

**UNIVERSIDAD REGIONAL AUTONOMA DE LOS ANDES**  
**“UNIANDES”**



**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN FARMACIA CLÍNICA Y HOSPITALARIA**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL GRADO  
ACADÉMICO DE MAGISTER EN FARMACIA CLÍNICA Y HOSPITALARIA**

**TEMA:**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA “*in vitro*” DEL  
EXTRACTO HIDROETANÓLICO DE HOJAS DE *Origanum majorana* EN  
CEPAS DE *Proteus spp.***

**AUTOR: BQF. GUEVARA GALÁRRAGA EDGAR ROLANDO**

**TUTORES: DR. BERMÚDEZ DEL SOL ABDEL Ph.D**

**DR. CARRANZA QUISPE LUIS EMILIO MsC.**

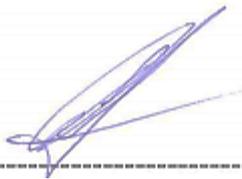
**AMBATO – ECUADOR**

**2018**

**APROBACIÓN DE LOS TUTORES DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**  
**CERTIFICACIÓN**

Quien suscribe, legalmente **CERTIFICA QUE:** El presente trabajo de Titulación realizado por la BQF. Guevara Galárraga Edgar Rolando, maestrante del Programa de Maestría en Farmacia Clínica y Hospitalaria, Facultad de Ciencias Médicas, con el tema “**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA “in vitro” DEL EXTRACTO HIDROETANÓLICO DE HOJAS DE *Origanum majorana* EN CEPAS DE *Proteus spp***”, ha sido prolijamente revisado, y cumple con todos los requisitos establecidos en la normativa pertinente de la Universidad Regional Autónoma de los Andes -UNIANDES-, por lo que apruebo su presentación.

Ambato, junio de 2018



Dr. Carranza Quispe Luis Emilio MsC.  
**TUTORES**

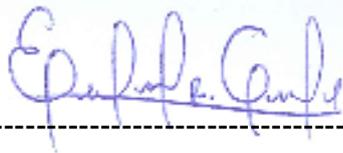


Dr. Bermúdez del Sol Abdel PhD.

## DECLARACION DE AUTENTICIDAD

Yo, Guevara Galárraga Edgar Rolando, estudiante del Programa de Especialidad en Farmacia Clínica y Hospitalaria, Facultad de Ciencias Médicas, declaro que todos los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, previo a la obtención del Grado Académico de **MAGISTER EN FARMACIA CLÍNICA Y HOSPITALARIA**, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas, por lo que son de mi exclusiva responsabilidad.

Ambato, mayo de 2018



---

BQF. Guevara Galárraga Edgar Rolando

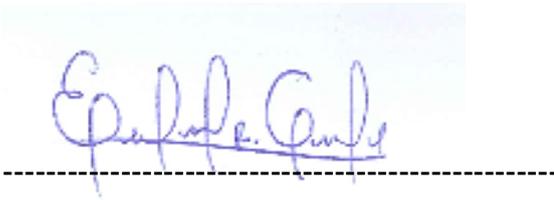
CI. 0603009085

**AUTOR**

## DERECHOS DE AUTOR

Yo, Guevara Galárraga Edgar Rolando, declaro que conozco y acepto la disposición constante en el literal d) del Art. 85 del Estatuto de la Universidad Regional Autónoma de los Andes, que en su parte pertinente textual dice: El Patrimonio de la UNIANDES, está constituido por: Propiedad intelectual sobre las investigaciones, trabajos científicos o técnicos, proyectos profesionales y consultoría que se realicen en la Universidad o por cuenta de ella.

Ambato, mayo de 2018



BQF. Guevara Galárraga Edgar Rolando

CI. 0603009085

**AUTOR**

## DEDICATORIA

*Las grandes obras no son llevadas a cabo por la fuerza, sino por la perseverancia es por eso que dedico este gran logro a mis queridas hijas Sayred y Anned; a mi amada esposa Sandra quienes motivan cada día una vida integra de emociones y la fortaleza de mejorar con el paso del tiempo.*

*Guevara Galárraga Edgar Rolando*

## **AGRADECIMIENTO**

*La trascendencia del hombre se ve marcada por quienes estuvieron siempre presentes en momentos y circunstancias únicas de la vida mi agradecimiento de corazón a:*

*Nuestro padre celestial por guardar siempre nuestra existencia y a su palabra que nos digna como seres humanos.*

*Mis abuelas Yolanda y Adela por impartir su sabiduría y experiencia de vida para ser mejor cada día.*

*Mis padres Edgar y Silvia por su enseñanza de vida, fuerza y valor para afrontar las dificultades con perseverancia y paciencia.*

*Mis hermanos Erica y Dorian por brindarme su apoyo y un hombro para compartir un sabio consejo.*

*Mis amigos y compañeros por permitirme aprender mucho más de la vida a su lado.*

*A la universidad y sus docentes por su filosofía de aprendizaje para afrontar las dificultades del ámbito profesional con un sentido de ética y humanismo.*

*Guevara Galárraga Edgar Rolando*

## ÍNDICE GENERAL

APROBACIÓN DE LOS TUTORES DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	
DECLARACION DE AUTENTICIDAD	
DERECHOS DE AUTOR	
DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTO	
INDICE GENERAL	
INDICE DE ABREVIATURAS	
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN	1
Antecedentes de la investigación	1
Planteamiento del problema	3
Formulación del problema	6
Delimitación del problema	6
Objeto de Investigación y campo de acción	6
Identificación de la línea de investigación	6
Objetivos	6
Objetivo general	6
Objetivos específicos	6
Idea a defender	7
Justificación del tema	7
Metodología investigativa a emplear	7
Técnicas	8
Instrumento de investigación	8
Aporte teórico	8
Significación práctica	9
CAPITULO I: MARCO TEÓRICO	10
1.1 Plantas medicinales	10
1.1.1 Historia de las plantas medicinales	10
1.1.2 Uso de las plantas medicinales	12
1.2 Estudios etnobotánicas y etnofarmacológicos	13
1.2.1 Etnobotánica	13

1.2.1.1 Métodos y técnicas usados en Etnobotánica	14
1.2.2 Etnofarmacología	15
1.3. Valor de uso de las plantas medicinales	15
1.4 Mejorana	16
1.4.1 Filogenia e historia evolutiva	17
1.4.2 Distribución y hábitat	18
1.4.3 Descripción botánica	18
1.4.4 Caracterización macro y micro morfológica	19
1.4.4.1 Macromorfología	19
1.4.4.2 Micromorfología	19
1.4.4.3 Interacción con el ser humano	20
1.4.4.4 Valor de uso de la mejorana	20
1.5 Caracterización fitoquímica de los extractos	21
1.5.1 Métodos de extracción	22
1.5.2 Maceración	24
1.5.3 Tamizaje fotoquímico	25
1.6.1 Actividad y resistencia antimicrobiana	26
1.6.2 Mecanismos de resistencia bacteriana	27
1.6.3 Bacterias de significancia clínica	28
1.6.4 Ensayos de susceptibilidad microbiana	29
1.6.5 Limitaciones del método de difusión en disco	29
<b>CAPITULO II: MARCO METODOLÓGICO</b>	<b>30</b>
2.1 Etapa I: Estudio Etnobotánico	30
2.1.1 Descripción del Área de Estudio	30
2.1.2 Procedimiento	32
2.1.3 Análisis e interpretación de datos	32
2.2 Etapa II: Obtención del extracto hidroetanólico de Mejorana	33
2.2.1 Acondicionamiento	33
2.2.2 Maceración de la muestra	34
2.2.3 Filtración	34
2.2.4 Determinación de requisitos organolépticos	34
2.2.5 Determinación de la densidad relativa	35
2.2.6 Determinación de pH	35

2.3. Etapa III: Caracterización fitoquímica del extracto hidroetanólico de <i>Origanum majorana</i>	35
2.3.1 Ensayo de Dragendorff para identificar alcaloides	36
2.3.2 Ensayo de Shinoda para identificar flavonoides	36
2.3.3 Ensayo de Espuma para identificar saponinas	36
2.3.4 Ensayo de Borntrager para identificar quinonas	37
2.3.5 Ensayo de cloruro férrico para identificar fenoles	37
2.3.6 Ensayo de Liberman Buchard para identificar triterpenos y/o esteroides	37
2.4 Etapa IV: Evaluación de actividad antimicrobiana del extracto hidroetanólico de <i>Origanum majorana</i> en cepas de <i>Proteus spp</i>	37
2.4.1 Método de difusión en disco (Kirby-Bauer)	38
CAPITULO III: DISCUSION Y RESULTADOS	39
3.1 Etapa I: Estudio Etnobotánico	39
3.2 Etapa II: Obtención del extracto hidroetanólico de Mejorana	45
3.2.1 Determinación de parámetros organolépticos	45
3.3 Etapa III: Caracterización fitoquímica del extracto hidroetanólico de <i>Origanum majorana</i>	46
3.4 Etapa IV: Evaluación de actividad antimicrobiana del extracto hidroetanólico de <i>Origanum majorana</i> en cepas de <i>Proteus spp</i>	47
CONCLUSIONES	49
RECOMENDACIONES	49
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Plantas medicinales utilizadas por los habitantes del sector San Francisco, Riobamba, Ecuador .....	40
Tabla 2. Análisis cuantitativo de las diferentes especies de Plantas medicinales utilizadas .....	42
Tabla 3. Determinación organoléptica del extracto hidroetanólico de hojas de <i>Origanum majorana</i> .....	45
Tabla 4. Determinación físico química del extracto hidroetanólico de hojas de <i>Origanum majorana</i> .....	46
Tabla 5. Tamizaje fitoquímico del extracto hidroetanólico de las hojas de <i>Origanum majorana</i> .....	46
Tabla 6. Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de <i>Origanum majorana</i> en cepas de <i>Proteus spp</i> a concentraciones de 25%,50%,75% y 100%.....	47

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Origanum majorana</i> - Mejorana .....	17
Figura N. 2: Provincia de Chimborazo .....	31
Figura N. 3 Parroquias urbanas Riobamba .....	31

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Diversidad de familias de plantas medicinales utilizadas por los habitantes del sector San Francisco, Riobamba, Ecuador.....	43
Gráfico 2. Forma de preparación para el uso de las plantas medicinales .....	44
Gráfico 3. Forma de administración empleada para el uso de las plantas medicinale .....	44

## RESUMEN

La utilización de las plantas medicinales está fundamentado en el conocimiento popular; cada vez se requiere la búsqueda constante de principios activos nuevos que promulguen una manera de combatir la resistencia bacteriana convirtiéndose en una alternativa terapéutica; por tal motivo el objetivo de la investigación fue evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto hidroetanólico de hojas de *Origanum majorana* en cepas de *Proteus spp*, para lo cual fue necesario complementarlo con etapas previas como un estudio etnobotánico a través de encuestas a 89 informadores clave del sector de San Francisco de la ciudad de Riobamba obteniendo un nivel de uso significativo del 21% que sirvió para la selección de *Origanum majorana* para el estudio. En una etapa posterior se obtuvo el extracto hidroetanólico y evaluación de parámetros físico químicos y organolépticos; seguido de la caracterización fitoquímica evidenciando la presencia de fenoles, flavonoides, terpenos y saponinas en dicho extracto. Culminando con la evaluación de su actividad antimicrobiana *in vitro* por la técnica de difusión en disco en cepas de *Proteus spp* a concentraciones de 25%,50%, 75% y 100% revelando que su actividad es directamente proporcional a la concentración del extracto. Se concluyó que la *Origanum majorana* es una de las plantas medicinales más usadas por la población estudiada y que el extracto hidroetanólico de sus hojas presentan actividad antimicrobiana.

**Palabras clave:** *Origanum majorana*, *Proteus spp*, etnobotánico, actividad antimicrobiana, plantas medicinales.

## ABSTRACT

The use of medicinal plants is based on popular knowledge. The constant search for new active ingredients that enact a way to combat bacterial resistance is required. Therefore, it will become a therapeutic alternative. For this reason, the objective of the present research work was to evaluate the *in vitro* antimicrobial activity of the hydroethanolic extract of *Origanum majorana* leaves in *Proteus* spp strains. It was necessary to complement the research with previous stages such as: an ethnobotanical study that applied surveys to 89 key informants from San Francisco area of Riobamba. A significant use level of 21% was obtained. Hence, *Origanum majorana* was selected for the study. At a later stage, the hydroethanolic extract was obtained and there was an evaluation of chemical and organoleptic physical parameters. Later, the phytochemical characterization was carried out where the presence of phenols, flavonoids, terpenes and saponins in that extract was evidenced. Finally, *in vitro* antimicrobial activity was evaluated by disc diffusion technique using *Proteus* spp strains at concentrations of 25%, 50%, 75% and 100%. This process allowed us to reveal that its activity is directly proportional to the concentration of the extract. It was concluded that *Origanum majorana* is one of the most used medicinal plants by the studied population and that the hydroethanolic extract of its leaves presents antimicrobial activity.

