



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL
EXTRACTO DE *Pleurotus ostreatus* ANTE CEPAS DE *Escherichia coli*
y *Staphylococcus aureus*.”**

Trabajo de titulación presentado para obtener el grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: GRACE ALEXANDRA FLORES PAUCAR

TUTORA: DRA. SANDRA NOEMÍ ESCOBAR ARRIETA

Riobamba-Ecuador

2017

©2017, Grace Alexandra Flores Paucar.

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: **“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE *Pleurotus ostreatus* ANTE CEPAS DE *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.”** de responsabilidad de la señorita Grace Alexandra Flores Paucar, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dra. Sandra Escobar

DIRECTORA DE TESIS

.....

.....

Dr. Iván Ramos

MIEMBRO DE TRIBUNAL

.....

.....

Yo, Grace Alexandra Flores Paucar, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

Riobamba, 14 de Marzo de 2017

Grace Alexandra Flores Paucar
180508894-3

DEDICATORIA

Dedico esta tesis con mucho cariño y amor a Dios y a mis padres y como también a todas las personas que me apoyaron incondicionalmente para este logro académico, para quienes creyeron en mí y me dieron la mano cuando más lo necesitaba para así lograr mis sueños y aspiraciones, a mis amigos también quienes con un granito de arena, con su solidaridad y que siempre estuvieron ahí para brindarme ese apoyo y así junto con ellos poder culminar una etapa más en la vida, a todos ellos y por ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

Grace Flores

AGRADECIMIENTO

Mi más sincero agradecimiento a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, y de manera especial a la Escuela de Bioquímica y Farmacia, por darme esa oportunidad de permitirme obtener una profesión y así ser una persona muchísimo más útil para la sociedad.

Agradezco también con el corazón a Dios por bendecirme siempre y haber permitido llegar tan lejos y cumplir con mi sueño tan anhelado, a mi familia, amigos, compañeros y profesores que me apoyaron de alguna forma para poder culminar mis estudios con éxito.

Y a mí tutora Dra. Sandra Escobar y colaborador Dr. Iván Ramos por su orientación, apoyo y paciencia para llevar a cabo esta investigación.

Grace Flores

INDICE DE ABREVIATURAS

OMS	Organización Mundial de la Salud
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
ATCC	American Type Culture Collection
g	Gramo
HCl conc	Ácido Clorhídrico concentrado
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetros
pH	Potencial de Hidrogeno
rpm	Revoluciones por minuto
µg	Microgramos
°C	Grados Celsius
%	Porcentaje

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUCCION	1
CAPITULO I	
1. MARCO TEORICO	5
1.1. Reino Fungi.....	5
1.1.1. Morfología.....	6
1.1.1.1 Pared celular fúngica.....	6
1.1.2. Principales componentes	7
1.1.2.1. Terpenoides	7
1.1.2.2. Proteínas	8
1.1.2.3. Polisacáridos	8
1.2. Pleurotus ostreatus.....	9
1.2.1. Clasificación taxonómica	10
1.2.2. Generalidades	10
1.2.3. Características de <i>Pleurotus ostreatus</i>	10
1.2.4. Propiedades Medicinales.....	11
1.2.5. Compuestos bioactivos.....	11
1.2.6. Actividad antimicrobiana	12
1.3. Extracción	12
1.3.1. Maceración.....	13
1.4. Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos	13
1.4.1. Técnicas de estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos.....	13
1.4.1.1. Técnicas de difusión.....	13
1.5. Antibióticos	14
1.5.1. Generalidades	14
1.5.2. Criterios microbiológicos en la elección del antimicrobiano	14

1.5.2.1. Concentración mínima inhibitoria y bactericida	14
1.5.3. Mecanismos de acción	15
1.5.3.1. Mecanismo de acción de los B-Lactámicos	15
1.5.3.2. Mecanismo de acción de los Aminoglucósidos	18
1.5.3.3. Límites de los diámetros de la zonas de inhibición para cepas patrón (Difusión en medio solido).....	20
1.5.4. Resistencia y Sensibilidad Bacteriana.....	20
1.5.4.1. Resistencia.....	21
1.5.4.2. Sensibilidad	21
1.6. Medios de cultivos	22
1.6.1. Caldo Cerebro Corazón.....	22
1.6.2. Agar Mueller Hinton	23
1.7. Microorganismos de interés microbiológico.....	23
1.7.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	24
1.7.1.1. Clasificación científica	24
1.7.2. <i>Escherichia coli</i>	25
1.7.2.1. Clasificación científica	25
CAPITULO II	
2. METODOLOGIA	26
2.1. Lugar de investigación y pruebas de ensayo	26
2.2. Recursos Naturales.....	26
2.2.1. Materia Prima.....	26
2.2.2. Microorganismos Monitores	26
2.2.3. Equipos.....	27
2.2.4. Materiales de laboratorio.....	27
2.2.5. Reactivos	28
2.2.6. Medios de Cultivo	28
2.3. Técnicas y Métodos.....	28
2.3.1. Recolección de la Materia prima.....	29

2.3.2. Obtención del extracto.	30
2.3.2. Concentración de Extracto Etanòlico	30
2.3.3. Tamizaje Fotoquímico.....	31
2.3.4. Control de calidad del Extracto.....	34
2.3.5. Determinación de la actividad antibacteriana del extracto sobre bacterias de importancia clínica.	37

CAPITULO III

3.1. Resultados del Tamizaje Fitoquímico	41
3.2. Control de Extractos.....	42
3.2.1. Requisitos Organolépticos.....	42
3.2.2. Determinación de Densidad Relativa	42
3.2.3. Determinación del Índice de Refracción	43
3.2.4. Determinación de pH	43
3.2.5. Determinación de Sólidos Totales.....	44
3.3. Resultados de Actividad Antimicrobiana de <i>Pleurotus ostreatus</i>	44
3.3.1. Determinación de Actividad Antimicrobiana mediante Método Difusión en Discos.	44
3.4. Resultados de Análisis de varianza univariante.	45
3.5 Resultados de formación de diámetros con respecto a las concentraciones del extracto de <i>Pleurotus ostreatus</i> y según el tipo de microorganismo <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	46

CONCLUSIONES	48
--------------------	----

RECOMENDACIONES	49
-----------------------	----

BIBLIOGRAFIA

ANEXOS

INDICE DE FIGURAS

Figura 1-1 Diagrama de la célula de un hongo	6
Figura 2-1 <i>Pleurotus ostreatus</i>	9
Figura 3-1 Estructura tridimensional de la pared celular bacteriana.....	16
Figura 4-1 Mecanismo de formación de enlaces cruzados en la estructura de peptidoglicanos.	17
Figura 5-1 Bloqueo del centro activo de la transpeptidasa por las penicilinas	17
Figura 6-1 Ampicilina	18
Figura 7-1 Mecanismo de acción de los Aminoglucósidos.....	19
Figura 8-1 Amikacina	20
Figura 9-1 Microfotografía de <i>S. aureus</i>	24
Figura 10-1 <i>Escherichia coli</i> . Micrografía de barrido. Racimo de bacterias	25
Figura 11-2 Esquema General de Técnicas y Métodos.....	29

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Limites de los diámetros de las zonas de inhibición.....	20
Tabla 2-3: Resultados de Análisis Fitoquímico Cualitativo en: <i>Pleurotus ostreatus</i>	41
Tabla 3-3: Resultados de Características Organolépticas del extracto de <i>Pleurotus ostreatus</i> ..	42
Tabla 4-3: Resultados de Densidad Relativa	42
Tabla 5-3: Resultado de Índice de Refracción	43
Tabla 6-3: Resultado de determinación de pH.....	43
Tabla 7-3: Resultado de determinación de Sólidos Totales En Extractos.....	44
Tabla 8-3: Resultados de Actividad Antibacteriana de <i>Pleurotus ostreatus</i> Mediante el Método de Difusión en discos.	44
Tabla 9-3: Resultados de Análisis de varianza univariante. Pruebas de los efectos inter-sujetos	45

INDICE DE GRAFICAS

Gràfica 1-3 Diámetro formado con respecto a la cincentracion del extracto de <i>Pleurotus</i> <i>ostreatus</i> bajo (30%), medio (70%) y alto (100%).....	46
Gràfica 2-3 Diámetro formado con respecto al tipo de microorganismos (Gram + y Gram -)..	47

INDICE DE ANEXOS

Anexo A Proceso de extracción

Anexo B Tamizaje Fitoquímico

Anexo C Control de calidad del extracto

Anexo D Proceso de elaboración de medios de cultivo y siembra de microorganismos

Anexo E lectura de medios

RESUMEN

El propósito del presente trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana del extracto de *Pleurotus ostreatus*, ante cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Para dicho estudio se preparó un extracto del hongo *Pleurotus ostreatus* mediante un proceso de maceración en medio alcohólico. El extracto fue evaluado realizando el tamizaje fitoquímico y control del mismo. Se utilizó el extracto a diferentes concentraciones: 30, 70 y 100%, posteriormente para la evaluación antimicrobiana se utilizó el Método de Difusión en discos sobre dos bacterias: *Escherichia coli* (American Type Culture Collection ATCC 9637) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). La actividad del extracto fue comparado con sus controles positivos: Ampicilina (10 µg.) y Amikacina (30 µg.). Se trabajó bajo un estándar de 0,5 McFarland y las placas inoculadas se incubaron a 35° por 18 a 24 horas. La actividad antimicrobiana se determinó por la presencia o ausencia de halos de inhibición y la potencia del extracto se estimó midiendo diámetros de halos. El extracto del hongo a una concentración del 100% presentó un halo superior con respecto a las otras. El *Staphylococcus aureus* con respecto a la *Escherichia coli* mostró también un halo de inhibición más grande. Se concluyó que mediante la evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de *Pleurotus ostreatus* se observó que no presenta un halo de diámetro que justifique dicha actividad o a la vez que el diámetro del halo es muy bajo al mínimo del rango presente en bibliografía, ante las cepas debido a que se trabajó con un extracto crudo y no con los compuestos específicos que le dan mayor actividad, por lo que se recomienda realizar una identificación de compuestos terpenicos presentes en el hongo *Pleurotus ostreatus*, debido a que presenta la mayor actividad antimicrobiana.

Palabras clave: <TECNOLOGÍA Y CIENCIAS DE LA INGENIERÍA>, <FITOQUÍMICA>, <MICROBIOLOGÍA>, < HONGO OSTRA (*Pleurotus ostreatus*)> <*Escherichia coli* (BACTERIA)> <*Staphylococcus aureus* (BACTERIA) > <ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA> <DIFUSIÓN EN DISCOS >

SUMMARY

The purpose of the present work was to evaluate the antimicrobial activity of the *Pleurotus ostreatus* extract against the *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains. For this study a *Pleurotus ostreatus* fungus extract was prepared through an alcohol maceration process. The extract was evaluated by conducting a phytochemical screening and a control of the same. The extract was used at different concentrations: 30, 70 and 100%, subsequently for the antimicrobial evaluation the disc diffusion method was used over two bacteria: *Escherichia coli* (American Type Culture Collection ATCC 9637) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). The activity from the extract was compared with its positive controls: ampicillin (10 µg) and amikacin (30 µg). It was performed under a standard of 0, 5 McFarland and the inoculated plates were incubated at 35°C for 18 to 24 hours. The antimicrobial activity was determined by the presence or lack of inhibition halos and the potency of the extract was estimated by measuring the diameters of these halos. The fungus extract at 100% concentration presented a larger halo relative to the others. The *Staphylococcus aureus* relative to the *Escherichia coli* showed an inhibition halo much larger. It was concluded that through the evaluation of the antimicrobial activity of the *Pleurotus ostreatus* extract, we observed that it doesn't present a halo diameter that would justify such activity or at the same time that the halo diameter is less than the minimum range present in bibliography on the strains because a raw extract was used and not with the specific compounds that give it more activity, for which it is recommended to perform an identification of terpene compounds present in the *Pleurotus ostreatus* fungus because it has the highest antimicrobial activity.

KEYWORDS: <ENGINEERING SCIENCE AND TECHNOLOGY>, <PHYTOCHEMISTRY>, <MICROBIOLOGY>, <OYSTER FUNGUS (*Pleurotus ostreatus*)>, <BACTERIA (*Escherichia coli*)>, < BACTERIA (*Staphylococcus aureus*)>, <ANTIMICROBIAL ACTIVITY>, <DISC DIFFUSION>.

INTRODUCCION

Identificación del problema

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los basidiomicetos, 204 especies han sido investigadas contra una serie de microorganismos patógenos al humano y controles de laboratorio. Los extractos de 45% de los aislados, representando las 109 especies mostraron actividad antimicrobiana, para las órdenes de Ascomycetes como Pezizales y Xylariales, Diaporthales, Eurotiales, Hypocreales, Leotiales, Sordariales y Pleurotus. Se observó diferencias a nivel de género, lo que indica que la capacidad de producir dichos compuestos bioactivos no se distribuyen homogéneamente entre los basidiomicetos. Los componentes aislados de algunas especies mostraron diferencia posiblemente por diferencia genética a nivel infraespecífica. (Suay I, 2000, pp. 39-129)

Beltran-García y Col. identificaron compuestos volátiles del cuerpo fructíferos de *Pleurotus ostreatus*, en 1997, como 1-3-octanol, 3-octanol, octanol, 3-octanona y 2 octanona. Dichos compuestos presentaron actividad antimicrobiana contra diversas bacterias tales como *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis*, teniendo un intervalo de concentración mínima inhibitoria (CMI) de 3.9 a 1000 µg/g. (Cruz, 2011, pp. 18-20)

Iwalokun y colaboradores examinaron las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de extractos de acetona y éter de *Pleurotus ostreatus*, en el 2007. El estudio evidenció actividad a bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas y algunos hongos aislados como *Candida albicans* ATCC 1880, *Candida* sp. y *Saccharomyces cerevisiae*, presentándose diámetros de halos de inhibición menores a 10 mm y la CMI osciló entre 65 a 100 mg/mL contra los microorganismos estudiados. Este autor reveló que los extractos utilizados contienen un nivel moderado de terpenoides, taninos, glicósidos esteroidales y carbohidratos.

Rahman y col. 2009 trabajaron con el extracto acuoso de *Pleurotus ostreatus*, el cual mostró efecto contra microorganismos patógenos como *Klebsiella* sp. y *Staphylococcus* sp., usando medio Mc Conkey. (Cruz, 2011, pp. 18-20)

Metabolitos presentes en el género *Pleurotus ostreatus* según Bermúdez y col., (2002) determinaron mediante cromatografía en capa delgada la presencia de dos micoesteroles, los

cuales son ergosterol y peróxido de ergosterol, en extractos de cloroformo-metanol de *Pleurotus ostreatus*.

Extractos hexánicos y metanólicos de cepas parentales (POS, PCM, SEC y UAP9) e híbridas (PAPO, UBPO, SAUA, SAUB) de *Pleurotus* spp. Presentaron sesquiterpenlactonas, glicósidos cardíacos y azúcares reductores. (Cruz, 2011, pp. 18-20)

La resistencia bacteriana es un fenómeno biológico natural, de modo que cada vez que se pone en uso un nuevo agente antimicrobiano (AAM) en la práctica clínica, el laboratorio de microbiología detecta cepas resistentes. Una cepa resistente se define como aquella que es capaz de multiplicarse en presencia de concentraciones mayores que las alcanzadas con dosis terapéuticas. (García, 2003, pp.11-23)

Según la OMS la resistencia a los antimicrobianos se produce cuando los microorganismos sufren cambios al verse expuestos. Los medicamentos se vuelven ineficaces y las infecciones persisten en el organismo. Están apareciendo nuevos mecanismos de resistencia que se propagan a nivel mundial y ponen en peligro nuestra capacidad para tratar enfermedades infecciosas comunes, con el consiguiente aumento de la discapacidad y las muertes, y la prolongación de la enfermedad. La resistencia antimicrobiana aumenta el costo de la atención sanitaria por la mayor duración de las hospitalizaciones y la necesidad de una atención más intensiva. La resistencia de los microorganismos está poniendo en riesgo los logros de los Objetivos de Desarrollo del Milenio y la consecución de los Objetivos de Desarrollo Sostenible. (Castro del Campo, 2004)

Se decidió realizar la actividad antibacteriana *in vitro* de la especie *Pleurotus ostreatus* cultivado en los laboratorios de la ESPOCH, estudiado debido a los pocos estudios que existen en nuestro medio frente a bacterias que provocan una serie de patologías peligrosas para el humano. Permitiendo así aportar importante información para investigaciones posteriores.

