes de la planta *Tanacetum* spp. frente a diferentes bacterias para comprobar si tienen actividad antibacteriana.
- Se recomienda separar el extracto de las flores, que mayor actividad antibacteriana mostró en distintas fracciones para ensayarlo con diferentes concentraciones y determinar la actividad antibacteriana.
- Obtener extractos con otros solventes para obtener compuestos de diferente polaridad.
- Se recomienda que se usen cepas aisladas de interés clínico de pacientes que hayan resultado resistentes a antibióticos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Álvarez Arias BT, Nombres vulgares de las plantas en la Península Ibérica. [Tesis doctoral en Internet]. [Madrid]: Universidad Autónoma de Madrid; 2006 [citado 25 de junio de 2018]. Disponible en: [http://bibdigital.rjb.csic.es/PDF/Alvarez\\_Nombr\\_Vulg\\_Pl\\_Penins\\_Iber\\_Baleares\\_2006.pdf](http://bibdigital.rjb.csic.es/PDF/Alvarez_Nombr_Vulg_Pl_Penins_Iber_Baleares_2006.pdf)
2. Rivera Butron BD, Efecto de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos hidroalcoholicos a base de llantén y té verde sobre Streptococos mutans. [Tesis en Internet]. [Perú]: Universidad Católica de Santa María; 2015 [citado 15 de junio de 2018]. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/54220099.pdf>
3. Cañigueral S, Vanaclochat V, Fitoterapia. Masson. [Internet]. Madrid: 2006 [citado 2 de julio de 2018]; 14(5):75-9 Disponible en: [https://books.google.com.ec/books?id=K3V4p5Pj\\_dAC&printsec=frontcover&q=plantas+medicinales+libros+actuales&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwigvN\\_qz u3cAhWJq1MKHfIuAagQ6AEIRzAH#v=onepage&q=plantas%20medicinales%20libros%20actuales&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=K3V4p5Pj_dAC&printsec=frontcover&q=plantas+medicinales+libros+actuales&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwigvN_qz u3cAhWJq1MKHfIuAagQ6AEIRzAH#v=onepage&q=plantas%20medicinales%20libros%20actuales&f=false)
4. Organización Panamericana de la Salud. Medicina Intercultural. [Internet]. Salud en las Américas. 2011. [citado 25 de julio de 2018]; Disponible en: <http://medicinaintercultural.org/contenido/2011-10-10-importancia-de-las-plantas-medicinales>.
5. Fernández J, Chacón M. Especies vegetales aromáticas de la Provincia de Sumapaz y la cuenca del río Chicamocha en Colombia [Internet]. Bogotá: Editor Cruz Helena Torres León; 2012 Feb [citado 8 de julio de 2018 Julio]. Disponible en: <http://www.rjb.csic.es/jardinbotanico/ficheros/documentos/pdf/pubinv/JLF/2012%20EspVegAromaSumChiColom2012re.pdf>
6. Palacios E, Economía y Plantas medicinales; [Internet]. 2015 [citado 12 de julio de 2018]; 28-30 Disponible en: <http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/publicaciones/consejo/boletin52/pdf/a04.pdf>
7. Barros N, Estudio de la calidad Bacteriológica de doce plantas medicinales de uso común en Ecuador. [Internet]. 2017 [citado 13 de julio de 2018]; 1(1):2-6