**Key Words:** *Origanum majorana*, *Proteus* spp, ethnobotanic, antimicrobial activity, medicinal plants.

## INTRODUCCIÓN

### Antecedentes de la investigación

En gran parte del mundo, la medicina tradicional es el pilar principal para la prestación de servicios de salud, o su vez se convierten en un complemento. La medicina tradicional o medicina no convencional suele llamarse medicina complementaria. La medicina tradicional es una parte importante y con frecuencia esta subestimada en la atención de salud. Muchos países reconocen actualmente la necesidad de elaborar un enfoque coherente e integral de la atención de salud, que facilite el acceso a la medicina tradicional de manera segura, respetuosa, asequible y efectiva.<sup>1</sup>

La utilización de las plantas medicinales generalmente está fundamentado en el conocimiento popular, y en muchas ocasiones, los pacientes no relatan de su uso a los profesionales de salud. Se calcula que de las 260.000 especies de plantas que se conocen en la actualidad el 10% se pueden considerar medicinales por presentar algún uso en ese campo.<sup>2</sup> El estudio de los componentes de las plantas medicinales se centra en las sustancias que ejercen una acción farmacológica sobre el ser humano o los seres vivos. Los principios activos en las plantas pueden ser sustancias simples como alcaloides o mezclas complejas como las resinas, aceites esenciales, etc.<sup>3</sup>

La *Origanum majorana* es comúnmente conocida como Mejorana, es una herbácea de 15 a 50 cm de alto con olor característico, de hojas pequeñas, redondas y blanquecinas, las flores son pequeñas de color blanco o rosado, las semillas son pequeñas oblongas y de color pardo oscuro.<sup>4</sup> Es una planta muy utilizada en industria farmacéutica por su cantidad de beneficios terapéuticos. Su uso es muy conocido en la industria de la alimentación como conservante en ensaladas, pescados carnes, repostería y en otros ámbitos como licorería y perfumería. Se le otorga propiedades calmantes y efecto positivo en el sistema nervioso, apoya un sistema inmune saludable, puede promover un sistema

cardiovascular saludable y un efecto antimicrobiano por lo que se usa también para tratamientos de fitoterapia. <sup>5</sup>

Abdel-Massih R, y colaboradores en su publicación acerca de la Actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos de *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana*, y *Trigonella foenum-graecum* sobre Bacilos Gram negativos drogo resistentes identificó que las partes aéreas de las de la plantas son las responsables de la actividad antimicrobiana y que la fracción de éter de petróleo de *Origanum majorana* inhibió significativamente el 94% de las cepas probadas mientras que las fracciones de diclorometano, acetato de etilo y las fracciones acuosas de todas las plantas seleccionadas mostraron crecimiento inhibitorio microbiano relativamente bajo. <sup>6</sup>

En el estudio realizado El-Akhal F. y colaboradores titulado composición química y actividad larvicida del aceite esencial de *Origanum majorana* cultivado en Marruecos contra *Culex pipiens* determinó que el rendimiento de aceite esencial correspondiente a 0.8% calculándolo sobre la base de la materia seca. Los resultados del análisis del aceite esencial por GC-MS mostraron que los principales componentes de *O. majorana* son 4-terpineno (28,96%),  $\gamma$ -terpineno (18,57%) y  $\alpha$ -terpineno (12,72%). Los hidrocarburos monoterpénicos constituyen la fracción principal (51.7%), seguidos por monoterpenos oxigenados con 44.38%. Los hidrocarburos sesquiterpénicos representaban solo el 3.67% de todos los constituyentes identificados (99.75%). <sup>7</sup>

De Oliveira J, y colaboradores presenta resultados en su investigación señalada como Eficacia de los aceites esenciales de *Origanum vulgare* L. y *Origanum majorana* L. en la inhibición del crecimiento de cepas bacterianas aisladas de los pacientes con conjuntivitis en la cual el crecimiento inhibitorio mínimo causo un efecto inhibitor significativo ( $P < 0.05$ ) sobre la viabilidad celular de *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.* y *S. aureus* que proporciona una eliminación total del inóculo bacteriano en un tiempo máximo de 24 h de exposición. <sup>8</sup>

En la investigación realizada por Prerna P, en su revisión fito-farmacológica de *Origanum majorana* concluye que los componentes principales que asignan la

actividad antimicrobiana se encuentran en los tallos y hojas de la planta que contienen taninos, pentosas y minerales encontrándose en mayor proporción en las hojas, pero el producto más importante y fragante es la esencia de color amarillento o verdoso cuyo rendimiento oscila entre 0,30 y 0.40% de la planta fresca. Esta esencia no es tóxica, contiene cantidades variables de terpenos principalmente terpineno, origanol (d-a-terpineol), sabineno y pequeñas cantidades de sesquiterpenos. <sup>9</sup>

Acerca del poder antiséptico de la *Origanum majorana* de los aceites esenciales se relacionan al contener un compuesto o principio activo propio pero varios compuestos son comunes en numerosas especies. Las plantas de uso tradicional ofrecen posibilidades para la búsqueda de principios bioactivos o etnomedicina siendo una alternativa de uso de antisépticos estándar. <sup>10</sup>

En cuanto a su actividad antimicrobiana, el resultado de la investigación confirma que el aceite esencial de la mejorana, posee efecto antimicrobiano frente a bacterias gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* y sobre bacterias gram negativas. La bacteria *Pseudomonas auriginosa* no mostró sensibilidad frente al aceite esencial. Investigaciones similares, demuestran la acción antibacteriana de la familia de las labiadas, sin embargo, existe una diferencia en cuanto al diámetro de inhibición de *Salmonella cholerae suis*. <sup>11</sup>

### **Planteamiento del problema**

En el ámbito internacional encontramos que las infecciones respiratorias agudas, las enfermedades diarreicas, el sarampión, el sida, el paludismo y la tuberculosis causan más del 85% de la mortalidad por infecciones en el mundo. La resistencia de los agentes infecciosos respectivos a los medicamentos de primera línea va desde cero hasta casi 100% y, en algunos casos, la resistencia a los fármacos de segunda y tercera línea afecta significativamente el resultado del tratamiento para las diversas patologías. A esto se agrega la importante carga de enfermedad que representan en todo el mundo las infecciones nosocomiales resistentes; los nuevos problemas que plantea la resistencia a los fármacos

antivirales, y los problemas crecientes de resistencia a los medicamentos entre las enfermedades parasitarias.<sup>12</sup>

El crecimiento masivo del comercio y los movimientos humanos como consecuencia de la globalización han permitido que los agentes infecciosos, incluidos los fármacos resistentes, se diseminen rápidamente. Si bien en los países desarrollados, en gran parte, todavía se puede confiar en la eficacia de los medicamentos antimicrobianos más nuevos para tratar las infecciones resistentes, en muchas otras partes del mundo el acceso a tales fármacos a menudo es limitado, cuando no se carece de ellos del todo.<sup>13</sup>

La incursión en la elaboración de nuevos antimicrobianos que sean eficaces para combatir agentes patógenos resistentes y de otros métodos, como vacunas, es vital si se ha de reducir la repercusión de la resistencia en el futuro. No obstante, los nuevos productos tienen limitaciones económicas y su desarrollo toma mucho tiempo. El interés de la industria farmacéutica por la investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos se ha ido perdiendo como consecuencia de la conquista de las enfermedades infecciosas que se ha logrado en los países desarrollados. Por lo tanto, a no ser que se logre controlar la aparición de la resistencia y desacelerarla para prolongar la vida de los medicamentos actuales, podría llegar a una falta total de tratamientos eficaces contra algunos agentes patógenos en los próximos 10 años, a raíz de la disminución de la elaboración de nuevos antimicrobianos.<sup>14</sup>

La medicina tradicional se utiliza ampliamente en todo el mundo y se la aprecia por diversos motivos. Se declaró que “las medicinas tradicionales de calidad, seguridad y eficacia comprobada contribuyen a asegurar el acceso de todas las personas a la atención de salud.”<sup>15</sup> Además, es culturalmente aceptada y en ella confían muchísimas personas. La asequibilidad de la mayor parte de las medicinas tradicionales las hace más atractivas en el contexto del vertiginoso encarecimiento de la atención en salud. La medicina tradicional sobresale también como un medio para afrontar el incesante aumento de las enfermedades no transmisibles crónicas. Independientemente de los motivos por los que se

recurre a la medicina tradicional, es indudable que el interés por ellas ha aumentado, y seguramente seguirá aumentando en todo el mundo. <sup>16</sup>

La posibilidad de reducir gastos es un motivo importante para que las personas opten por servicios de medicina tradicional o complementaria. Por ejemplo, un ensayo aleatorio controlado incluyó una evaluación económica de tratamientos de fisioterapia, terapia manual y atención médica general contra los dolores cervicales: los resultados indicaron que el grupo de terapias manuales conseguía mejoras más rápidamente que la fisioterapia y la atención médica general, y que los gastos totales de la terapia manual (€447) representaban, aproximadamente, un tercio de los gastos de fisioterapia (€1.297) y de atención médica general (€1.379). Esto sugiere que la terapia manual es más eficaz y menos costosa para tratar dolores cervicales, que la fisioterapia o la atención dispensada por un médico generalista. <sup>1</sup>

Otro estudio reciente indica que los pacientes cuyos médicos generalistas están capacitados también en medicina complementaria y alternativa incurren en menores gastos de atención sanitaria y registran tasas de mortalidad más bajas que los demás. Los menores gastos se debieron al menor número de ingresos hospitalarios y prescripciones de medicamentos. <sup>17</sup>

Cada vez se requiere la creación y búsqueda constante de principios activos nuevos con actividad antimicrobiana que promulgue una manera de combatir la resistencia bacteriana que por razones diversas se ha constituido en un problema de salud a mundial por lo que se propone la investigación de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroetanólico de las hojas de *Origanum majorana* ya que la información en el Ecuador es escasa acerca de ello y de esta manera promover el uso de medios naturales y disminuir los efectos adversos de los fármacos.

## **Formulación del problema**

¿Presenta efecto antimicrobiano “*in vitro*” el extracto hidroetanólico de *Origanum majorana* sobre *Proteus spp*?

## **Delimitación del problema**

Se realizará el estudio del efecto antimicrobiano “*in vitro*” sobre *Proteus spp.* con el extracto hidroetanólico de las hojas de mejorana perteneciente al género *Origanum especie majorana*.

## **Objeto de Investigación y campo de acción**

Actividad antimicrobiana “*in vitro*” de *Origanum majorana*

## **Identificación de la línea de investigación**

### **Estudios microbiológicos**

#### **Objetivos:**

#### **Objetivo general**

Evaluar la actividad antimicrobiana “*in vitro*” del extracto hidroetanólico de las hojas de *Origanum majorana* sobre *Proteus spp.*

#### **Objetivos específicos**

1. Obtener el extracto hidroetanólico de las hojas de *Origanum majorana*.
2. Identificar los metabolitos secundarios mediante el tamizaje fitoquímico del extracto hidroetanólico de *Origanum majorana*.
3. Evaluar el efecto antimicrobiano del extracto hidroetanólico de *Origanum majorana* sobre *Proteus spp.*

## **Idea a defender**

El extracto hidroetanólico de las hojas de *Origanum majorana* tiene efecto antimicrobiano frente a cepas bacterianas de *Proteus spp*

## **Justificación del tema**

La resistencia a los antimicrobianos está en aumento en todo el mundo a niveles alarmantes, diariamente se presenta y propaga en todo el planeta nuevos mecanismos de resistencia que ponen en riesgo nuestra capacidad para tratar las enfermedades infecciosas. Un creciente número de infecciones son cada vez más difíciles y a veces se convierten en imposibles de tratar, a medida que los antimicrobianos van perdiendo eficacia.

La búsqueda para determinar la actividad antimicrobiana en fuentes naturales como plantas uso medicinal en territorio nacional se convierte en una alternativa para aquellos tratamientos que se han convertido en obsoletos frente a microorganismos que hayan generado un mecanismo de resistencia a fármacos sintéticos por lo que esta investigación en el extracto hidroetanólico en las hojas de mejorana originará el aporte necesario para la elaboración de formas farmacéuticas que contribuyan a la disminución de enfermedades infecciosas originadas por *Proteus spp*.

## **Metodología investigativa a emplear**

Se realizará una investigación experimental aplicada en cuatro etapas:

### **ETAPA I**

En primer lugar, por medio de cuestionarios se verificò los usos potenciales de la planta en base al conocimiento popular de los encuestados, posteriormente se realizò el correspondiente estudio etnobotánico de la especie para su acondicionamiento y preparación, lo cual incluye la obtención de la materia prima, secado y molienda.

## ETAPA II

Una vez realizado el proceso de molienda se pudo reducir el tamaño de partícula facilitando la extracción de todos los componentes, obteniéndose el extracto por maceración hidroetanólica.

Seguidamente se procedió a la concentración del extracto empleando un rotavapor.

## ETAPA III

Se procedió a la identificación cualitativa de los metabolitos presentes en el extracto hidroetanólico mediante pruebas fitoquímicas específicas del tamizaje.

## ETAPA IV

Una vez identificados los componentes bioactivos presentes en el extracto de *Origanum majorana* se evaluó la actividad microbiológica del mismo sobre cepas bacterianas que mostraron evidencias bibliográficas.

## **Técnicas**

Estudio etnobotánico y etnofarmacológico, extracción por arrastre por vapor, tamizaje fitoquímico, evaluación actividad antimicrobiana.

## **Instrumento de investigación**

Ficha de recolección de datos: a través de una encuesta que proporcione datos relacionados con el tema a investigar.

## **Aporte teórico**

Como aporte teórico el presente trabajo va a servir como una base bibliográfica nacional de gran interés, pues contendrá revisiones actualizadas con aporte teórico, que parte del conocimiento empírico acerca de los usos tradicionales de la mejorana. Permitiendo potenciar saberes ancestrales con soporte científico documentado adecuadamente.

## **Significación práctica**

Con este trabajo de investigación además de promover el uso de las especies nativas de nuestro medio se va a verificar de manera experimental su actividad antimicrobiana sobre cepas aisladas proporcionando realce al uso de fuentes naturales en el tratamiento de patologías, evitando los efectos adversos frecuentes que se observan en la medicina convencional.

## **CAPITULO I: MARCO TEÓRICO**

### **1.1 Plantas medicinales**

Se puede definir que son plantas medicinales, aquellas que contienen en alguno de sus órganos, la presencia de principios activos, los cuales, al ser o no administrados en dosis suficientes, producen efectos curativos en las enfermedades del ser humano y porque no en los animales en general. Se calcula que de las 260.000 especies de plantas actualmente se conocen el 10% se pueden considerar medicinales, lo que indica, que se encuentran recogidas dentro de los tratados médicos de fitoterapia, modernos y de épocas ancestrales, por presentar algún uso medicinal. <sup>15</sup>

En las regiones ecuatoriales, la proporción de especies medicinales puede variar sensiblemente de este porcentaje, ya que se considera que se conoce muy poco de la totalidad de la flora y convirtiéndose en una fuente de exploración cada día para el hallazgo de nuevas especies y posibles principios activos que ayuden a contrarrestar efectos indeseables como las enfermedades. El estudio de los componentes de las plantas medicinales se centra en las sustancias que ejercen una acción farmacológica sobre el ser humano o los seres vivos. <sup>15</sup>

Los principios activos que se encuentran en las plantas pueden ser sustancias de estructura simple (como alcaloides) o bien mezclas complejas (resinas, aceites esenciales, etc.). Los compuestos que se encuentran comúnmente son los azúcares y heterósidos (azúcar más un compuesto sin azúcar), que pueden ser glucósidos, galactósidos, etc. Se registra que el primer heterósido que se descubrió fue la salicina. Entre otros componentes activos que se encuentran en las plantas son alcaloides, lípidos, gomas, mucílagos, principios amargos, taninos, aceites esenciales, resinas, bálsamos, oleorresinas, ácidos orgánicos, enzimas y vitaminas. <sup>15</sup>

#### **1.1.1 Historia de las plantas medicinales**

Una parte importante de la historia la conforman las plantas medicinales siendo fundamental en la cultura de los pueblos indígenas. Su uso y aplicaciones

empleados como remedio de enfermedades, constituyen un conocimiento que se transmite en forma oral y con la experiencia generada en cada uno de sus integrantes se la lleva de generación en generación.

