

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Actividad antimicrobiana de las secreciones cutáneas de
Hyloscirtus lindae e *Hyloscirtus pantostictus* (Anura: Hylidae)
sobre cepas tipo de bacterias Gram positivas, Gram negativas y
levaduras.**

Disertación previa a la obtención del título de Microbióloga

CAROLINA IVONNE VITERI DÁVILA

Quito, 2020

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Microbiología de la Srta. Carolina Ivonne Viteri Dávila ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Mtr. Miryan Rivera I.
Directora de la Disertación
Quito, 2020

Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.

Marie Curie

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia, en especial a mis padres y a mi hermana por su apoyo incondicional a todos mis sueños y creer en mí.

Agradezco a la Mtr. Miryan Rivera Íñiguez por darme la confianza desde que me conoció y los recursos necesarios para realizar esta investigación.

A Migue, Ailín, Bere, Vero y Mateo, parte del Laboratorio de Investigación de Citogenética y Biomoléculas de Anfibios (LICBA), por ayudarme con todas mis dudas y tenerme paciencia en el laboratorio.

A la Mtr. Mercedes Rodríguez directora del proyecto PUCE-QINV0048-IINV529010100, por el apoyo brindado a esta investigación.

A la Dra. Iliana Alcocer y Mtr. Andrés Zabala por facilitarme las cepas ATCC de bacterias y levaduras, respectivamente.

Al Dr. Andrés Merino Viteri y a su equipo de la Balsa de los Sapos por cuidar y permitirme utilizar las ranas que necesitaba.

A mis amigos de la universidad y Centro de Investigación para la Salud en América Latina (CISeAL) por acompañarme en esta etapa de mi vida.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, al CISeAL y al LICBA por darme el apoyo económico y estructural para este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|------|
| CERTIFICACIÓN | III |
| AGRADECIMIENTOS | V |
| LISTA DE FIGURAS | VIII |
| LISTA DE TABLAS..... | IX |
| LISTA DE ANEXOS | X |
| 1. RESUMEN..... | 1 |
| 2. ABSTRACT | 2 |
| 3. INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| OBJETIVOS | 9 |
| OBJETIVO GENERAL | 9 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 9 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS | 10 |
| 4.1 ESPECÍMENES DE ANFIBIOS ANALIZADOS | 10 |
| 4.2 PROCEDIMIENTOS DE EXPERIMENTACIÓN | 10 |
| 4.3 EXTRACCIÓN Y LIOFILIZACIÓN DE LAS SECRECIONES CUTÁNEAS DE ANUROS | 10 |
| 4.4 PRUEBAS DE DIFUSIÓN POR DISCO SOBRE CEPAS BACTERIANAS ATCC 11 | |
| 4.5 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC) | 12 |
| 4.6 DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA O BACTERIOSTÁTICA DE LAS SECRECIONES CUTÁNEAS TOTALES..... | 12 |
| 4.7 ENSAYOS HEMOLÍTICOS | 12 |
| 4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 13 |
| 5. RESULTADOS | 14 |
| 5.1 EXTRACCIÓN DE LAS SECRECIONES CUTÁNEAS TOTALES DE ANFIBIOS 14 | |
| 5.2 PRUEBAS DE DIFUSIÓN POR DISCO DE LA SECRECIÓN TOTAL CUTÁNEA DE ANUROS SOBRE CEPAS DE MICROORGANISMOS ATCC . | 15 |
| 5.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC) Y DETECCIÓN DE LA MINIMA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA O BACTERIOSTÁTICA DE LAS SECRECIONES CUTÁNEAS TOTALES (MBC)19 | |
| 5.4 EVALUACIÓN DEL GRADO DE HEMÓLISIS..... | 21 |

| | | |
|-----|----------------------------------|----|
| 5.5 | ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 23 |
| 6. | DISCUSIÓN..... | 27 |
| 7. | CONCLUSIONES..... | 30 |
| 8. | RECOMENDACIONES | 32 |
| 9. | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 33 |
| 10. | ANEXOS | 40 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Obtención de secreciones cutáneas de anfibios..... | 15 |
| Figura 2. Prueba de difusión por disco <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922. | 16 |
| Figura 3. Prueba de difusión por disco <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 16 |
| Figura 4. Prueba de difusión por disco <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883 | 17 |
| Figura 5. Prueba de difusión por disco <i>Candida albicans</i> ATCC 10231..... | 17 |
| Figura 6. Prueba de difusión por disco <i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 | 18 |
| Figura 7. Efecto inhibitorio de la secreción cutánea total de <i>Hyloscirtus lindae</i> sobre cepas ATCC | 19 |
| Figura 8. Efecto inhibitorio de la secreción cutánea total de <i>Hyloscirtus pantostictus</i> sobre cepas ATCC | 20 |
| Figura 9. Mínima concentración bactericida y bacteriostática de <i>Hyloscirtus lindae</i> contra <i>Escherichia coli</i> | 20 |
| Figura 10. Mínima concentración bactericida y bacteriostática de <i>Hyloscirtus pantostictus</i> contra <i>Escherichia coli</i> | 21 |
| Figura 11. Porcentaje de hemólisis del péptido <i>Hyloscirtus lindae</i> | 21 |
| Figura 12. Efecto hemolítico de la secreción cutánea de <i>Hyloscirtus lindae</i> | 22 |
| Figura 13. Porcentaje de hemólisis de péptido <i>Hyloscirtus pantostictus</i> | 22 |
| Figura 14. Efecto hemolítico de la secreción cutánea de <i>Hyloscirtus pantostictus</i> | 23 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Número total de extracciones de secreciones cutáneas totales realizadas)..... | 14 |
| Tabla 2. Resultados de las pruebas de difusión por disco. Diámetros de los halos de inhibición de microorganismos ATCC. | 18 |

LISTA DE ANEXOS

| | |
|---|----|
| Anexo 1. Esquema del modelo de alfombran..... | 40 |
| Anexo 2. Esquema del modelo de poro toroidal..... | 40 |
| Anexo 3. Esquema del modelo de poro de barril..... | 41 |
| Anexo 4. Datos específicos de ranas analizadas..... | 42 |
| Anexo 5. Detalles de la configuración para la liofilización de secreciones cutáneas totales de anfibios | 43 |
| Anexo 6. Prueba de ANOVA de <i>Hyloscirtus lindae</i> contra <i>Candida albicans</i> | 43 |
| Anexo 7. Prueba de ANOVA de <i>Hyloscirtus lindae</i> contra <i>Escherichia coli</i> | 44 |
| Anexo 8. Prueba de ANOVA de <i>Hyloscirtus lindae</i> contra <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 44 |
| Anexo 9. Prueba de ANOVA de <i>Hyloscirtus lindae</i> contra <i>Serratia marcescens</i> .. | 44 |
| Anexo 10. Prueba de ANOVA de <i>Hyloscirtus lindae</i> contra <i>Staphylococcus aureus</i> | 45 |
| Anexo 11. Prueba de ANOVA de <i>Hyloscirtus pantostictus</i> contra <i>Candida albicans</i> | 45 |
| Anexo 12. Prueba de ANOVA de <i>Hyloscirtus pantostictus</i> contra <i>Escherichia coli</i> | 45 |
| Anexo 13. Prueba de ANOVA de <i>Hyloscirtus pantostictus</i> contra <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 46 |
| Anexo 14. Prueba de ANOVA de <i>Hyloscirtus pantostictus</i> contra <i>Serratia marcescens</i> | 46 |
| Anexo 15. Prueba de ANOVA de <i>Hyloscirtus pantostictus</i> contra <i>Staphylococcus aureus</i> | 46 |
| Anexo 16. Prueba de TUKEY de <i>Hyloscirtus pantostictus</i> contra <i>Staphylococcus aureus</i> | 47 |
| Anexo 17. Prueba de TUKEY de <i>Hyloscirtus pantostictus</i> contra <i>Serratia marcescens</i> | 48 |
| Anexo 18. Prueba de TUKEY de <i>Hyloscirtus pantostictus</i> contra <i>Candida albicans</i> | 49 |
| Anexo 19. Prueba de TUKEY de <i>Hyloscirtus pantostictus</i> contra <i>Escherichia coli</i> | 50 |

| | |
|--|----|
| Anexo 20. Prueba de TUKEY de <i>Hyloscirtus pantostictus</i> contra <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 51 |
| Anexo 21. Prueba de TUKEY de <i>Hyloscirtus lindae</i> contra <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 52 |
| Anexo 22. Prueba de TUKEY de <i>Hyloscirtus lindae</i> contra <i>Staphylococcus aureus</i> | 53 |
| Anexo 23. Prueba de TUKEY de <i>Hyloscirtus lindae</i> contra <i>Escherichia coli</i> | 53 |
| Anexo 24. Prueba de TUKEY de <i>Hyloscirtus lindae</i> contra <i>Candida albicans</i> | 54 |
| Anexo 25. Prueba de TUKEY de <i>Hyloscirtus lindae</i> contra <i>Serratia marscencens</i> | 55 |
| Anexo 26. Filograma de consenso Bayesiano de las relaciones de ranas arbóreas del género <i>Hyloscirtus</i> | 56 |

1. RESUMEN

El aumento de casos de resistencia a antibióticos por parte de diversos microorganismos, es un problema de salud pública mundial; esto es causado por el uso inapropiado de fármacos, inadecuadas condiciones sanitarias o mal manejo de alimentos, ha permitido que a través de distintos mecanismos los microorganismos desarrollen gran variedad de resistencias. Por esta razón, es importante buscar nuevos compuestos bioactivos con actividad antimicrobiana, que puedan ayudar a la creación de distintos medicamentos. Los Péptidos Antimicrobianos (AMPs), que se originan de las secreciones cutáneas de anfibios, poseen actividad contra una gran variedad de microorganismos; por lo cual el presente trabajo investigativo, tiene como objetivo analizar la actividad antimicrobiana de las secreciones cutáneas de *Hyloscirtus lindae* e *Hyloscirtus pantostictus* (Anura: Hylidae), sobre cepas ATCC de bacterias Gram positivas, Gram negativas y levaduras. Para lograrlo se ejecutaron pruebas de difusión de disco y microdiluciones en caldo, bajo los parámetros descritos en el "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI) del 2019. Con todas las secreciones cutáneas, se hicieron ensayos hemolíticos para calcular el daño celular que se podría causar en los eritrocitos. Se registró un halo de inhibición de 9 mm en el antibiograma de *H. lindae* contra *Staphylococcus aureus*; una mínima concentración inhibitoria de 256 mg/L en *H. lindae* contra *Escherichia coli*, y una de 128 mg/L en *H. pantostictus* contra *E. coli*. Actividad bactericida a una concentración de 512 mg/L, y actividad bacteriostática a 256 mg/L en los ensayos de *H. lindae* contra *E. coli*, para el péptido *H. lindae* contra *E. coli* se encontró actividad bactericida en concentraciones 512 y 256 mg/L, pero también actividad bacteriostática en la concentración 128 mg/L. Los ensayos hemolíticos mostraron 0% de hemólisis en las concentraciones 4, 2 y 1 mg/L para las secreciones de *H. lindae*, mientras que para *H. pantostictus* 0% de hemólisis en las concentraciones 16, 8, 4, 2 y 1 mg/L. Esto indica que estos péptidos tienen diversos usos.

Palabras clave: Anfibio, bacteria, levadura, microorganismos, péptidos antimicrobianos.

2. ABSTRACT

The rise of antibiotic resistance cases in various kinds of microorganisms has started a public health issue around the world; on the grounds of the inappropriate: use of medication, inadequate sanitary conditions or poor food handling, among other aspects that allow the development of many resistance variety microorganisms through different mechanisms. This is the reason why search for new bioactive assemblies, with antimicrobial activity, is essential due to the fact that it will be helpful for the elaboration of new drugs. The antimicrobial peptides (AMPs), which are generated of amphibious cutaneous secretions, have shown activity against a variety of microorganisms. This investigative research has the objective of analyzing the microbian activity from the *Hyloscirtus lindae* and *Hyloscirtus pantostictus* (Anura: Hylidae) cutaneous secretions focusing on ATCC gram positive, gram negative and yeasts. To achieve this, tests of disc diffusion and micro solutions on broth, under Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) parameters of 2019 have been done. Hemolytic essays have also been carried a bout with all the cutaneous secretions to estimate the cellular damage that can be taken by the erythrocytes. A 9 mm halo of inhibition was found in the antibiogram of *H. lindae* against *Staphylococcus aureus*; a minimum inhibitory concentration of 256 mg/L in *H. lindae* against *Escherichia coli* and one of 128 mg/L in *H. pantostictus* against *E. coli*. Bactericidal activity at a concentration of 512 mg/L and bacteriostatic activity at 256 mg/L in the *H. lindae* against *E. coli* assays, for *H. lindae* peptide against *E. coli* bactericidal activity was found in 512 and mg / 256 mg/L, but also bacteriostatic activity at 128 mg/L concentration. Hemolytic assays affected 0% hemolysis in concentrations 4, 2 and 1mg/L for *H. lindae* secretions, while for *H. pantostictus* 0% of hemolysis in concentrations 16, 8, 4, 2 and 1 mg/L. This indicates that these peptides have properties that they could use in various areas.