Justificación de la investigación

Debido a los tratamientos farmacoterapéutico seguido por pacientes para diferentes tipos de infecciones, que no terminan con su medicación o son educados inadecuadamente ocasionan la resistencia antimicrobiana, existiendo números cada vez mayor de infecciones más fuertes producidas por bacterias, parásitos, virus y hongos.

Es una amenaza cada vez mayor para la salud pública mundial. La resistencia se extiende a escala internacional, una elevada proporción de bacterias responsables de infecciones frecuentes son capaces de resistir la acción de los antibióticos. Un alto porcentaje de las infecciones nosocomiales es causado por bacterias muy resistentes como *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) o bacterias Gramnegativas multirresistentes. (OMS, 2016)

El Ministerio de Salud Pública recomienda, que si una persona presenta alguna enfermedad y por cualquier motivo no puede acudir de inmediato a ser evaluado por un médico, una opción es el uso momentáneo de remedios caseros o naturales, aunque lo óptimo siempre será ir lo más pronto al centro de salud más cercano para tener un diagnóstico exacto y el tratamiento adecuado para cada caso, evitando así la automedicación que conlleva a varios riesgos y como principal está la Resistencia bacteriana al medicamento. (MSP, 2012)

En el Plan Nacional del Buen Vivir en la política 3.2 corresponde a Fortalecer la prevención, control y vigilancia de las enfermedades y desarrollo de capacidades para describir, prevenir y controlar la morbilidad. (PNBV, 2009)

Por otra parte los hongos tienen una defensa contra la invasión bacteriana, han desarrollado fuertes antibióticos, que también resultan ser efectivos para los seres humanos. La penicilina, la estreptomycinina y la tetraciclina provienen de extractos de hongos. Aunque se trata de un estudio pequeño, ofrece esperanzas para la elaboración de tratamientos nuevos, no convencionales, para ayudar a enfrentar infecciones graves.

Muchos hongos han sido empleados durante siglos en la cultura Oriental, especialmente en China y Japón. Hoy en día se han realizado varios estudios que permiten afirmar que muchas especies de hongos son en realidad alimentos funcionales con propiedades medicinales comprobadas. Entre tantas propiedades medicinales de los hongos encontramos la antibacteriana. (UNSAM, 2017)

La resistencia a medicamentos ya es un problema mundial, por esta razón el trabajo de investigación es realizar nuevas búsquedas de antibióticos o actividad antimicrobiana en hongos no estudiados a profundidad como el *Pleurotus ostreatus*, para contrarrestar dichas resistencias infecciosas y así contribuir con la salud y además prevenir la morbilidad de la población.

OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo general

Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto de *Pleurotus ostreatus* ante cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Objetivo específico

- Obtener el extracto etanólico del *Pleurotus ostreatus* mediante maceración.
- Identificar mediante el Tamizaje Fitoquímico los compuestos necesarios que le darán la actividad antimicrobiana en el medio extraído.
- Aplicar el método de difusión en discos en medio sólido, para la inoculación del extracto etanólico de *Pleurotus ostreatus* en los cultivos de *E. coli* y *S. aureus*.
- Comparar la actividad antibacteriana del extracto etanólico del *Pleurotus ostreatus* sobre las diferentes bacterias patógenas con discos control.

CAPITULO I

1. MARCO TEORICO

1.1. REINO FUNGI

Los hongos hoy en día se han ganado un lugar importante en el mundo, no basta decir con las funciones en el ecosistema siendo este fundamental, sino además funciones o influencias en el ser humano y como también en sus actividades. Los hongos son y han sido siempre indispensables en el ambiente y además esenciales en la descomposición, transporte de nutrientes y reciclamiento, algunas son patógenas con animales y plantas y otras forman simbiosis también con animales, algas, plantas y cianobacterias. (Urrutia, 2010, pp3-4)

Los hongos se han definido según las características que cada uno presentan; como organismos eucarióticos, sin clorofila, con nutrición heterótrofa, productores de esporas, reproducción asexual y/o sexual, su estructura formada por un conjunto de hifas, denominadas micelios y rodeada de una pared compuesta de quitina. (Kuhar et al, 2013, pp. 11-13)

En el área farmacológica es de gran importancia los productos naturales de diversos y diferentes especies de hongos. A nivel mundial son importantes por presentar atributos nutricionales y medicinales. Los hongos presentan un sinnúmero de sustancias bioactivas, utilizadas en industrias diversas, como para elaborar algún tipo de medicamento, detergentes, curtiembres, alimentos y para procesos de biorremediación. (Ramírez, 2009, p. 33)

Se denomina a la mayoría de los hongos como macroscópicos incluidos en la división Basidiomycota. Están presentes especies entre las 30.000 setas comestibles que representan el 50% y venenosas un 10%, de los cuales su papel más importante es la descomposición de sustratos vegetales. (Pontón, 2009, p. 5)

Los macromicetes o basidiomicetes son los más evolucionados y se les puede ver a simple vista del Reino fungi. Presentan diversas variedades, siendo diferentes colores, tamaños, formas y aromas. Su estructura macroscópica presenta hifas desarrolladas, dando origen a pseudo-tejidos

que son los llamados cuerpos fructíferos, su diferencia es la producción de basidiosporas por sus basidios. (Brizuela, 1998, p. 70)

Estos hongos bacidiomicetes pueden algunos sobrevivir a condiciones desfavorables y por un largo periodo, siendo así una estructura ascomycota. (Brizuela, 1998, p. 70)

Desde hace miles de años se han consumidos a los hongos por ser nutritivos, por su sabor y por sus propiedades medicinales ya que presentan productos naturales biológicamente activos. Principios activos se han extraído de estos hongos como: terpenos, proteínas, polisacáridos y complejos de péptido-polisacáridos, utilizados para diversos tratamientos. (Kuhar et al, 2013, pp. 11-13)

1.1.1. Morfología

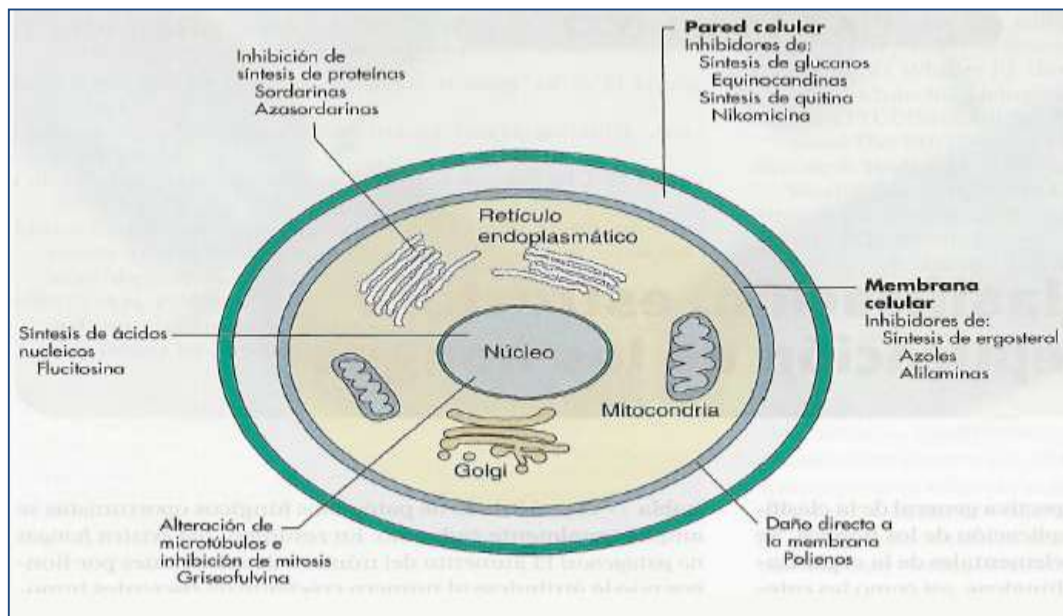


Figura 1-1 Diagrama de la célula de un hongo

Fuente: (Murray et al, 2007)

1.1.1.1 Pared celular fúngica

La pared celular fúngica es una estructura relativamente rígida y a la vez dinámica que tiene diferentes funciones muy esenciales como para su crecimiento y también su desarrollo en el ambiente en el que este se desarrolla. (Gregori, 2005, pp. 1-2)

La pared celular de los hongos es muy compleja y está compuesta por sales minerales, pigmentos, lípidos, proteínas y carbohidratos en orden creciente, el 80% del peso seco del hongo pertenece solamente a los carbohidratos. (Gregori, 2005, pp. 1-2)

La pared celular fúngica está básicamente compuesta por proteínas y polisacáridos a diferencia de la pared celular de la vegetal que es fundamentalmente de celulosa. Según perteneciendo este a la división de Basidiomicetes está compuesta del 10% de proteínas, 33 de quitina y el 50% de polisacáridos. (Díaz, 2006, pp. 856-860)

1.1.2. Principales componentes

1.1.2.1. Terpenoides

Los terpenoides son 5 unidades de tomos de carbono unidos y debe ser múltiplo del esqueleto C5 del isopreno, así tenemos:

- Hemiterpenos (C_5H_8)
- Monoterpenos ($C_{10}H_{16}$)
- Sesquiterpenos ($C_{15}H_{24}$)
- Diterpenos ($C_{20}H_{32}$)
- Sesterpenos ($C_{25}H_{40}$)
- Triterpenos ($C_{30}H_{48}$)
- Tetraterpenos ($C_{40}H_{64}$)
- Politerpenos (C_5H_8)_n

Estos metabolitos no son utilizados en el crecimiento, ni en la reproducción y por ende se los caracterizan. Estos metabolitos dependen de igual forma en las condiciones en las cuales el hongo se encuentre el cultivo, son producidos a partir de metabolitos primarios y ciertas especies no lo hacen, dependiendo el género. (Palà, 2002, pp. 28-29)

Estos compuestos no son necesarios en el funcionamiento intracelular pero si en interacción entre organismos y ambiente. (Carrera, 2002 p. 84-85)

El solamente conocer la existencia de estos compuestos en el hongo, este tiene una importancia farmacológica importante, presentan sustancias antivirales, antifúngicas y antibacterianas. (Carrera, 2002 p. 84-85)

1.1.2.2. Proteínas

Los hongos representan de 20 a 30% de peso seco en su pared celular de los filamentosos, mientras que en los hongos leveduriformes es el 30-50%. Las proteínas forman glicoproteínas al enlazarse entre glúcidos por O o N. (Corrochano, 2013, p. 10)

Tienen diferentes funciones como darle forma celular, en procesos de adhesión, protección de sustancias dañinas o extrañas, proceso de absorción de varias moléculas, transmisión de señales al citoplasma, etc. (Pontón, 2008, p.79)

1.1.2.3. Polisacáridos

Los polisacáridos se encuentran muy externamente de la pared celular, además son muy abundantes y son polímeros de carbohidratos, su composición incluye:

- β -glucanos
- heteroglucanos
- β -heteroglicanos
- α - β -mano-glucanos
- complejos que se encuentran en macrohongos.

Estos polisacáridos tienen la actividad mayormente inmunomoduladora y antitumoral. (Talavà, 2013. p. 44)

1.1.2.3.1. β -glucanos

Los hongos presentan en mayor cantidad glucanos con diferentes enlaces así como: (1->3), (1->6) – β -glucanos y lineales (1-3)- α glucanos y otros son heteroglicanos. (Talavà, 2013. pp. 46-48)

La actividad inmunomoduladora y antitumoral la tienen una amplia gama de estos compuestos siendo homopolímeros a heteropolímeros. La actividad antitumoral se conoce a través del β -(1->3), (1->6)-glucanos. Su fuente principal de este tipo de compuestos es de la pared celular que tienen el complejo quitina-glucano. (Talavà, 2013. pp. 46-47)

1.1.2.3.2. *Quitina*

En la dietas, los hongos presentan una gran cantidad de fibra por la presencia de polisacáridos no digeribles en el organismo, como es la quitina. Este es un compuesto biopolímero que está presente como polisacárido. Es uno de los componentes más importantes y necesarios en la pared celular. Su función principal es la de mantener la forma, la resistencia y su integridad celular.(Talaván, 2013. p. 48)

1.1.2.3.3. *Quitosano*

El quitosano es un derivado del polisacárido quitina, es un polímero, no es tóxico, es biodegradable, no alérgico y además de alto peso molecular. Propiedades fundamentales como Hipoglicemiante, hipolipemiante o como biopiel, es decir para reducir el sobrepeso, obesidad y para pacientes con quemaduras en la piel.(Velásquez,2013,pp. 91-94)

1.2. PLEUROTUS OSTREATUS



Figura 2-1 *Pleurotus ostreatus*

Fuente: (Herrera et al, 2000)

1.2.1. Clasificación taxonómica

Reino: Fungi

Subreino: Fungi superior

División: Basidiomycota

Clase: Himenomycetes

Subclase: Holobasidiomicetidae

Orden: Agaricales

Familia: Tricholomataceae

Género: *Pleurotus*

Especie: *Ostreatus*(Hernández,2012, p. 28)

1.2.2. Generalidades

Dichos anteriormente a estos hongos pertenecientes a la clase basidiomicetos comestibles, presentan basidios que producen basidiosporas. Este género son principalmente degradadores de material lignocelulósico, es decir que para su crecimiento utilizan nada más que material agrícola como también agroindustrial.(Macías,1996, pp. 16-18)

El *Pleurotus ostreatus* pertenece al grupo del 10% de los hongos comestibles de entre las 10000 especies, es de origen húngaro, conocido como seta ostra, gírgola, orellana, seta de chopo, etc. (Varnero, 2010, pp.13-20)

1.2.3. Características de *Pleurotus ostreatus*

El *Pleurotus ostreatus* o seta de ostra, es una gran fuente de selenio, lo que ayuda en el ser humano como micronutriente para el metabolismo, además también tiene efecto antioxidante lo que significa que ayuda mucho en algunos tipos de cáncer. Su gran cantidad de polisacáridos presentes en este permite darle una acción inmunomoduladora.(Sánchez,2015, pp. 37-39)

Este hongo es de tipo degradador de materia orgánica, se alimenta principalmente de lignina y celulosa proveniente de materia ya muerta. Ejemplo:

- Paja
- Rastrojo de maíz
- Caña
- Trigo
- Cebada,
- Centeno
- Avena
- Arroz
- Jaragua
- Bernuda
- Pasto estrella, etc.(Ardón,2007, p. 96)

1.2.4. Propiedades Medicinales

El hongo *Pleurotus ostreatus* ayuda al organismos combatiendo enfermedades, dando el bienestar y su equilibrio, por ende es considerado como uno de los probióticos, permitiendo que la salud del ser humano no se desequilibre.