Los indígenas poseían un magistral conocimiento sobre las hierbas medicinales, así como la anatomía humana y que la relacionaban para curar con certeza muchas de las enfermedades que se presentaban. Posterior a las hierbas se añadieron los minerales con propiedades curativas. Una manera de administrar sus medicamentos, era mediante cocimientos, aceraciones, emplastos, polvos secos, aceites, muchas veces acompañados de conjuros, mandas, rezos o limpias. La aplicación de la medicina estaba en dependencia del tipo de enfermedad que se presentaba, es decir, los curanderos estaban ubicados por especialidades. <sup>15</sup>

Para un sinnúmero de personas, los tratamientos a base de hierbas, son prácticas de la medicina tradicional y a su vez representan la principal fuente de atención sanitaria, y en algunas ocasiones única. Esta manera de atención es la más próxima a los hogares, es accesible y asequible. Además, se ha convertido culturalmente aceptada y en ella depositan su confianza las personas. La asequibilidad para la mayor parte de las medicinas tradicionales las hace más llamativas en el contexto de un mundo de cambio constante y evolucionario en la medicina convencional. <sup>1</sup>

Al llegar a nuestro país los españoles se quedaron admirados de la práctica ancestral de conocimientos y habilidades de los indígenas para la curación de las enfermedades. Los españoles en su afán de conquista y en su desconocimiento hacia este tipo de medicina, llegaron a prohibir una parte de curaciones por considerarlas mágicas y supersticiosas, mucha gente fue condenada, hasta llegar a la prohibición de curar sin un título constituyendo un pago de 60 pesos de oro. Esta situación provocó que la medicina indígena se practicara a escondidas. <sup>16</sup>

La medicina Española introdujo nuevas maneras de curación a los pueblos aborígenes como el uso de la jeringa metálica y la incorporación de otras plantas como: la manzanilla, el romero, la sábila y el alba, hoy en día muy utilizadas

por los pueblos indígenas. Este mestizaje originó también a la botica como tal, donde se realizaba la preparación de compuestos con sustancias extraídas de las plantas, dando lugar así a la introducción de aceites, olores, esencias, etc. En la botica se daba un acto médico integral, ya que la misma persona diagnosticaba, recetaba y realizaba un seguimiento al paciente. <sup>3</sup>

No obstante, el progreso en el desarrollo de la medicina provocó que la farmacia industrial gana espacio sobre la botánica y hasta que se le considerara ilegal para que no se la siga practicando. A partir de la aparición de las medicinas de farmacia, los médicos prácticamente se olvidaron del uso de las plantas medicinales como una fuente de curación para enfermedades limitándose a recetar medicamento de alto costo, en ocasiones difíciles de conseguir y en muchos casos considerados de efectos peligrosos. <sup>3</sup>

### **1.1.2 Uso de las plantas medicinales**

La utilización de plantas medicinales designadas como recurso terapéutico es lo suficientemente difundida en todo el planeta, y se conoce que el 67% de las especies vegetales medicinales son provenientes de países en desarrollo. Son consideradas como terapia complementaria o alternativa en salud y su uso ha sido creciente. El empleo de las plantas generalmente está fundamentado en el conocimiento popular acerca de sus propiedades, y en muchas ocasiones, los pacientes no relatan su utilización a los profesionales de salud. <sup>3</sup>

El conocimiento de las indicaciones terapéuticas de las plantas medicinales generalmente se atribuye a las personas mayores, quienes también son responsables por la aplicación de sus conocimientos para preparar las formulaciones a base de plantas. La terapéutica con plantas medicinales entre los mayores al parecer se desarrolla, principalmente en un campo de aplicación como práctica de automedicación y posterior tratamiento de la enfermedad con el fin de curarla. <sup>3</sup>

Se toma como referencia investigaciones generalizadas en bibliografías varias se constató el empleo de dos o más plantas medicinales en un 16,2% de los mayores entrevistados, lo que fue denominado de polihervas. El té de camomilla

fue la planta medicinal que resalto su uso, seguido del ajo, y el té de artemisa. El empleo de plantas medicinales también fue aseverado por mayores canadienses, en que 17% de la muestra hacía uso rutinario en diferentes formas de administración, y el cual obtuvo como resultado la presencia de once interacciones medicamentosas potenciales lo que nos refiere que aun siendo productos de origen natural todavía, las plantas medicinales comúnmente consumidas por la población pueden presentar efectos colaterales, a pesar de existir considerable carencia de estudios clínicos que posibiliten el uso seguro de esas plantas; he aquí le importancia de ampliar el tema investigativo de manera incesante. <sup>2</sup>

Todo en cuanto tiene que ver a las interacciones medicamento y planta, las averiguaciones se han dirigido a las plantas de origen europea y asiática, como la equinácea, el ginkgo, la hierba de San Juan y el ginseng coreano. En ese caso, el ginseng puede reducir el efecto diurético de medicamentos, como la furosemida. Cuando administrado con la warfarina, esa planta puede opacar la eficacia del anticoagulante. <sup>2</sup>

## **1.2 Estudios etnobotánicas y etnofarmacológicos**

Se ha destacado numerosos estudios en los campos de etnobotánica médica y etnofarmacología los cuales resaltan la importancia de la fitoterapia para las personas en diferentes partes del mundo. Se sostiene que la herbolaria es la forma de terapia más extendida y antigua. Incluso se estima que aproximadamente el 34% de la población del mundo al final del siglo XX se basó principalmente en las plantas medicinales para la mayor parte del tratamiento de la enfermedad. <sup>18</sup>

### **1.2.1 Etnobotánica**

Se puede definir a la etnobotánica como el conocimiento, el rol, los significados y los usos de las especies vegetales en una sociedad determinada; además de los aspectos meramente económicos su campo de acción incluye otros aspectos relevantes que corresponden al mundo cognoscitivo y la vida espiritual de la gente. En el mundo a partir de la década de los 90 se empezó con el interés

formal de los antropólogos por las especies de plantas utilizadas por distintos grupos étnicos, con la finalidad de investigar los rasgos culturales de las sociedades, en las que las plantas ocupan un lugar importante y valorizado. <sup>19</sup>

Se han presentado algunas revisiones sobre la naturaleza y alcances de la etnobotánica contribuyendo a unificar su marco teórico y resaltar el papel de éste campo en la conservación de la biodiversidad y en el desarrollo de comunidades. Las innovaciones de mayor trascendencia en etnobotánica incluyen la utilización de técnicas que permiten analizar cuantitativamente los datos recolectados, incluyendo la prueba estadística de hipótesis y el diseño de métodos para cuantificar el valor económico de las especies no maderables en bosques tropicales, como parte de documentar el conocimiento etnobotánico. <sup>20</sup>

#### **1.2.1.1 Métodos y técnicas usados en Etnobotánica**

Las técnicas empleadas para el registro del conocimiento local se encuentran aquellas derivadas de la antropología, entre estas se consideran la observación participante y las entrevistas a determinados miembros de la comunidad, siempre en dependencia del tipo de datos que se quieren recolectar. Se utilizan también técnicas botánicas de colección, herborización e identificación de especies. Obteniendo como producto final de esta fase es, por lo general, una lista etnoflorística y la colección de herbario de las plantas medicinales utilizadas en el contexto a investigar. <sup>20</sup>

La encuesta etnobotánica actualmente es uno de los métodos más utilizados para identificar vegetales con potencial de uso es una encuesta sobre los usos tradicionales de estas especies por los pobladores de dicha zona. Una de las formas más idóneas de realizar encuestas es mediante la realización de preguntas sencillas y tomando en consideración matrices de categorías aglutinantes. A esta teoría se la conoce como desarrollo de encuestas en base a cuestionarios semiestructurados apoyado en grupos focales. <sup>19</sup>

### **1.2.2 Etnofarmacología**

En la actualidad las plantas tienen aplicaciones importantes en medicina, entre las más priorizadas es que constituyen una fuente directa de agentes terapéuticos. Si bien es cierto una gran parte de los medicamentos se obtiene por síntesis química en laboratorios especializados la mayoría de las estructuras principales o principios activos están basadas en productos naturales. Aproximadamente del 60% de los compuestos anticancerígenos y el 75% de los antimicrobianos son productos de origen natural o derivados de los mismos obtenidos mediante estudios e investigaciones para potenciarlos o disminuir los efectos adversos de otros. <sup>21</sup>

Debemos tener en cuenta que es difícil predecir la utilidad farmacológica de ellos, ya que no existe una alta correlatividad entre el comportamiento in vitro e in vivo, debido tal vez a la compleja composición que presentan los extractos vegetales, se busca principalmente compuestos bioactivos entre la gran cantidad de plantas que no se han estudiado todavía constituyéndose en un hallazgo para la medicina. Hay que considerar seriamente esta especulación que más del 35 % de las medicamentos que se utilizan en la actualidad provienen de las plantas.

<sup>21</sup>

### **1.3. Valor de uso de las plantas medicinales**

En la evaluación cuantitativa acerca de la importancia del uso de las plantas ha sido objeto de constante revisión y modificaciones que precisan ajustes para una mejor correlación. Existen diferentes metodologías empleadas, las cuales pueden agruparse en tres enfoques principales.

El Consenso de informantes empleado para un análisis de la importancia relativa de cada uso de acuerdo con el grado de consenso en las respuestas que dan los informantes, con respecto a los usos de una especie. Sin embargo, para el desarrollo completo de la misma, se requiere desmedido tiempo para realizar la toma de información y repetición de la toma de datos con el mismo entrevistado, por lo que sólo se emplea con éxito en estudios etnobotánicos a largo plazo. <sup>22</sup>

Incluimos a la ubicación subjetiva como metodología, que expresa la importancia relativa de las diferentes plantas o usos es determinada de manera subjetiva, con base en el significado cultural de cada planta o uso. Se pueden o no dividir las categorías de uso en mayores y menores, asignando a cada una un valor diferencial. Una variante es la propuesta por Kvist, en la que los valores asignados varían entre 0,5 y 1,5 en dependencia de la importancia de uso, con base en lo que denominan una “negociación” con los entrevistados.<sup>23</sup>

Y finalmente la sumatoria de usos o usos totalizados; en esta metodología, el número de usos es sumado dentro de cada categoría, para evaluar el valor de uso de una especie, una familia o un tipo de vegetación. Esta es la forma más rápida de cuantificar datos etnobotánicos y se ha convertido en la más usada hasta el momento, su ventaja principal está en la rapidez de su aplicación y en que suministra información cuantitativa confiable para grandes áreas a un costo bajo. Este enfoque plantea que cada uso mencionado para una especie determinada, contribuye al valor total de importancia de dicha especie, independientemente de la categoría.<sup>22</sup>

#### **1.4 Mejorana**

La mejorana es una planta herbácea muy ramificada, con su nombre científico *Origanum majorana* y de tallos leñosos en su base caracterizada por su olor extremadamente aromático. Esta especie se cultiva en numerosos países y probablemente fue introducida desde inicios de la colonización, por lo que se cultiva con frecuencia en jardines, macetas y cultivada a escala por pequeños productores que lo comercializan en plazas, tiendas naturistas y mercados.<sup>5</sup>

**Figura 1. *Origanum majorana* - Mejorana**



Su forma de uso usualmente es en infusión siendo eficaz en desórdenes digestivos, dolores espasmódicos y como sedante, entre otras; además de poseer una actividad antimicrobiana sobre agentes patógenos se emplea también como condimento y para sazonar embutidos, por lo que se ha calificado una amplia gama de utilidades, así como también de excelentes perspectivas de mercado, ya que por citar algunos ejemplos, países como Estados Unidos consumen alrededor de 300-400 t/año y Francia y Alemania más de 500 t anuales.<sup>5</sup>

#### **1.4.1 Filogenia e historia evolutiva**

El género *Origanum* comprende una veintena de especies, y todas ellas caracterizadas por ser aromáticas. En este género cabe destacar a parte de la mejorana al orégano (*Oreganum vulgare*). De igual manera que la mejorana pertenece a la familia taxonómica *Lamiaceae*, comúnmente llamadas labiadas teniendo relación directa con sus flores ya que se caracterizan porque tienen forma de labios. Su diferenciación es difícil y en ocasiones pueden encontrarse híbridos entre estas u otros miembros del género.<sup>24</sup>

### **1.4.2 Distribución y hábitat**

La mejorana es originaria del oeste asiático y de la zona mediterránea, tanto europea como africana. En la actualidad y debido a su gran número de aplicaciones se cultiva en las zonas europeizadas. Prefiere zonas soleadas y secas (como el ecosistema mediterráneo). Es posible encontrarla naturalizada a partir de los cultivos en los bordes de caminos y zonas sin labrar, puesto que sus requerimientos en cuanto a nutrientes es relativamente bajo comparada con otras especies. Sus requerimientos edáficos son muy pocos, crece con más vigor en suelos calizos. En cuanto a temperaturas no soporta bien las heladas. Por lo que se recomienda sembrarla entrada la primavera en los climas fríos. <sup>9</sup>

### **1.4.3 Descripción botánica**

Las plantas que pertenecen a este grupo botánico se caracterizan por poseer en la mayoría de sus partes la presencia de aceites esenciales los cuales son muy aromáticos. Pertenecen a esta familia otras especies aromáticas resaltando a la menta, el tomillo, la salvia y el romero. Inicialmente la mejorana se consideró como una variedad de orégano pero en posteriores investigaciones se han evidenciado diferencias notorias entre estas plantas que pertenecen al mismo género pero a diferente especie.