Keywords:

Amphibian, antimicrobial peptides, bacteria, microorganism, yeast

3. INTRODUCCIÓN

El uso inadecuado de los antibióticos ha generado graves problemas de resistencia bacteriana (Alós, 2015; Serra Valdéz, 2017; Organización Mundial de la Salud, 2018; Torres, Sothiselvam, Lu y de la Fuente-Nunez, 2019). En la actualidad se ha encontrado gran diversidad de genes de resistencia a antibióticos, en estudios de genomas bacterianos provenientes de humanos y entornos ambientales; pese a ello, los antimicrobianos se prescriben de forma libre produciendo graves impactos para la salud humana, animal y ambiental, con la consiguiente alteración de la microbiota normal (Oteo Iglesias, 2019).

A esto se suma el manejo inadecuado de los aguas residuales y desechos producidos en actividades tanto industriales como domésticas, que incrementan la contaminación en ecosistemas acuáticos tales como el caso del río Machángara que atraviesa la ciudad de Quito (Ortega-Paredes et al., 2019), ecosistemas terrestres entre otros, con la consiguiente afectación de diversos sistemas vivientes y el incremento de la dispersión de microorganismos resistentes (Beceiro, Tomás y Bou, 2012; Bhullar et al., 2012; McArthur et al., 2013; Rodriguez et al., 2014; Ortega- Paredes et al., 2019).

Entre los microorganismos más comunes que causan diversas infecciones a los seres humanos se encuentran: *Escherichia coli*, *Serratia marscences* y *Klebsiella pneumoniae* las cuales son bacterias Gram negativas, *Staphylococcus aureus* que es bacteria Gram positiva, y *Candida albicans* perteneciente a las levaduras (Hervé et al., 2015; Paz, 2015; Lakhundi y Zhang, 2018; Ayala et al., 2019), bacterias que según la Organización Mundial de la Salud (OMS), han desarrollado mayor resistencia bacteriana de forma principal (Organización Mundial de la Salud, 2018). Cabe recalcar que en el año 2016 el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) manifestó que la bacteria más común dentro de los hospitales del Ecuador es *E. coli* y la bacteria con mayor resistencia antibiótica dentro del país es *K. pneumoniae* (Mosquera, 2016).

Escherichia coli es cocobacilo anaerobio facultativo, Gram negativo no esporulado y pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Puede tener movilidad

debido a sus flagelos peritricos y se las detecta mediante las siguientes pruebas bioquímicas: Citrato negativo; "Triple Sugar Iron" (TSI) con resultado A/A y gas positivo; Rojo de Metilo/Voges Proskauer positivo; Sulfuro Indol Movilidad (SIM) con Indol positivo, motilidad positiva y presencia de gas sulfhídrico (H₂S) (Alcocer, 2020).

Este microorganismo tiene serotipos que se basan de forma fundamental en tres tipos de antígenos K (capsular), O (somático o del lipopolisacárido) y H (flagelar), pero se debe tomar en cuenta que existe un mayor número de serotipos de esta especie; esta clasificación facilita la comprensión de la epidemiología y patogenia de las infecciones causadas por este patógeno (Hartel, Editors, Clark y Finley, 2015). Es el causante común de infecciones en el tracto urinario y enfermedades gastrointestinales (Hartel et al., 2015).

Serratia marcescens es un bacilo Gram negativo, que pertenece al grupo de las enterobacterias, sus pruebas bioquímicas son las siguientes: Citrato negativo; "Triple Sugar Iron" (TSI) con resultado K/A y poco; Rojo de Metilo/Voges Proskauer negativo; Sulfuro Indol Movilidad (SIM) con Indol negativo, motilidad positiva y ausencia de gas sulfhídrico (H₂S) (Alcocer, 2020).

Sus mecanismos de patogenicidad son producción de lisina, biosíntesis de lipopolisacáridos y captación de hierro, los cuales son muy importantes para que este microorganismo pueda tener virulencia. Se puede encontrar en ambientes terrestres y acuáticos, pero también en humanos u otros seres vivos. Por esta razón es causante de infecciones relacionadas al cuidado de la salud, de forma principal en unidades de terapia intensiva y unidades neonatales, como se pudo evidenciar en un brote el año 2013 en un hospital de Guayaquil (Di Venanzio, 2014; Hervé et al., 2015; Soria, Nieto, Villacís, Lainez y Cartelle, 2016).

Klebsiella pneumoniae es un bacilo Gram negativo, que también está dentro del grupo de las enterobacterias; sus pruebas bioquímicas son las siguientes: citrato positivo, "Triple Sugar Iron" (TSI) con resultado A/A y gas positivo, Rojo de Metilo/Voges Proskauer negativo, Sulfuro Indol Movilidad (SIM) con Indol negativo, motilidad negativa y ausencia de gas sulfhídrico (H₂S) (Alcocer, 2020).

Tiene varios mecanismos de defensa contra el sistema inmune de su hospedero de los cuales se destacan, pilis, lipopolisacáridos, sideróforos y la cápsula. Se clasifica en 77 serotipos debido a sus terminales antigénicas. Existen también otros mecanismos como porinas, bombas de eflujo entre otras, pero no han sido caracterizados de forma completa. Este microorganismo es causante de infecciones del tracto urinario, neumonías, bacteriemias y abscesos, sobre todo en personas inmunocomprometidas (López Vargas y Echeverri Toro, 2010; Paczosa y Meccas, 2016).

Staphylococcus aureus es un coco Gram positivo, anaeróbico facultativo, beta hemolítico, catalasa y coagulasa positiva; se la encuentra agrupada en forma de racimos y es resistente al frío o calor. Sus factores de virulencia son componentes estructurales que ayudan al microorganismo a adherirse a los tejidos del huésped y evitar la fagocitosis. Se localiza principalmente en la piel y zona nasofaríngea, es responsable de infecciones no solo en la piel, sino en varios tejidos blandos como músculos, tendones, tejidos grasos, etc. En América del Norte y Latinoamérica es la principal causante de bacteriemia asociada al cuidado de la salud, mientras que en Europa ocupa el segundo puesto entre las causas de este tipo (Pasachova, Ramirez y Munoz, 2019).

Candida albicans es una levadura que se reproduce por gemación, en la cual se puede observar la formación de yemas. Se la puede cultivar en medios cromogénicos específicos para levaduras o medio Sabouraud, aunque su identificación se basa en las características metabólicas. Forma parte de la microbiota normal de los seres humanos, se la considera como un patógeno oportunista que puede ser causante de diversos tipos de candidiasis, que van desde infecciones dérmicas a sistémicas de las cuales se registra un 30% de mortalidad, es también responsable de infecciones relacionadas al cuidado de la salud (Prats, 2013; Hernández, 2016; Cusquipoma Echeverria, 2018).

Las infecciones causadas por los microorganismos antes mencionados, están asociadas con el aumento de la morbilidad y mortalidad de las poblaciones afectadas, trayendo como consecuencia exorbitantes costos de tratamientos para el sistema de salud, a los pacientes y familias de los mismos. Estos aspectos hacen que sea prioritaria la búsqueda e identificación de nuevos compuestos, que

permitan el adecuado control de este tipo de afecciones (Alós, 2015, Allegranzi et al., 2017; Organización Mundial de la Salud, 2020).

Generar nuevos fármacos para la inhibición de la gran variedad de microorganismos, es un objetivo difícil ya que la aparición de nuevas cepas resistentes, es rápida (McArthur et al., 2013).

En los últimos años, la exploración de nuevos compuestos, se ha centrado en los Péptidos Antimicrobianos (AMPs) procedentes de la piel de los anfibios (Bahar y Ren, 2013; Cilveti et al., 2013; Conlon y Mechkarska, 2014; Cajiao, 2018; Cuesta et al., 2019; Proaño-Bolaños et al., 2019; Torres et al., 2019).

Los anfibios a través de las glándulas granulares de su piel, son secretores de péptidos antimicrobianos que inhiben el crecimiento de bacterias, protozoos, hongos y virus, resistentes a los antibióticos que podrían ocasionarles infecciones letales (Schadich, 2009; Mirski, Niemcewicz, Bartoszcze, Gryko y Michalski, 2018). Los AMPs son pequeños biopolímeros anfipáticos, con carga neta positiva, que contienen de entre 10 a 50 aminoácidos básicos que se alinean en tres dimensiones en caras opuestas. Pueden adoptar una conformación lineal, α -helicoidal, β -hoja plegada, o cíclica (Nguyen, Haney y Vogel, 2011; Zhang y Gallo, 2016). Estas características conformacionales de anfipaticidad (por poseer extremos hidrofílicos e hidrofóbicos), y de cationicidad (por la presencia de residuos de lisina que poseen), les permiten interactuar con las bicapas fosfolipídicas de los microorganismos y actuar sobre ellos con mecanismos de acción diferentes (Conlon, 2011; Torres et al., 2019).

El modo de acción de estas moléculas es diverso y depende de los parámetros biofísicos y estructurales de cada uno de los péptidos (Torres et al., 2019), sin embargo, todos se basan en una interacción electrostática inicial entre la carga positiva de los AMPs, con las cargas negativas de la membrana celular de los microorganismos (Torcato et al., 2012; da Cunha et al., 2017; Felício, Silva, Gonçalves, Santos y Franco, 2017). Además, la acción de los AMPs dependerá no solo de la estructura del péptido, sino también de la composición de la membrana de los microorganismos o tipos de células (Conlon y Mechkarska, 2014; Zhang y Gallo, 2016).

Se han propuesto modelos que explican los posibles mecanismos de acción de los AMPs, entre los que constan el modelo de alfombra (Carpet model), modelo de poro de barril (Barrel stave model), y modelo de poro toroidal (Toroidal pore model).

En el modelo de alfombra o “Carpet model” (Anexo 1), los AMPs se orientan de forma paralela a la membrana y se unen a los fosfolípidos de la membrana de los microorganismos, creando una “alfombra” sin insertarse dentro de la célula. Cuando se llega a una cierta concentración de sobresaturación, los AMPs giran hacia la parte hidrofóbica de la membrana, lo que causa que se formen micelas y la destrucción de la misma (Lopez-Meza, Ochoa-Zarzosa, Aguilar y Loeza-Lara, 2011).

El modelo de poro toroidal o “Toroidal pore model” (Anexo 2), se inicia con un estado inactivo el momento en que los AMPs catiónicos de alfa-hélice interactúan con los fosfolípidos, colocándose paralelamente a la membrana del microorganismo. Cuando se sobrepasa el límite péptido-fosfolípido, los péptidos se ubican perpendicularmente a la bicapa lipídica y al interactuar con varios lípidos que le rodean, los AMPs se invierten para ingresar al interior de la región hidrofóbica de la membrana. Con ello se forma un complejo supramolecular dinámico péptido-lípido que provoca la ruptura de la membrana. Es decir, la lisis de la bicapa fosfolipídica, se da por la transición del estado inactivo al dinámico, dependiendo obviamente, de la estructura del péptido y de la de la bicapa (Lopez-Meza et al., 2011; Torres et al., 2019).

El modelo de poro de barril o “Barrel stave model” (Anexo 3), propone que las moléculas de AMPs de estructuras α -helicoidales, interactúan con la superficie de la membrana para luego colocarse perpendicularmente a ella, gracias a la interacción de la región hidrofóbica del péptido con la parte hidrofóbica de la bicapa del microorganismo; la parte hidrofílica del péptido entra a la membrana para formar un canal, el cual provoca la lisis celular (Lopez-Meza et al., 2011).

Estos peculiares mecanismos de acción convierten a los AMPs de anfibios, en candidatos idóneos para la generación de nuevos fármacos, que inhiban el

crecimiento de microorganismos multirresistentes y tengan poca probabilidad de generar resistencia.

Es por ello que el presente trabajo se enfoca, en el análisis del efecto antimicrobiano de las secreciones cutáneas totales de dos especies de ranas de la familia Hylidae, que hasta el momento no han sido estudiadas: *Hyloscirtus pantosticus* e *Hyloscirtus lindae*.

Hyloscirtus pantosticus es una especie nocturna conocida como Rana del torrente del suro. Está presente entre los 1950 a 2700 metros sobre el nivel de mar, en las estribaciones orientales de la cordillera de Los Andes, en las provincias ecuatorianas de Carchi y Sucumbíos, también al sur de Colombia. Se la puede encontrar en bosques parcialmente talados y cerca de riachuelos. En la Lista Roja de Especies Amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, UICN, es considerada una especie en peligro (Coloma, Frenkel, Ron y Páez-Rosales, 2018).