Esta seta tiene diferentes actividades y es útil para la hipertensión, obesidad, combate problemas cardiovasculares, es hepatoprotector, inmunomodulador, antifúngico, antibacterianos, etc.(Pineda,2014, p. 11)

1.2.5. Compuestos bioactivos

Este tipo de hongos contienen fibra dietética, bajo nivel de sodio, grasa insaturada, proteínas y minerales, es por eso que son hongos comestibles, pero además también presentan otro tipo de sustancias como los glucanos, enzimas, policétidos, ácidos grasos, polifenoles, flavonoides, terpenoides, etc.(Pineda,2014, p. 16)

1.2.6. Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana del hongo *Pleurotus ostreatus* se ha desarrollado por la sobrevivencia que tienen de unos a otros y en este caso a microorganismos. Es decir que este hongo aparte de ser comestible produce compuestos antibióticos u tóxicos para combatir otro tipo de microorganismos como bacterias, levaduras o hasta otro tipo de hongos. (RAMIREZ, 2009, p. 59)

La actividad antibacteriana del hongo ostra está relacionada con la cantidad de compuestos Terpenicos presentes en el mismo. Cabe recalcar que la producción de este tipo de compuestos se producen ya sean en plantas u hongos en condiciones desfavorables es decir en condiciones de estrés para el ser vivo. Los compuestos terpenicos que principalmente tiene esta acción y en su mayor porcentaje son los Sesquiterpenos teniendo propiedades bactericida, especialmente el 3-hidroxil-metilglutaril CoA. (Ambriz, 2014, p. 6)

1.3. EXTRACCIÓN

La extracción es una técnica utilizada para separar y purificar componentes que se encuentren en una mezcla de compuestos o ya sea en fuentes naturales. Se lo puede realizar mediante un solvente orgánico. El objetivo de esta técnica es transferir una sustancia de una fase a otra. Puede ser en caliente o en frío. Existen diferentes métodos de extracción:

- Lixiviación
- Hidrodestilación
- Maceración
 - Maceración en frío
 - Maceración con calor (Carrión, 2010, p. 27)

1.3.1. Maceración

1.3.1.1. Maceración en frío

Esta técnica consiste en colocar el producto a extraer los compuestos en un recipiente cerrado con la cantidad de solvente necesario, por un largo periodo, la ventaja de este es que los compuestos son en su totalidad inalterados. (Lasanta, 2009, p. 109)

1.4. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

Las pruebas de sensibilidad tienen como objetivo evaluar la respuesta a uno o varios antimicrobianos. Es decir el antibiograma define la actividad *in vitro* de un antibiótico frente a microorganismos determinados, lo que refleja que el antibiótico tiene la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano o población bacteriana. Criterios microbiológicos, farmacológicos y clínicos son necesarios para sustentar tratamientos farmacológicos y combatir así enfermedades infecciosas. (Rolger, 1997, pp. 297-298)

1.4.1. Técnicas de estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos

Se clasifican según la función en la que son utilizados los antimicrobianos:

Técnica de Dilución → incorpora al medio de cultivo sólido o líquido

Técnica de Difusión → aplica discos o tiras de papel filtro. (Rolger, 1997, p. 298)

1.4.1.1. Técnicas de difusión

Es el método más sencillo, utiliza discos de papel filtro con el antimicrobiano, colocados en la superficie del medio de cultivo sólido previamente inoculado la suspensión bacteriana. No existe crecimiento bacteriano cuando la concentración del antimicrobiano es mayor o superior al valor de la CMI, observando un halo de inhibición alrededor del disco, lo que indica que el diámetro formado por el disco, relaciona el grado de sensibilidad o resistencia del microorganismo al antibiótico. (Rolger, 1997, pp. 301-302)

1.5. ANTIBIÓTICOS

1.5.1. Generalidades

Los antibióticos o antimicrobianos son sustancias elaboradas naturalmente, sintéticas o también semi-sintéticas, para inhibir el crecimiento de bacterias, virus u hongos a concentraciones bajas. (Medina, 2000, pp. 59-60)

Los antibióticos impiden o inhiben el crecimiento de los microorganismos sin causar daño al individuo en sus funciones metabólicas. Su eficacia depende del estado inmunológico del paciente y de sus defensas naturales. Su mal uso puede producir resistencia o efectos indeseables. (Rolger, 1997, pp. 255-257)

1.5.2. Criterios microbiológicos en la elección del antimicrobiano

1.5.2.1. Concentración mínima inhibitoria y bactericida

1.5.2.1.1. Antibiótico bacteriostático

Inhibe el crecimiento o desarrollo de las bacterias, en este fenómeno los microorganismos pueden continuar con su desarrollo o crecimiento una vez se elimine el antibiótico. (Rolger, 1997, p. 258)

1.5.2.1.2. Antibiótico bactericida

Producen inhibición en el crecimiento de las bacterias y producen también la muerte celular, siendo así una acción irreversible.

Las diferencias entre bactericida y bacteriostático no siempre están claro y es que depende de la especie bacteriana y de la concentración del antibiótico. (Rolger, 1997, p. 258)

La actividad del antimicrobiano se realiza en función de:

- **Concentración mínima inhibitoria (CMI):** es la concentración mínima del antimicrobiano que inhibe el crecimiento bacteriano.
- **Concentración mínima bactericida (CMB):** concentración mínima de antimicrobiano capaz de matar el 99.9% de la población bacteriana.
- **Concentración mínima antibiótica (CMA):** es la mínima concentración de antimicrobiano capaz de producir alteración morfológica o en la estructura de la bacteria.

La CMI, CMB, CMA son probadas *in vitro* la concentración del antimicrobiano frente a los agentes infecciosos. Se expresan en µg/ml o en mg/l.

La CMI es utilizada como referencia en el estudio de sensibilidad, además también establece resistencia o sensibilidad del microorganismo al antibiótico en función de este valor. (Rolger, 1997, pp. 259-260)

1.5.3. Mecanismos de acción

1.5.3.1. Mecanismo de acción de los *B-Lactámicos*

Este tipo de antibióticos β-Lactámicos, inhiben el crecimiento bacteriano ya que interfieren en el proceso de biosíntesis de la pared celular de la bacteria, por lo que pared celular no presentan células eucariotas, lo que les hacen selectivos en el organismo.

La pared celular presenta o están formadas por una estructura de peptidoglicanos; unidades peptídicas y glucosídicas, formando una estructura tridimensional. Es esencial el enlace de la pared celular formada por la glicina (Gly) y de D-alanina (D-Ala) que es catalizada por la enzima transpeptidasa. (Delgado, et al, 2003, pp. 427-430)

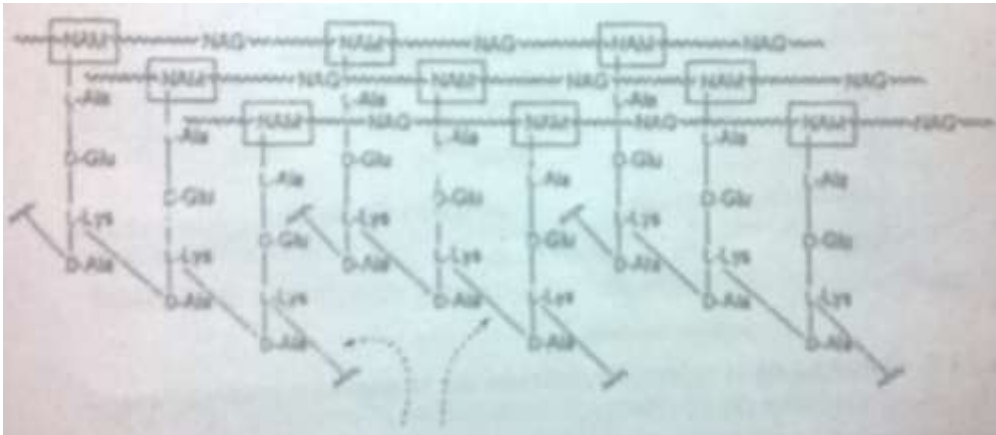


Figura 3-1 Estructura tridimensional de la pared celular bacteriana

Fuente: (Delgado, 2003)

El mecanismo de acción está basada en la similitud estructural con la conformación adoptada por el fragmento D-Ala-D-Ala, que interviene en la formación de los enlaces cruzados. Los β -Lactámicos son erróneamente reconocidos como sustrato por la transpeptidasa, por lo que el centro activo queda acilado por reacción con el sistema de β -lactama. La acilación depende de: la reactividad de la β -lactama y su orientación adecuada para permitir el ataque de un resto nucleòfilo del centro activo de la enzima.

La orientación del antibiótico en el seno de la proteína dependerá de los grupos funcionales que rodean al carbonilo β -lactámico, especialmente el grupo carboxilato de la posición 2 y el sustituyente R de la carboxamida de la posición 6. Estos grupos establecen una interacción reversible con la enzima, seguida de un enlace covalente irreversible. La traspeptidasa acilada en su centro activo es incapaz de reaccionar con el resto de glicina de la cadena lateral del peptidoglicano, por lo que queda interrumpido el proceso de formación de la pared celular bacteriana. (Delgado, et al, 2003, pp. 427-430)

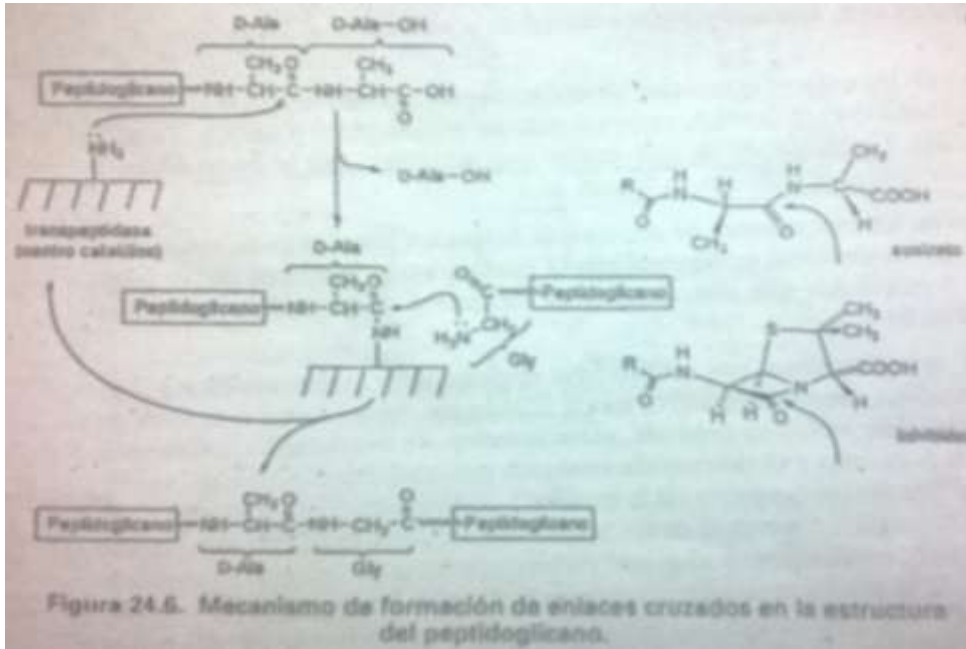


Figura 4-1 Mecanismo de formación de enlaces cruzados en la estructura de peptidoglicanos

Fuente: (Delgado, 2003)

Además de interferir en la síntesis de peptidoglicano bloqueando en la última etapa de su producción (transpeptidación), actúan también activando la autolisina bacteriana endógena que destruyen el peptidoglicano. Denominándolos bactericidas parciales porque actúan en la fase de crecimiento, su eficacia es tiempo dependiente ya que su efecto ocurre a concentraciones de 4-5 veces mayor o por encima de la CMI. (Gómez, 2015, pp.1-2)

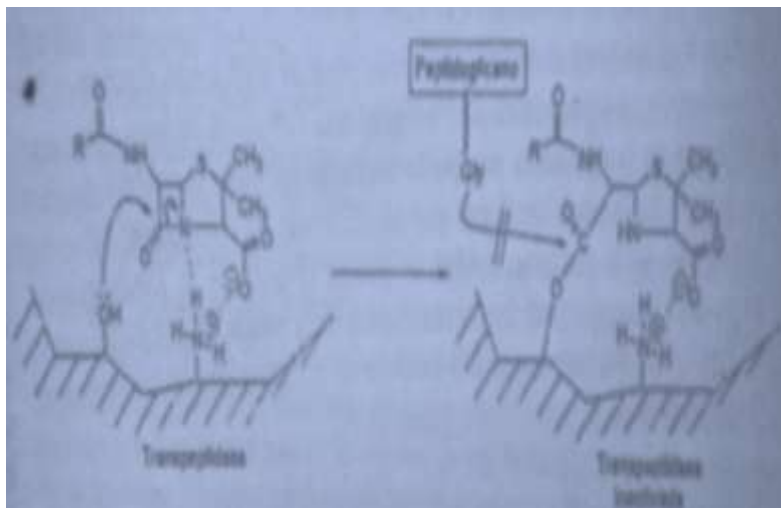


Figura 5-1 Bloqueo del centro activo de la transpeptidasa por las penicilinas

Fuente: (Delgado, 2003)

1.5.3.1.1. Ampicilina

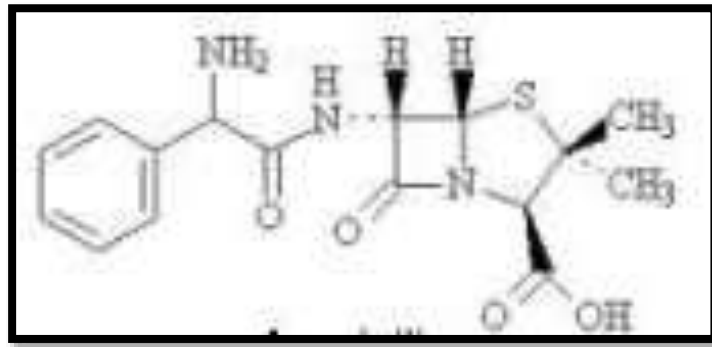


Figura 6-1 Ampicilina
Fuente: (ANMAT, 2010)

Es un antibiótico penicilínico semisintético, de vía oral activo, resistente a los ácidos y de amplio espectro frente a microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos, es más activo que las penicilinas naturales. Derivada del núcleo 6-aminopenicilánico, es bactericida y actúa en la biosíntesis de la pared celular. (Lozano, 1998, p. 34)

1.5.3.2. Mecanismo de acción de los Aminoglucósidos

Son antibióticos que inhiben la biosíntesis de proteínas por interacción de ribosomas bacterianos, al igual que las células eucariotas y procariotas la síntesis proteica es similar, lo que se diferencia son la composición proteica de los ribosomas, por lo que el antibiótico es selectivo. Esta interferencia en: inhibición del crecimiento celular o procesos bioquímicos esenciales para la bacteria explica el efecto bacteriostático o bactericida de los antibióticos. (Delgado, et al, 2003, p. 449)

Los aminoglucósidos atraviesan membrana difundidos por poros formados de proteínas porinas, a través de un transporte concentrativo (contra gradiente: dependiente de energía), se unen a la subunidad 30s de los ribosomas, proteínas que constituyen el sitio de unión del ARNt al ribosoma, provocando alteración en la interacción codón-anticodón, realizando una mala lectura del código genético.

En las bacterias susceptibles conducen a una retroalimentación positiva o feedback positiva del mismo, acelerando la producción de proteínas anómalas siendo más termolábiles y que se destruyan fácilmente con el consiguiente aumento de la incorporación de aminoácidos (efecto bactericida).

Otra consecuencia de los aminoglucósidos a la fracción ribosomal 30s es la aceleración del ingreso del antibiótico a la célula mediado por proteínas anómalas. Las proteínas aberrantes pueden ser insertadas en la membrana bacteriana alterando su permeabilidad y estimulando el paso de más cantidad de aminoglucósidos.