La mejorana es una planta tipo arbusto como la mayor parte de la lamiáceas caracterizadas por tallos erectos, casi leñosos y cuadrangulares otra característica común en las labiadas. El tallo es ramificado presentado varias ramos convirtiéndolo en una mata relativamente grande de aproximadamente 30-50cm de anchura por 40-60cm de alto. Sus hojas se presentan de forma oval, opuesta, enteras y pecioladas. El follaje es tomentoso y de color verde blanquecino a consecuencia de presentar una capa fina de vellosidades que cubre totalmente la hoja su tamaño oscila entre 5 y 25mm de largo por 7mm de ancho. <sup>5</sup>

La mejorana presenta una inflorescencia en forma de ramilletes terminales, este tipo de inflorescencia se agrupa pequeñas flores en el raquis o eje principal. Las flores son diminutas, sésiles, cortamente pedunculadas y están situadas sobre cuatro brácteas tomentosas, el cáliz se presenta de color blanco, rosado o

púrpura presentando una estructura en forma de labios característico de la familia de la lamiáceas. Es una planta melífera.

El fruto de la mejorana es un aquenio cuadrangular, que en su parte interna guarda sus semillas de color pardo, éste fruto solo puede alcanzar su madurez solamente en climas templados y estaciones cálidas. En toda la planta se evidencia la presencia de un agradable olor que se caracteriza por ser cálido y amargo.

#### **1.4.4 Caracterización macro y micro morfológica**

##### **1.4.4.1 Macromorfología**

Es una mezcla de hojas enteras y tallos finos que presentan un color verde grisáceo y de olor aromático suave, agradable como a especias sus tallos presentan forma cuadrangular de color púrpura, claro y verde blanquecino a causa de la vellosidades anteriormente descritas, que se encuentran en toda la planta.

##### **1.4.4.2 Micromorfología**

Las estomas de tipo diacítico están presentes en las hojas uniformemente distribuido con presencia de venas, terminaciones e islotes y venas en la superficie. Poligonal las células están presentes en la epidermis superior, mientras que numerosos cubriendo los tricomas en el exterior. Los tricomas que cubren son multicelulares, puntiagudos y de pared delgada. La hoja muestra epidermis cuticular que consiste en capas de colénquima dispuesta de forma compacta seguido de paquetes vasculares, mientras que; el mesófilo exhibe solo células empalizadas y parénquima esponjoso. El tejido de colénquima consiste en la pared amurallada gruesa células de parénquima y fibras de xilema. <sup>9</sup>

El tallo de la hierba es circular en la sección transversal que consiste en una cutícula gruesa. La epidermis está compuesta de una sola capa celdas rectangulares y 5-6 capas de embalado. Las células del parénquima poligonal forman la corteza. Las fibras de floema y el parénquima del floema son

claramente distinguidos. Dos rayos medulares gruesos a lo largo con vasos de xilema, parénquima de xilema y prominente la médula parenquimatosa está presente en el centro.

En la raíz la sección es circular en el contorno que consta de 2-3 capas de células rectangulares de corcho con 6-7 capas parénquima que forma la corteza. El floema se presenta externo al xilema y médula ausente. <sup>9</sup>

#### **1.4.4.3 Interacción con el ser humano**

En cuanto a la conservación de la especie silvestre de mejorana se considera en un estado de no preocupación, como ocurre con otras plantas domesticadas. La mejorana es utilizada para aromatizar en la gastronomía mediterránea, arreglo ornamental y en la farmacia. En ocasiones se puede confundir con el orégano puesto que ambas comparten características similares a consecuencia de pertenecer al mismo grupo. A diferencia del orégano la mejorana presenta un aroma cítrico y de pino.

Entre las cualidades que ofrece la mejorana en la medicina tradicional se la usa en infusiones o en emplasto otorgándole capacidades para calmar los nervios y dolores de cabeza. Las partes utilizadas de la mejorana son tanto las hojas como las inflorescencias. Pudiéndose usar tanto fresca como seca. Para secarla basta dejarla en ramilletes boca abajo en un lugar aireado y a temperatura cálida. Su conservación puede realizarla en frascos hasta un año. <sup>24</sup>

#### **1.4.4.4 Valor de uso de la mejorana**

El uso de la mejorana es reconocido en varios ámbitos de aplicación de acuerdo a sus características tanto físicas como químicas y biológicas otorgadas al paso de estudios y por sus investigaciones que la catalogan como una planta completa al resaltar sus usos en tres áreas que tiene un dominio completo frente a otras especies de labiadas.

En el ámbito medicinal la mejorana figura como una droga oficial en la Farmacopea Española y es uno de los componentes del bálsamo tranquilo. Es tónica y estimulante, aromática, estomacal, antimicrobiana y antiespasmódica. En diversas partes del mundo se emplea el cocimiento de las hojas y los tallos

contra las afecciones microbianas del pecho. También emplean con el mismo propósito el jugo de la planta calentando junto con aceite. En un mayor porcentaje se emplean para el catarro el cocimiento de mejorana con cáscaras de naranja y un poco de anís. Entre otras de sus aplicaciones en el régimen medicinal se ha catalogado que la mejorana se aplica en los dolores de parto lo mismo que el toronjil, y ambas plantas que también en todas partes para los dolores de estómago.<sup>9</sup>

Con respecto a sus aplicaciones culinarias las partes utilizadas de la planta están las hojas y las ramitas de flores son populares en la cocina griega e italiana, con platos de carne, sopas, salsas de tomate, pastas y para aromatizar sumergidos en aceites y vinagres. Al tener un sabor similar, pero más suave que el orégano, por lo que es recomendable usarlo fresco hacia el final de la cocción para una mejor apreciación de su sabor. Puede frotarse en chuletas de carne como condimento, antes de asarlas.

La mejorana fresca con albahaca es muy buena, troceada y esparcida sobre una ensalada cruda y también aplicada a rellenos y embutidos. Complementa también la delicadeza de vegetales. Muy utilizada con la mantequilla y en guisos en el momento de servirlos para que conserven todo el sabor.

Las flores de la mejorana pueden secarse para adornos duraderos, por lo que se considera también su aplicación en el ámbito ornamental y se pueden usar para combinar con musgo para cubrir cestas y cajas, y los tallos secos sirven de material para cestería. Las flores de la mejorana dulce por su coloración característica sirven para crear zonas de color denso en cualquier tipo de arreglo floral, ya sea de material fresco o seco, confiriendo un aspecto campestre a coronas, guirnaldas, anillos y trenzas vegetales.<sup>9</sup>

### **1.5 Caracterización fitoquímica de los extractos**

Generalmente los extractos son preparaciones de consistencia líquida, semisólida o sólida que se obtienen a partir de drogas vegetales o tejidos provenientes de animales en estado generalmente seco. Los extractos son preparados por métodos acertadamente usados con etanol u otro solvente

adecuado. Pueden ser mezclados diferentes lotes de droga vegetal o tejido animal previo a la extracción.<sup>25</sup>

La droga vegetal o tejido animal a ser extraído debe someterse con anterioridad a uno o varios tratamientos para lograr la optimización del extracto, por ejemplo, se puede realizar la inactivación de enzimas, molienda o trituración. Y lógicamente las materias indeseables presentes que pueden causar un conflicto posterior deben ser eliminadas antes de la extracción.

Tanto las drogas vegetales, tejido animal y solvente orgánico usado para la preparación de extractos cumplen con la descripción en las farmacopeas. Al elaborar extractos densos y secos donde el solvente orgánico es eliminado por evaporación, puede usarse solvente recuperado o reciclado, siempre que el procedimiento de recuperación sea controlado y monitoreado con el fin de que el solvente cumpla con sus propiedades antes del rehúso o mezclado con otros materiales aceptados.<sup>26</sup>

La extracción realizada con un solvente dado direcciona a las proporciones típicas de un constituyente caracterizado en la materia extraíble. No obstante, en el proceso de estandarización y cuantificación, se pueden aplicar más procedimientos de purificación para incrementar estas proporciones con respecto al valor esperado, tales extractos se los refiere como “refinados”.<sup>25</sup>

### **1.5.1 Métodos de extracción**

Los diferentes métodos de extracción permiten obtener como productos en formas farmacéuticas adecuadas para su administración oral o externa de acuerdo al lugar de acción que sea necesario. Las farmacopeas mantienen la inclusión dentro de sus especificaciones regulaciones con fundamento científico para garantizar la calidad de estos preparados, los cuales no precisan un control tan exacto como los medicamentos oficiales, pero siempre deben tener en cuenta cuidados en cuanto a la conservación y tiempo de almacenamiento.<sup>27</sup>

Entre los procesos de extracción destacan las nuevas tecnologías entre las que se encuentra la extracción en fluidos supercríticos. Pero todavía se utilizan otros

procesos extractivos más convencionales por sus ventajas, como los de arrastre de vapor, los de extracción por solución y los de extracción por centrifugación.

a) *EFS, fluidos supercríticos*

Un fluido supercrítico es una mezcla, sustancia o elemento que, mediante operaciones mecánicas y bajo condiciones operativas de presión y temperatura, se sitúa por encima de su punto crítico, pero por debajo de la presión necesaria para condensarlo en un sólido. La extracción por fluidos supercríticos se considera más respetuosa con el medio ambiente que otros métodos de extracción convencionales, por la utilización de gases como el CO<sub>2</sub> a elevada presión, en estado líquido o supercrítico, en lugar de disolventes clorados, que como resultado producen residuos tóxicos. <sup>28</sup>

Como características de un fluido supercrítico podemos destacar que tienen un gran poder disolvente y una gran capacidad de penetración en sólidos, lo que da lugar al agotamiento rápido y prácticamente total de los sólidos extraíbles. También se pueden separar totalmente y de forma sencilla de los extractos, sólo variando la presión o la temperatura, hasta el extremo, si es necesario, en que el fluido pasa al estado gaseoso. <sup>28</sup>

b) Extracción por solución

Este método precisa una mayor inversión que la extracción por arrastre de vapor, pero es compensado por su rendimiento casi duplicado respecto a los sistemas anteriores, además de obtenerse prácticamente todos los compuestos presentes en el material herbáceo: volátiles, grasas, ceras, pigmentos, etc. Se utiliza disolventes orgánicos como alcoholes, hidrocarburos, éteres, etc.

Y si no se llega a un el extracto limpio es necesario establecer etapas adicionales de purificación si la esencia o el producto se van a destinar al consumo o la higiene humana. Esta restricción ha derivado en la búsqueda de nuevas soluciones y optimizar al máximo su recuperación, pero también ha elevado su coste y su aplicación. Para ello se lleva a cabo una extracción con disolventes orgánicos, que penetran en la materia vegetal y disuelven las sustancias, que son evaporadas y concentradas a baja temperatura. Después, se elimina el

disolvente, obteniendo la fracción deseada. La extracción puede ser sólido – líquido o líquido – líquido en función del estado de la muestra.

Extracción sólido – líquido: Se trata de una muestra sólida, la cual se pulveriza y a continuación, se extrae los analitos con un disolvente en el que sean muy solubles, que diferencie las sustancias presentes en la matriz, que por lo general son insolubles en ese disolvente. Se puede adicionar también métodos físicos como agitación, temperatura o ultrasonidos para una mayor eficacia. Generalmente se somete a centrifugación tras la extracción para eliminar los posibles sólidos que hayan podido quedar. <sup>29</sup>

### **1.5.2 Maceración**

El producto sólido (materia prima) tiene una serie de compuestos que son solubles en el líquido extractante (fase líquida) que son los que se pretende extraer. En este método, el agente extractante suele ser agua, pero también se emplean otros líquidos entre estos tenemos vinos, jugos, alcohol o aceites aderezados con diversos ingredientes que suelen modificar las propiedades de extracción del medio líquido. <sup>26</sup>

La maceración consiste en sumergir la planta en un disolvente durante un lapso más o menos largo según las características de la parte utilizada de la planta. A manera general, en herbolaria se utiliza este método cuando la planta contiene principios activos que pueden perder o se modificar al ser expuestos a un calor excesivo o cuando el disolvente pudiera alterarse por lo mismo. <sup>26</sup>

Existen, básicamente, dos tipos de maceración:

La maceración en frío que consiste en sumergir el producto a macerar en un recipiente de ser necesarios con la menor cantidad de líquido posible, solamente se deja lo suficiente como para cubrir totalmente lo que se desea macerar. Esto se hace por un período extenso, dependiendo de lo que se vaya a macerar. La ventaja principal de la maceración en frío radica en que de usarse solo agua se logran extraer todas las propiedades de lo que se macera, es decir, toda la esencia como tal sin una variación en lo más mínimo. <sup>26</sup>

Otro tipo de maceración es la que se realiza con calor cuyo proceso a ejecutar es el mismo que en la maceración en frío, sino que en este caso puede variar el medio por el cual se logra la maceración. La desventaja de la maceración en calor es el no lograr extraer la totalidad de la esencia del producto a macerar ya que siempre quema o destruye por causa del calor alguna o pequeña parte de estas, es decir, muchas veces se trata de compuestos termolábiles presentes en la planta. En variadas ocasiones, para acortar más los tiempos de extracción y que las sustancias pasen el menor tiempo posible a elevadas temperaturas, se realizan extracciones con corriente de vapor.<sup>26</sup>

Extracción líquido – líquido: Consiste en extraer los analitos de una muestra líquida mediante un disolvente inmisible en ella, como puede ser una fase acuosa con un disolvente orgánico no miscible. El pH es fundamental para conseguir buen rendimiento.

#### c) Extracción por centrifugación

En este proceso los extractos y aceites obtenidos tienen características aromáticas superiores a las que se consiguen en la extracción por arrastre de vapor. Al no ser un proceso térmico, no existen pérdida de sus propiedades or tanto son más estables, por los antioxidantes naturales presentes. Sin embargo, la fricción interna de la materia prima puede provocar un aumento de temperatura no controlable que puede implicar una degradación térmica y oscurecimiento del extracto. Este cambio requiere posterior utilización de equipos de purificación adicionales con altos costes operativos que incrementan el precio final del producto.<sup>29</sup>

#### d) Extracción en fase sólida

En este tipo de extracción se emplean columnas o cartuchos con la capacidad de retener el analito, que se extrae posteriormente con un pequeño volumen de disolvente.