Hyloscirtus lindae, también llamada Rana de torrente de Linda, habita entre los 2000 a 2500 metros sobre el nivel del mar en las estribaciones de la cordillera oriental de Los Andes, desde el sur de Colombia hasta el centro de Ecuador, en donde existen registros para las provincias de Sucumbíos, Napo y Pastaza. Es una especie nocturna que vive en bosques, pero también se la ha encontrado en diversos hábitats alterados como por ejemplo pastizales. Según la UICN es una especie de anfibio catalogada como vulnerable (Coloma, Frenkel, Ron y Páez-Rosales, 2018a).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Analizar la actividad antimicrobiana de las secreciones cutáneas de *Hyloscirtus lindae* e *Hyloscirtus pantostictus* (Anura: Hylidae) sobre bacterias Gram positivas, Gram negativas y levaduras.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Identificar la actividad antimicrobiana de la secreción cutánea total de *H. lindae* e *H. pantostictus* mediante pruebas de difusión en disco sobre cepas de la Colección Americana de Cultivos Tipo ("American Type Culture Collection", ATCC) de bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* 25922, *Klebsiella pneumoniae* 13883, *Serratia marcescens* 13880), Gram positivas (*Staphylococcus aureus* 25923) y levaduras (*Candida albicans* 10231).

-Determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de la secreción cutánea total de *H. lindae* y *H. pantostictus* sobre cepas ATCC de *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens* y *C. albicans* mediante la técnica de microdilución en caldo.

-Evaluar el grado de hemólisis de las secreciones cutáneas totales que presenten actividad antimicrobiana.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 ESPECÍMENES DE ANFIBIOS ANALIZADOS

Para analizar la actividad antimicrobiana de las secreciones cutáneas totales de anfibios, se utilizaron 9 individuos de *Hyloscirtus lindae* y 12 individuos de *Hyloscirtus pantostictus*. Estos especímenes se encuentran en las instalaciones del Programa de Conservación Balsa de los Sapos de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) y se mantienen en terrarios con una dieta basada en grillos, provenientes del bioterio de la misma dependencia. Los datos específicos de cada uno de los especímenes estudiados constan en el Anexo 4.

4.2 PROCEDIMIENTOS DE EXPERIMENTACIÓN

Los procesos de extracción, liofilización de secreciones cutáneas de anfibios y las pruebas antimicrobianas, se llevaron a cabo bajo condiciones controladas de laboratorio y con estrictas medidas de asepsia para evitar una posible contaminación. Estas pruebas se realizaron en el Laboratorio de Investigación de Citogenética y Biomoléculas de Anfibios (LICBA) del Centro de Investigación para la Salud en América Latina (CISeAL).

4.3 EXTRACCIÓN Y LIOFILIZACIÓN DE LAS SECRECIONES CUTÁNEAS DE ANUROS

La extracción de las secreciones cutáneas totales de los especímenes de anfibios analizados, se realizó siguiendo el protocolo descrito a continuación: Primeramente, se lavó a cada rana con 10 ml de agua Milli Q, para luego someterlas a ligeras a estimulaciones eléctricas usando un Estimulador Transcutáneo para Anfibios (TAS, por sus siglas en inglés) durante un minuto; se realizó un segundo baño con 10 ml de agua Milli Q para recoger la secreción del anfibio en una caja Petri, la misma que fue congelada a la temperatura de -20 °C hasta el momento de la liofilización (Grant y Land, 2002).

Las secreciones obtenidas se liofilizaron en el equipo Liofilizador Virtis Advantage Plus, bajo el protocolo número seis (Anexo 5), del programa de liofilización establecido previamente en el LICBA, para las secreciones cutáneas totales de anfibios. Al final del ciclo, se pesaron los liofilizados y se los guardó en tubos de criopreservación, con su rotulación correspondiente a -20 °C (Cajiao, 2018).

4.4 PRUEBAS DE DIFUSIÓN POR DISCO SOBRE CEPAS BACTERIANAS ATCC

Se determinó la susceptibilidad microbiana a las secreciones cutáneas totales de las especies *H. lindae* e *H. pantostictus* mediante pruebas de difusión por disco (antibiogramas), en cajas Petri con agar Mueller Hinton, con tres repeticiones (Llumiquinga, 2017; Vallejo Rodríguez, 2016) por motivos de reproducibilidad, siguiendo los parámetros sugeridos por el “Clinical and Laboratory Standards Institute” (2019). Los antibiogramas se realizaron con las cepas ATCC de *Escherichia coli* 25922, *Staphylococcus aureus* 25923, *Serratia marcescens* 13880, *Klebsiella pneumoniae* 13883, las cuales fueron proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología de la Escuela de Ciencias Biología de la PUCE y *Candida albicans* 10231 proporcionada por el Laboratorio de Biología Molecular de la carrera de Laboratorio clínico.

Las diluciones seriadas del extracto liofilizado se realizaron en agua “Milli-Q” conteniendo como disolventes 0,01% de ácido acético glacial y 0,2% de Suero Albúmina Bovino (Llumiquinga, 2017; Vallejo Rodríguez, 2016). Los discos de papel filtro para test de susceptibilidad antimicrobiana se colocaron de manera equidistante con la ayuda de una pinza estéril y se añadió en cada uno de ellos, 15 µl de las respectivas diluciones (Llumiquinga, 2017). Como control positivo se usó secreción cutánea de *Agalychnis spurrelli* basado en el estudio de Caicedo (2007) y como control negativo se utilizó la solución en la que se diluyó el péptido; después se incubó las cajas Petri a 37 °C durante 18 horas; pasado este tiempo se midió lo halos de inhibición en milímetros, utilizando una regla. En base a los resultados obtenidos por Caicedo (2007), se consideraron como positivas las secreciones que formaron halos de inhibición entre 8 y 13 mm.

4.5 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC)

Se realizaron pruebas de microdilución en caldo sobre cepas ATCC de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* y *Candida albicans* con las secreciones totales de las dos especies. Para determinar la concentración más baja (MIC) de la secreción cutánea, se siguió el protocolo definido por Proaño-Bolaños et al. (2016), con modificaciones.

Se diluyó el péptido en 30 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) para obtener la concentración de 512 mg/L, a continuación se realizaron diluciones seriadas con DMSO 1:1 para obtener concentraciones de 256 mg/L, 128 mg/L, 64 mg/L, 32 mg/L, 16 mg/L, 8 mg/L, 4 mg/L, 2 mg/L, 1 mg/L (Proaño-Bolaños et al., 2016). Luego, se transfirió 2 µl de cada dilución del péptido a una placa de microtitulación estéril de 96 pocillos y se agregó 198 µl del microorganismo. Como control positivo se utilizaron 2 µl de DMSO con 198 µL de microorganismo y 200 µl de caldo Müeller Hinton como control negativo; se realizaron 7 réplicas por concentración de péptido y el experimento se efectuó por triplicado (Proaño-Bolaños et al., 2016) por motivos de reproducibilidad. Las placas de microtitulación se incubaron a 37 °C durante 18–22 horas para proceder a leer los resultados a 600 nm en un lector de placas de microtitulación.

4.6 DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA O BACTERIOSTÁTICA DE LAS SECRECIONES CUTÁNEAS TOTALES

Se detectó la actividad bactericida o bacteriostática de secreciones cutáneas totales, utilizadas en los ensayos contra las cepas de microorganismos. Para ello, después de realizar la placa para MIC, la incubación de 18 horas y su lectura correspondiente, se tomaron 5 µL de cada uno de los pocillos con dilución de péptidos con sus controles los cuales se sembraron sobre Agar Müeller Hinton. Las cajas Petri se incubaron a 37 °C durante 18 horas y se tomaron fotografías para su posterior análisis (Proaño-Bolaños et al., 2016).

4.7 ENSAYOS HEMOLÍTICOS

Se siguió el protocolo definido por Proaño-Bolaños et al. (2016), con modificaciones.

Una suspensión de glóbulos rojos (2%) fue preparada con sangre de caballo defibrinada, la cual fue utilizada para realizar las diluciones seriadas de los péptidos a concentraciones 512×10^2 mg/L, 256×10^2 mg/L, 128×10^2 mg/L, 64×10^2 mg/L, 32×10^2 mg/L, 16×10^2 mg/L, 8×10^2 mg/L, 4×10^2 mg/L, 2×10^2 mg/L, 1×10^2 mg/L.

Se utilizaron 200 μ l de sangre con 200 μ l de cada péptido diluido. Para los controles negativos, se añadió a las células sanguíneas, solución salina tamponada con fosfato y para controles positivos, se empleó solución salina tamponada con fosfato con 2% (v/v) de Triton X-100 con péptido.

Se incubó a 37 °C durante 2 horas. Luego, las muestras se centrifugaron a 5000 rpm y 200 μ L de sobrenadante se transfirió a una placa de 96 pocillos. Se analizó en un lector de placas microtitulación a 600 nm y se procedió a calcular el porcentaje de hemólisis.

4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó ANOVA con cada uno de los datos de las concentraciones mínimas inhibitorias de los péptidos, también una prueba de TUKEY para ver las diferencias específicas entre cada grupo de datos (Sánchez-Otero, 2010). Los análisis estadísticos se realizaron en el programa SPSS Statistics versión 25.

5. RESULTADOS

5.1 EXTRACCIÓN DE LAS SECRECIONES CUTÁNEAS TOTALES DE ANFIBIOS

A partir de los 21 anfibios analizados, se realizó un total de 97 extracciones de secreciones cutáneas totales producidas en las glándulas granulares de la piel de las cuales, 30 corresponden a *Hyloscirtus lindae* y 67 a *Hyloscirtus pantostictus* (Tabla 1 y Figura 1). Estas secreciones de las dos especies tuvieron una consistencia viscosa de color blanco, cuando se encontraba sobre la piel del anfibio o se lo manipulaba, con un olor característico a fréjol. Al momento de la extracción, y también del pesaje después de la liofilización, la secreción produjo irritación en las fosas nasales de mi persona; al obtener las secreciones liofilizadas en cajas Petri, tenían aspecto algodonoso de color blanco.

Tabla 1: Número total de extracciones de secreciones cutáneas totales realizadas (Tomado de la base de datos del Programa de conservación “Balsa de los Sapos” de la PUCE).

| Especies de anfibios | Número de extracciones realizadas | Peso total obtenido del liofilizado en gramos |
|---------------------------------|--|--|
| <i>Hyloscirtus lindae</i> | 30 | 0,9638 |
| <i>Hyloscirtus pantostictus</i> | 67 | 1,3581 |

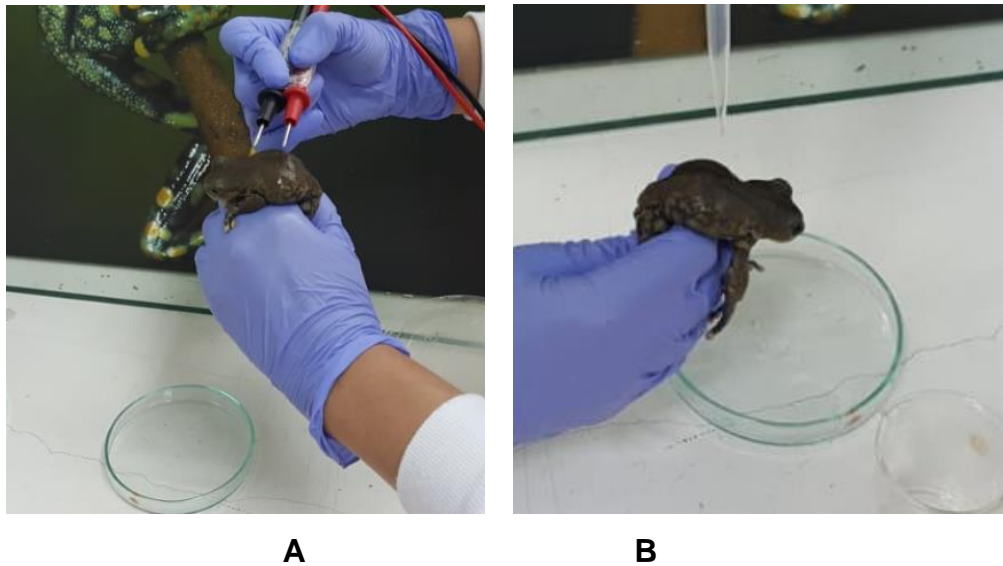
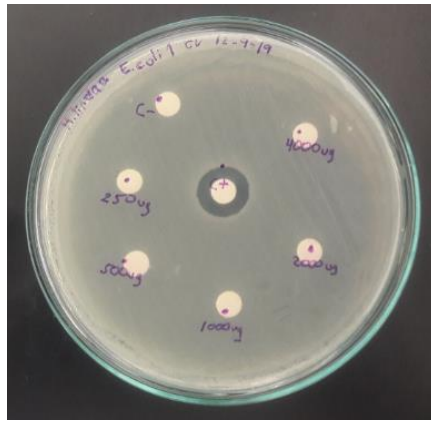


Figura 1. Obtención de secreciones cutáneas de anfibios. A: *Hyloscirtus pantostictus* con estimulación eléctrica utilizando el Transcutaneous Amphibian Stimulator (TAS). B: Baño de agua Milli Q a *Hyloscirtus pantostictus*.