- Disponible en: <http://ojs.unemi.edu.ec/index.php/facsalud-unemi/article/view/539>
8. Guevara M, Mena I, Mosquera S. El poder curativo de las plantas medicinales. [Internet]. 2012. [Consultado 5 de mayo de 2018]. Disponible en: <file:///C:/Users/Family/Downloads/007PLANTAS-MEDICINALES.pdf>
  9. Organización Mundial de la Salud. Medicina tradicional [Internet]. 2017 May [citado 25 de julio de 2018]; Disponible en: [http://www.who.int/topics/traditional\\_medicine/definitions/es/](http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/)
  10. Azuero A, Jaramillo C, San Martín D, Armas H. Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador. Rev UNEMI. [Internet]. 2016 [citado 6 de julio de 2018]; 9(20): 12-7. Disponible en: [ojs.unemi.edu.ec/index.php/cienciaunemi/article/view/342](http://ojs.unemi.edu.ec/index.php/cienciaunemi/article/view/342)
  11. Organización Mundial de la Salud. Microbiología. [Internet]. 2009. [citado 15 de mayo de 2018]. 15(11):15-9 Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2009/myl0911-12d.pdf>
  12. Ocegueda S, Moreno E, Koleff P. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica en Ecuador. [Internet]. 2005. [citado 25 de junio de 2018]; 62(1):12-15 Disponible en: <https://www.biodiversidad.gob.mx/Biodiversitas/Articulos/biodiv62art3.pdf>
  13. Herrero V, Terradillos J, Ramírez V, Riera K. Especies, hierbas medicinales y plantas. Usos en la medicina [Internet]. 2013 [citado 22 de julio de 2018]; 12(2):15-9. Disponible en: <http://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4335203.pdf>
  14. Souza A, Ceolin T, Vargas N, Ruíz R, Mendieta M. Plantas medicinales utilizadas en la salud infantil. [Internet]. 2011 [citado 12 de julio de 2018]; 10(24):2-9 Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1695-61412011000400004](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1695-61412011000400004)
  15. Vivot E, Sánchez C, Cacik F, Sequin C. Ciencias exactas y naturales: Actividad antibacteriana en plantas medicinales de la flora de Entre Ríos (Argentina). [Internet]. 2012 [citado 6 de julio de 2018]; 12(45):24-8 Disponible en: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1851-17162012000200008](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-17162012000200008)

16. Zambrano L, Buenaño M, Mancera N, Jiménez E. Estudio etnobotánico de plantas medicinales utilizadas por los habitantes del área rural de la Parroquia San Carlos, Quevedo, Ecuador. *Plantas medicinales y sus principios*. [Internet]. 2015 [citado 16 de julio de 2018] Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/reus/v17n1/v17n1a09.pdf>
17. Velázquez C, Cornejo P, Volkow P. Resistencia bacteriana de cultivos de orina en un hospital oncológico: seguimiento a diez años. *Salud Pública Mex* [Internet]. 2016 Ago [citado 2017 Jul 16] 58(4):446-52. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-36342016000400446](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342016000400446)
18. León S, Valencia R, Pitman N, Endara L. Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador. [Internet] 2011. [citado 25 de junio de 2018]; 2(1):12-7 Disponible en: <https://www.slu.se/globalassets/ew/subw/artd/bryophyte-conservation/bryoconservation/gradstein-leon-2011-briofitas-libro-rojo.pdf>
19. Hanan A, Mondragón J. *Diagnostic Systems*. [Internet]. Ago 2009. [citado 25 de junio de 2018] 8(5):2-8 Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/tanacetum-parthenium/fichas/ficha.htm>
20. Benítez G. Acciones farmacológicas de la especie vegetal [Internet]. 2010. 2(6):5-9 Disponible en: [http://www.micobotanicajaen.com/Revista/Articulos/GBenitezC/Farmacognosia\\_01/Farmacognosia%20GB\\_1.pdf](http://www.micobotanicajaen.com/Revista/Articulos/GBenitezC/Farmacognosia_01/Farmacognosia%20GB_1.pdf)
21. Mena P. La biodiversidad de Ecuador. [Internet]. 2010. Disponible en: <http://www.flacsoandes.edu.ec/libros/digital/49914.pdf>
22. Taroco R, Seija V, Vignoli R. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. [Internet]. 2009. [Consultado 10 de mayo de 2018]. 2(7):14-8 Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>
23. Buchi. Manual de instrucciones. [Internet]. 2012. [citado 5 de mayo de 2018]. Disponible en: [http://static2.buchi.com/sites/default/files/downloads/11593360\\_R-220SE\\_OM\\_es\\_F\\_LR.pdf](http://static2.buchi.com/sites/default/files/downloads/11593360_R-220SE_OM_es_F_LR.pdf)