### 1.5.3 Tamizaje fotoquímico

El tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico se considera una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, la cual permite determinar

cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés.<sup>30</sup>

El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de los metabolitos de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacción de color y precipitación. Se debe de permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen en sí, una orientación y debe de interpretarse conjuntamente con los resultados del screening farmacológico.<sup>30</sup>

Cuando en una planta se determina la presencia de alcaloides en el tamizaje fitoquímico, es bastante probable que la acción farmacológica sobre el sistema nervioso se deba a la fracción alcaloidal. De la misma manera, el hecho de evidenciarse la presencia de flavonoides otorga una acción anti-inflamatoria, puede dar lugar a procesos de aislamiento y sometimiento a pruebas más específicas de estos compuestos. Efectos catárticos pueden ser asociados a las antraquinonas. Y la presencia de glicósidos cianogénicos durante el desarrollo de la marcha fitoquímica puede dar lugar a descartar la planta para uso terapéutico debido a su alta toxicidad.<sup>30</sup>

## **1.6 Evaluación antimicrobiana de extractos**

### **1.6.1 Actividad y resistencia antimicrobiana**

Los antimicrobianos son drogas usadas para el tratamiento y prevención de infecciones bacterianas. Actualmente, existe una gran preocupación basada en la gradual disminución del número de antimicrobianos que son eficientes frente a una infección debido a la creciente aparición de microorganismos resistentes a los mismos. Por tal razón, se ha incrementado el interés en la búsqueda activa de nuevos compuestos de origen vegetal que presenten actividad antimicrobiana.<sup>31</sup>

La resistencia a los antimicrobianos puede ser codificada genéticamente por el microorganismo, si bien se produce en el cromosoma o en plásmidos, en los llamados plásmidos de resistencia (factores R), en gran parte de las bacterias

resistentes a antimicrobianos aisladas de pacientes presentan genes de resistencia en plásmidos R, en la mayoría de los casos, la resistencia a antibióticos mediada por genes cromosómicos aparece como una modificación de células diana de acción del antibiótico,

Por el contrario la mayoría de casos la resistencia plasmídica R se debe a la presencia en el plásmido R de genes responsables de codificar nuevas enzimas las cuales inactivan el fármaco o de genes que codifican enzimas que impiden la incorporación del antimicrobiano o lo trasladan fuera de la célula.<sup>32</sup>

Para el tratamiento de una infección particular los fármacos prescritos han ido aumentando progresivamente por consecuencia del aumento de la resistencia del microorganismo causante de la enfermedad, es decir, los antimicrobianos se usan en la práctica clínica con mucha mayor frecuencia, y que además esto se acompaña del incumplimiento del tratamiento por parte del paciente. Otros usos indiscriminados de los antimicrobianos también contribuyen a la emergencia de cepas resistentes.<sup>31</sup>

### **1.6.2 Mecanismos de resistencia bacteriana**

Las maneras por las cuales ingresan las moléculas del fármaco en una célula son el transferirse por difusión a través de porinas, la difusión a través de la bicapa y auto absorción. Los canales de porina se encuentran en la membrana externa de bacterias Gram-negativas. La disminución en el número de canales de porina, conduce a una disminución de la entrada de antibióticos  $\beta$ -lactámicos y flouoroquinolonas en la célula, como consecuencia, la resistencia a estas clases de antibióticos.<sup>32</sup>

#### **Bombas de eflujo**

Las proteínas de membrana que son encargadas de exportar antibióticos de la célula y mantienen bajas las concentraciones intracelulares se llaman bombas de eflujo. A la misma velocidad, con que estos antimicrobianos ingresan a la célula, los mecanismos de expulsión actúan bombeándolos de nuevo, antes de

que alcancen su objetivo. Estas bombas están presentes en la membrana citoplásmica, mientras que las porinas que están en la membrana externa.<sup>33</sup>

#### Modificación de la molécula diana

Existen variaciones naturales o los cambios adquiridos en los sitios diana de los antimicrobianos que impiden la unión a fármacos son un mecanismo común de resistencia. Los cambios en el sitio objetivo por lo general son el resultado de la mutación espontánea de un gen bacteriano en el cromosoma. El hecho mismo de la interacción antibiótica con la molécula diana es a menudo bastante específica y bien diferenciada, una mínima alteración de la molécula diana puede tener un efecto importante sobre la unión a antibióticos.<sup>33</sup>

### 1.6.3 Bacterias de significancia clínica

#### ***Proteus spp.***

Es un género de bacterias gramnegativas, las cuales están inmersas patógenos responsables de muchas infecciones del tracto urinario en su mayoría. Las especies de *Proteus* por lo general no fermentan lactosa por razón de no tener una  $\beta$ -galactosidasa, pero algunas han evidenciado que son capaces de hacerlo en el test TSI (Triple Sugar Iron en inglés, o "Triple Azúcar de Hierro"). Son oxidasa-negativas y ureasa-positivas. Algunas especies son móviles. Tienden a ser organismos pleomórficos, no esporulados ni capsulados y son productoras de fenilalanina desaminasa.<sup>34</sup>

Son residentes habituales del tracto intestinal del hombre y algunos animales. También se encuentran en el suelo degradando materia orgánica; tres especies causan infecciones oportunistas en el hombre: *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, y *P. penneri*. Causan infecciones urinarias, enteritis, abscesos hepáticos, meningitis, otitis media y neumonía con o sin empiema, entre otros. Todas las especies de *Proteus* son resistentes a la ampicilina. *P. mirabilis* es sensible a la penicilina.<sup>35</sup>

#### **1.6.4 Ensayos de susceptibilidad microbiana**

Dichos ensayos de susceptibilidad están diseñados para apoyar la quimioterapia antimicrobiana de tratamiento en procesos infecciosos por bacterias cuando se torna imposible conocer la identidad del microorganismo y no es suficiente para predecir en forma confiable su susceptibilidad. Estos ensayos por lo general son indicados cuando se presume que el organismo causante pertenece a una especie capaz de mostrar resistencia a los agentes antimicrobianos más comúnmente usados.<sup>36</sup>

Existen mecanismos de resistencia incluyen la producción de enzimas inactivantes de la droga, que alteran el objetivo, o alteran la acción. Y e pueden encontrar aún microorganismos que tienen susceptibilidad predecible a agentes antimicrobianos y con terapias empíricas ampliamente reconocidas. Las pruebas o ensayos de susceptibilidad rara son vez necesarias cuando la infección es producida por un organismo con una reconocida susceptibilidad a una droga. Las pruebas de susceptibilidad son también importantes en estudios epidemiológicos de resistencia y en estudios de nuevos agentes antimicrobianos.<sup>37</sup>

#### **1.6.5 Limitaciones del método de difusión en disco**

En el método de difusión descrito cabe resaltar que ha sido estandarizado para patógenos de rápido desarrollo entre los que contemplamos a *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas spp.*, *S. maltophilia*, *Acinetobacter spp.*, y ha sido modificado para probar microorganismos nutricionalmente exigentes *Haemophilus spp.*, *N. gonorrhoeae*, *Streptococcus spp.* Para organismos como *Campylobacter spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Bacillus spp.*, no se han desarrollado estándares reproducibles para la interpretación de resultados.<sup>38</sup>

## CAPITULO II: MARCO METODOLÓGICO

Se realizó un trabajo de investigación de tipo etnofarmacológico debido a la integración de diferentes especialidades en el presente trabajo ya que se identificó la etnobotánica, la química extractiva y estructural y finalmente la farmacología experimental y clínica que corroboró la actividad antimicrobiana *in vitro* de las plantas medicinales usadas por la población para las diferentes afecciones.

El trabajo de investigación contempló cuatro etapas: En la primera etapa se realizó un estudio etnobotánico para identificar y seleccionar la planta con mayor nivel de uso significativo como antimicrobiano, la segunda etapa se obtuvo el extracto hidroetanólico que contiene los metabolitos activos para evaluarlo, en una tercera etapa se realizó la caracterización fitoquímica del extracto y finalmente la cuarta etapa, evaluó el efecto antimicrobiano del extracto hidroetanólico.

### 2.1 Etapa I: Estudio Etnobotánico

En cumplimiento de esta etapa se la realizó en la parroquia Velasco, en el sector San Francisco identificada como zona urbana del Cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo, Ecuador. Se ejecutó en el período comprendido entre los meses de Diciembre de 2017 y Febrero de 2018. El estudio estuvo direccionado en la identificación de las plantas medicinales más utilizadas por la población de la zona mencionada y uso medicinal; calculando el nivel de uso significativo de las especies registradas cuya referencia es la acción antimicrobiana.

#### 2.1.1 Descripción del Área de Estudio

La provincia de Chimborazo (Figura N.2), está ubicada en la Región Sierra, limita al norte con la provincia de Tungurahua, los cantones Guano y Penipe; al Oeste con la provincia de Morona Santiago y el cantón Chambo; al Sur con los cantones Guamote y Colta; y al Este con la provincia de Bolívar. Su superficie oscila entre los 6.500 km<sup>2</sup> y posee una población total de 5 09.352 habitantes, constituyéndose en la novena provincia más poblada del Ecuador.

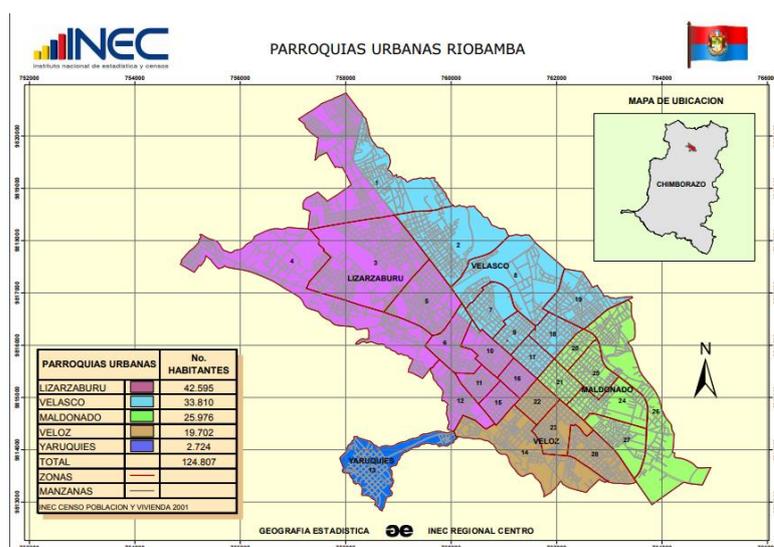
**Figura N. 2: Provincia de Chimborazo**



Fuente: Dirección de Planificación – GPP

La capital de la provincia es la ciudad de Riobamba (Figura N.3), que se encuentra ubicada en el centro-norte de la misma, a una altitud de 2.750 msnm y una superficie de 2.900 hectáreas de área urbana. La parroquia Velasco, se encuentra el sur este de la ciudad de Riobamba, se estima que un 54,34% de población es femenina y un 46,75% de población masculina.

**Figura N. 3 Parroquias urbanas Riobamba**



Fuente: Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC) Ecuador

### 2.1.2 Procedimiento

- En el sector de estudio se captó los informadores necesarios con el fin de mantener conversaciones con los habitantes del sector de San Francisco e informar de los objetivos del estudio.
- Se realizó el cuestionario etnofarmacológico a 89 personas (Anexo N.1) enfocándose en adultos mayores, curanderos, docentes universitarios, propietarios de centros naturistas, comerciantes de plantas medicinales en los mercados y agricultores ya que al poseer el conocimiento sobre el uso de las plantas medicinales contribuyeron con el estudio.
- Posteriormente se procedió a tabular el cuestionario aplicado con la información etnobotánica proporcionada y siendo recopilada y organizada en una base de datos empleando la hoja de cálculo de Microsoft Office Excel 2013.

### 2.1.3 Análisis e interpretación de datos

- Para el análisis correspondiente se empleó la siguiente fórmula para determinar el conocimiento relativo de la especie por varios informantes (RVU):

$$RVU = \frac{\sum \frac{VUis}{IVUs}}{Nsp}$$

Dónde: VUis= valor de uso de la especie por cada informante

IVUs= es el índice de valor de uso de la especie,

Ns: es el número de informantes para cada especie.

El IVU hace referencia a la importancia de uso que tiene una especie determinada de acuerdo a su frecuencia de reporte en el muestreo, con respecto a los demás recursos reportados en toda la zona.

- Para el nivel de uso significativo para cada especie para verificar su aceptación cultural se usó la siguiente ecuación:

$$UST = \frac{Uso\ especie\ (s)}{Nis} \times 100;$$

Dónde: Uso especie (s): número de citas para cada especie

Nis: número de informantes encuestados.

Esta propuesta de análisis metodológica expuesta por Germosén – Robineau, se basa en que aquellos usos medicinales que son citados con una frecuencia superior o igual al 20% por los informantes, pueden considerarse significativos desde un punto de vista cultural en cuanto a su relevancia de aceptación.

## **2.2 Etapa II: Obtención del extracto hidroetanólico de Mejorana**

Identificada la especie con un nivel de uso superior significativo al 20% en la etapa anterior y su parte a utilizar se procedió a la obtención de extracto hidroetanólico luego de someterse a algunos procesos que conlleva el método de Maceración a partir con hojas frescas de *Origanum majorana*. Se midió el volumen obtenido y se calculó su concentración mediante la siguiente relación; gramos de sustancias extraídas por mL de extracto.

### **2.2.1 Acondicionamiento**

En éste proceso se lleva a cabo el lavado y desinfección de la planta para lo cual:

- Se seleccionaron hojas frescas evitando otras partes aéreas de la planta y en buen estado.
- Se efectuó el lavado de las hojas seleccionadas, por inmersión con agua potable y una solución desinfectante de hipoclorito de sodio al cuya concentración fue del 2% realizando esta operación por reiteradas ocasiones durante 5 minutos.
- Se secó a temperatura ambiente dejándolo reposar en papel de empaque para eliminar el exceso de agua.

### 2.2.2 Maceración de la muestra

En el proceso de maceración hidroetanólica se logró de la siguiente manera:

- Se pesó 100g de las hojas frescas previamente acondicionadas y trituró en un mortero hasta reducir su tamaño y facilitar que los solventes penetren la estructura celular.
- En un frasco de vidrio ámbar se colocó hojas previamente trituradas con una relación 7:3 de agua y etanol al 96%.
- Se dejó reposar la preparación durante 7 días en un lugar oscuro y agitando vigorosamente cada día el frasco para que el solvente penetre la estructura celular y disuelva las sustancias.
- Al extracto se le midió el volumen obtenido y se le calculó su concentración, esto es, gramos de sustancias extraídas por mL de extracto.

### 2.2.3 Filtración

- Transcurridos los 7 días del proceso de maceración se decantó el líquido filtrando, para lo cual se procedió a utilizar una bomba de vacío y un embudo Buchner.
- Se concentró extracto hidroetanólico de *Origanum majorana* mediante un equipo de rotavapor YAMATO RE801A-W a 45°C.