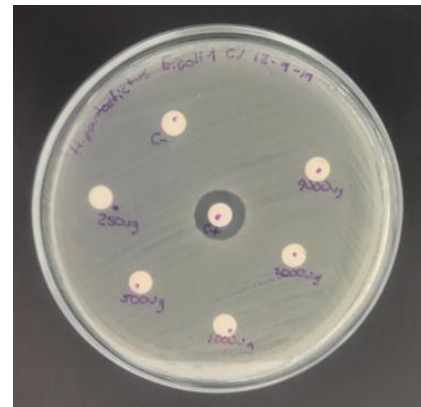
5.2 PRUEBAS DE DIFUSIÓN POR DISCO DE LA SECRECIÓN TOTAL CUTÁNEA DE ANUROS SOBRE CEPAS DE MICROORGANISMOS ATCC

Se halló que la secreción cutánea total de *Hyloscirtus lindae* inhibió el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a 4000 mg/L, como se observa en la Figura 3 A y Tabla 2, formando un halo de inhibición de 9mm, pero sobre *Escherichia coli* (Figura 2 A), *Klebsiella pneumoniae* (Figura 4 A), *Candida albicans* (Figura 5 A) y *Serratia marcescens* (Figura 6 A) no presentaron ningún halo de inhibición.

En relación a la secreción total de *H. pantostictus* no se obtuvo ningún halo de inhibición sobre *Escherichia coli* (Figura 2 B), *Staphylococcus aureus* (Figura 3 B), *Klebsiella pneumoniae* (Figura 4 B), *Candida albicans* (Figura 5 B) ni *Serratia marcescens* (Figura 6 B), que permita observar algún grado de actividad antibiótica (Tabla 2).

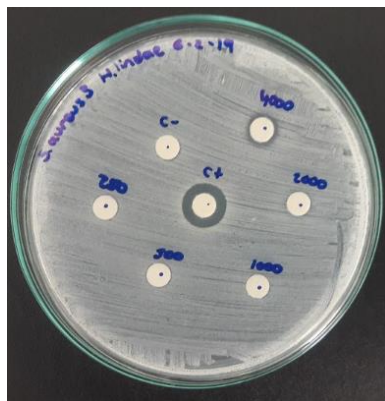


A



B

Figura 2. Prueba de difusión por disco *Escherichia coli* ATCC 25922
 Secreción cutánea de A: *Hyloscirtus lindae* a concentraciones de 4000 mg/L, 2000 mg/L, 1000 mg/L, 500 mg/L, 250 mg/L control positivo y control negativo. B: *Hyloscirtus pantostictus* a concentraciones de 4000 mg/L, 2000 mg/L, 1000 mg/L, 500 mg/L, 250 mg/L, control positivo y control negativo.



A



B

Figura 3. Prueba de difusión por disco *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
 Secreción cutánea de A: *Hyloscirtus lindae* a concentraciones de 4000 mg/L, 2000 mg/L, 1000 mg/L, 500 mg/L, 250 µg/ml, control positivo y control negativo. B: *Hyloscirtus pantostictus* a concentraciones de 4000 mg/L, 2000 mg/L, 1000 mg/L, 500 mg/L, 250 µg/ml, control positivo y control negativo.

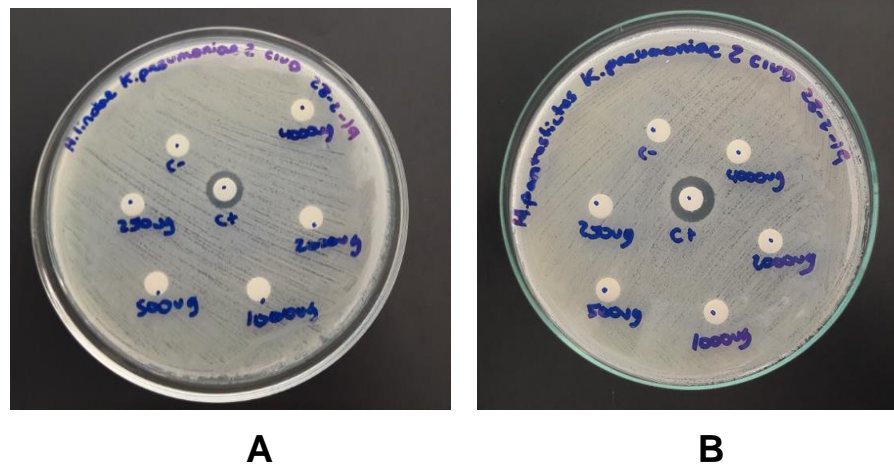


Figura 4. Prueba de difusión por disco *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883
 Secreción cutánea de A: *Hyloscirtus lindae* a concentraciones de 4000 mg/L, 2000 mg/L, 1000 mg/L, 500 mg/L, 250 mg/L, control positivo y control negativo., B: *Hyloscirtus pantostictus* a concentraciones de 4000 mg/L, 2000 mg/L, 1000 mg/L, 500 mg/L, 250 μ g/ml control positivo y control negativo.

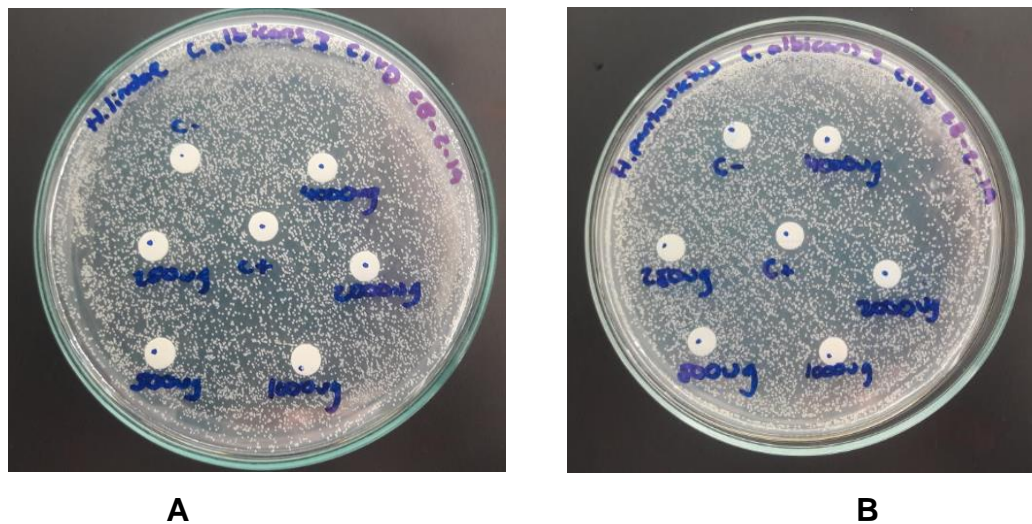


Figura 5. Prueba de difusión por disco *Candida albicans* ATCC 10231
 Secreción cutánea de A: *Hyloscirtus lindae* a concentraciones de 4000, 2000, 1000, 500, 250 mg/L, control positivo y control negativo., B: *Hyloscirtus pantostictus* a concentraciones de 4000 mg/L, 2000 mg/L, 1000 mg/L, 500 mg/L y 250 mg/L.

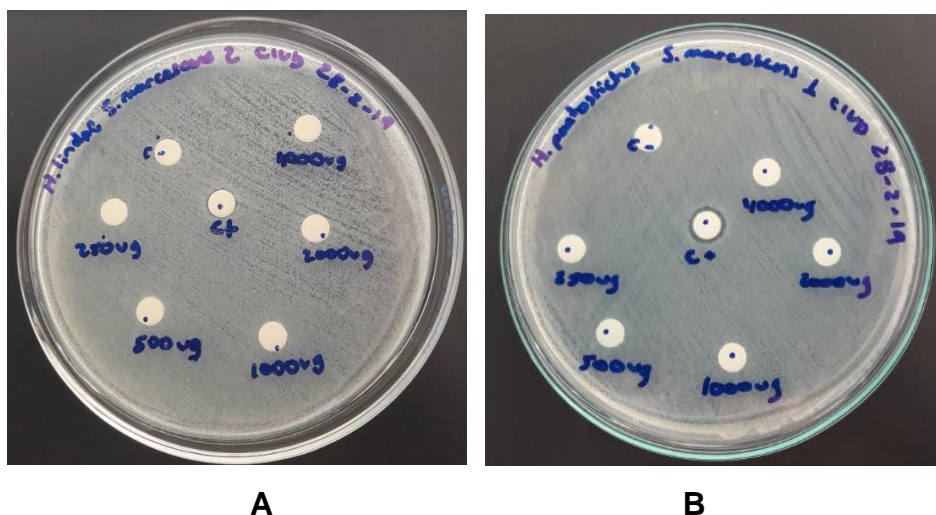


Figura 6. Prueba de difusión por disco *Serratia marcescens* ATCC 13880
 Secreción cutánea de A: *Hyloscirtus lindae* a concentraciones de 4000 mg/L, 2000 mg/L, 1000 mg/L, 500 mg/L, 250 mg/L, control positivo y control negativo., B: *Hyloscirtus pantostictus* a concentraciones de 4000 mg/L, 2000 mg/L, 1000 mg/L, 500 mg/L y 250 mg/L.

Tabla 2. Resultados de las pruebas de difusión por disco. Diámetros de los halos de inhibición de microorganismos ATCC.

| | <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | <i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883 | <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 |
|---------------------------------|---------------------------------------|--|--|--|---------------------------------------|
| <i>Hyloscirtus lindae</i> | 0 | 9 mm para 4000 mg/L | 0 | 0 | 0 |
| <i>Hyloscirtus pantostictus</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

5.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC) Y DETECCIÓN DE LA MINIMA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA O BACTERIOSTÁTICA DE LAS SECRECIONES CUTÁNEAS TOTALES (MBC)

Mediante la técnica de microdilución en caldo se pudo determinar que la concentración mínima inhibitoria, MIC, de las secreciones cutáneas totales de *Hyloscirtus lindae* contra *Escherichia coli*, fue de 256 mg/L. Contra *Serratia macescens*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* las secreciones no mostraron actividad antibiótica por lo que, obviamente, no se logró establecer la MIC (Figura 7).

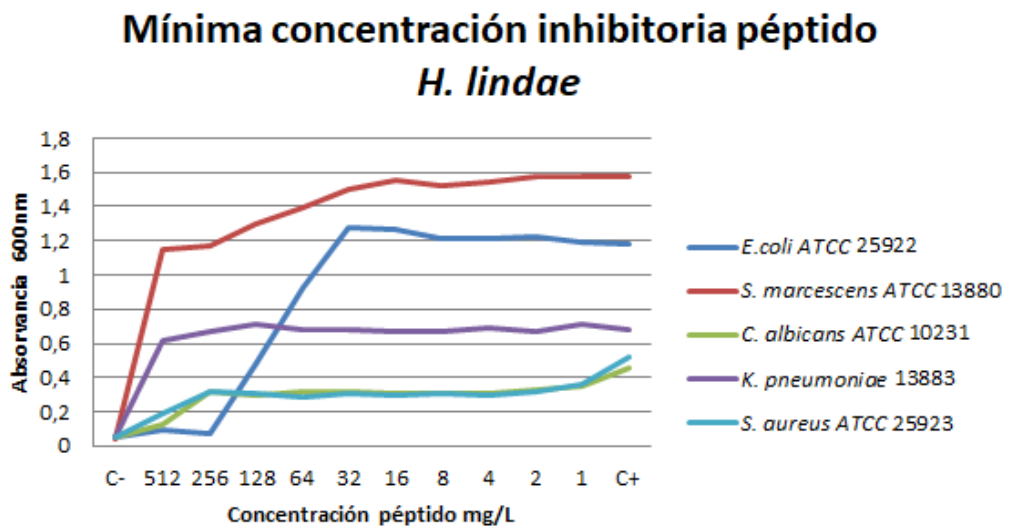


Figura 7. Efecto inhibitorio de la secreción cutánea total de *Hyloscirtus lindae* sobre cepas ATCC

La concentración mínima inhibitoria de *Hyloscirtus pantostictus* para *Escherichia coli* es de 128 mg/L, mientras que *Serratia macescens*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* no presentaron concentración mínima inhibitoria (Figura 8).