24. Rodas R. Manual básico de Microbiología. [Internet]. 2012. [citado 5 de mayo de 2018]. Disponible en: [https://rodas5.us.es/file/116d23b8-c458-2012-481b-2357fffa2b34/2/modulo\\_general\\_SCORM.zip/pagina\\_19.htm](https://rodas5.us.es/file/116d23b8-c458-2012-481b-2357fffa2b34/2/modulo_general_SCORM.zip/pagina_19.htm)
25. Organización Mundial de la Salud. Cepas de interés clínico [Internet]. 2015 [citado 6 de julio de 2018]; Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
26. Organización Mundial de la Salud. *Escherichia coli* [Internet]. 2018. [Consultado 12 de julio de 2018]; Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
27. Andrade V, Silva J. Caracterización de *Klebsiella pneumoniae* productora de la  $\beta$ -lactamasa SHV-5, en una unidad de cuidados intensivos. [Internet]. 2004. [citado 9 de julio de 2018]; 46(2):525-8. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/spm/v46n6/22565.pdf>
28. Luján D. Microbiología. [Internet]. 2014. [citado 22 de mayo de 2018]; 48(4):25-7. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v48n4/v48n4a09.pdf>
29. Organización Mundial de la Salud. Importancia de la resistencia a los antimicrobianos para la Salud Pública. [Internet]. 2018. [citado 12 de julio de 2018]; Disponible en: [http://www.who.int/drugresistance/AMR\\_Importance/es/](http://www.who.int/drugresistance/AMR_Importance/es/)
30. Calvo J, Martínez L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. [Internet]. 2009 Ene [citado 2017 Julio 27(1):44-52. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X08000177>
31. Martínez J. Interpretación del antibiograma. [Internet]. 2016. [citado 22 de mayo de 2018]. Disponible en: <https://www.academia.cat/files/425-2414-DOCUMENT/Martinez-24-4Oct11.pdf>
32. Bernal M, Guzmán M. El antibiograma técnica de Kirby-Bauer. Rev Biomédica. [Internet]. [Consultado 22 de junio de 2018]; 4(3):112-20 Disponible en: <https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/viewFile/1891/1917>
33. Mojica D, Román Y. Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos vegetales contra *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina. [Internet]. 2015. [citado 6 de junio de 2018]. 2(1):25-37. Disponible en: <file:///C:/Users/Family/Downloads/3976-7812-1-PB.pdf>

34. Dalynn D. McFarland Standars [Internet]. 2015. [Consultado 6 de junio de 2018]. Disponible en:  
[http://www.dalynn.com/dyn/ck\\_assets/files/tech/TM53.pdf](http://www.dalynn.com/dyn/ck_assets/files/tech/TM53.pdf)
35. Organización Mundial de la Salud. Lista de bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. [Internet]. Edición OMS. Editor OMS; 2017 Feb 27 [citado 22 de junio de 2018]. Disponible en:  
<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/>

## ANEXOS

### Anexo 1: Secado de las fracciones de la planta *Tanacetum* spp.



Se realizó el secado de las tres partes de la planta *Tanacetum* spp. en la azotea de la Facultad de Ingeniería durante 72 horas.

### Anexo 2: Pulverización de las partes de la planta



Se trituraron cada una de las partes y se colocaron en frascos de vidrio limpios.

### Anexo 3: Filtración de los extractos metanólicos



Se filtro cada una de las partes de la planta *Tanacetum* spp. con papel filtro para llevarlo a rotaevaporación.

### Anexo 4: Rotaevaporación de las partes metanólicas de las plantas



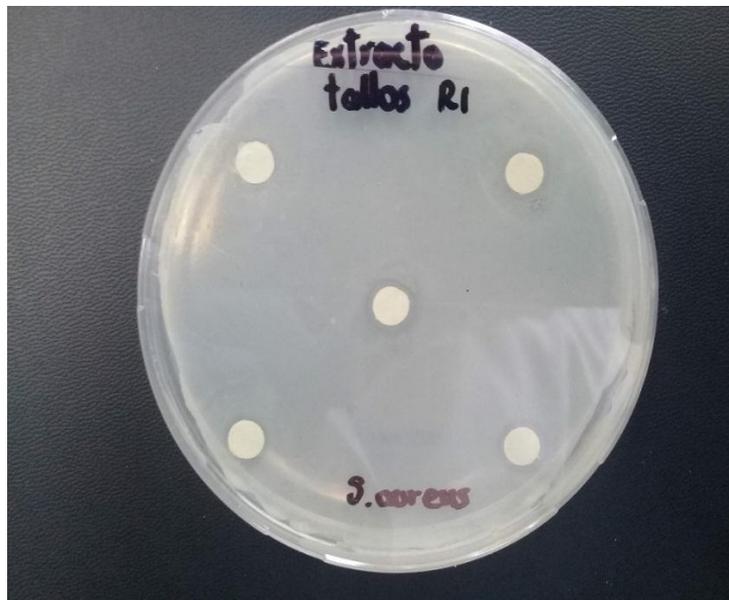
Por medio del equipo rotavapor se extrajo todas las partes metanólicas a una temperatura de 40°C y una presión de 260 hectopascales (hPa).