El extracto hidroetanólico de *Origanun majorana* debe someterse a un control de calidad en el cual se realizó las siguientes determinaciones físico – químicas:

### 2.2.4 Determinación de requisitos organolépticos

- Se procedió a colocar una alícuota de extracto en un tubo de ensayo y se introduciendo una tira de papel secante y se olfatea al secar correspondiendo al olor característico de la planta.
- Se colocó las tres cuartas partes del tubo de ensayo con el extracto hidroetanólico y se observó color, transparencia, presencia de partículas y separación de capas.

### 2.2.5 Determinación de la densidad relativa

- Se usó un picnómetro vacío y seco a 2°C el cual se pesó y luego se llenó con extracto a la temperatura de 25°C ( $\pm 1$  °C) durante 15 minutos.
- Se pesó el picnómetro con la muestra repitiendo la operación con agua destilada a 25°C.
- Posteriormente se calculó la densidad relativa usando la siguiente fórmula:

$$D_{25} = \frac{M1 - M}{M2 - M}$$

Donde:

M1: peso del picnómetro con la muestra (g)

M2: peso del picnómetro con el agua (g)

M: peso del picnómetro vacío (g).

### 2.2.6 Determinación de pH

- En primera instancia se calibró el pHmetro HANNA AB-150 con soluciones buffer pH 4, 7.
- Se calcula teóricamente mediante la ecuación:

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

$a [\text{H}^+]$  = actividad de los iones hidrógeno.

- Esta lectura está en función de la diferencia de potencial establecida entre un electrodo indicador y un electrodo de referencia usando como solución de ajuste de la escala del medidor de pH, una solución reguladora del mismo.
- Calibrado el pHmetro se determinó el valor del pH del extracto hidroetanólico.

## 2.3. Etapa III: Caracterización fitoquímica del extracto hidroetanólico de *Origanum majorana*

Luego de un control físico químico del extracto hidroetanólico obtenido a partir de hojas de *Origanum majorana* se procedió a la caracterización fitoquímica; el mismo que consistió en efectuar ensayos preliminares sencillos y rápidos con

el propósito de revelar cualitativamente la presencia de determinados metabolitos, los cuales se identificaron mediante la formación de precipitados, coloraciones, espuma, separación de fases, etc. cuyos ensayos se describen a continuación:

### **2.3.1 Ensayo de Dragendorff para identificar alcaloides**

- Se colocó una alícuota de extracto en un tubo de ensayo y se añadió 1 gota de HCl concentrado; se calentó suavemente y se dejó enfriar hasta la acidez.
- En seguida a la solución ácida se añadió el reactivo de Dragendorff y se observa la reacción; si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++), precipitado coposo (+++).

### **2.3.2 Ensayo de Shinoda para identificar flavonoides**

- En un tubo de ensayo se colocó una alícuota del extracto el cual se diluyó con 1 mL de HCl concentrado y con una pequeña cantidad de limaduras de Mg.
- Posterior a la reacción se esperó 5 minutos y se añadió 1 mL de alcohol amílico, se mezclaron las fases y se dejó reposar hasta que se separen las fases.
- Se observó la reacción de coloración: cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo intenso indican la presencia de flavonoides.

### **2.3.3 Ensayo de Espuma para identificar saponinas**

- En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto hidroetanólico y se agitó la muestra vigorosamente durante 5-10 minutos.
- Posteriormente se observa la formación o no de espuma, considerándose positivo si aparece espuma en la superficie del líquido.

#### **2.3.4 Ensayo de Borntrager para identificar quinonas**

- Se colocó una alícuota del extracto en un tubo de ensayo y se adicionó tres gotas de hidróxido de sodio al 5%.
- Se agitó mezclando las fases y se dejó en reposo hasta su ulterior separación.
- Se observa la reacción de coloración sea rosado o rojo, el ensayo. Coloración rosada (++) y coloración roja (+++).

#### **2.3.5 Ensayo de cloruro férrico para identificar fenoles**

- En un tubo de ensayo se colocó 1 mL del extracto y se adicionó de 1-2 gotas de  $\text{FeCl}_3$ . La presencia de compuestos fenólicos se observará mediante una reacción de coloración de rojo – vino, verde intenso o azul.

#### **2.3.6 Ensayo de Liberman Buchard para identificar triterpenos y/o esteroides**

- En un tubo de ensayo se colocó una alícuota de extracto y luego se adicionó el reactivo de Liberman Buchard.
- Luego se observa la presencia o no de reacción de coloración: rosado azul muy rápido, verde intenso visible aunque rápido y verde oscuro negro final de la reacción.

#### **2.4 Etapa IV: Evaluación de actividad antimicrobiana del extracto hidroetanólico de *Origanum majorana* en cepas de *Proteus spp***

Una vez identificados los componentes bioactivos presentes en el extracto de *Origanum majorana* se evaluó la actividad microbiológica del mismo sobre cepas bacterianas de *Proteus spp* utilizando el siguiente método:

### 2.4.1 Método de difusión en disco (Kirby-Bauer)

Se empleó este método para determinar la sensibilidad del agente microbiano *Proteus spp.* frente a un antimicrobiano presente en el extracto de *Origanum majorana*. Este método comprende lo que se denomina un antibiograma o prueba de susceptibilidad bacteriana frente a drogas específicas cuyo procedimiento a seguir fue:

- Se procedió a preparar los medios de cultivo con agar Mueller Hinton para lo cual se pesó 7.6 g del medio con la finalidad de hacer varias repeticiones.
- También se prepararon medios con agar cerebro corazón para reactivar las cepas de *Proteus spp.*
- Se reactivaron las cepas de *Proteus spp* en caldo cerebro corazón por 24 horas a 37°C para lo cual se procedió a sembrar la cepa en el medio mencionado a una concentración de 0.5 en la escala de McFarland.
- Se esterilizaron los materiales a usar para el proceso de siembra.
- Una vez que se prepararon los medios y se esterilizaron los materiales a usar se procedió a plaquear los medios.
- En la cámara de flujo laminar y con la ayuda de un hisopo estéril se procedió a sembrar la cepa de *Proteus spp* sobre la superficie de agar Müller-Hinton: medio de cultivo microbiológico utilizado comúnmente para realizar la prueba de susceptibilidad a antibióticos.
- Una vez que el medio estuvo seco se procedió a colocar con una pinza los discos esterilizados del estándar, blanco y discos en los cuales se va a impregnar extracto. Luego con una micropipeta se impregnaron 20 µl del extracto de *Origanun majorana* a diferentes concentraciones (25, 50, 75 y 100%) y se incubó a 37 °C por 24 horas. Se efectuó tres repeticiones por cada concentración.
- Finalmente se observó la presencia de halo y se midieron los halos de inhibición incluyendo el diámetro de los discos.

## **CAPITULO III: DISCUSION Y RESULTADOS**

### **3.1 Etapa I: Estudio Etnobotánico**

En el sector estudiado se analizaron 89 encuestas de las cuales se obtuvo un total de 28 registros de especies de plantas medicinales que a su vez pudieron ser identificadas y que están distribuidas en 18 familias. (Tabla 1).

**Tabla 1.** Plantas medicinales utilizadas por los habitantes del sector San Francisco, Riobamba, Ecuador

	NOMBRE CIENTÍFICO	FAMILIA	PLANTA	USO MEDICINAL	VÍA DE ADMINISTRACIÓN	MÉTODO DE PREPARACIÓN	PARTE UTILIZADA
1	<i>Lathyrus odoratus</i>	Fabaceae	Alverjilla	OM	Ue	In, Of	H,FI
2	<i>Peumus boldus</i>	Monimiaceae	Boldo	Gs, H	Be	In	H,FI,T
3	<i>Cuscuta corymbosa</i>	Convolvulaceae	Cabello de Angel	H, Ru	Be	In	PI
4	<i>Aloysia citrodora</i>	Verbenaceae	Cedrón	Gs	Be	In	H,T
5	<i>Baccharis salicifolia</i> L.	Asteraceae	Chilca	Gs, N	Be	In	H, FI
6	<i>Equisetum arvense</i>	Equisetáceas	Cola de caballo	Ru,OM	Be	In,Cc	PI
7	<i>Taraxacum officinale</i>	Asteraceae	Diente de león	C,H	Be	In	H
8	<i>Bryophyllum</i> sp. Salisb	Crassulaceae	Dulcamara	I	Be	Cc	H
9	<i>Eucalyptus globulus</i>	Myrtaceae	Eucalipto	Rs,OM	Ue	In,Of	H
10	<i>Mentha sativa</i> L.	Lamiaceae	Hierba buena	Gs	Be	In	H
11	<i>Cymbopogon citratus</i>	Poaceae	Hierba luisa	N	Be	In	PI
12	<i>Citrus x limon</i>	Rutaceas	Hoja de Limon	S,C	Be	In	H
13	<i>Linum usitatissimum</i>	Linaceae	Linaza	Gs,OM	Be, Co, Ue	Cc	Cr
14	<i>Matricaria chamomilla</i>	Asteraceae	Manzanilla	Gs,OM,Rs	Be, Ue, Ba	In	H,FI
15	<i>Artemisa vulgaris</i>	Asteraceae	Marco	Gs, H	Be	In	H
16	<i>Buddleja globosa</i>	Buddlejaceae	Matico	P,H,Gs	Be,Ue	In,Of	H
17	<i>Origanum majorana</i>	Lamiaceae	Mejorana	Gs,Ru	Be	In	H
18	<i>Mentha rotundifolia</i> L.	Lamiaceae	Menta	Gs, Rs	Be	In	H
19	<i>Cyperus esculentus</i>	Ciperaceas	Orchata	Gs	Be,Co	In,Cc	H
20	<i>Origanum vulgare</i>	Lamiaceae	Orégano	Gs	Be	In	H

21	Urtica dioica L	Urticaceae	Ortiga	OM, S	Be,Ue	In,Of	H,T
22	Rosmarinus officinalis L	Lamiaceae	Romero	Gs	Co	Cc	H
23	Ruta graveolens L	Rutaceae	Ruda	OM,Gs	Be	In	H,FI
24	Aloe vera L	Liliaceae	Sábila	P,Gs	Be,Ue	Pc	PI
25	Taraxacum officinale	Asteraceae	Taraxaco	H, Ru	Be	In	PI
26	Camellia sinensis	Teaceae	Te verde	N	Be	In	PI
27	Tilia platyphyllos	Tiliáceas	Tilo	Rs,N	Be	In	H
28	Melissa officinalis L	Lamiaceae	Toronjil	Rs,Gs	Be	In	H,FI
	<b>Indicaciones o uso medicinal:</b>	C (cardiovascular), ENT (sistema sensorial), Gs (gastrointestinal), H (hepático), I (Inmunológico), N (neurológico), Ot(otros), OM (osteomuscular), P (piel), Rs (respiratorio), Ru (renal/urológico), S (sanguíneo).					
	<b>Método de preparación:</b>	In (Infusión), Cc (Cocimiento), Pc (Planta cruda), Of (Otra forma)					
	<b>Parte utilizada:</b>	Cr (cristal), Ct (corteza), FI (Flor), Fr (fruto), H (hojas), PI (planta completa), R (Raíz), T (tallo)					
	<b>Vía de administración:</b>	B (Baños), Be (bebidas), Co (comida), Ue (uso externo)					

Fuente: Encuestas etnofarmacológicas

Elaborado por: autor

Con el objeto de apreciar un análisis cuantitativo de datos conforme al índice de conocimiento relativo de las especies por los informantes (RVU) y el nivel de uso significativo (UST); parámetros significativos para identificar la importancia de cada una de las 28 especies de plantas medicinales se evidencia la Tabla 2.

**Tabla 2.** Análisis cuantitativo de las diferentes especies de Plantas medicinales utilizadas

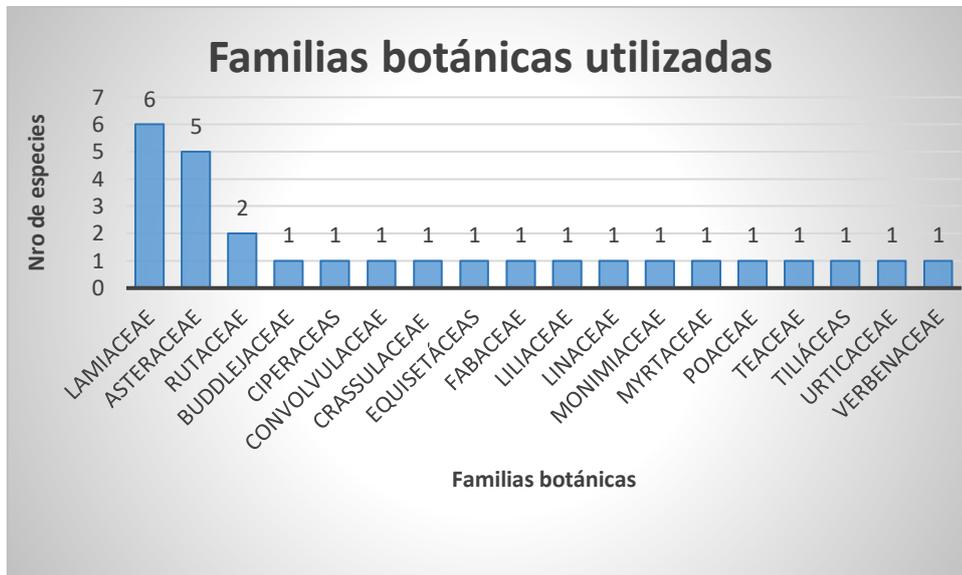
	<b>Planta</b>	<b>Veces citadas</b>	<b>RVU</b>	<b>UST (%)</b>
1	Manzanilla	81	2,89	91%
2	Cedrón	53	1,89	60%
3	Hierba luisa	35	1,25	39%
4	Diente de león	34	1,21	38%
5	Matico	29	1,04	33%
6	Marco	21	0,75	24%
7	Menta	21	0,75	24%
8	Orégano	21	0,75	24%
9	Eucalipto	20	0,71	22%
10	Ortiga	20	0,71	22%
11	Mejorana	19	0,68	21%
12	Sábila	18	0,64	20%

Fuente: Encuestas etnofarmacológicas

Elaborado por: autor

Se observa que las especies más representativas y de uso más frecuente para los habitantes del sector de San Francisco de la ciudad de Riobamba pertenecen los siguientes índices en donde la manzanilla obtuvo un RVU=2,89 y UST=91%; cedrón con RVU=1,89 y UST=60%; hierba luisa con RVU=1,25 y UST=39%; diente de león su RVU= 1,21 y UST=38%; incluida la Mejorana que obtuvo un RVU=0,68 y UST=21% por lo cual fue considerada al tener un valor de UST superior a 20% representado en la Tabla 2.