Evidencias sugiere que los aminoglucósidos podrán inhibir los procesos de iniciación y elongación de la síntesis de proteínas:

- Los aminoglucósidos se unirían a los ribosomas 70s impidiendo su separación en subunidades, paso necesario para la formación de complejo de iniciación.
- La elongación estaría afectada por lo que las drogas impedirían la unión del aminoacil-ARNt al ribosoma.

En bacterias resistentes, la mala lectura del código genético puede producir la supresión fenotípica de una mutación desfavorable para la bacteria; lo que explicaría los fenómenos hórmesis y dependencia. (VIVES E. A. et al., 2004)

Los aminoglucósidos al ser aumentados al máximo su dosis, permitiendo al límite de toxicidad, estudios han comprobado que el cociente entre la concentración máxima y concentración mínima inhibitoria $C_{\max}/CMI \geq 10$ consigue el máximo efecto bactericida, disminuyendo así la selección de subpoblaciones resistentes. (Palomino J, at al., 2003, p. 106)

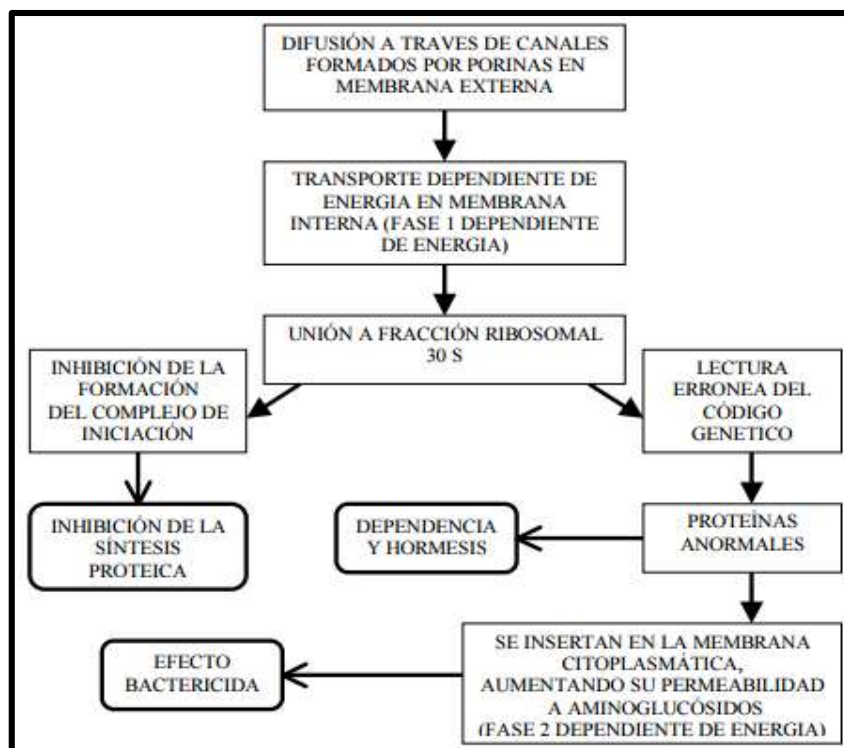


Figura 7-1 Mecanismo de acción de los Aminoglucósidos

Fuente: (Delgado, et al, 2003)

1.5.3.2.1. Amikacina

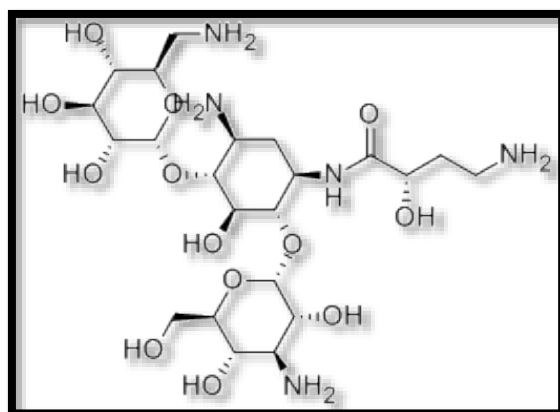


Figura 8-1 Amikacina

Fuente: (ANMAT, 2010)

Es un aminoglucósido semisintético derivado de la kanamicina. Absorción gastrointestinal escasa, amplio espectro intramuscular o por perfusión. Actúa penetrando la pared celular, uniéndose a los lipopolisacáridos y por difusión lenta de los poros. (Delgado y Minguillon, 2003, pp. 449-450)

1.5.3.3. Límites de los diámetros de las zonas de inhibición para cepas patrón (Difusión en medio sólido).

Tabla 1-1: Límites de los diámetros de las zonas de inhibición para cepas patrón

Agente antimicrobiano	<i>E. coli</i> ATCC ^a 25922	<i>S. aureus</i> ATCC ^a 25923
Amikacina	19-26	20-26
Ampicilina	16-22	27-35

Realizado por: FLORES G, 2017
FUENTE: Boquet, 1990, p. 241

1.5.4. Resistencia y Sensibilidad Bacteriana

A través del fenotipo de sensibilidad o resistencia se detectan mediante técnicas. Este fenotipo resulta de la ausencia o presencia de determinados procesos bioquímicos que afectan al mecanismo de actuación del antimicrobiano. El mecanismo de resistencia depende de la

dotación genética de la bacteria, es decir presencia o ausencia de uno o varios determinantes genéticos de resistencia.

1.5.4.1. Resistencia

La resistencia a los antibióticos es un fenómeno que cada vez crece parcial o totalmente en los microorganismos al antibiótico, la razón es por el uso indiscriminado e irracional de estos, sufriendo cambios al verse expuestos y desarrollando mecanismo de resistencia que impidan al antimicrobiano realizar su mecanismo de acción. Causando así que los medicamentos sean ineficaces y las infecciones persistan en el organismo, incrementando y propagando a otras personas y causando un gran porcentaje de morbilidad y mortalidad. (Medina, 2000, p. 59)

La resistencia bacteriana de determinados antibióticos se conoce como intrínseca o natural, adquirida y transmisible.

La resistencia natural o intrínseca es en las bacterias que carecen de diana para un antibiótico

La resistencia adquirida puede ser por cambios en el ADN cromosómico, provocado por mutación o la adquisición de materia genética extracromosómico mediante transferencia genética.

Y la resistencia transmisible es mucho más importante, son mediadas por plásmidos, transposones o integrones pudiendo pasar de una bacteria a otra. (Daza, 1998, p. 59)

1.5.4.2. Sensibilidad

La sensibilidad bacteriana a los antibióticos es importante y fundamental en los laboratorios, las pruebas de sensibilidad son llevadas a cabo por el antibiograma que sirve para medir la sensibilidad de una cepa bacteriana a uno o varios antibióticos, es necesario mantener constante numerosas variables como: el inóculo bacteriano y la concentración del antibiótico. El estudio es *in vitro*, es uno de los requisitos previos para la eficacia *in vivo* de un tratamiento antibiótico, como también es importante en los estudios sobre la evolución de la resistencia bacteriana que permite revisar los protocolos de la antibioticoterapia empírica. (Flores, 1985, p. 30)

El análisis de sensibilidad determina la efectividad de los antibióticos contra bacterias o microorganismos que han sido aisladas en los cultivos.

Existen dos tipos de análisis de sensibilidad a los antimicrobianos: los cualitativos y los cuantitativos.

- Cualitativos: antibiograma de disco o difusión en agar. Permite clasificar directamente a un microorganismo como sensible o resistente.

- Cuantitativos: método de dilución y los Etest o elipsograma. Permiten determinar la CMI y la CMB. (Herrera, 1999, pp. 33-41)

1.6. MEDIOS DE CULTIVOS

Un medio de cultivo es un material nutritivo preparado para el crecimiento de los microorganismos en el laboratorio. Cada bacteria necesita medios en las que se puedan desarrollar y cumplan con sus necesidades, es decir necesitan contener nutrientes adecuados, humedad y pH. Existen medios sólidos y medios líquidos. (Tortora, 2007, p. 168)

Dependiendo a los microorganismos existe:

- medios generales
- selectivos
- diferenciales
- selectivo-diferencial
- enriquecimiento. (Brock, 1976, pp. 2-3)

1.6.1. Caldo Cerebro Corazón

Es un medio líquido de enriquecimiento para cultivo de bacterias anaerobias y aerobias, ya sean exigentes o no exigentes

Su composición:

- infusión de cerebro y corazón de (sólido) 8.0g
- digerido péptico de tejido animal 5.0g
- digerido pancreático de caseína 16.0g
- cloruro de sodio 5.0g

- glucosa 2.0g
- fosfato disódico de hidrogeno 2.5g
- agar 13.5g
- pH $7,4 \pm 0.2$ (Paredes, 1994, p. 160)

1.6.2. Agar Mueller Hinton

Es un medio utilizado especialmente para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana con el método de difusión de discos. Es un medio que permite el crecimiento de bacterias no exigentes: entre ellos se encuentran las enterobacterias, estafilococos, entre otras.

Su composición es

- Infusión de carne 3.0 g (polvo)
- peptona acida de caseína 17.5g
- almidón 1.5g
- agar 15.0g
- pH 7.3 ± 0.1 (Forbes, 2009, p. 194)

1.7. MICROORGANISMOS DE INTERÉS MICROBIOLÓGICO

Los microorganismos son organismos vivos no visibles para la vista del ser humano, entre ellos se encuentran las bacterias, virus y hongos. Son seres tan diminutos que son observados solo con un microscopio, conocidos también como microbio u organismo microscópico. Son unicelulares la mayoría, aunque existen también multicelulares, también son procariotas y eucariotas. Presentan varias formas y tamaños. (Hernandez, 1990, p. 6)

1.7.1. *Staphylococcus aureus*

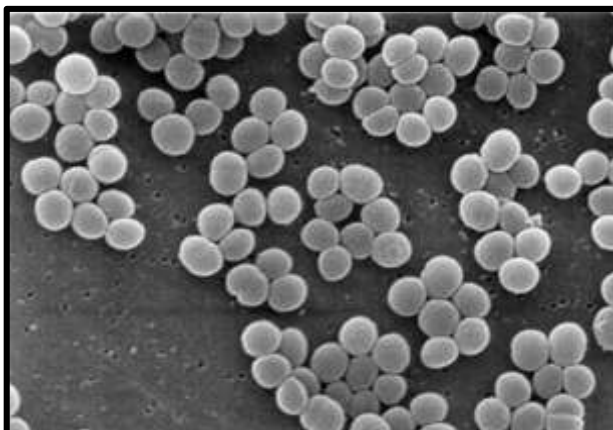


Figura 9-1 Microfotografía de *S. aureus*
Fuente: (UNAM, 2011)

Staphylococcus aureus o conocido como estafilococo dorado, es un microorganismo muy importante en la salud ya que es conocido como un agente importante patógeno en el ser humano. Pertenecen a la flora natural de la piel y mucosas del hombre. Es un coco Gram-positivo, no forma esporas, no es móvil, anaerobio facultativo, produce catalasa, coagulasa.

Sus colonias son de 1 a 3mm, producen una coloración amarilla por presencia de carotenoides y producen hemólisis de 24-36horas.

Este tipo de microorganismos es de importancia clínica por la alta patogenicidad que presenta. Es un tipo de microorganismos oportunista ya que en la piel lesionada producen daño o afección de amplio espectro, infectan el sistema nervioso, entre otras, también producen enterotoxinas produciendo intoxicación alimentaria. Producen enzimas y citotoxinas que tienen como función ayudar a degradar tejidos del huésped para utilizar como nutrientes. (Cervantes, et al., 2014, p. 30)

1.7.1.1. *Clasificación científica*

Reino: Bacteria

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Staphylococcaceae

Género: *Staphylococcus*

Especie: *S. aureus*

Nombre binomial: *Staphylococcus aureus*. (Gil 2000, p. 145)

1.7.2. Escherichia coli



Figura 10-1 Escherichia coli. Micrografía de barrido. Racimo de bacterias

Fuente: (Molina, 2011)

Este microorganismo se encuentra normalmente en el tracto gastrointestinal del ser humano y de animales de sangre caliente, siendo un hábitat intestinal natural, es la principal indicador de contaminación fecal.

Es un bacilo Gram negativo, no forman esporas, son móviles ya que presentan flagelos peritricos, producen catalasa, oxidasa, reducen nitritos a nitratos y producen vitamina B y K, es una bacteria no exigente, producen gas y es un anaerobio facultativo.

1.7.2.1. Clasificación científica

Reino: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: Escherichia

Especie: E. coli.

Nombre binomial: Escherichia coli. (Molina y Escavala, 2011)

CAPITULO II

2. METODOLOGIA

2.1. Lugar de investigación y pruebas de ensayo

La presente investigación se realizó en:

- Laboratorio de Recursos Naturales de la Facultad de Ciencias de la Escuela de Bioquímica y Farmacia.
- Laboratorio de Biotecnología ESPOCH, Facultad de Ciencias, Escuela de Biotecnología Ambiental

2.2. Recursos Naturales

2.2.1. *Materia Prima*

- Hongo (*Pleurotus ostreatus*)

2.2.2. *Microorganismos Monitores*

- *Escherichia coli* ATCC 9637
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

2.2.3. Equipos

- Rotavapor
- Autoclave
- Refrigerador
- Cámara de aislamiento de flujo laminar
- Balanza de precisión
- Estufa
- Cámara fotográfica
- Computadora
- Sorbona
- Cámara UV
- Refrigeradora
- Refractómetro
- pH-metro
- Estufa

2.2.4. Materiales de laboratorio

- Reverbero
- Guantes estériles
- Mascarilla
- Cofia
- Espátula
- Piseta
- Cajas Petri de plástico (140x15)
- Lámpara de alcohol
- Matraz enlermeyer de 250mL.(3)
- Matraz enlermeyer de 100mL
- Pipetas de 1mL, 5mL.
- Papel aluminio
- Tubos de ensayo
- Tubos de ensayo con tapas
- Balón esmerilado de 500mL.
- Pera de succión
- Pinzas de tubo
- Espátula
- Bolsa de esterilización
- Pinzas
- Gradilla
- Vasos de precipitación de 50mL, 1000mL.
- Cuchillo
- Papel secante
- Cápsula
- Desecador
- Picnómetro
- Frasco color ámbar de 4Lts, 250mL.
- Probeta de 500mL.
- Parafilm
- Micropipeta de 10µL y 5 µL
- Puntas amarillas de micropipeta
- Papel filtro
- Frasco color ámbar de 4Lts, 250mL.
- Perforadora
- Papel bon
- Cinta indicadora
- Marcador
- Isopos
-

2.2.5. Reactivos

- Agua destilada
- Alcohol 96%
- Caldo Cerebro Corazón
- Medio agar Mueller Hinton
- BaCl₂
- H₂SO₄
- Colorante Sudan III
- Ácido clorhídrico 1%
- Reactivo de Dragendorff
- Cloruro de Sodio
- Reactiva de Mayer
- Reactivo *Wagner*
- Agua destilada
- Alcohol amílico
- Reactivo de Sudan
- Reactivo de Lieberman Buchard
- Reactivo para Catequinas
- Reactivo de Shinoda
- Reactivo *Baljet*
- Cloroformo
- Hidróxido de potasio
- Anhídrido acético
- Cloroformo
- Ácido sulfúrico concentrado
- solución de carbonato de sodio
- Reactivo de Fehling A
- Reactivo de Fehling B
- Solución de tricloruro férrico al 5 %
- Cloruro de sodio al 0.9 % en agua
- Ácido clorhídrico concentrado
- Cinta de magnesio metálico
- Reactivo para resinas
- Reactivo de FeCl₃
- Reactivo de Ninhidrina
- Reactivo de Borntrager
- Reactivo de Antocianidinas

2.2.6. Medios de Cultivo

- Agar Mueller Hinton
- Caldo Cerebro Corazón

2.3. Técnicas y Métodos

La investigación se desarrolló en dos ámbitos importantes, el primero fue la preparación de extracto y su respectivo análisis fotoquímico del extracto alcohólico.