### Anexo 5: Estándar Mcfarland



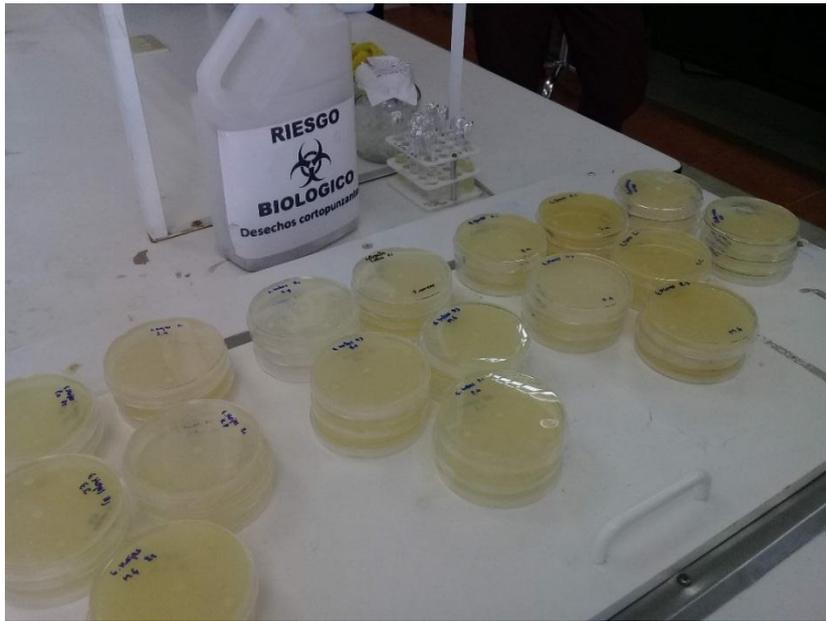
Se utilizó el estándar de Mcfarland que contiene  $10^6$ - $10^8$  UFC/mL

### Anexo 6: Antibiograma sin presencia de halos en la parte de los tallos



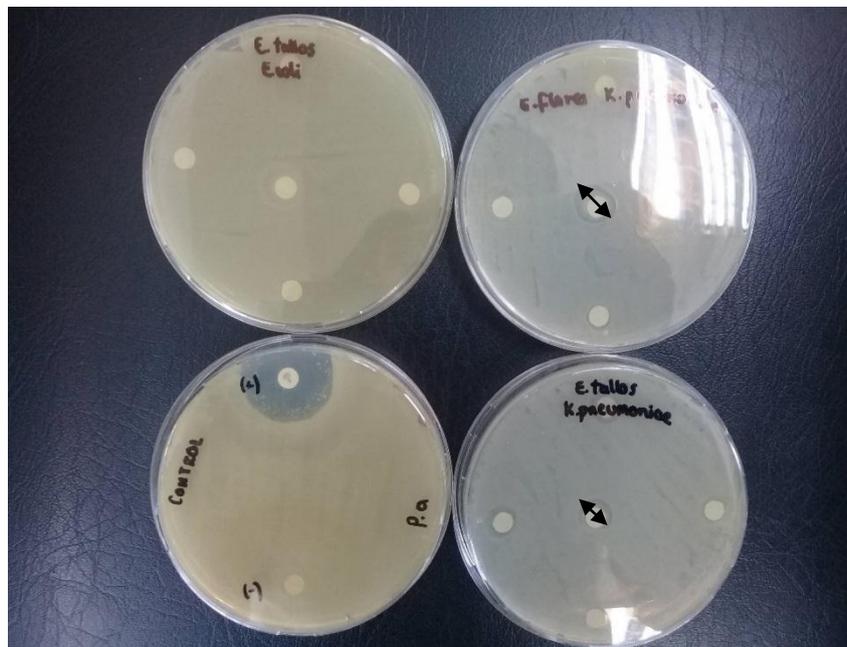
Al utilizar el extracto de los tallos se evidencia que no hubo presencia de halos de inhibición.

## Anexo 7: Interpretación de resultados de antibiograma



Se interpretaron cada uno de los antibiogramas para determinar la presencia o ausencia de halos de inhibición.

## Anexo 8: Halos de inhibición



Se midieron cada uno de los halos de inhibición para determinar por mm el diámetro.