**Gráfico 1.** Diversidad de familias de plantas medicinales utilizadas por los habitantes del sector San Francisco, Riobamba, Ecuador

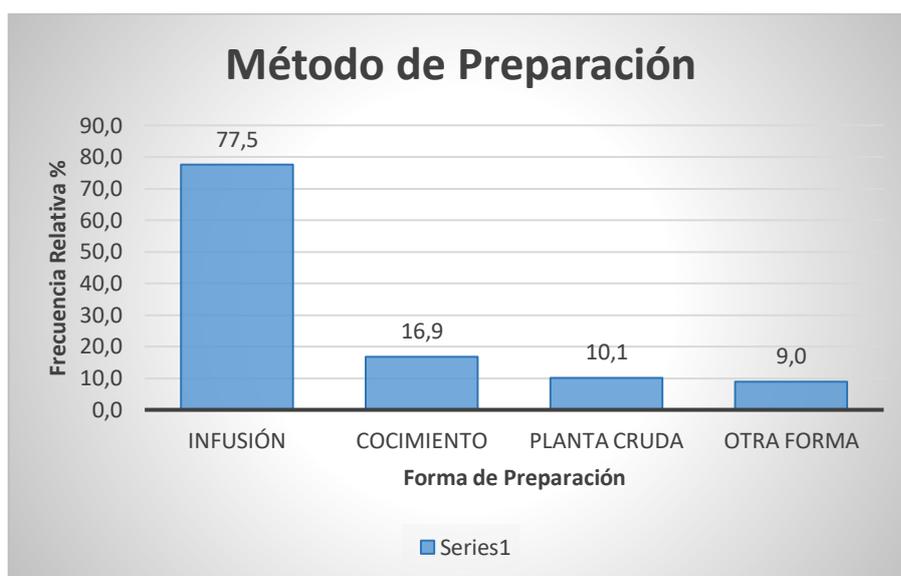


Fuente: Encuestas etnofarmacológicas

Elaborado por: autor

Se evidencia que las familias con el mayor número de especies medicinales en todo el estudio representadas en el Gráfico 1; fueron *Lamiaceae* 6 especies que representan el 21,4%, seguido de *Asteraceae* con 5 especies representando el 17,9% y *Rutaceae* que contiene 2 especies conteniendo el 7,1%; dejando así a las 15 familias restantes con 1 especie cada una dando un 3,6%.

**Gráfico 2.** Forma de preparación para el uso de las plantas medicinales



Fuente: Encuestas etnofarmacológicas

Elaborado por: autor

En el Gráfico 2. Se representa las formas de preparación por los habitantes para el uso de las plantas medicinales en el sector de San Francisco son variadas. La mayor parte de las preparaciones se las realiza en forma de infusión 77,5%, seguido del cocimiento con un porcentaje de 16,9%, planta cruda en un 10,1% y en otras formas como emplasto, jugo con un porcentaje de 9,0%.

**Gráfico 3.** Forma de administración empleada para el uso de las plantas medicinales



Fuente: Encuestas etnofarmacológicas

La forma de administración más empleada por los habitantes del sector de San Francisco de la ciudad de Riobamba para el consumo de estas plantas medicinales fue como bebida con un 64,0%, seguida del uso externo con un 18%, la comida con 11% y el baño con 7% expresados en el Gráfico 3.

### 3.2 Etapa II: Obtención del extracto hidroetanólico de Mejorana

Posterior al proceso de acondicionamiento, maceración hidroetanólica, filtración y concentración del extracto hidroetanólico se deben cumplir parámetros de control de calidad como lo son organolépticos y ensayos físico químicos.

#### 3.2.1 Determinación de parámetros organolépticos

La determinación de las propiedades físicas del extracto hidroetanólico de *Origanum majorana* se realizó mediante la percepción propia de los sentidos como se puede apreciar en la siguiente tabla:

**Tabla 3.** Determinación organoléptica del extracto hidroetanólico de hojas de *Origanum majorana*

PARÁMETRO	CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS	MÉTODO
Aspecto	Siruposo	Visual
Olor	Característico de la planta	Olfato
Color	Verde	Visual
Sabor	Astringente	Gusto

La determinación organoléptica de los extracto de hojas de *Origanum majorana* presentó un aspecto siruposo por ser un líquido espeso similar a un jarabe de color verde oscuro y un olor característico a la planta con un leve olor del solvente utilizado en la maceración; el sabor de es astringente debido al empleo de

alcohol absoluto como solvente siendo todos los datos expresados en la Tabla 3.

**Tabla 4.** Determinación físico química del extracto hidroetanólico de hojas de *Origanum majorana*

PARÁMETRO	VALOR	MÉTODO
PH	5,97	Potenciométrico
densidad relativa	0,99 g/mL	Gravimétrico

En la Tabla 4 se muestra que el pH del extracto hidroetanólico de las hojas de *Origanum majorana* fue de 5,97 lo que indica que las hojas contienen compuestos ricos en iones H<sup>+</sup>, como los de naturaleza fenólica. La densidad relativa (respecto a la del agua) del extracto es de 0,99 g/mL indicativo que los componentes del extracto tienden a una naturaleza apolar, pudiendo ser estos terpenos.

### 3.3 Etapa III: Caracterización fitoquímica del extracto hidroetanólico de *Origanum majorana*

**Tabla 5.** Tamizaje fitoquímico del extracto hidroetanólico de las hojas de *Origanum majorana*

ENSAYO	METABOLITO A DETERMINAR	RESULTADO
Dragendorff	Alcaloides	-
Shinoda	Flavonoides	++
Fehling	Azúcares reductores	+
Baljet	Lactonas y cumarinas	-
Espuma	Saponinas	++
Borntrager	Quinonas	-
FeCl <sub>3</sub>	Fenólicos y/o Taninos	+++

Liberman Buchard	Triterpenos y/o esteroides	++
+++ : Alta evidencia    ++ : Evidencia    + : Baja evidencia    - : Negativo		

En la tabla 5 luego de concluida la caracterización fitoquímica del extracto hidroetanólico de hojas de *Origanum majorana* se evidenció la presencia de metabolitos secundarios como flavonoides, azúcares, saponinas, compuestos fenólicos y taninos y también la presencia de triterpenos y esteroides confirmando así lo que Prerna y Neeru en el 2015 en su artículo titulado *Origanum majorana* L. – Phyto-pharmacological review cuando realizó el análisis fitoquímico del extracto y el aceite esencial de *Origanum majorana*.

### 3.4 Etapa IV: Evaluación de actividad antimicrobiana del extracto hidroetanólico de *Origanum majorana* en cepas de *Proteus spp*

**Tabla 6.** Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de *Origanum majorana* en cepas de *Proteus spp* a concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100%.

	<b>HALO DE INHIBICION Promedio (mm)</b>
Extracto 25%	6,3
Extracto 50%	8,7
Extracto 75%	9,3
Extracto 100%	10,3
DMSC	0
Agua	0

En la Tabla 6 se evidenció los halos de inhibición de crecimiento bacteriano con diferentes concentraciones del extracto hidroetanólico de las flores de *Origanum majorana* mediante la técnica de difusión en disco en el cual la mayor actividad presente es el extracto al 100% tomando en cuenta el diámetro de papel

wathman que fue de 6mm por tanto se puede decir que existe una correlación directa entre la concentración del extracto con el diámetro de inhibición.

Obteniendo que el extracto hidroetanólico al 100% obtuvo un diámetro promedio de 10,3 mm seguido del extracto con una concentración del 75% y su diámetro de 9,3; el extracto al 50% presenta un diámetro de inhibición de 8,7%; y su homólogo al 25% hace referencia a un 6,3%.

Existen diferencias significativas en el crecimiento de *Proteus spp* con los tratamientos aplicados a concentraciones del 25%,50%, 75% y 100% donde se demostró que  $p < 0,05$ .

## CONCLUSIONES

1. De las 89 encuestas etnofarmacológicas realizadas se obtuvo 28 especies de plantas medicinales, pertenecientes a 18 familias donde Lamiaceae y Asteraceae fueron las más representativas, las partes de la planta en su mayoría usadas fueron las hojas que se las prepara en forma de infusión. *Origanum majorana* al obtener un %UST superior al 20% fue seleccionada para las siguientes etapas del estudio etnofarmacológico.
2. Se obtuvo el extracto hidroetanólico por maceración de las hojas de *Origanum majorana*. Obteniendo un control óptimo al realizar las pruebas físico químicas como el pH que fue de 5,97 y una densidad relativa de 0,99g/mL y ensayos organolépticos satisfactorios en cuanto a su aspecto de color.
3. La caracterización fitoquímica realizada en el extracto hidroetanólico de *Origanum majorana* resultó positivo para compuestos fenólicos, flavonoides, azúcares, triterpenos y taninos; a quienes se les puede atribuir la actividad antimicrobiana.
4. El extracto hidroetanólico de las hojas de *Origanum majorana* mostró un efecto antimicrobiano *in vitro* en cepas de *Proteus spp.*

## RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios dirigidos a investigar los metabolitos activos presentes en otras partes de la planta de *Origanum majorana* cualificando una mayor concentración de principios que mejoren el rendimiento del extracto hidroetanólico.
2. Cuantificar los metabolitos activos que confieren la actividad antimicrobiana a la planta *Origanum majorana* para lograr una mejor apreciación de su uso e implementarlo en la industria farmacéutica como alternativa terapéutica.

## BIBLIOGRAFÍA

1. OMS. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. *Organ Mund la Salud*. 2013;72. doi:10.1212/01.wnl.0000282763.29778.59
2. NURIA L. Plantas Medicinales. 2013.
3. da Silva Lima SC, Oliveira de Arruda G, Rogério DR, Martins Alvarenga MR. Representaciones y usos de las plantas medicinales en mayores. *Latino Am Enferm*. 2012;20(4).
4. Cerón Martínez CE. Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos. *Botánica Económica los Andes Cent*. 2006:285-293.
5. Mejorana ( *Origanum Majorana* ). :112.
6. Abdel-Massih R, Abdou E, Baydoun E, Daoud Z. Antibacterial Activity of the Extracts Obtained from *Rosmarinus officinalis* , *Origanum majorana* , and *Trigonella foenum-graecum* on Highly Drug-Resistant Gram Negative Bacilli. *J Bot*. 2010;2010:1-8. doi:10.1155/2010/464087
7. El-Akhal F, Lalami AEO, Zoubi YE, Greche H, Guemmouh R. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil of *Origanum majorana* (Lamiaceae) cultivated in Morocco against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Asian Pac J Trop Biomed*. 2014;4(9):746-750. doi:10.12980/APJTB.4.2014APJTB-2014-0392
8. de Oliveira JLTM, de Fátima Melo Diniz M, de Oliveira Lima E, de Souza EL, Trajano VN, Santos BHC. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. essential oils in inhibiting the growth of bacterial strains isolated from the patients with conjunctivitis. *Brazilian Arch Biol Technol*. 2009;52(1):45-50. doi:10.1590/S1516-89132009000100006
9. Prerna P, Vasudeva N. *Origanum majorana* L. -Phyto-pharmacological review. *Indian J Nat Prod Resour*. 2015;6(4):261-267.
10. Acevedo D, Navarro M, Monroy L. Composición química del aceite esencial de hojas de orégano (*Origanum vulgare*). *Inf Tecnol*. 2013;24(4):43-48. doi:10.4067/S0718-07642013000400005
11. Albado Plaus E, Saez Flores G, Grabiél Ataucusi S. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare*

- (orégano). *Rev Médica Hered.* 2001;12(3):16-19.
12. De Sá Del Fiol F, De Mattos Filho TR, Groppo FC. Resistencia bacteriana. *Rev Bras Med.* 2000;57(10):1129-1140. doi:10.4067/S0301-732X2002000200008
  13. Organización Mundial de la Salud OMS. Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. *Oms.* 2001;2:104. doi:10.1590/S1020-49892001001000014
  14. Organización mundial de la salud. Resistencia a los antimicrobianos: una amenaza mundial. *Bol Medicam esenciales.* 2000;28-29:1-36.
  15. Perez I. El uso de las plantas medicinales. *Rev Intercult.* 2008:23-26.
  16. Heisler EV, Budó M de LD, Schimith MD, Badke MR, Ceolin S, Heck RM. Uso de plantas medicinales en el cuidado de la salud: la producción científica de tesis y disertaciones de enfermería brasileña. *Enfermería Glob.* 2015;14(39):390-403.
  17. Fresquet J, Blanquer G, Galindo M, et al. Inventario de las plantas medicinales de uso popular en la ciudad de Valencia. *Med y Ciencias Soc.* 2001;13.
  18. Quiroga R, Meneses L, Bussmann RW. Medicinal ethnobotany in Huacareta (Chuquisaca, Bolivia). *J Ethnobiol Ethnomed.* 2012;8(1):1. doi:10.1186/1746-4269-8-29
  19. Bermúdez A, Oliveira-Miranda MA, Velázquez D. La Investigación Etnobotánica Sobre Plantas Medicinales : Una Revisión De Sus Objetivos Y Enfoques Actuales Alexis Bermúdez , María a . Oliveira-Miranda. *Interciencia.* 2005;30(8):453-459.
  20. Menéndez-Baceta G, Pardo-de Santayana M, Reyes-García V, Tardío J. Etnobotánica de las plantas silvestres comestibles y medicinales en cuatro comarcas de Araba y Bizkaia. *Fac Ciencias, Dep Biol.* 2015;PhD:332.
  21. Yeung AWK, Heinrich M, Atanasov AG. Ethnopharmacology-A bibliometric analysis of a field of research meandering between medicine and food science? *Front Pharmacol.* 2018;9(MAR). doi:10.3389/fphar.2018.00215
  22. Marín C, Cárdenas D, Suárez S. Utilidad del valor de uso en etnobotánica. Estudio en el departamento de Putumayo (Colombia).