El segundo fue la determinación de la Actividad antibacteriana en microorganismos monitores ATCC mediante el método de sensibilidad bacteriana a partir de difusión de extracto en discos.

A continuación se indica el proceso que se efectuó.

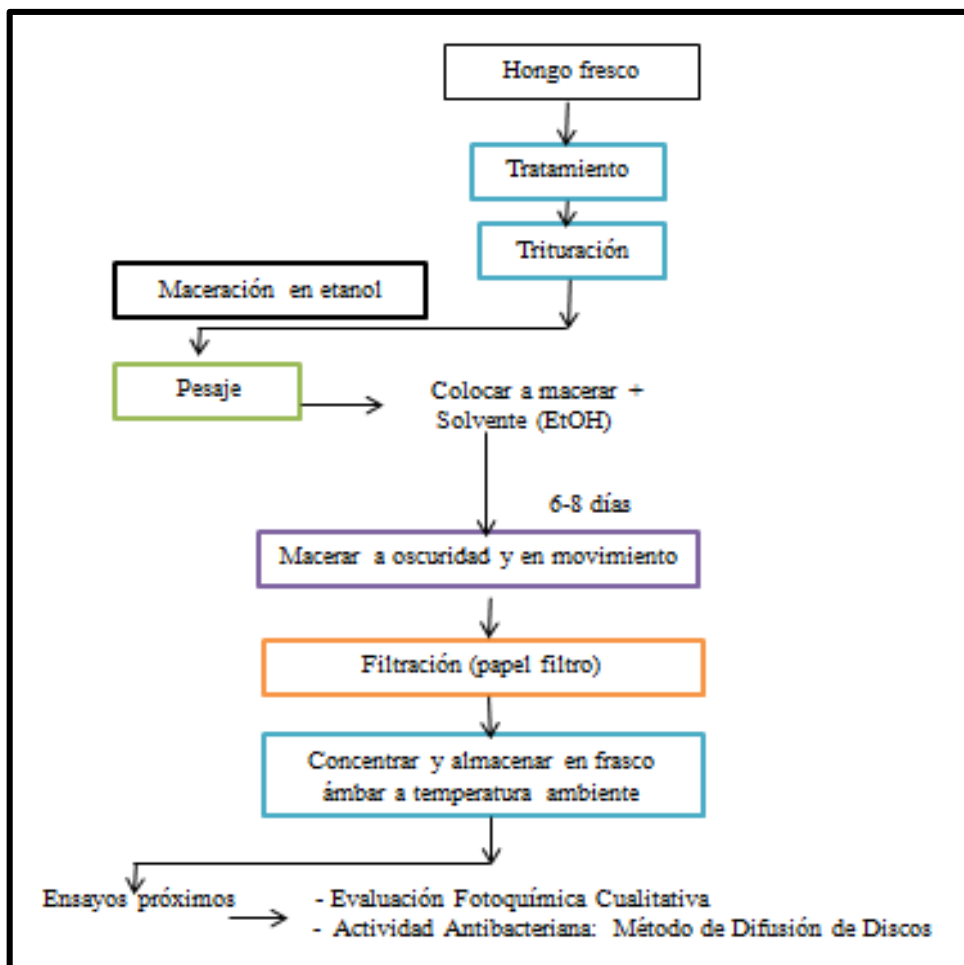


Figura 111-2 Esquema General de Técnicas y Métodos
Realizado por: FLORES, G. 2106

2.3.1. Recolección de la Materia prima

- Hongo Ostra *Pleurotus ostreatus* procedente de:

Provincia: Chimborazo

Cantón: Riobamba

Parroquia: Riobamba

Lugar: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; Laboratorio de Biotecnología Ambiental

2.3.2. Obtención del extracto.

2.3.2.1. Obtención de extracto alcohólico - Método de Maceración

La técnica de maceración es un proceso que se emplea para extraer principios activos de un sólido hacia un líquido. La materia prima en este caso el hongo contiene ciertos compuestos que son solubles en el líquido que se utiliza como extractante (alcohol). Como ventaja existe la extracción de los activos sin alterar en lo más mínimo.

El procedimiento para la extracción es:

- Seleccionar la materia prima (hongo).
- Se procedió a lavar el hongo con agua purificada para eliminar impurezas.
- Se trituró el hongo en pequeños fragmentos para facilitar su extracción.
- Se pesó la cantidad de 150g de hongo
- Se midió un volumen de 300mL de alcohol
- Luego se colocó en el frasco estéril color ámbar con tapa el hongo triturado y posteriormente el alcohol al 96%.
- Se dejó reposar por 8 días en la obscuridad, agitando de 20 a 30 minutos diarios para obtener el extracto alcohólico.
- Al culminar los 8 días, se procedió a filtrar para de este modo obtener el extracto alcohólico.

2.3.2. Concentración de Extracto Etanólico

- Se agregó agua en el Baño María hasta una marca señalada.
- Se debe encender el equipo y conectar las mangueras adecuadamente.
- Se colocó 150 mL de extracto etanólico en el balón de fondo plano.
- Se sujetó el balón en el adaptador y se colocó en el baño María para el traspaso de vapor.
- Se abrió la llave de agua que conecta la manguera con el refrigerante y con el botón de rotación del equipo se reguló la velocidad de evaporación a 7 (90 -110 rpm), se procuró evitar el exceso de velocidad y la formación de una película espesa alrededor del balón.
- Repetir el procedimiento hasta concentrar todo el extracto.

2.3.3. Tamizaje Fotoquímico

El Tamizaje fotoquímica permite determinar cualitativamente los principales grupos fotoquímicos presentes en la materia prima, a partir del empleo de solventes apropiados y reacciones de caracterización y coloración. Se aplica esta técnica de tamizaje para conocer la composición química general, de forma rápida.

Para la determinación cualitativa de compuestos presentes en un extracto del hongo se tomó una alícuota (30 mL) del extracto Etanólico (Método de Maceración).

Determinación de Compuestos Grasos

- **Ensayo de Sudan**

La alícuota de la fracción en el solvente de extracción, se le añade 1 mL de una solución diluida en agua del colorante Sudan III o Sudan IV. Se calienta en baño de agua hasta evaporación del solvente. La presencia de compuestos grasos se considera positiva si aparecen gotas o una película coloreada de rojo en el seno del líquido o en las paredes del tubo de ensayos respectivamente. (Miranda, M. 2006, p 1)

Determinación de Alcaloides

- **Ensayo de Dragendorff**

La alícuota del extracto está disuelta en un solvente orgánico, este debe evaporarse en baño de agua y el residuo se disuelve en 1 mL de ácido clorhídrico al 1 % en agua. Si el extracto es acuoso, a la alícuota se le añade 1 gota de ácido clorhídrico concentrado, (calentar suavemente y dejar enfriar hasta acidez). Con la solución acuosa ácida se realiza el ensayo, añadiendo 3gotas del reactivo de Dragendorff, si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++), precipitado (+++). (Miranda, M. 2006, p 1)

- **Ensayo de Mayer**

Proceda de la forma descrita anteriormente, hasta obtener la solución ácida. Añada una pizca de cloruro de sodio en polvo, agite y filtre. Añada 2 ó 3 gotas de la solución reactiva de Mayer, si se observa opalescencia (+), Turbidez definida (++), precipitado coposo (+++). (Miranda, M. 2006, p 1)

- **Ensayo de Wagner**

Se parte al igual que en los casos anteriores de la solución ácida, añadiendo 2 ó 3 gotas del reactivo, clasificando los resultados de la misma forma. (Miranda, M. 2006, p 1)

Determinación de Cumarinas

- **Ensayo de Baljet**

La alícuota del extracto no se encuentra en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en la menor cantidad de alcohol (1 mL). En estas condiciones se adiciona 1mL del reactivo, considerándose un ensayo positivo la aparición de coloración o precipitado rojo (++) y (+++) respectivamente. (Miranda, M. 2006, p 1)

Determinación de Quinonas

- **Ensayo de Borntrager**

La alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo re disolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amonio al 5 % en agua. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su ulterior separación. Si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado o rojo, el ensayo se considera positivo. Coloración rosada (++) , coloración roja (+++).(Miranda, M. 2006, p 2)

Determinación de Triterpenos y/o Esteroides

- **Ensayo de Liebermann-Burchard**

La alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo de ensayos se dejan resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración:

- Rosado-azul muy rápido.
- Verde intenso-visible aunque rápido.
- Verde oscuro-negro-final de la reacción. (Miranda, M. 2006, p 2)

Determinación de Catequinas

- **Ensayo de catequinas**

Se toma de la solución alcohólica obtenida una gota, con la ayuda de un capilar y aplique la solución sobre papel de filtro. Sobre la mancha aplique solución de carbonato de sodio. La aparición de una mancha verde carmelita a la luz UV, indica un ensayo positivo. (Miranda, M. 2006, p 3)

Determinación de Resinas

- **Ensayo de resinas**

A una alícuota de 2 mL de la solución alcohólica, 10 mL de agua destilada. La aparición de un precipitado, indica un ensayo positivo. (Miranda, M. 2006, p 3)

Determinación de Azúcares Reductores

- **Ensayo de Fehling**

La alícuota del extracto no se encuentra en agua, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1-2 mL de agua. Se adicionan 2 mL del reactivo y se calienta en baño de agua 5-10 minutos la mezcla. El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo. (Miranda, M. 2006, p 3)

Determinación de Saponinas

- **Ensayo de la espuma**

La alícuota se encuentra en alcohol, se diluye con 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5-10 minutos. El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persistente por más de 2 minutos. (Miranda, M. 2006, p 3)

Determinación de Compuestos Fenólicos y/o Taninos

- **Ensayo del cloruro férrico**

Si el extracto de la planta se realiza con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. A una alícuota del extracto alcohólico se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9 % en agua). Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos. A una alícuota del extracto se añade acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica, un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:

- Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
- Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo piro catecólicos
- Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo piro galotánicos. (Miranda, M. 2006, p 4)

Determinación de Flavonoides

- **Ensayo de Shinoda**

La alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen. El ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intensos en todos los casos. (Miranda, M. 2006, p 4)

Determinación de Antocianidinas

- **Ensayo de antocianidinas**

Se calientan 2 mL del extracto etanólico por 10 min con 1 mL de HCL conc. Se deja enfriar y se adiciona 1 mL de agua y 2 mL de alcohol amílico. Se agita y se deja separar las dos fases. La aparición de color rojo a marrón en la fase amílica, es indicativa de un ensayo positivo. (Miranda, M. 2006, p 5)

Determinación de Polisacáridos

- **Ensayo de mucílagos**

Una alícuota del extracto en agua se enfría a 0-5 °C y si la solución toma una consistencia gelatinosa el ensayo es positivo. (Miranda, M. 2006, p 6)

Determinación de principios amargos y Astringentes

- **Ensayo de principios amargos y astringentes**

“El ensayo se realiza saboreando 1 gota del extracto y reconociendo el sabor de cada uno de estos principios, bien diferenciados al paladar. (Miranda, M. 2006, p 6)

2.3.4. Control de calidad del Extracto

2.3.4.1. Requisitos Organolépticos (Miranda, 2002, p.51 -55)

A. Determinación de Olor

Se utilizó una tira de papel secante y se introdujo en una alícuota del extracto, se huele y se reporta el resultado.

B. Determinación de Color

Se colocó 2 a 5 mL de extractos en tubos de ensayo limpios y secos, posteriormente se registran su color, presencia o ausencia de partículas/ grumos y transparencia.

2.3.4.2. Determinación de Densidad Relativa (Miranda, 2002, p.51 -55)

La densidad relativa se refiere a la relación entre la masa de un volumen de la sustancia a 25 0C y la masa de un volumen igual de agua a la misma temperatura, esta relación se determina según la siguiente formula:

$$D_{25} = (M_1 - M) / (M_2 - M)$$

M₁: Peso picnómetro con muestra

M₂: Peso picnómetro con agua destilada

M: Peso de Picnómetro vacío.

2.3.4.3. Determinación de Índice de Refracción. (Miranda, 2002, p.51 -55)

El Índice de refracción es una propiedad óptica propia, característica de cada sustancia. Es el cociente entre la velocidad de la luz en el vacío y en otro medio, el numerador del cociente siempre será mayor de cualquier denominador

$$n_2 = n_1 (\text{Sen}\theta_1 / \text{Sen}\theta_2)$$

Procedimiento

Se colocó sobre el prisma del refractómetro una gota de agua destilada, se calibró ajustando el equipo seleccionando la zona del espectro visible, en el caso del agua es 1,33 con la ayuda del compensador cromático se llegó a colocar la línea límite entre dos campos.

Después se lavó el prisma con agua destilada y se colocó una gota de extracto, se cerró el termoprisma y con la ayuda del compensador cromático se llegó a colocar la línea límite entre dos campos. Se efectuó la lectura en la parte inferior del campo visual del equipo. La expresión de resultados viene dado por la siguiente formula:

$$Nd_{25} = Ndt + 0.00044 (t-25)$$

Nd_{25} = Índice de refracción a 25 °C

Ndt = valor leído en la escala del aparato a la temperatura t .

t = Temperatura a que se realiza la medición (°C)

0.00044 = factor de corrección por grado Celcio. (Miranda, 2002, p.51 -55)

2.3.4.4. Determinación de pH (Miranda, 2002, p.51 -55)

El pH es un índice numérico adimensional utilizado para expresar el grado de acidez o basicidad de ciertas sustancias diluidas de acuerdo a los iones hidrogeno.

El rango de pH se encuentra entre 0 a 14, la línea ácida presenta valores de pH menor 7, la línea básica presenta valores de pH mayor a 7, en el caso de presentar un valor de 7, significa que la solución es neutra. La expresión de resultado viene dado por la siguiente formula:

$$pH = -\log a[H^+]$$

Método de Medición en pH-metro

Se debe calibrar el equipo con una solución reguladora de pH de acuerdo a las necesidades de medición de muestras. Se lavó el electrodo con agua destilada estéril, y se puso en contacto el electrodo en un vaso de vidrio con el extracto a analizar. Se agitó el extracto y se volvió hacer una segunda medición para corroborar si la medición es correcta o existe algún cambio.

2.3.4.5. Determinación de Sólidos Totales (Miranda, 2002, p.51 -55)

Este método valora cuantitativamente la variación de masa de una solución, se fundamenta en la pérdida de compuestos volátiles por evaporación y el secado del restante en una estufa hasta llegar a peso constante. La expresión de sólidos totales en porcentaje viene dado por la siguiente formula:

$$St = (Pr - P / V) \times 100$$

Pr = masa de la cápsula más el residuo (g)

P = masa de la cápsula vacía (g)

V = volumen de la porción de ensayo.

100 = factor matemático para el cálculo

Método

El ensayo se realizó por duplicado para lo cual se midió 5 mL de extracto en una cápsula tarada (peso constante), la muestra fue evaporada sobre un baño María hasta obtener un residuo seco.

La cápsula fue colocada en una estufa y se dejó reposar hasta obtener peso constante, para conseguir pesos iguales se tuvo que pesar cada 60 minutos.

Finalmente se retiraron de la estufa y se colocaron en un desecador por 60 minutos con el propósito de obtener masas constantes entre varias pesadas de muestra y además que logre llegar a temperatura ambiente. (Miranda, 2002, p.51 -55)

2.3.5. Determinación de la actividad antibacteriana del extracto sobre bacterias de importancia clínica.

2.3.5.1. Preparación de Medios de Cultivo.

Previo al test de actividad antibacteriana se prepararon medios de cultivo indispensables para el crecimiento de los microorganismos monitores.