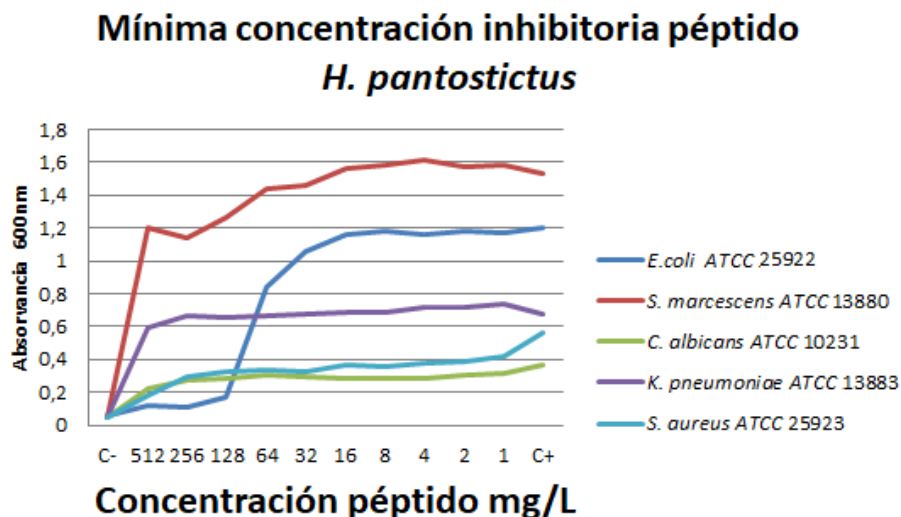


Figura 8. Efecto inhibitorio de la secreción cutánea total de *Hyloscirtus pantostictus* sobre cepas ATCC

Los resultados de las placas *H. lindae* contra *E. coli* muestran que existe una actividad bactericida para la concentración 512 mg/L y una actividad bacteriostática a una concentración 256 mg/L (Figura 9). En el caso de la secreción de *H. pantostictus* contra *E. coli* hay una actividad bactericida en las concentraciones 512 y 256 mg/L, mientras que la concentración 128 tiene actividad bacteriostática (Figura 10).



Figura 9. Mínima concentración bactericida y bacteriostática de *Hyloscirtus lindae* contra *Escherichia coli*. Control negativo, concentración 512 mg/L, 256 mg/L y 128 mg/L.

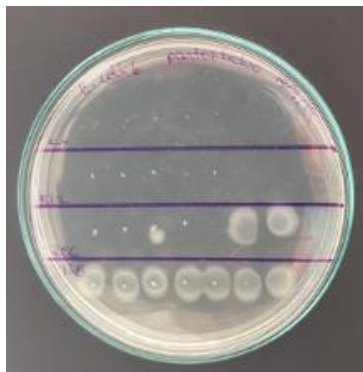


Figura 10. Mínima concentración bactericida y bacteriostática de *Hyloscirtus pantostictus* contra *Escherichia coli*. Control negativo, concentración 512 mg/L, 256 mg/L y 128 mg/L.

Las secreciones estudiadas no mostraron ningún efecto bactericida o bacteriostático contra los microorganismos *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens* y *C. albicans*.

5.4 EVALUACIÓN DEL GRADO DE HEMÓLISIS

Los resultados obtenidos de *H. lindae* se encuentran resumidos en las Figuras 11 y 12; los mismos ayudaron a establecer que desde la concentración 16 mg/L hasta 512 mg/L hay un alto porcentaje de hemólisis en los eritrocitos y en las concentraciones 8 mg/L, 4 mg/L, 2 mg/L y 1 mg/L no existió hemólisis.

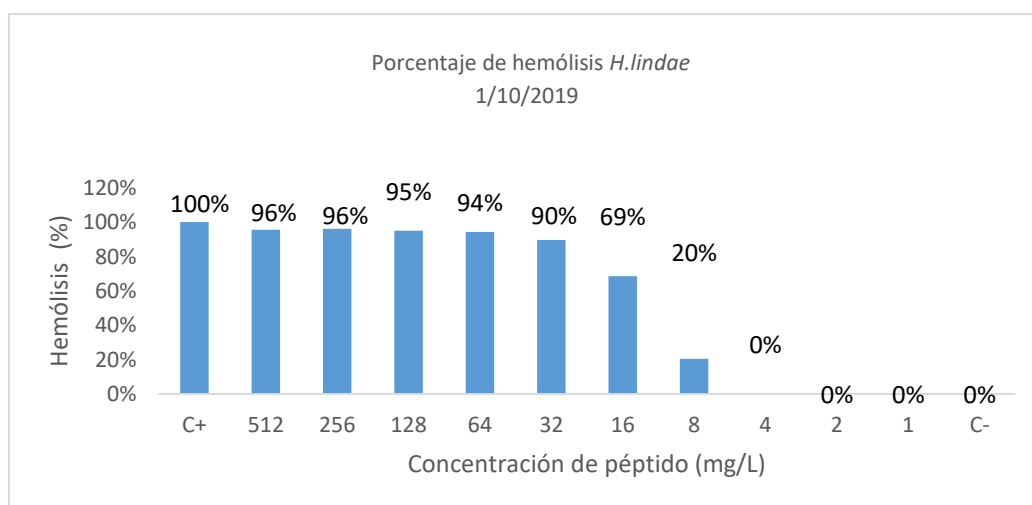


Figura 11. Porcentaje de hemólisis del péptido *Hyloscirtus lindae*

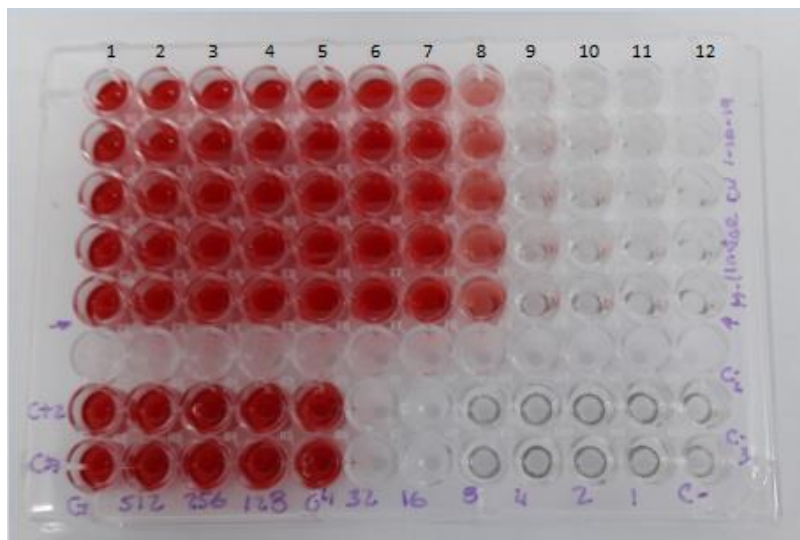


Figura 12. Efecto hemolítico de la secreción cutánea de *Hyloscirtus lindae*

Se observa la placa de microtitulación con cinco repeticiones para un individuo: Concentraciones: Columna 2 – 11 concentraciones: 512 mg/L, 256 mg/L, 128 mg/L, 64 mg/L, 32 mg/L, 16 mg/L, 8 mg/L, 4 mg/L, 2 mg/L y 1 mg/L. Control no hemolítico (columna 12), control de hemólisis (columna 1).

Mientras que los datos del grado de hemólisis de *H. pantostictus* se localizan en las Figuras 13 y 14, los que permiten saber que a partir de la concentración 128 mg/L provoca un alto grado de hemólisis en los glóbulos rojos pero en las concentraciones 64 mg/L, 32 mg/L, 16 mg/L, 8 mg/L, 4 mg/L, 2 mg/L y 1 existe un 0% de hemólisis.

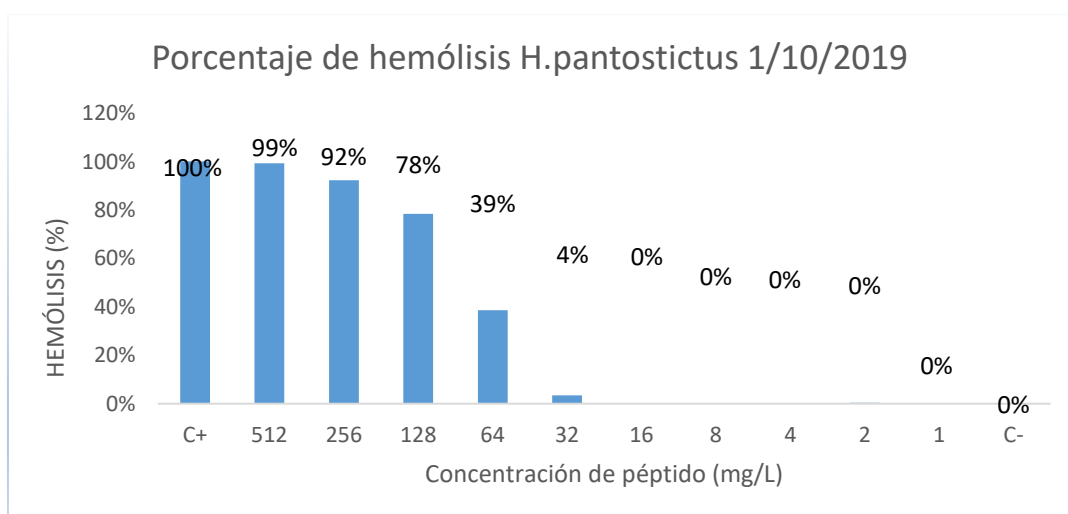


Figura 13. Porcentaje de hemólisis de péptido *Hyloscirtus pantostictus*

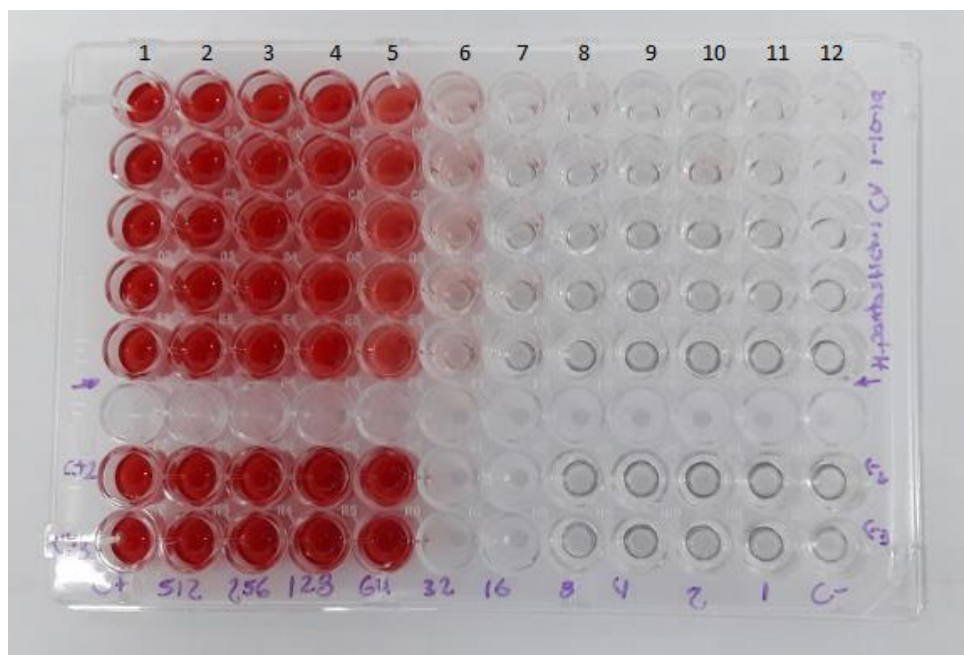


Figura 14. Efecto hemolítico de la secreción cutánea de *Hyloscirtus pantostictus*. Se observa la placa de microtitulación con cinco repeticiones para un individuo: Concentraciones: Columna 2 – 11 concentraciones: 512 mg/L, 256 mg/L, 128 mg/L, 64 mg/L, 32 mg/L, 16 mg/L, 8 mg/L, 4 mg/L, 2 mg/L y 1mg/L. Control no hemolítico (columna 12), control de hemólisis (columna 1).

5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Al realizar ANOVA de un factor se encontró un nivel de significación de ,000 en todas las pruebas de mínima concentración inhibitoria realizadas, lo cual quiere decir que existen diferencias estadísticas significativas entre ellos (Anexo 6 al 17). Por esta razón se efectuó la prueba de TUKEY a los mismos grupos de datos y de esta forma observar las diferencias.