- Caldasia*. 2005;27(1):89-101.
23. Canales, Margarita; Hernández, Tzasna; Caballero, Javier; Romo de Vivar, Alfonso; Durán, Ángel y Lira R. Análisis cuantitativo del Conocimineto Tradicional de las Plantas Medicinales en An Rafael Coxcatlán, Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México. *Acta Bot Mex*. 2006;75:21-43.
  24. Rodríguez Ferradá CA, Acosta De La Luz L, Fuentes Fiallo V, Borrego GM. Investigaciones agrícolas en especies de uso frecuente en la medicina tradicional. II. Mejorana *Origanum majorana* L. *Rev Cuba Plantas Med*. 2000;5(3):87-90.
  25. Fruto DEL, Bromelia DE, Su YEDE, et al. 1 , 2 , 3 4 \*. 28(2).
  26. González A. Obtención de aceites esenciales y extractos etanolicos de plantas del amazonas. 2004:87.  
doi:<http://www.bdigital.unal.edu.co/1173/1/angelaandreagonzalezvilla.2004.pdf>
  27. López F, Meza E, Jiménez S, Martínez M, Manjarrez J. Métodos de extracción e identificación de los bioactivos de la *Lavandula officinalis* y su potencial uso como agente sedante Methods of extraction and identification of bioactive agents of. *Rev Mex Ciencias Farm*. 2013;44:60-65.
  28. Guerra Corado EA. Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades físicoquímicas de los extractos fluidos, blandos y secos así como de las tinturas del rizoma y de la fronda de calahuala (*phlebodium pseudoaureum*) a nivel de laboratorio. *Univ San Carlos Guatemala*. 2005;1(1):55-60.
  29. Melissa S.A. Las plantas de extractos. bases para un plan de desarrollo del sector I. 1999:1-73.
  30. Bullaín-Galardis MM, Torres-Rodríguez E, Hermosilla-Espinoza R. Tamizaje fitoquímico de los extractos de *Faramaea occidentalis* ( L . ) A . Rich . ( nabaco ). *Rev Cuba Plantas Med*. 2014;19(1):421-432.
  31. Bauer ME, Shafer WM. On the in vivo significance of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2015;1848(11):3101-3111. doi:10.1016/j.bbamem.2015.02.012
  32. G. Kapoor, S. Saigal AE. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*.

2017;33(3):300-305. doi:10.4103/joacp.JOACP

33. Munita JM, Arias CA, Unit AR, Santiago A De. HHS Public Access. *Mech Antibiot Resist.* 2016;4(2):1-37. doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.Mechanisms
34. Drzewiecka D. Significance and Roles of *Proteus* spp. Bacteria in Natural Environments. *Microb Ecol.* 2016;72(4):741-758. doi:10.1007/s00248-015-0720-6
35. Rambach A. New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp. from *Proteus* spp. and other enteric bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1990;56(1):301-303.
36. Ogata SK, Gales AC, Kawakami E. Antimicrobial susceptibility testing for *Helicobacter pylori* isolates from Brazilian children and adolescents: Comparing agar dilution, e-test, and disk diffusion. *Brazilian J Microbiol.* 2014;45(4):1439-1448. doi:10.1590/S1517-83822014000400039
37. Castillo A. Colombia Médica Original article. 2017;48:183-190.
38. Internacional L, Committee N, Comit S, Los I. Prueba De Susceptibilidad Antimicrobiana Por Difusión En Agar.

## ANEXOS

### Etapa I: Estudio Etnobotánico

#### Anexo N° 1: Encuesta etnofarmacológica

##### CUESTIONARIO ETNOFARMACOLÓGICO

La Universidad Regional Autónoma de los Andes (UNIANDES), se encuentra desarrollando un proceso de investigación sobre el uso tradicional de las plantas medicinales por la población ecuatoriana, es por ello que, teniendo en cuenta la experiencia acumulada por usted al respecto le solicitamos su valiosa cooperación, la cual se materializará llenando el siguiente cuestionario.

1.- ¿Conoce Ud. alguna(s) planta(s) utilizada(s) con fines medicinales?

Si:  No:  ¿Cuáles? \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

3.- ¿La(s) ha utilizado Ud. alguna vez? ¿Para qué? (Indicación) Si:  No:

Nombre de la Planta	Indicación o Uso
a)	a)
b)	b)
c)	c)
d)	d)

4.- ¿Quién se la indicó o le sugirió su uso?

a) Médico  b) Curandero  c) Familiares  d) Vecinos o amigos

5.- ¿En qué forma la ha utilizado? (Modo de uso)

a)  Infusión b)  Cocimiento c)  Planta cruda d)

Otra forma ¿Cuál? \_\_\_\_\_

6.- ¿Cómo la preparó? (Describa el modo de preparación del remedio especificando la parte de la planta empleada: *hojas, tallo, raíces, flores, frutos*.)

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

7.- ¿Dónde encuentra Ud las plantas?

a) \_\_\_ El patio b) \_\_\_ Fuera de la casa c) \_\_\_ Las compra.

¿Dispone de un ejemplar a su alcance? Si: \_\_\_ No \_\_\_

8.- ¿Durante qué tiempo la utilizó? (Duración del tratamiento)

a) \_\_\_ Un día b) \_\_\_ Menos de una semana c) \_\_\_ Más de una semana

d) \_\_\_ Un mes e) \_\_\_ Varios meses f) \_\_\_ Un año g) \_\_\_ Más de un año

9.- ¿Qué resultados obtuvo con su empleo?

a) \_\_\_ Mejoró b) \_\_\_ No mejoró c) \_\_\_ Empeoró

10.- ¿La ha consumido sola o conjuntamente con otras sustancias? En el caso de que la haya consumido con otras sustancias responda:

Con medicamentos ¿cuáles? \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_,

\_\_\_\_\_

Con otras plantas medicinales ¿cuáles? \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_,

\_\_\_\_\_

11.- ¿Conoce Ud si esa planta se ha estudiado científicamente? Si: \_\_\_ No: \_\_\_

¿Por qué vía le llegó la información de dicho(s) estudios (s)?

a) \_\_\_ La radio b) \_\_\_ T.V c) \_\_\_ Libros, revista, periódico d) \_\_\_ Internet

12.- ¿Conoce alguna precaución que debe tomarse durante el tratamiento?

(Contraindicaciones) Si: \_\_\_ No: \_\_\_ ¿Cuál (s)? \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_,

\_\_\_\_\_

13.- En qué personas las ha usado:

En niños: \_\_\_

En adultos: \_\_\_

En ancianos: \_\_\_

OBSERVACIONES:

GRACIAS

## Etapa II: Obtención del extracto hidroetanólico de Mejorana

### Anexo Nº 2: Proceso de maceración hidroetanólica



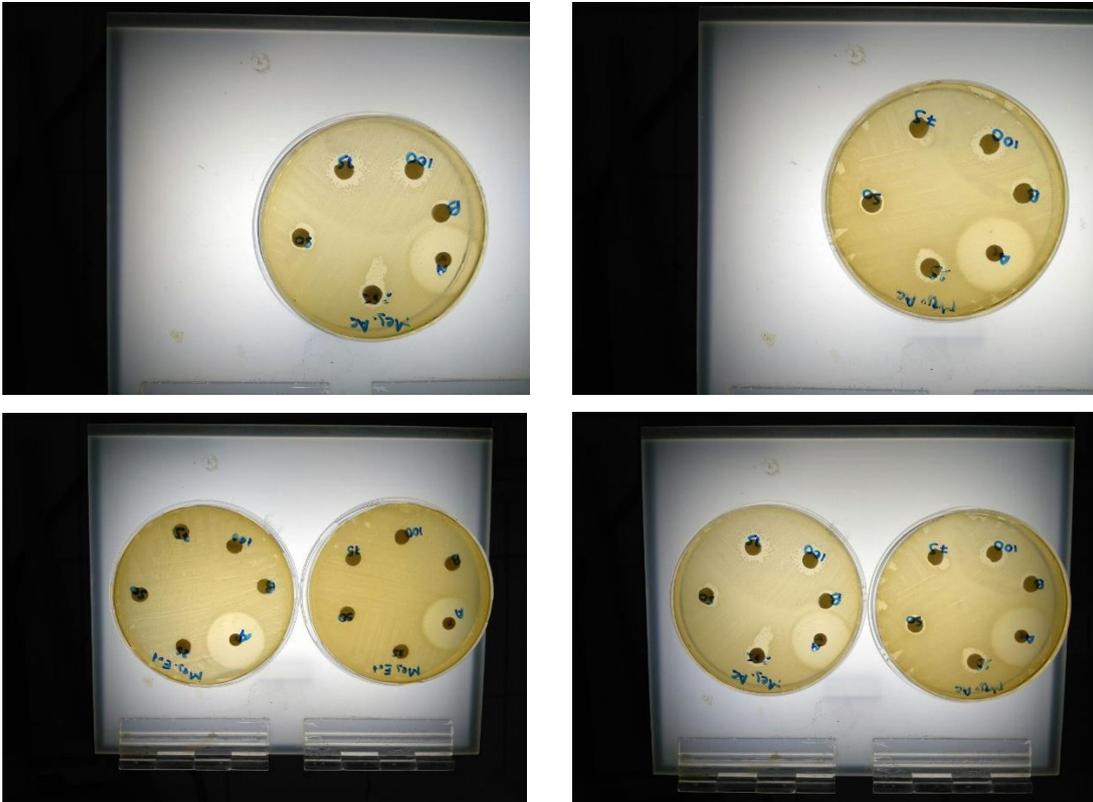
**Etapa III: Caracterización fitoquímica del extracto hidroetanólico de *Origanun majorana***

Anexo 3. Tamizaje fitoquímico detección de metabolitos



**Etapla IV:** Evaluación de actividad antimicrobiana del extracto hidroetanólico de *Origanum majorana* en cepas de *Proteus spp*

Anexo 4. Actividad antimicrobiana difusión en disco



Anexo 5. Análisis estadístico

Tabla 5.1. Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de *Origanum majorana* en cepas de *Proteus spp* a concentraciones de 25%,50%,75% y 100%.

	<b>HALO DE INHIBICION Promedio (mm)</b>
Extracto 25%	6,3
Extracto 50%	8,7
Extracto 75%	9,3
Extracto 100%	10,3
DMSO	0
Agua	0

Elaborado por: autor

## Análisis univariado de varianza

El análisis estadístico de la presente investigación se ejecutó con el programa SPSS para el cual es necesario un análisis univariado, ya que la experimentación tiene como única variable dependiente el microorganismo *Proteus spp.*

Tabla 5.2 Factores Inter- Sujetos

		Etiqueta de valor	N
Tratamiento	1	T1_25%	3
	2	T2_50%	3
	3	T3_75%	3
	4	T4_100%	3
	5	DMSO	3
	6	Agua	3

Elaborado por: autor

En la Tabla 5.2 se analiza los tratamientos T1,T2,T3,T4 correspondientes a diferentes concentraciones de extracto en un 25%,50%,75% y 100% adicionando un tratamiento 5 correspondiente al Dimetilsulfóxido y un tratamiento 6 que corresponde al Agua; cada uno de estos análisis se realizaron por triplicado.

Tabla 5.3 Prueba de Efectos inter- sujetos

Variable dependiente: <i>Proteus_spp</i>					
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	192,944 <sup>a</sup>	5	38,589	86,825	,000
Intersección	382,722	1	382,722	861,125	,000
Tratamiento	192,944	5	38,589	86,825	,000
Error	5,333	12	,444		
Total	581,000	18			
Total corregido	198,278	17			

a. R al cuadrado = ,973 (R al cuadrado ajustada = ,962)

Donde:

**gl:** grados de libertad de la distribución t-Student que sigue el estadístico de contraste.

**Sig** (bilateral): valor que permite decidir la aceptación o no de la hipótesis nula. Es la significación muestral de la hipótesis nula, es decir, el p-valor. Si  $p \geq \alpha$ , se acepta la hipótesis nula. Si  $p \leq \alpha$ , se rechaza la hipótesis nula.

**F:** El estadístico F o F-test (se llama F en honor al estadístico Ronald Fisher) se obtiene al estimar la variación de las medias entre los grupos de la variable independiente y dividirla por la estimación de la variación de las medias dentro de los grupos.

Este modelo univariado determinó que el microorganismo *Proteus spp.* frente al extracto hidroetanólico de hojas de *Origanum majorana* con los distintos tratamientos (T1,T2,T3,T4 DMSO, Agua) intervienen directamente; ya que en la Tabla 5.3 de pruebas de efectos inter sujetos muestran niveles de significancia para los tratamientos aplicados dándonos un valor menor a 0,05.

### Planteamiento de la hipótesis

**Ho:** No existen diferencias significativas en el crecimiento de *Proteus spp* con los tratamientos aplicados  $p \geq 0,05$

**Hi:** Existen diferencias significativas en crecimiento de *Proteus spp* con los tratamientos aplicados  $p < 0,05$

### Decisión:

Estadísticamente se rechaza la hipótesis nula porque el nivel de significancia es menor a 0,05 ( $p=0,05$ ). Se acepta la hipótesis alternativa (Hi) lo que significa que existen diferencias significativas en el crecimiento de *Proteus spp* con los tratamientos de extractos aplicados.

Tabla 5.4 Sub conjuntos homogéneos

<i>Proteus_spp</i>						
	Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
			1	2	3	4
HSD	DMSO	3	,33			
Tukey <sup>a</sup>	Agua	3	,33			

	T1_25%	3		4,67		
	T2_50%	3		6,00	6,00	
	T3_75%	3			7,67	7,67
	T4_100%	3				8,67
	Sig.		1,000	,214	,082	,480

Elaborado por: autor

En el análisis de Tukey se muestra que para las medias de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano de cepas de *Proteus\_spp* (mm) con respecto a los tratamientos aplicados, indica homogeneidad entre las medias obtenidas en los tratamientos DMSO y Agua al ser utilizados como blancos, así como entre las medias de los tratamientos T1, T2, y los tratamientos T2, T3, y finalmente los tratamientos T3, T4.

Tabla 5.5 ANOVA

<i>Proteus_spp</i>					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	192,944	5	38,589	86,82 5	,000
Dentro de grupos	5,333	12	,444		
Total	198,278	17			

Elaborado por: autor

### Planteamiento de la hipótesis

**H0:** No existen diferencias significativas en el crecimiento de *Proteus\_spp* por efecto de los tratamientos aplicados  $p \geq 0,05$

**H1:** Existen diferencias entre el crecimiento de *Proteus\_spp* por efecto de los tratamientos aplicados. Al menos dos muestras son diferentes  $p < 0,05$

## **Decisión**

Estadísticamente se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa ya que su valor de significancia es menor a  $p < 0,05$

Finalmente se realizó un análisis comparativo de medias equivalente a la concentración de 25%, 50%, 75% y 100 % mm determinando que tuvieron mayor actividad antimicrobiana del microorganismo *Proteus spp.*