Agar Mueller – Hinton

- El Agar fue preparado a partir del reactivo comercial deshidratado y de acuerdo a las especificaciones del frasco. La preparación se realizó en un Erlenmeyer.
- Se procedió al autoclavado del medio por 30 minutos a 15 psi de presión.
- Inmediatamente después de esterilizar el medio nutritivo se dejó enfriar al ambiente por 10 – 15 minutos hasta que el Erlenmeyer se lo pueda soportar en la palma de la mano, para evitar cualquier contaminación del medio nutritivo se realizó en una cámara de flujo laminar.
- Se vertió el preparado ligeramente tibio en una placa Petri de plástico de fondo plano para alcanzar una uniformidad de volumen cercano a los 4 mm (20-25 mL/caja).
- Una vez vertida en la placa Petri se dejó enfriar al interior de la cámara, esto tomó un tiempo de 15 -20 minutos, después las cajas fueron envueltas y almacenadas en refrigeración a 2-8 °C para análisis microbiológicas posteriores.

Preparación de Agar en Pico de Flauta

- Se prepararon agares en picos de flauta utilizando medio de cultivo deshidratado (Mueller Hinton).
- Se preparó en un matraz, mezclando y disolviendo adecuadamente el polvo con el solvente, homogeneizando con agitación permanente, evitando la sedimentación del agar, completado el proceso de disolución se esterilizó por 30 minutos a 121 0C (15 psi de presión).
- El matraz fue retirado del autoclave y llevado a la cámara de flujo, se dejó reposar por 10 – 15 minutos con la intención de disminuir la temperatura del medio, posteriormente se vertió hasta la mitad de cada tubo estéril, cubriéndolos ligeramente.
- Los tubos se inclinaron a un ángulo aproximado de 10º dejándolos solidificar por 10 a 20 minutos.
- Una vez solidificados los medios en los tubos, se almacenaron en refrigeración 2-8 °C hasta su utilización.

Preparación de tubos con Caldo Nutritivo: Caldo Cerebro Corazón

- El medio nutritivo se pesó de acuerdo a las especificaciones del fabricante.
- Con una agitación permanente evitando la sedimentación del caldo se colocó de 4-5 mL en cada tubo, inmediatamente se cerraron ligeramente los tubos con tapas rojas y se autoclavaron por 30 minutos a 121 0C de temperatura y 15 psi de presión.
- Los tubos se retiraron de autoclave, se dejaron reposar al ambiente por unos minutos para luego ser almacenados en refrigeración para empleos posteriores.
-

2.3.5.2. Preparación de Extractos para determinar actividad antimicrobiana

El extracto etanólico del hongo *Pleurotus ostreatus* obtenido por maceración y luego concentrado, se tomó diluciones al 30, 70 y 100% dividiéndose en tres tubos estériles para determinar su actividad.

2.3.5.3. Reactivación de Microorganismos Monitores

Para el test de sensibilidad, se utilizaron cepas de American Type Culture Collection (ATCC) que pertenecen al Laboratorio de Microbiología de La Escuela de Bioquímica y Farmacia – ESPOCH. Se inició con la reactivación de microorganismos Monitores (Bacterias), a partir de cultivos en Pico de Flauta con Mueller Hinton agarizado.

Se seleccionaron las colonias tocándolas por arriba con un hisopo estéril específico por microorganismo, con ligeros movimientos circulares en el pico de flauta se transfirió la muestra bacteriana a un tubo con 5 mL de caldo cerebro corazón mezclando el hisopo en el medio ligeramente.

Se conservaron cuñas de bacterias en pico de flauta para garantizar un respaldo de muestras y evitar posibles contaminaciones.

2.3.5.4. Preparación y Siembra del Inóculo

De las cuñas de microorganismos reactivadas, se tocó la cepa por arriba con un hisopo y se sembró en caldo nutritivo Cerebro corazón por cada bacteria.

El caldo nutritivo fue incubado a 35 °C por 12 a 16 horas, hasta que alcance o exceda la turbidez del estándar de 0,5 McFarland. La turbidez del caldo se ajustó con solución salina estéril (0,9%) hasta alcanzar una suspensión bacteriana equivalente a una turbidez estándar de $1,5 \times 10^8$ UFC en la escala de McFarland.

Para realizar la estandarización del inóculo se realizó de forma visual, se comparó el inóculo suspendido en Sol. Salina con el estándar McFarland previamente preparado contra un fondo blanco con líneas blancas y negras contrastantes.

Después de ajustar la turbidez del inóculo, se introdujo un hisopo estéril en ella, el palillo del hisopo fue retirado eliminando el exceso de líquido presionando y girando contra la pared interna del tubo sobre el nivel del líquido. Se inoculó en la superficie de una Placa con Mueller Hinton para bacterias, rayando sobre toda la superficie, el procedimiento fue repetido dos veces más rotando la placa 60 °C, garantizando una distribución homogénea del inóculo, como etapa final del rayado se pasó el hisopo sobre el borde circular del agar.

2.3.5.5. Ensayo de Sensibilidad: Difusión de agar

➤ **Actividad Bactericida, preparación y siembra de controles**

Los ensayos de actividad antibacteriana se llevaron a cabo por triplicado para cada microorganismo monitor. Para bacterias se utilizó agar Mueller Hinton.

Se utilizaron como controles positivos Ampicilina (10 µg) y Amikacina (30 µg).

- Una vez preparado y sembrado el inóculo microbiano, con la ayuda de una pinza estéril se colocaron sobre la superficie del agar discos de papel filtros estériles de 5 mm diámetro y sobre ellos se impregnados con 15 µL de extracto diluidos. A la vez en medio se colocó los discos con antibióticos de referencia
- Presionando con una pinza estéril suavemente sobre el disco, asegurando de esta manera un contacto completo con la superficie del medio de cultivo.
- Los discos se dejaron secar en el agar por 5 a 10 minutos en una cámara de flujo laminar.
- Transcurridos los 10 minutos, se incubaron las placas en posición invertida a 35 °C durante 18 a 24 horas.
- Posterior al tiempo de incubación se examinó cada placa y con la ayuda de una regla se midieron los diámetros de halos de inhibición de cada disco. El efecto antimicrobiano de los controles fue evidenciado por la aparición y medición de halos de inhibición en los puntos de aplicación.
- La expresión de resultados estará en función del diámetro alcanzado lo que permitirá establecer si la bacteria monitor es Resistente – Intermedio o Sensible al extracto diluido.

La forma de expresión de se indican a continuación:

3 = Halo de inhibición translúcido (altamente tóxico)

2 = Halo de inhibición pequeño y turbio (Moderadamente tóxico)

1 = Halo de inhibición muy opaco y muy pequeño (Bacteriostático, levemente tóxico)

0 = Ausencia de Halo de Inhibición (No Tóxico)

CAPITULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1. Resultados del Tamizaje Fitoquímico

Tabla 2-3: Resultados de Análisis Fitoquímico Cualitativo en: *Pleurotus ostreatus*

Determinación/ Grupo Fitoquímico	Extracto Etanólico
COMPUESTOS GRASOS Ensayo de Sudán	-
ALCALOIDES Ensayo de Dragendorff	-
ALCALOIDES Ensayo de Mayer	-
ALCALOIDES Ensayo de Wagner	-
CUMARINAS Ensayo de Baljet	-
QUINONAS Ensayo de Borntrager	-
TRITERPENOS Y/O ESTEROIDES Ensayo de Liebermann-Burchard	++
CATEQUINAS Ensayo de catequinas	-
RESINAS Ensayo de resinas	-
AZUCARES REDUCTORES Ensayo de Fehling	-
SAPONINAS Ensayo de la espuma	+
COMPUESTOS FENÓLICOS Y/O TANINOS Ensayo del cloruro férrico	+
PROTEINAS Ensayo de la ninhidrina	NE
FLAVONIDES Ensayo de Shinoda	+
ANTOCIANIDINAS Ensayo de antocianidinas	-
POLISACÁRIDOS Ensayo de mucílagos	++
PRINCIPIOS AMARGOS Y ASTRINGENTES Ensayo de principios amargos y astringentes	+

Indicador: (-) Negativo, (+) Escasa evidencia (++) Evidencia Moderada (+++) Alta Evidencia (NE) No evaluado

Realizado Por: FLORES G., .2017

En la tabla 2-3 se muestran los resultados del Análisis Fitoquímico cualitativo del extracto etanólico de *Pleurotus ostreatus*, los ensayos Fitoquímicos determinaron la presencia de: Triterpenos, Saponinas, Compuestos Fenólicos, Flavonoides, Mucilagos, Amargos y Astringentes.

Los datos presentados en el cuadro concuerdan con estudios realizados por Valencia del Toro, et al., (2008) y Beltrán (2013), quienes determinaron la presencia de Terpenos, Polisacáridos y Compuestos Fenólicos. De esta manera se determina que la especie de hongo *Pleurotus ostreatus* podrían presentar dichos compuestos.

3.2. Control de Extractos

3.2.1. Requisitos Organolépticos

Tabla 3-3: Resultados de Características Organolépticas del Extracto de *Pleurotus ostreatus*

<i>Pleurotus ostreatus</i>		
Tipo de extracto	Color	Olor
Extracto etanólico	Amarilla transparente	Característico al alcohol/picante

Realizado Por: FLORES G., .2017

La tabla 3-3 muestra las características físicas y organolépticas, la tonalidad del extracto etanólico del *Pleurotus ostreatus*, presentó una coloración amarilla transparente y su olor característico al alcohol-picante.

Los resultados expuestos no presentan valores de referencia, por lo que el análisis fue realizó de acuerdo a una perspectiva visual.

3.2.2. Determinación de Densidad Relativa

Tabla 4-3: Resultados de Densidad Relativa del Extracto de *Pleurotus ostreatus*

<i>Pleurotus ostreatus</i>	
Densidad relativa	
Extracto etanólico	0,8096

Realizado Por: FLORES G., .2017

La tabla 2-3 muestra el resultado obtenido de densidad relativa o peso específico, así en el extracto etanólico de *Pleurotus ostreatus* presentó un valor de 0,8096.

3.2.3. Determinación del Índice de Refracción

Tabla 5-3: Resultado de Índice de Refracción

<i>Pleurotus ostreatus</i>	
Índice de Refracción	
Extracto etanólico	1,358

Realizado Por: FLORES G., .2017

La tabla 3-3 muestra los resultados de índice de refracción obtenido del extracto etanólico de *Pleurotus ostreatus* mostrando un valor de 1.358., este parámetro físico bajo condiciones controladas de medición ayuda a determinar el grado de pureza del extracto u otras sustancias, también es usado en control de calidad y puede incluso establecer indirectamente un criterio de la concentración de algún extracto que se encuentre en investigación.

3.2.4. Determinación de pH

Tabla 6-3: Resultado de determinación de pH

<i>Pleurotus ostreatus</i>	
Extracto en reposo	
Extracto etanólico	8,10

Realizado Por: FLORES G., .2017

En la tabla 4-3 se muestran los resultados de pH, en extracto etanólico del *Pleurotus ostreatus* fue de 8,10. La alcalinidad se puede deber al pH del suelo en el que crece, a la temperatura u otras condiciones, además también cabe mencionar que no hay que dejar fuera al medio en el que fue extraído en el cual influye el pH básico en su totalidad al extracto.

3.2.5. Determinación de Sólidos Totales

Tabla 7-3: Resultado de determinación de Sólidos Totales En Extractos

<i>Pleurotus ostreatus</i>	
Solidos Totales	
Extracto etanólico	1,03

Realizado Por: FLORES G., 2017

En la tabla 6-3 se muestra el resultado de Determinación de sólidos totales. De acuerdo a la tabla el porcentaje del extracto etanólico de *Pleurotus ostreatus* presentan un valor de 1,03 lo que determina una cantidad de residuos sólidos o materia seca en un volumen definido de solvente.

3.3. Resultados de Actividad Antimicrobiana de *Pleurotus ostreatus*

3.3.1. Determinación de Actividad Antimicrobiana mediante Método Difusión en Discos.

Tabla 8-3: Resultados de Actividad Antibacteriana de *Pleurotus ostreatus* Mediante el Método de Difusión en discos.

Bacterias Monitores	Extracto (Medición en mm)			Controles Positivos (Medición en mm)	
	Baja (30%)	Media (70%)	Alta (100%)	Ampicilina (10 µg)	Amikacina (30 µg)
<i>Escherichia coli</i>	0,6	0,8	0,9	0,7	2,2
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,6	0,8	1	2,2	1,6

Realizado por: FLORES G., 2017

La concentración del extracto etanólico por maceración utilizó concentraciones de (30, 70 y 100%) 30, 70 y 100mg/100mL. Colocando 15µL/disco. Las mediciones de los halos de inhibición se muestran en milímetros (mm)

La Tabla 7-3 muestra los resultados de actividad antimicrobiana del extracto sobre microorganismos. El extracto etanólico por maceración mostró actividad sobre las dos cepas evaluadas, pero presentó un mayor diámetro de inhibición sobre *S. aureus*, mostrando un halo de inhibición (10 mm).

Los resultados mostrados sobre *E. Coli* y *S. aureus* mediante el método de difusión en discos coinciden con los estudios realizados por Ambriz, et al. (2014), quienes demostraron mediante

el método de Concentración mínima Inhibitoria, que *Pleurotus ostreatus* extraído no presentan actividad bactericida sobre *S. aureus* y *E. coli*.

Para que tenga un efecto antimicrobiano bacteriostático el extracto debe presentar una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 16-37mm de diámetro según Boquet, et al. (1990) y una concentración mínima bactericida (CMB) debe presentar valores superiores a lo mencionado anteriormente.

3.4. Resultados de Análisis de varianza univariante.

Tabla 9-3: Resultados de Análisis de varianza univariante. Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: DIAMETRO					
Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	2,349 ^a	5	,470	48,959	,000
Intersección	84,947	1	84,947	8852,872	,000
Concentración	2,237	2	1,119	116,578	,000
BACTERIA	,111	1	,111	11,580	,001
Error	1,324	138	,010		
Total	88,620	144			
Total corregida	3,673	143			

Realizado por: FLORES G., 2017

En la Tabla 8-3 observamos al Diámetro como variable dependiente, mientras que la Concentración y la Bacteria son independientes. La Significancia (sig) debe tener un valor menor a 0,05, ya que este indique que si es menor a este valor existe una diferencia entre la relación Diámetro y Concentraciones y diferencia entre Diámetro y Bacterias. Si el valor de significancia es mayor se concluyera que no existe diferencia y tanto las concentraciones y las bacterias producen lo mismo, es decir el mismo Diámetro del halo del disco a diferentes concentraciones o las diferentes bacterias.