Las pruebas de TUKEY realizadas se interpretan de la siguiente manera:

- En la prueba *Hyloscirtus pantostictus* contra *Staphylococcus aureus* (Anexo 18) el control negativo es estadísticamente diferente a la concentración 512 mg/L. La concentración 512 mg/L tiene una diferencia estadística significativa a las concentraciones 256 mg/L, 128 mg/L, 64 mg/L, 32 mg/L y 8 mg/L. La concentración 256 mg/L tiene diferencia estadística significativa con la

concentración 16 mg/L y 4 mg/L, pero se asemeja entre las concentraciones 128 mg/L, 64 mg/L, 32 mg/L y 8 mg/L. La concentración 32 mg/L es estadísticamente diferente a la concentración 2 mg/L, mientras que las concentraciones 28 mg/L, 64 mg/L, 16 mg/L y 8 mg/L son semejantes. Las concentraciones 128 mg/L y 64 mg/L tienen diferencias estadísticas significativas con la concentración 1 mg/L. Las concentraciones 16 mg/L, 8 mg/L, 4 mg/L y 2 mg/L son semejantes. La concentración 1 mg/L es estadísticamente diferente con el control positivo pero las concentraciones 16 mg/L, 8 mg/L, 4 mg/L y 2 mg/L son semejantes. El control positivo es estadísticamente diferente a las demás concentraciones.

- En la prueba *Hyloscirts pantostictus* contra *Serratia marcescens* (Anexo 19) el control negativo es estadísticamente diferente a las demás concentraciones. La concentración 512 mg/L se asemeja a la 256 mg/L, pero la concentración 256 mg/L tiene diferencia estadística significativa con la concentración 128 mg/L. La concentración 128 mg/L es estadísticamente diferente a las concentraciones 64 mg/L, 32 mg/L y control positivo. El control positivo, las concentraciones 16 mg/L, 8 mg/L, 4 mg/L, 2 mg/L y 1 mg/L tienen diferencia estadística significativa las demás concentraciones.

- En la prueba *Hyloscirts pantostictus* contra *Candida albicans* (Anexo 20) el control negativo es estadísticamente diferente a las demás concentraciones. El control positivo, las concentraciones 512 mg/L, 256 mg/L, 128 mg/L, 64 mg/L, 32 mg/L, 16 mg/L, 8 mg/L, 4 mg/L, 2 mg/L y 1 mg/L son semejantes, pero son estadísticamente diferente a las demás concentraciones.

- En la prueba *Hyloscirts pantostictus* contra *Escherichia coli* (Anexo 21) las concentraciones 512 mg/L y 256 mg/L son semejantes el control negativo tiene diferencia estadística significativa con la concentración 128 mg/L. Las concentraciones 512 mg/L, 256 mg/L y 128 mg/L son diferentes estadísticamente con la concentración 64 mg/L. La concentración 64 mg/L tiene diferencia estadística significativa con las demás concentraciones. La concentración 32 mg/L tiene diferencia estadística significativa con el control positivo, pero las concentraciones 16 mg/L, 8 mg/L, 4 mg/L, 2 mg/L y 1 mg/L son semejantes.

- En la prueba *Hyloscirtus pantostictus* contra *Klebsiella pneumoniae* (Anexo 22) el control negativo es estadísticamente diferente a las demás concentraciones. La concentración 128 mg/L es semejante, pero la concentración 512 tiene diferencia estadística significativa con las concentraciones 256 mg/L, 64 mg/L, 32 mg/L, 16 mg/L, 8 mg/L, 4 mg/L, 2 mg/L, 1 mg/L y control positivo. Las concentraciones 256 mg/L, 64 mg/L, 32 mg/L, 16 mg/L, 8 mg/L, 4 mg/L, 2 mg/L, 1 mg/L y control positivo sin diferentes de forma significativa.
- En la prueba *Hyloscirtus lindae* contra *Klebsiella pneumoniae* (Anexo 23) el control positivo es estadísticamente diferente a las demás concentraciones. La concentración 512 mg/L tiene diferencia estadística significativa con las concentraciones 128 mg/L, 64 mg/L, 32 mg/L, 4 mg/L, 1 mg/L y control positivo, pero concentraciones 256 mg/L, 16 mg/L, 8 mg/L y 2 mg/L son semejantes. Las concentraciones 128 mg/L, 64 mg/L, 32 mg/L, 4 mg/L, 1 mg/L son semejantes.
- En la prueba *Hyloscirtus lindae* contra *Staphylococcus aureus* (Anexo 24) el control negativo tiene diferencia estadística significativa con las demás concentraciones. La concentración 512 mg/L tiene diferencia estadística significativa con las demás concentraciones. La concentración 64 mg/L tiene diferencia estadística significativa con la concentración 1 mg/L pero las concentraciones 256 mg/L, 128 mg/L, 32 mg/L, 16 mg/L, 8 mg/L, 4 mg/L y 2 mg/L se asemejan. La concentración 1 mg/L se asemeja a las concentraciones 256 mg/L, 128 mg/L, 32 mg/L, 16 mg/L, 8 mg/L, 4 mg/L y 2 mg/L. Control positivo tiene diferencia estadística significativa con las demás concentraciones.
- En la prueba *Hyloscirtus lindae* contra *Escherichia coli* (Anexo 25) el control negativo, la concentración 512 mg/L y 256 mg/L tienen diferencias estadísticas significativas con las demás concentraciones. La concentración 128 es estadísticamente diferente a las demás concentraciones. La concentración 64 tiene diferencia estadística significativa con las demás concentraciones. El control positivo, las concentraciones 32 mg/L, 16 mg/L, 8 mg/L, 4 mg/L, 2 mg/L y 1 mg/L son semejantes, pero estadísticamente diferente a las demás concentraciones.

- En la prueba *Hyloscirtus lindae* contra *Candida albicans* (Anexo 26) el control negativo es estadísticamente diferente a las demás concentraciones. La concentración 512 mg/L tiene diferencia estadística significativa con las demás concentraciones. Las concentraciones 256 mg/L, 128 mg/L, 64 mg/L, 32 mg/L, 16 mg/L, 8 mg/L, 4 mg/L, 2 mg/L y 1 mg/L son estadísticamente diferentes a las demás concentraciones. El control positivo tiene diferencia estadística significativa con las demás concentraciones.

- En la prueba *Hyloscirtus lindae* contra *Serratia marcescens* (Anexo 27) el control negativo tiene diferencia estadística significativa con las demás concentraciones. Las concentraciones 512 mg/L y 256 mg/L se asemejan, pero tienen diferencias estadísticas significativas con las demás concentraciones. Las concentraciones 128 mg/L y 64 mg/L se asemejan, pero tienen diferencias estadísticas significativas con las demás concentraciones. Las concentraciones 32 mg/L, 16 mg/L, 8 mg/L, 4 mg/L, 2 mg/L, 1 mg/L y control positivo se asemejan, pero tienen diferencias estadísticas significativas con las demás concentraciones.

6. DISCUSIÓN

Como parte de su inmunidad innata, los anfibios producen un sinnúmero de péptidos antimicrobianos que potencialmente podrían resultarle letales (Montaño-Pérez y Vargas-Albores, 2002; Proaño-Bolaños et al., 2016; Schadich, 2009; Vargas Hurtado, 2012) y en la actualidad se pretende aprovechar la existencia de estas moléculas, para usarlas en el control del crecimiento de microorganismos patógenos para el ser humano.

La mayor parte de los péptidos antimicrobianos con importantes actividades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, etc., han sido extraídos de las secreciones cutáneas de especies de anuros de la familia Hylidae (Schadich, 2009; Mirski, Niemcewicz, Bartoszcze, Gryko y Michalski, 2018).

Tomando en cuenta que dentro de este grupo taxonómico no se han realizado estudios de bioprospección de especies del género *Hylascirtus*, en el presente trabajo se decidió hacer determinar la actividad antimicrobiana de las secreciones cutáneas totales de dos especies de este género: *Hyloscirtus lindae* y *Hyloscirtus pantostictus*.

En cuanto a la parte metodológica, para la obtención de las secreciones cutáneas, en estudios anteriores en el LICBA, se estandarizó el uso del Estimulador Transcutáneo para Anfibios (TAS) (Llumiquinga, 2017; Vallejo Rodríguez, 2016); sin embargo, Cilveti (2013) y Cajiao (2018) consiguieron obtener las secreciones tan solo con masajes estimuladores en el dorso de los especímenes. Con el objetivo de ocasionar el menor impacto posible sobre los individuos experimentales, en este trabajo se probaron las dos metodologías, y se llegó a determinar que tanto en *H. lindae* y *H. pantostictus*, las estimulaciones manuales no fueron suficientes para obtener cantidades adecuadas de secreciones, por lo que los individuos fueron sometidos a estimulaciones eléctricas, de 4 a 6 voltios dependiendo del tamaño del individuo. Cabe mencionar que, con estos voltajes, no se ocasionó ningún tipo de daño a las ranitas estudiadas y por el contrario el uso del TAS resultó sumamente eficiente, pues permitió obtener grandes cantidades de secreción.

El hecho de que las secreciones cutáneas de ambas especies presentaron características físico-químicas similares tales como: consistencia viscosa, color blanco, olor a frejol y que resultaron irritantes de las mucosas nasales, ratifican el hecho de que estas son especies de hílidos estrechamente emparentadas, tal como se puede constatar en el árbol filogenético de este grupo de anuros (Anexo 28). Una característica que llamó la atención, precisamente fue el hecho de que sean secreciones irritantes de las mucosas nasales, lo cual puede deberse a la presencia de compuestos volátiles, tal como varios autores lo reportan para otras especies, no solo de miembros de la familia Hylidae como: *Litoria caerulea* e *Hypsiboas pulchellus*, sino a especies como *Heleioporus* spp. de la familia Leptodactylidae (Brunetti, 2014; Smith, Williams, Tyler, y Williams, 2004).

Al momento de pesar las secreciones liofilizadas obtenidas, la cantidad de las mismas varió entre los individuos, lo cual podría estar en relación a la estimulación a la cual es sometida la rana mediante el TAS, pues el voltaje utilizado es proporcional al tamaño del individuo (Clark, 2009). Por ello, y para disponer de la cantidad suficiente de secreción para poder llevar a cabo los análisis, se tomó la decisión realizar una mezcla de las secreciones de todos los individuos de una misma especie. Sin embargo, es necesario tomar en cuenta a futuro, la procedencia geográfica de los especímenes a analizarse, puesto que el ambiente podría estar determinando una expresión génica diferenciada (Álvarez et al., 2011).

En relación a las pruebas antimicrobianas, se hace necesario resaltar que al realizar los antibiogramas aplicando la técnica de difusión por disco, los resultados fueron prácticamente nulos, pues se detectó que la secreción de *H. lindae* produjo un halo de inhibición solo contra *Staphylococcus aureus* a una concentración sumamente alta (4000 mg/L) (Figura 3 A), mientras que *Hyloscirtus pantostictus* no mostró actividad sobre ninguno de los microorganismos analizados (Figuras 2 B, 3 B, 4 B, 5 B y 6 B). Sin embargo, al aplicar la técnica de microdilución en caldo para determinar el MIC, se detectó actividad antimicrobiana de las secreciones de *H. lindae* y *H. pantostictus* sobre *E. coli* a concentraciones mínimas inhibitorias de 256 mg/L y 128 mg/L, respectivamente. Esto nos permite deducir que la técnica de microdilución en caldo es una técnica con mayor

sensibilidad que la de difusión por disco, pues se basa en lecturas de absorbancia que proporcionan mayor precisión y confiabilidad, evitando a través de estas lecturas, emitir falsos negativos. Se esperaba que las secreciones *H. lindae* y *H. pantostictus* tengan una amplia actividad antibiótica sobre los microorganismos utilizados, debido a que, como se mencionó anteriormente, según la literatura se han encontrado variedad de AMPs con importante bioactividad procedentes de secreciones cutáneas de especies de ranas de la familia Hylidae (Cajiao, 2018; Llumiquinga, 2017; Proaño-Bolaños et al., 2019), familia a la que pertenecen las dos especies analizadas en esta investigación.

Se podría pensar que la ausencia de actividad antimicrobiana detectada en las secreciones analizadas podría deberse a la desnaturalización de los péptidos presentes en ella; por ello, cabe enfatizar que las secreciones cutáneas totales recién extraídas, fueron guardadas a -20 °C, de acuerdo a lo recomendado en la literatura, donde se indica el que el rango de temperatura de almacenamiento de estas, debe ser entre -20 °C a -80 °C (Clark, 2009), descartándose así esta posibilidad.