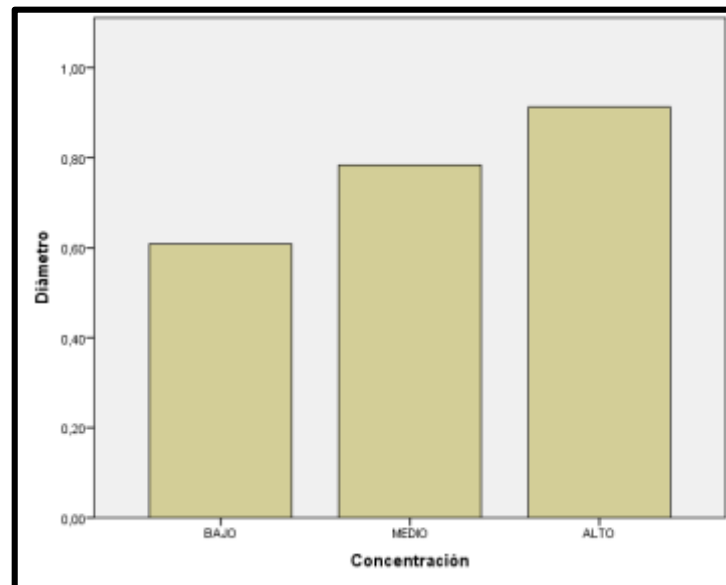
Mediante esta tabla se establecerán las siguientes hipótesis:

H₀: No existe diferencia en el diámetro por efecto de la concentración y bacterias. $p \geq 0,05$

H₁: Existe diferencia en el diámetro por efecto de la concentración y bacterias. $P < 0,05$

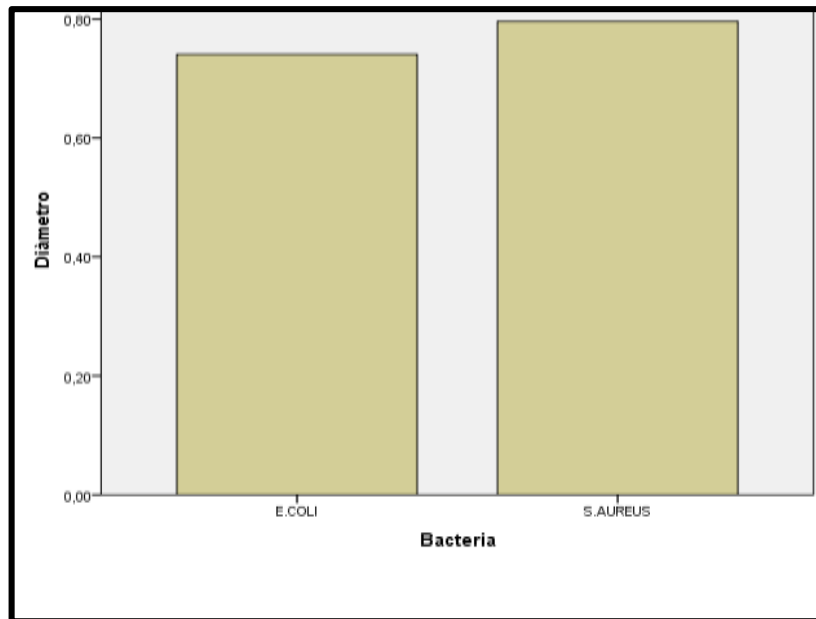
Con respecto a la decisión a las hipótesis y los valores de sig: en el caso del cambio de concentración y en la combinación concentración más bacteria se desecha H_0 , por tanto existe diferencia en el diámetro.

3.5 Resultados de formación de diámetros con respecto a las concentraciones del extracto de *Pleurotus ostreatus* y según el tipo de microorganismo *E. coli* y *S. aureus*.



Gràfica 1-3 Diámetro formado con respecto a la concentración del extracto de *Pleurotus ostreatus* bajo (30%), medio (70%) y alto (100%)
Realizado por: (FLORES G, 2017)

El gráfico anterior presenta en el eje **x** las diferentes concentraciones del extracto bajo, medio y alto, en tanto que en el eje **y** se encuentra la formación del diámetro.



Gràfica 2-3 Diámetro formado con respecto al tipo de microorganismos (Gram + y Gram -)
 Realizado por: (FLORES G, 2017)

El gráfico anterior presenta en el eje **x** las diferentes cepas de microorganismos *E. coli* y *S. aureus* en tanto que en el eje **y** se encuentra la formación del diámetro.

En la Grafica N. 1 indica el diámetro del halo formado del disco utilizado, según la concentración baja, media y alta, en donde se muestra que el diámetro formado es directamente proporcional a la concentración utilizada, es decir mientras mayor sea la concentración, mayor será la formación de halo o mayor inhibición del microorganismo. Por lo contrario mientras menos sea la concentración del extracto de *Pleurotus ostreatus* menos diámetro de la formación del halo existirá, es por ende que es necesario un extracto más puro para una mejor actividad.

En la Grafica N. 2 también representa la formación del diámetro del halo pero en función de la bacteria, es decir según el tipo de microorganismo *E.coli* (Gram -) y *S. aureus* (Gram +) la formación del diámetro del halo es diferente. En este caso un diámetro mayor de halo presenta el *S. aureus*, siendo así una bacteria más sensible al extracto etanólico de *Pleurotus ostreatus*.

CONCLUSIONES

Mediante la evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de *Pleurotus ostreatus* se observó que no presenta un halo de diámetro que justifique dicha actividad, ante las cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus*, debido a que se trabajó con un extracto crudo y no con los compuestos específicos que le dan mayor actividad.

Se obtuvo un extracto etanólico de *Pleurotus ostreatus* mediante maceración en medio alcohólico por un tiempo de 8 días.

Mediante el tamizaje Fitoquímico del extracto etanólico crudo, se identificó los compuestos que le dan la actividad antimicrobiana, tales como: Triterpenos, Compuestos Fenólicos y Mucilagos, conociendo así también la presencia de otros compuestos como: Saponinas, Amargos y Astringentes.

Se aplicó el método de difusión en discos en medio sólido, utilizando el extracto etanólico de *Pleurotus ostreatus* a diferentes concentraciones de 30, 70 y 100% ante los cultivos de *E. coli* y *S. aureus*.

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico del *Pleurotus ostreatus* sobre las bacterias *E. coli* y *S. aureus* no pudo ser determinada, debido a que presenta un halo de diámetro muy bajo al mínimo del rango presente en bibliografía, y se comparó dicha actividad del extracto con discos control como los antibióticos ampicilina y amikacina.

Se comparó la actividad antibacteriana del extracto etanólico del *Pleurotus ostreatus* con la presencia de halos formados y con los formados por los discos control para diferentes bacterias patógenas.

RECOMENDACIONES

En la extracción es recomendable trabajar con un macerado de un tiempo más extenso, para obtener una cantidad de compuestos mayor.

Se recomienda también utilizar un método de extracción más específico para obtener solo el/los compuestos que den la actividad evaluada.

Se recomienda realizar una cuantificación y purificación de compuestos activos y aplicarlos en diferentes tipos de microorganismos monitores, para conocer más actividades y conocer cual metabolito es el principal que le otorgue dicha actividad

Realizar una identificación de compuestos terpénicos presentes en el hongo *Pleurotus ostreatus*, debido a que presenta la mayor actividad antimicrobiana, además establecer también la posible utilidad clínica.

BIBLIOGRAFIA

AMBRIZ, M. et al. Evaluación de las propiedades inhibitorias del extracto de *Pleurotus ostreatus* sobre cepas de *Staphylococcus aureus* [en línea] (Tesis) (Postgrado). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Iztacala, México . 2014. p. 6. [Consulta: 11/11/2016]. Disponible en: https://www.academia.edu/15108091/Evaluaci%C3%B3n_de_las_propiedades_inhibitorias_del_extracto_de_Pleurotus_ostreatus_sobre_cepas_de_Staphylococcus_aureus

ANMAT. *Vademecum-Amikacina* [en línea]. Argentina: Equipo de redacción de IQB, 17 de septiembre de 2010. . [Consulta:19/12/2016]. Disponible en: <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/a043.htm>.

ANMAT. *Vademecum-Ampicilina* [en línea]. Argentina: Equipo de redacción de IQB, 17 de septiembre de 2010. . [Consulta: 19/12/2016]. Disponible en: <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/a052.htm>

ARDÓN LÓPEZ Carlos Esduardo. La producción de los hongos comestibles [en línea] (Tesis) (Postgrado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Humanidades, Departamento de Postgrado. Guatemala. 2007. p. 96. [Consulta: 11/11/2016]. Disponible en: http://www.innovacion.gob.sv/inventa/attachments/article/2043/07_1932.pdf

BELTRAN DELGADO Yaixa, et al. “Contenido de fenoles totales en extractos de *Pleurotus* obtenidos con solventes de diferente polaridad”. *Rev Cubana Invest Bioméd* [En línea]. 2013, (Ciudad de la Habana) vol.32 (n.2), pp. 121-129. [Consultado: 2017-01-25], ISSN 0864-0300. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002013000200001&lng=es&nrm=iso

BOQUET JIMENEZ Ernesto, et al., *Manual de técnicas en microbiología clínica*. Madrid-España: Asociación Española de Farmacéuticos Analistas, 1990, p. 241.

BRIZUELA María Antonieta et al., “Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios”. *Rev Iberoam Micol*, 15 (1998), (Cuba), p. 70.

BROCK Thomas D.. *Biología de los microorganismos* [en línea]. Octava edición. Madrid-España: Omega, 1976. pp. 2-3. [Consulta: 13/11/2016]. Disponible en:

https://books.google.com.ec/books?id=ZnAVvgAACAAJ&dq=Biolog%C3%ADa+de+los+microrganismos&hl=es&sa=X&redir_esc=y

CARRERAS López, N. “Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud”. *Revista Nutrición Clínica*, 3, 32(2002), (España) p. 84-85.

CARRIÓN JARA Ana Victoria & GARCÍA GÓMEZ Cándida Rafaela. Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica [en línea] (Tesis) (Postgrado). Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Químicas, Escuela de Bioquímica y Farmacia. Cuenca, Ecuador. 2010. p. 27. [Consulta: 11/11/2016]. Disponible en: <http://cdjbv.ucuenca.edu.ec/ebooks/tq1005.pdf>

CASTRO DEL CAMPO Nohelia, et al. “Sobrevivencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en frutos mínimamente procesados”. *Rev Cubana Salud Pública* [En línea], 2004, (Mexico) vol.30, (1), pp. 0-0. [Consulta 2017-02-02], ISSN 0864-3466. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-34662004000100009&lng=es&nrm=iso.

CERVANTES GARCIA Estrella & et al., “Características generales del *Staphylococcus aureus*”. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab*, 6 (2014), (México), p. 30.

CORROCHANO Alberto Román. Digestibilidad de proteínas de los hongos comestibles, *Agaricus bisporus*, *Pleurotus eryngii* y *Sarcodon imbricatum* [en línea] (Tesis) (Maestría). Universidad de Valladolid, Facultad de Medicina, Departamento de Biología Celular, Histología y Farmacología. Valladolid, España. 2013. p. 10. [Consulta: 10/11/2016]. Disponible en: <https://uvadoc.uva.es/bitstream/10324/3639/1/TFM%20M%2040.pdf>

CRUZ SOLORIO Angélica. Evaluación de la actividad antibacteriana de cepas híbridas de *Pleurotus spp.* (Tesis)(Maestría). [En línea] Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. México. 2011. pp. 18-20. [Consulta: 2017-01-30]. Disponible en: <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/15745/INFORME%20TESIS%20MAESTRIA%20ACS%20B091471.pdf?sequence=1>

DAZA PEREZ R. M., “Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria.”. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de la Salud*”, 22, 3 (1998), (España) p. 59.

DIAZ Micaela Pucheta et al. “Mecanismo de acción de los hongos entomopatògenos”. *Revista de ciencia y tecnología de América* [en línea], 2006, (EEUU) 31 (12), pp.856-860. [Consulta: 11/11/2016]. ISSN 0378-1844. Disponible en:
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2205982>.

DELGADO CIRILO Antonio, et al. *Introducción a la química terapéutica*. 2º edición. Barcelona, España: Díaz de Santos, 2003, pp. 449-450.

DELGADO CIRILO Antonio, et al. *Introducción a la química terapéutica*. 2º edición. Barcelona, España: Díaz de Santos, 2003, pp. 427-430.

DELGADO CIRILO Antonio, et al. *Introducción a la química terapéutica*. 2º edición. Barcelona, España: Díaz de Santos, 2003, p. 449.

DELGADO CIRILO Antonio, et al. *Introducción a la química terapéutica*. 2º edición. Barcelona, España: Díaz de Santos, 2003, p. 428.

DELGADO CIRILO Antonio, et al. *Introducción a la química terapéutica*. 2º edición. Barcelona, España: Díaz de Santos, 2003, p. 429.

DELGADO CIRILO Antonio, et al. *Introducción a la química terapéutica*. 2º edición. Barcelona, España: Díaz de Santos, 2003, p. 430.

FLORES ACOSTA Heraclio Indalecio. *Evaluación de la sensibilidad bacteriana de los uropatogenos a los quimioterapicos antimicrobianos en el Hospital Central del Sur área No. 2 del IPSS de Arequipa, ano 1984* [en línea]. Arequipa-Perú: UNSA., 1985, p. 30 [Consulta: 22/12/2016]. Disponible en:
https://books.google.com.ec/books?id=IzkUHAAACAAJ&dq=sensibilidad+bacteriana&hl=es&sa=X&redir_esc=y.

GARCIA C. Patricia. “Resistencia bacteriana en Chile”. *Rev. chil. infectol.* [En línea], 2003, (Chile) vol.20, (1), pp.11-23. [Consulta: 2017-02-02]. ISSN 0716-1018. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182003020100002&lng=es&nrm=iso.

GIL Mónica D. de M., “Staphylococcus aureus: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina”. *Rev Chil Infect*, vol2, 17 (2000), (Chile), p. 145.

GÓMEZ Joaquin, et al.. ”Betalactámicos en la práctica clínica”. *Rev Esp Quimioter*, 1, 28 (2015), (España) p.1-2.

GREGORI VALDÈS Bárbara Susana. “Estructura y actividad de los antifúngicos”. *Revista Cubana de Farmacia* [en línea], 2005, (Cuba) 39 (2), pp.1-2. [Consulta: 11/11/2016]. ISSN 1561-2988. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152005000200012.

HERNÁNDEZ Alicia. *Microbiología Industrial* [en línea]. Guadalajara- México: EUNED, 1990. p. 6. [Consulta: 15/11/2016]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=KFq4oEQQjdEC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

HERNÁNDEZ CORREDOR Ricardo Alfredo & LÓPEZ RODRÌGEZ Claudia Liliana. Evaluación del crecimiento y producción de *Pleurotus ostreatus* sobre diferentes residuos agroindustriales del departamento de Cundinamarca [en línea] (Tesis) (Tercer Nivel). Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Carrera de Microbiología Industrial. Bogotá, Colombia. 2012. p. 28. [Consulta: 10/11/2016]. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis257.pdf>

HERRERA Marco Luis. “Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: Metodología de laboratorio”. *Rev. méd. Hosp. Nac. Niños* [en línea]. 1999, (Costa Rica) vol.34, suppl, pp. 33-41. [Consulta: 11.1.2017]. ISSN 1017-8546. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85461999000100010&lng=en&nrm=iso

HERRERA Teófilo; et al. *El reino de los hongos: micología básica y aplicada* [en línea]. México: Cornell, 2000, p.452. [Consulta: 2017-01-04]. Disponible en:
https://books.google.com.ec/books?id=HrJ0PQAACAAJ&dq=eI+reino+de+los+hongos&hl=es&sa=X&sqi=2&redir_esc=y

KUHAR Francisco et al., “Reino Fungi: morfologías y estructuras de los hongos”. *Revista boletín biológica*, 28 (2013), (Argentina), pp. 11-13.

LASANTA MELERO Cristina. Estudio y aplicación de nuevos procesos para la mejora de la elaboración de vinos tintos en zonas de clima cálido. [en línea] (Tesis) (Postgrado). Universidad de Cádiz, Facultad de Ciencias, Departamento de Ingeniería Química y Tecnología de Alimentos. Cádiz, España. 2009. p. 109. [Consulta: 11/11/2016]. Disponible en:
<https://eddymercado.files.wordpress.com/2013/04/estudio-y-aplicacion-de-nuevos-metodos-para-la-mejora-de-la-elaboracion-de-vinos-tintos-en-zonas-de-clima-calido.pdf>

LOZANO VALDÈS David, et al., “Penicilinas”. *Revista acta médica*, 8 (1998), (México), p. 34.