Con respecto a los ensayos hemolíticos, se pudo observar que las concentraciones de las secreciones de *H. lindae* a 256 mg/L y *H. pantostictus* a 128 mg/L, tuvieron actividad inhibitoria contra *Escherichia coli*, las mismas presentan un alto porcentaje de hemólisis, de 96% y 78%, respectivamente. Hay que considerar que, al ser una secreción total, sin duda estará formada por muchos AMPs, de los cuales uno o varios, podrán ser los responsables de la actividad antibacteriana detectada en este trabajo, contra *E. coli*, y otro u otros AMPs, podrían ser los que ocasionen la lisis de los eritrocitos. Es por ello que se hace necesario, emplear técnicas como el clonaje molecular o espectrometría de masas, para aislar, purificar y caracterizar los péptidos responsables de las bioactividades antes mencionadas.

En definitiva, las secreciones cutáneas de *H. lindae* y *H. pantostictus*, constituyen una probable fuente de péptidos antimicrobianos que inhibirían el crecimiento de *E. coli*, lo que potenciaría la posibilidad de contribuir a generar una terapia alternativa que, por su posible mecanismo de acción, tenga baja probabilidad de causar resistencia en este microorganismo.

7. CONCLUSIONES

- De las dos especies de anfibios analizados, solo las secreciones cutáneas totales de *Hyloscirtus lindae* presentaron actividad antibiótica en las pruebas de difusión por disco, a la concentración de 4000 mg/L sobre la cepa bacteriana ATCC de *Staphylococcus aureus*.
- Las secreciones cutáneas totales de *H. lindae* presentó una concentración mínima inhibitoria para *Escherichia coli* a una concentración de 256 mg/L e *Hylocirtus pantostictus* para la misma bacteria una concentración de 128 mg/L.
- La especie *Hyloscirtus lindae* presentó una actividad bactericida para *Escherichia coli* a una concentración 512 mg/L, pero actividad bacteriostática en una concentración 256 mg/L; mientras que la secreción de *Hyloscirtus pantostictus* presentó una actividad bactericida para la misma bacteria en una concentración 512 y 256 mg/L, pero con la concentración 128 mg/L se observó actividad bacteriostática.
- Los ensayos con microdilución en caldo, son más sensibles comparando con los antibiogramas de difusión.
- La secreción cutánea de *H. lindae* presenta hemólisis a partir de la concentración 8 mg/L, mientras que de *H. pantostictus* se observa hemólisis desde la concentración 32 mg/L.
- Los ensayos de mínima concentración bactericida demostraron que las secreciones cutáneas de *H. lindae* y *H. pantostictus* tuvieron actividad bactericida y bacteriostática en distintas concentraciones.

- En definitiva, la obtención de resultados, permiten evidenciar los efectos antibióticos de las secreciones cutáneas totales de las dos especies contra *Escherichia coli*, debido a sus compuestos bioactivos, por lo tanto son una probable solución viable que contribuya a solucionar el grave problema la salud pública, como lo es el de la resistencia bacteriana.

8. RECOMENDACIONES

1. Tener la precaución de seguir rigurosamente los protocolos de transporte y congelación establecidos para muestras recién extraídas para así minimizar la posibilidad de la pérdida de las propiedades de los AMPs contenidos en las secreciones cutáneas totales.

2. Realizar, no solo pruebas de difusión por disco, sino también pruebas de microdilución ya que esta es una técnica más sensible que permitiría revelar actividad antimicrobiana, que no sea detectada con el método de antibiogramas con disco; esto ayudará a tener mejores resultados.

3. Aislar, purificar y caracterizar los AMPs contenidos en las secreciones cutáneas totales de *Hyloscirtus lindae* e *Hyloscirtus pantostictus*, para detectar cuál, o cuáles de ellos presentan la actividad antibacteriana detectada contra *Escherichia coli*.

4. Cuando exista algún grado de citotoxicidad se debe recordar que es una secreción cutánea total, por lo cual se debe realizar análisis que permitan ver esa composición y ver cuál es la molécula específica que presenta esa actividad.

5. Para futuras investigaciones cuando se realice la mezcla de péptidos por falta de cantidad suficiente, tomar la precaución de que fueron recolectados en la misma localidad, debido a que podría existir posibles diferencias epigenéticas.

6. Se debe realizar más trabajos con este género, para ver si existe actividad antibiótica en las secreciones de otras especies.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcocer, I. (2020). Manual de Laboratorio de Microbiología. Quito: Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Allegranzi, B., Kilpatrick, C., Storr, J., Kelley, E., Park, B. J. y Donaldson, L. (2017). Global infection prevention and control priorities 2018–22: a call for action. *The Lancet Global Health*, 5(12), e1178–e1180. doi: 10.1016/S2214-109X(17)30427-8
- Almendáriz, A., Brito, J. M., Batallas, D. y Ron, S. R. (2014). Una especie nueva de rana arbórea del género *Hyloscirtus* (Amphibia: Anura: Hylidae) de la Cordillera del Cóndor. *Papéis Avulsos de Zoología*, 54(4), 33–49.
- Alós, J. I. (2015). Antibiotic resistance: A global crisis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. doi: 10.1016/j.eimc.2014.10.004
- Ayala, J., Jibaja, T., Sotelo, E., Montaña, V., Soler, A. y Armas, A. (2019). Efecto antimicótico del timol sobre cepas de *Candida albicans*: estudio in vitro. *Revista KIRU*, 16(4), 141–146. doi: 10.24265/kiru.2019.v16n4.02
- Bahar, A. y Ren, D. (2013). Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 6(12), 1543–1575. doi: 10.3390/ph6121543
- Beceiro, A., Tomás, M. y Bou, G. (2012). Resistencia a los antimicrobianos y virulencia, ¿una asociación beneficiosa para el mundo microbiano? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(8), 492–499. doi: 10.1016/j.eimc.2012.01.011
- Bhullar, K., Waglechner, N., Pawlowski, A., Koteva, K., Banks, E. D., Johnston, M. D., Barton, H. y Wright, G. D. (2012). Antibiotic Resistance Is Prevalent in an Isolated Cave Microbiome. *PLoS ONE*, 7(4). doi: 10.1371/journal.pone.0034953
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 238–250. doi: 10.1038/nrmicro1098
- Brunetti, A. (2014). *Comunicación química de anuros: una perspectiva integral a partir de aspectos comportamentales, morfológicos y químicos en dos especies de Hypsiboas* (Amphibia: Anura: Hylidae) (Tesis doctoral). Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. Recuperado de https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/collection/tesis/document/tesis_n5622_

Brunetti

- Caicedo, A. (2007). *Análisis de secreciones peptídicas de anfibios ecuatorianos con pruebas de susceptibilidad en bacterias patógenas* (Disertación de pregrado). Pontificia Universidad Católica Del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Cajiao, V. (2018). *Determinación de la bioactividad de fracciones peptídicas de *Agalychnis spurrelli* y *Phyllomedusa tomopterna* (Anura: Hylidae)* (Disertación de pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador. Recuperado de <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/15832>
- Cilveti, C., Rivera, M., Rodríguez, M. y Alcocer, I. (2013). Secreciones peptídicas de anfibios nativos ecuatorianos. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*. Recuperado de <http://investigaciones.puce.edu.ec/handle/23000/502>
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2019). M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th edición. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute
- Coloma, L. A., Frenkel, C., Ron, S. R. y Páez-Rosales, N. (2018a). *Hyloscirtus lindae*. Recuperado de [https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/Hyloscirtus lindae](https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/Hyloscirtus%20lindae)
- Coloma, L. A., Frenkel, C., Ron, S. R. y Páez-Rosales, N. (2018). *Hyloscirtus pantostictus*. Recuperado de [https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/Hyloscirtus pantostictus](https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/Hyloscirtus%20pantostictus)
- Conlon, J. M. (2011). Structural diversity and species distribution of host-defense peptides in frog skin secretions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(13), 2303–2315. doi: 10.1007/s00018-011-0720-8
- Conlon, M. y Mechkarska, M. (2014). Host-defense peptides with therapeutic potential from skin secretions of frogs from the family Pipidae. *Pharmaceuticals*, 7(1), 58–77. doi: 10.3390/ph7010058
- Cuesta, S., Gallegos, F., Arias, J., Pilaquina, F., Blasco-Zúñiga, A., Proaño-Bolaños, C., Rivera, M. y Meneses, L. (2019). Molecular modeling of four Dermaseptin-related peptides of the gliding tree frog *Agalychnis spurrelli*. *Journal of Molecular Modeling*, 25(9), 1–12. doi: 10.1007/s00894-019-4141-1
- Cusquipoma Echeverría, M. (2018). *Efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de las hojas de *Ruta graveolens* (RUDA) sobre *Candida albicans** (Disertación

- de pregrado). Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, Trujillo, Perú. Recuperado de <http://repositorio.uladech.edu.pe/handle/123456789/5105>
- da Cunha, N. B., Cobacho, N. B., Viana, J. F. C., Lima, L. A., Sampaio, K. B. O., Dohms, S., Ferreira, Arthur C., de la Fuente-Núñez, C., Costa, F., Franco, O. y Dias, S. C. (2017). The next generation of antimicrobial peptides (AMPs) as molecular therapeutic tools for the treatment of diseases with social and economic impacts. *Drug Discovery Today*, 22(2), 234–248. doi: 10.1016/j.drudis.2016.10.017
- Dillón, X. (2012). Identificación de fracciones con actividad antimicrobiana obtenidas del exudado de la piel de *Agalychnis spurrelli* (Anura:Hylidae) (Disertación de pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador. Recuperado de <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/4879>
- Di Venanzio, G. (2014). *Mecanismos de patogénesis de Serratia marcescens* (Disertación de pregrado). Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina. Recuperado de [http://rehip.unr.edu.ar/bitstream/handle/2133/10304/Tesis Di Venanzio Final.pdf?sequence=3&isAllowed=y](http://rehip.unr.edu.ar/bitstream/handle/2133/10304/Tesis_Di_Venanzio_Final.pdf?sequence=3&isAllowed=y)
- Felício, M., Silva, O., Gonçalves, S., Santos, N. y Franco, O. L. (2017). Peptides with dual antimicrobial and anticancer activities. *Frontiers in Chemistry*, 5(Feb), 1–9. doi: 10.3389/fchem.2017.00005
- Grant, J. B. y Land, B. (2002). Transcutaneous Amphibian Stimulator (TAS): A device for the collection of amphibian skin secretions. *Herpetological Review*, 33(1), 38–41.
- Hartel, R. W., Editors, A., Clark, J. P. y Finley, J. W. (2015). *Detection and Typing Strategies for Pathogenic Escherichia coli*. doi: 10.1007/978-1-4939-2346-5
- Hernández, C. (2016). *Efecto del aceite esencial de chrysactinia mexicana gray en aislados clinicos de Candida albicans de mujeres con neoplasia intraepitelial* (Disertación de pregrado). Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México. Recuperado de [http://ninive.uaslp.mx/xmlui/bitstream/handle/i/4778/Tesis de licenciatura Cristian Mendoza Hernandez.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://ninive.uaslp.mx/xmlui/bitstream/handle/i/4778/Tesis_de_licenciatura_Cristian_Mendoza_Hernandez.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Hervé, B., Chomali, M., Gutiérrez, C., Luna, M., Rivas, J., Blamey, R., Espinoza,

- R., Izquierdo, G., Cabezas, C., Álvarez, C. y De La Fuente, S. (2015). Brote de infección nosocomial por *Serratia marcescens* asociado a contaminación intrínseca de clorhexidina acuosa. *Revista Chilena de Infectología*, 32(5), 517–522. doi: 10.4067/S0716-10182015000600004
- Lakhundi, S. y Zhang, K. (2018). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews*. doi: 10.1128/CMR.00020-18
- Llumiquinga, M. (2017). *Potencial antimicrobiano de la secreción cutánea total de anuros ecuatorianos sobre cepas bacterianas tipo y aislados clínicos* (Disertación de pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador. Recuperado de [http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/13218/Potencial antimicrobiano de la secreción cutánea total de anuros ecuatorianos sobre cepas bacteri.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/13218/Potencial%20antimicrobiano%20de%20la%20secreci%C3%B3n%20cut%C3%A1nea%20total%20de%20anuros%20ecuatorianos%20sobre%20cepas%20bacteri.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Lopez-Meza, J., Ochoa-Zarzosa, A., Aguilar, J. y Loeza-Lara, P. (2011). Antimicrobial Peptides: Diversity and Perspectives for Their Biomedical Application. In *Biomedical Engineering: Trends, Research and Technologies* (Vol. i, pp. 275–304). doi: 10.5772/57353
- López Vargas, J. y Echeverri Toro, L. (2010). *K. pneumoniae*: ¿The new “superbacteria”? Pathogenicity, epidemiology and resistance mechanisms. *Iatreia*, 23(2), 157–165.
- McArthur, A. G., Waglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M. A., Baylay, A. J., Bhullar, K., Canova, M., De Pascale, G., Ejim, L., Kalan, L., King, A., Koteva, K., Morar, M., Mulvey, M., O'Brien, J., Pawlowski, A., Piddock, L., Spanogiannopoulos, P., Sutherland, A., Tang, I., Taylor, P., Thaker, M., Wang, W., Yan, M., Yu, T. y Wright, G. D. (2013). The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(7), 3348–3357. doi: 10.1128/AAC.00419-13
- Mirski, T., Niemcewicz, M., Bartoszcze, M., Gryko, R. y Michalski, A. (2018). Utilisation of peptides against microbial infections – a review. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 25(2), 205–210. doi: 10.26444/aaem/74471
- Montaño-Pérez, K., & Vargas-Albores, F. (2002). Péptidos antimicrobianos: Un mecanismo de defensa ancestral con mucho futuro. *Interciencia*, 27(1), 21–

27.