MACIAS Ramón Rodríguez. Caracterización de cepas del hongo comestible *Pleurotus spp.* En medio de cultivo y su evaluación en sustratos lignocelulosicos forrajeros para la producción de carporos[en línea] (Tesis) (Postgrado). Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Agronomía, Subdirección de estudios de postgrado. Marín Nuevo León, México. 1996. pp. 16-18. [Consulta: 10/11/2016]. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/6210/1/1080071715.PDF>

MEDINA ASENSIO Jesús. *Guía de antimicrobianos y tratamiento de las infecciones* [en línea]. Segunda edición. Madrid- España: Ediciones Díaz de Santos, 2000. pp. 59-60 [Consulta: 13/11/2016]. Disponible en:
https://books.google.com.ec/books?id=zYkcuSWhhnkC&dq=antibioticos&hl=es&source=gbs_navlinks_s

MEDINA ASENSIO Jesús. *Guía de antimicrobianos y tratamientos de las infecciones* [en línea]. Segunda edición. Madrid-España: Edigrafos, S. A., 2000, p. 59 [Consulta: 22/12/2016]. Disponible en:
https://books.google.com.ec/books?id=zYkcuSWhhnkC&printsec=frontcover&hl=es&source=gb_s_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA DEL ECUADOR, *Salud preventiva: MSP recomienda evitar la automedicación* [en línea], *Subsecretaría Nacional de Gobernanza de la salud pública*, 2012. [Consulta: 2017-02-02]. Disponible en: <http://www.salud.gob.ec/salud-preventiva-msp-recomienda-evitar-la-automedicacion/>

MOLINA LÓPEZ José & ESCAVALA CAMPOS Carlos A. *Escherichia coli* Diarrogènica [en línea]. México, Teresa, 2011. . [Consulta: 16/11/2016]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/escherichia-coli.html>

MOLINA LOPEZ José & ESLAVA CAMPOS Carlos A. *Escherichia coli* Diarrogènica [en línea]. México: UNAM, 2011. [Consulta: 17/12/2016]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/escherichia-coli.html>

MURRAY Patrick; et al. *Microbiología médica*. 5^{ta} ed. Madrid-España: Elsevier, 2007, p.68.

OMS. *Resistencia a los antimicrobianos* [en línea]. Motivo de preocupación mundial. Sin Nota Descriptiva. Septiembre de 2016. [Consulta: 2017-02-02]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>

PALA Paúl Jesús. Contribución al conocimiento de los aceites esenciales del género “eryngium” l, en la península ibérica [en línea] (Tesis) (Postgrado). Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Bilógicas, Departamento de Biología Vegetal I. Madrid, España. 2002. pp. 28-29. [Consulta: 10/11/2016]. Disponible en: <http://biblioteca.ucm.es/tesis/bio/ucm-t26240.pdf>.

PALOMINO J, et al., “Aminoglucósidos”. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2, 21 (2003), (España) p. 106.

PAREDES SALIDO Fernando et al. *Microbiología clínica práctica* [en línea]. Segunda edición. Cádiz-España: Imprenta Repeto-Cádiz, 1994. p. 160. [Consulta: 13/11/2016]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=4N8qVKckrUUC&dq=caldo+cerebro+corazon&hl=es&source=gbs_navlinks_s

PINEDA INSUASTI Julio Amilcar. Desarrollo de una tecnología para la producción a pequeña escala de la biomasa del hongo ostra [en línea] (Tesis) (Postgrado). Universidad de Camagüey “Ignacio Agramonte Loynaz”, Facultad de Química, Departamento de Ingeniería Química. Camagüey, Cuba. 2014. p. 16. [Consulta: 11/11/2016]. Disponible en: <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/1586/1/T-SENESCYT-00704.pdf>

PINEDA INSUASTI Julio Amilcar. Desarrollo de una tecnología para la producción a pequeña escala de la biomasa del hongo ostra [en línea] (Tesis) (Postgrado). Universidad de Camagüey “Ignacio Agramonte Loynaz”, Facultad de Química, Departamento de Ingeniería Química. Camagüey, Cuba. 2014. p. 11. [Consulta: 11/11/2016]. Disponible en: <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/1586/1/T-SENESCYT-00704.pdf>

PONTON José et al. “Hongos y actinomicetos alérgicos” [En línea]. Bilbao-España: Imprenta Berekintza, Bilbao, 2009. [Consulta: 11/11/2016]. Disponible en: <http://server1.docfoc.com/uploads/Z2015/12/30/2Cj9wwrKfn/53a7d51c4e36704409b77bbfe1fad964.pdf>

PONTÓN José, “La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina”. *Revista Iberoam Micol*, 25 (2008), (España), p. 79.

PLAN NACIONAL PARA EL BUEN VIVIR 2009-2013. *Objetivos Nacionales para el buen vivir* [en línea]. 2009. [Consulta: 2017-02-01]. Disponible en: https://issuu.com/publisenplades/docs/pnbv_2009-2013

RAMIREZ ANGUIANO Ana Cristina. Estudio de las propiedades bioactivas de hongos comestibles para el diseño de productos cárnicos funcionales [en línea] (Tesis) (Postgrado). Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Química Física Aplicada. Madrid, España. 2009. p. 33. [Consulta: 10/11/2016]. Disponible en: https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/117/22590_ramirez_anguiano_ana_cristina.pdf?sequence=1

RAMIREZ ANGUIANO Ana Cristina. Estudio de las propiedades bioactivas de hongos comestibles para el diseño de productos cárnicos funcionales [en línea] (Tesis) (Postgrado). Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Química Física Aplicada. Madrid, España 2009. p. 59. [Consulta: 11/11/2016]. Disponible en: https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/117/22590_ramirez_anguiano_ana_cristina.pdf?sequence=1

ROLGER ANGLADA Rafael. *Microbiología sanitaria y clínica*. Madrid-España: Editorial Síntesis, S. A., 1997, pp. 297-298.

ROLGER ANGLADA Rafael. *Microbiología sanitaria y clínica*. Madrid-España: Editorial Síntesis, S. A., 1997, p. 298.

ROLGER ANGLADA Rafael. *Microbiología sanitaria y clínica*. Madrid-España: Editorial Síntesis, S. A., 1997, pp. 301-302.

ROLGER ANGLADA Rafael. *Microbiología sanitaria y clínica*. Madrid-España: Editorial Síntesis, S. A., 1997, pp. 255-257.

ROLGER ANGLADA Rafael. *Microbiología sanitaria y clínica*. Madrid-España: Editorial Síntesis, S. A., 1997, pp. 259-260.

ROLGER ANGLADA Rafael. *Microbiología sanitaria y clínica*. Madrid-España: Editorial Síntesis, S. A., 1997, p. 258.

SÀNCHEZ PALACIOS Annerys. Producción de hongos comestibles del género *Pleurotus* a partir de los residuos vegetales provenientes de la plaza de mercado del municipio de quibdó [en línea] (Tesis) (Postgrado). Universidad de Manizales, Facultad de Ciencias Contables Económicas y Administrativas, Maestría en Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente. Manizales, Colombia. 2015. pp. 37-39. [Consulta: 10/11/2016]. Disponible en: [http://ridum.umanizales.edu.co:8080/xmlui/bitstream/handle/6789/2204/Tesis%20Annerys%20-%2026%20de%20mayo%20de%202015%20\(1\).pdf?sequence=3](http://ridum.umanizales.edu.co:8080/xmlui/bitstream/handle/6789/2204/Tesis%20Annerys%20-%2026%20de%20mayo%20de%202015%20(1).pdf?sequence=3)

SUAY I. et al. “Proyección de basidiomicetos para actividades antimicrobianas”. *Pubmed* [en línea], 2000, (España) 2 (78), pp. 39-129. [Consulta: 2017-01-30]. Número ISSN 11204765. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11204765>

TALAVÀN Noella Blanco. Papel funcional de las proteínas crh en la biogénesis de la pared celular y la morfogénesis de *Saccharomyces cerevisiae* [en línea] (Tesis) (Doctorado). Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia, Departamento de Microbiología II. Valladolid, España. 2013. p. 44. [Consulta: 10/11/2016]. Disponible en:
<http://eprints.ucm.es/22979/1/T34792.pdf>

TALAVÀN Noella Blanco. Papel funcional de las proteínas crh en la biogénesis de la pared celular y la morfogénesis de *Saccharomyces cerevisiae* [en línea] (Tesis) (Postgrado). Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia, Departamento de Microbiología II. Valladolid, España. 2013. pp. 46-47. [Consulta: 10/11/2016]. Disponible en:
<http://eprints.ucm.es/22979/1/T34792.pdf>

TALAVÀN Noella Blanco. Papel funcional de las proteínas crh en la biogénesis de la pared celular y la morfogénesis de *Saccharomyces cerevisiae* [en línea] (Tesis) (Postgrado). Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia, Departamento de Microbiología II. Valladolid, España. 2013. p. 48. [Consulta: 10/11/2016]. Disponible en:
<http://eprints.ucm.es/22979/1/T34792.pdf>

TORTORA Gerard J. et al. *Introducción a la microbiología* [en línea]. Novena edición. Buenos Aires-Argentina: Editorial Medica Panamericana, 2007. p. 168. [Consulta: 13/11/2016]. Disponible en:
https://books.google.com.ec/books?id=Nxb3iETuwpIC&pg=PA168&dq=MEDIOS+DE+CULTIVO&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false

UNAM. *Taxonomía: Staphylococcus aureus, S. epidermidia, y S. saprophyticus.* [blog]. Mexico, Q.F.B. de Fes-Cuautitlan-UNAM México, 2011. [Consulta: 17/12/2016]. Disponible en:
<http://microbitosblog.com/2011/08/03/staphylococcus-aureus-epidermidis-saprophyticus/>

UNSAM. *Micología y Cultivo de Hongos Comestibles y Medicinales* [en línea]. Argentina, Buenos Aires: UNSAM, 2017. [Consulta: 2017-02-02]. Disponible en:
<http://www.iib.unsam.edu.ar/web/micologia.php?mico=7>.

URRUTIA TORO Enis Dahiana. Extracción, separación y caracterización cualitativa de componentes químicos en el cuerpo fructífero de *Pholiota nameko* y evaluación de actividad antimicrobiana [en línea] (Tesis) (Postgrado). Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias, Escuela de Química Farmacéutica. Valdivia, Chile. 2010. pp. 3-4. [Consulta: 10/11/2016]. Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2010/fcu.81e/doc/fcu.81e.pdf>

VALENCIA DEL TORO Gustavo, et al., “Actividad antibacteriana de extractos hexánicos de cepas de *Pleurotus djamor*”. *Revista mexicana de micología* [En línea]. 2008, (México) vol. 28, pp. 119- 123. [Consultado: 2017-01-25], ISSN 0187-3180. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802008000300014&lng=es&nrm=iso

VARNERO, María T et al., Utilización de Residuos Forestales Lignocelulósicos para Producción del Hongo Ostra (*Pleurotus ostreatus*) [en línea], 2010, (Chile) vol.21 (2), pp.13-20. [Consulta: 2017-01-04]. ISSN 0718-0764 Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642010000200003&lng=es&nrm=iso

VELÁSQUEZ Làrez, “Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos”. *Revista Iberoamericana de Polimeros*, vol 4, 28 (2013), (Venezuela), pp. 91-94.

VIVES E. A. et al. Aminoglucósidos. Farmacomedia, 2004. [Consulta: 18/11/2016]. Disponible en: <https://farmacomedia.files.wordpress.com/2010/05/aminoglucosidos.pdf>

ANEXOS

Anexo A Proceso de extracción



Materia prima
Tomado por: FLORES G. (2017)



Troceado de la materia prima
Tomado por: FLORES G. (2017)



Pesaje de materia prima
Tomado por: FLORES G. (2017)



Relación peso-volumen de
materia prima y etanol
Tomado por: FLORES G. (2017)



Filtración del extracto
Tomado por: FLORES G. (2017)



Concentración del extracto en
Rotavapor
Tomado por: FLORES G. (2017)

Anexo B Tamizaje Fitoquímico



Tamizaje Fitoquímico
Tomado por: FLORES G. (2017)



Determinación de
compuestos grasos,
Ensayo de Sudán
Tomado por: FLORES G. (2017)



Determinación de alcaloides,
Ensayo de Dragendorff
Tomado por: FLORES G. (2017)



Determinación de alcaloides,
Ensayo de Mayer
Tomado por: FLORES G. (2017)



Determinación de alcaloides,
Ensayo de Wagner
Tomado por: FLORES G. (2017)



Determinación de Cumarinas,
Ensayo de Baljet
Tomado por: FLORES G. (2017)



Determinación de Quinonas,
Ensayo de Borntrager
Tomado por: FLORES G. (2017)



Determinación de Triterpenos
y/o Esteroides, Ensayo de
Liebermann Burchard
Tomado por: FLORES G. (2017)



Determinación de Catequinas
Tomado por: FLORES G. (2017)



Determinación de Resinas
Tomado por: FLORES G. (2017)



Fotografía 1-3: Determinación de Azúcares
reductores, Ensayo de Fehling
Tomado por: FLORES G. (2017)



Fotografía 2-3: Determinación de Saponinas
Tomado por: FLORES G. (2017)



Determinación de compuestos Fenólicos y/o Taninos, Ensayo de Cloruro Férrico
Tomado por: FLORES G. (2017)



Determinación de Flavonoides, Ensayo de Shinoda
Tomado por: FLORES G. (2017)



Determinación de Antocianidinas
Tomado por: FLORES G. (2017)



Determinación de Polisacáridos, Ensayo de Mucílagos
Tomado por: FLORES G. (2017)

Anexo C Control de calidad del extracto



Determinación de la Densidad Relativa
Tomado por: FLORES G. (2017)



Determinación del pH del extracto
Tomado por: FLORES G. (2017)

Anexo D Proceso de elaboración de medios de cultivo y siembra de microorganismos



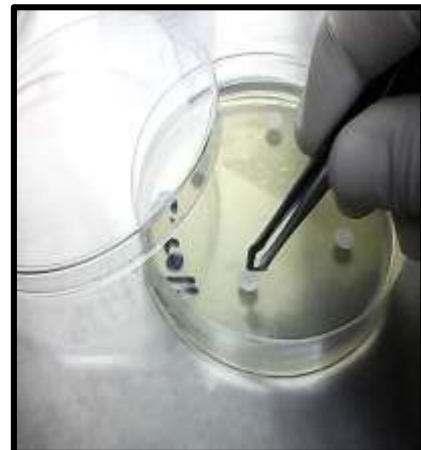
Fotografía 3-3: Antibióticos control
Tomado por: FLORES G. (2017)



Reactivación de cepas puras
Tomado por: FLORES G. (2017)



Siembra de microorganismos en el medio
Tomado por: FLORES G. (2017)



Cultivo de cepas y colocación de discos
Tomado por: FLORES G. (2017)



Adición del extracto a los discos
Tomado por: FLORES G.(2017)



Incubación de microorganismos
Tomado por: FLORES G. (2017)

Anexo E lectura de medios



Lectura de discos (30%)
Tomado por: FLORES G. (201



Halo de inhibición (30%)
Tomado por: FLORES G. (201



Lectura de discos (70%)
Tomado por: FLORES G. (201



Halo de inhibición (70%)
Tomado por: FLORES G. (201



Lectura de inhibición (100%)
Tomado por: FLORES G. (201



Halo de inhibición (100%)
Tomado por: FLORES G. (201