- Mosquera, D. (2016). *Klebsiella pneumoniae*, la bacteria más resistente en hospitales del país. Recuperado de <https://www.edicionmedica.ec/secciones/salud-publica/klebsiella-pneumoniae-la-bacteria-m-s-resistente-en-hospitales-del-pa-s-88613>
- Nguyen, L. T., Haney, E. F. y Vogel, H. J. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*. doi: 10.1016/j.tibtech.2011.05.001
- Organización Mundial de la Salud (2018). Datos recientes revelan los altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/detail/29-01-2018-high-levels-of-antibiotic-resistance-found-worldwide-new-data-shows>
- Organización Mundial de la Salud (2020). Carga mundial de infecciones asociadas a la atención sanitaria. Recuperado de https://www.who.int/gpsc/country_work/burden_hcai/es/
- Ortega-Paredes, D., Barba, P., Mena-lópez, S., Espinel, N., Crespo, V. y Zurita, J. (2019). High quantities of multidrug-resistant *Escherichia coli* are present in the Machángara urban river in Quito, Ecuador. *Journal of Water and Health*, 18(1), 67–76. doi: 10.2166/wh.2019.195
- Oteo Iglesias, J. (2019). Comprendiendo la resistencia a antibióticos. *Revista de Investigación y Educación En Ciencias de La Salud (RIECS)*, 4(2), 84–89. doi: 10.37536/riecs.2019.4.2.164
- Paczosa, M. K. y Mecsas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 629–661. doi: 10.1128/mnbr.00078-15
- Pasachova, J., Ramirez, S. y Munoz, L. (2019). *Staphylococcus aureus*: generalidades , mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *NOVA*, 17(32), 25–38. doi: 10.25058/24629448.1030
- Paz, A. (2015). *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de betalactamasas en pacientes con infección del tracto urinario. *Revista Cubana de Medicina Intensiva y Emergencias*, 14(4), 16–29. Recuperado de http://www.revmie.sld.cu/index.php/mie/article/view/114/html_30#.XVjfh53aUa
E.mendeley
- Prats, G. (2013). *Microbiología y Parasitología Médicas* (1ª). Madrid: Editorial

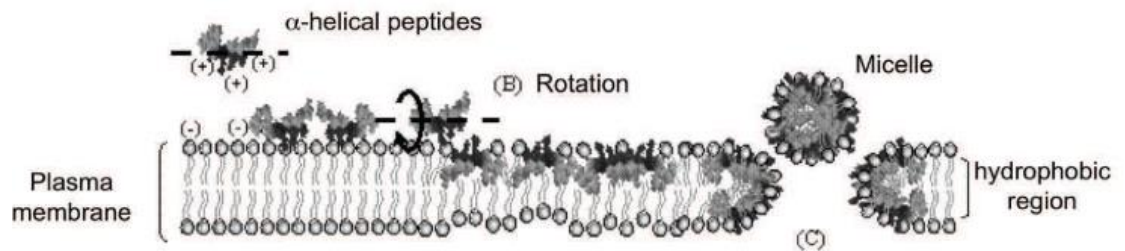
Panamericana.

- Proaño-Bolaños, C., Blasco-Zúñiga, A., Almeida, J. R., Wang, L., Llumiquinga, M. A., Rivera, M., Zhou, M., Chen, T. y Shaw, C. (2019). Unravelling the skin secretion peptides of the gliding leaf frog, *Agalychnis spurrelli* (hylidae). *Biomolecules*, 9 (11). doi: 10.3390/biom9110667
- Proaño-Bolaños, C., Zhou, M., Wang, L., Coloma, L. A., Chen, T. y Shaw, C. (2016). Peptidomic approach identifies cruzioseptins, a new family of potent antimicrobial peptides in the splendid leaf frog, *Cruziohyla calcarifer*. *Journal of Proteomics*, 146, 1–13. doi: 10.1016/j.jprot.2016.06.017
- Rodriguez, S., Chamorro, S., Marti, E., Huerta, B., Gros, M., Barceló, D., Barceló, D., Sánchez, A. Borrego, C. y Balcázar, J. (2014). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Research*, 69, 234–242. doi: 10.1016/j.watres.2014.11.021
- Sanchez-Otero, J. (2017). Introducción al diseño experimental. Quito: Giro Creativo
- Schadich, E. (2009). Skin Peptide Activities against Opportunistic Bacterial Pathogens of the African Clawed Frog (*Xenopus laevis*) and Three Litoria Frogs. *Journal of Herpetology*, 43 (2), 173–183. doi: 10.1670/08-113r1.1
- Serra Valdéz, M. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 16 (3), 402–419.
- Smith, B., Williams, C., Tyler, M. y Williams, B. (2004). A survey of frog odorous secretions, their possible functions and phylogenetic significance. *Applied Herpetology*, 2(1), 47–82. doi: 10.1163/1570754041231587
- Soria, C., Nieto, N., Villacís, J., Lainez, S. y Cartelle, M. (2016). Brote por *Serratia marcescens* en una Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales: Guayaquil-Ecuador. *Revista Chilena de Infectología: Organo Oficial de La Sociedad Chilena de Infectología*, 33(6), 703–705. doi: 10.4067/S0716-10182016000600016
- Torcato, I., Castanho, M. y Henriques, S. (2012). The Application of Biophysical Techniques to Study Antimicrobial Peptides. *Spectroscopy: An International Journal*, 27(5–6), 541–549. doi: 10.1155/2012/460702

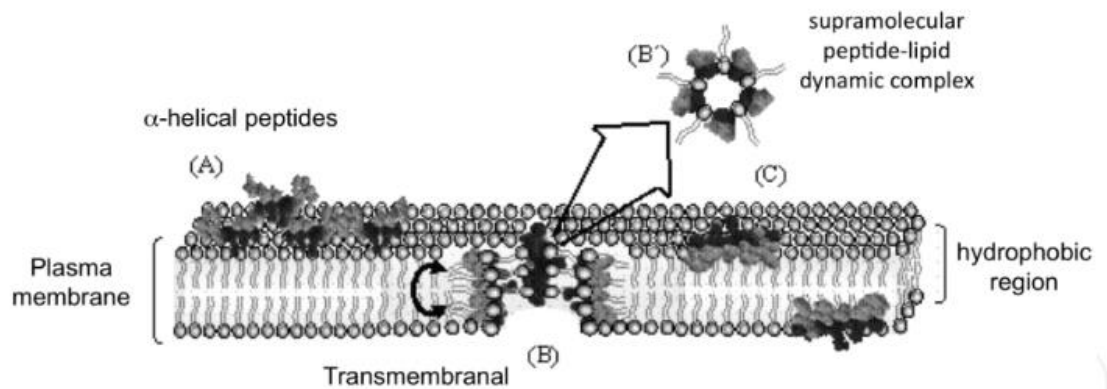
- Torres, M., Sothiselvam, S., Lu, T. y de la Fuente-Nunez, C. (2019). Peptide Design Principles for Antimicrobial Applications. *Journal of Molecular Biology*, (2019). doi: 10.1016/j.jmb.2018.12.015
- Vallejo Rodríguez, G. (2016). *Identificación de secreciones peptídicas de 15 especies de anuros amazónicos con actividad antimicrobiana y anticancerígena y su aporte como servicio ecosistémico de tipo provisión* (Tesis de posgrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador. Recuperado de <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/11021>
- Vargas Hurtado, A. (2012). *Pruebas antimicrobianas de secreciones cutáneas de *Agalychnis spurrelli* (Anura: Hylidae) en cinco especies de levaduras patógenas del género *Candida** (Disertación de pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador. Recuperado de <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/4929>
- Zhang, L. y Gallo, R. (2016). Antimicrobial peptides. *Current Biology*, 26(1), R14–R19. doi: 10.1016/j.cub.2015.11.017

10. ANEXOS

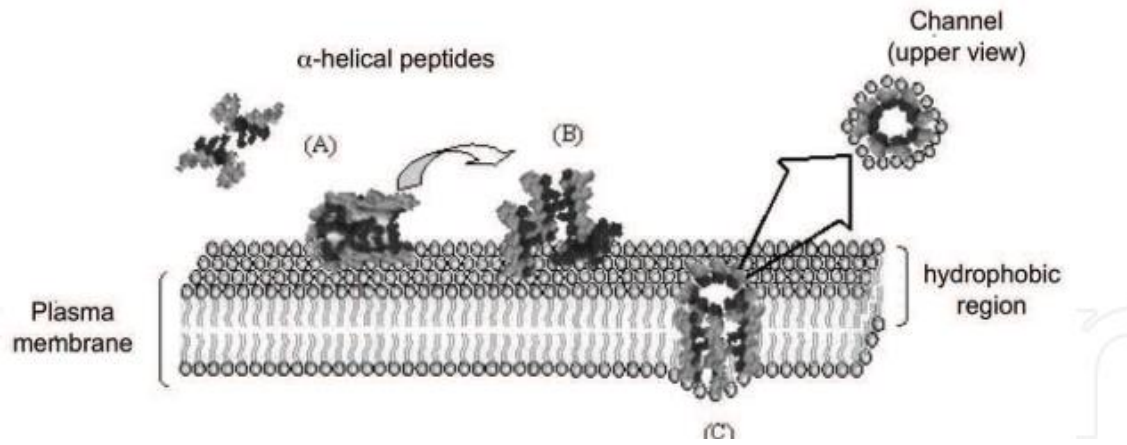
Anexo 1. Esquema del modelo de alfombran. (Tomado de Lopez-Meza et al., 2011)



Anexo 2. Esquema del modelo de poro toroidal (Tomado de Lopez-Meza et al., 2011)



Anexo 3. Esquema del modelo de poro de barril (Tomado de Lopez-Meza et al.,2011)



Anexo 4. Datos específicos de ranas analizadas. (Tomado de la base de datos del programa de conservación “Balsa de los Sapos” de la PUCE).

| ESPECIE | TERRARIO | N° INDIVIDUOS | SERIE DE CAMPO | PROVINCIA | POBLADO | ALTITUD (m) | LATITUD | LONGITUD |
|---------------------------------|----------|---------------|----------------|-----------|---------------|-------------|--------------------|---------------|
| <i>Hyloscirtus lindae</i> | 4378 | 2 | | Pichincha | Papallacta | 2722 | -0,37902 | -78,07366 |
| <i>Hyloscirtus lindae</i> | 4379 | 2 | | Pichincha | Papallacta | 2722 | -0,37902 | -78,07366 |
| <i>Hyloscirtus lindae</i> | 3452 | 1 | 31034 | Napo | Papallacta | 2630 | | |
| <i>Hyloscirtus lindae</i> | 3759 | 1 | | Napo | Papallacta | 2628 | -0,38765 | -78,06187 |
| <i>Hyloscirtus lindae</i> | 3974 | 1 | | Napo | Papallacta | 2628 | -0,38765 | -78,06187 |
| <i>Hyloscirtus lindae</i> | 3455 | 1 | 31034 | Napo | Papallacta | 2630 | | |
| <i>Hyloscirtus lindae</i> | 3453 | 1 | 32540 | Sucumbíos | | 2800 | 0,63992 | -77,50762 |
| <i>Hyloscirtus pantostictus</i> | 3300 | 1 | 32540 | Sucumbíos | | 2800 | 0,63992 | -77,50762 |
| <i>Hyloscirtus pantostictus</i> | 3050 | 1 | 32519 | Sucumbíos | | 2826 | 0,63286 | -77,52315 |
| <i>Hyloscirtus pantostictus</i> | 3454 | 1 | 32540 | Sucumbíos | | 2800 | 0,63992 | -77,50762 |
| <i>Hyloscirtus pantostictus</i> | 1332 | 1 | 24313 | Sucumbíos | Santa Bárbara | | | |
| <i>Hyloscirtus pantostictus</i> | 3103 | 1 | | Sucumbíos | Santa Bárbara | 2709 | S00.64'4 5''N | 77,52''28'W |
| <i>Hyloscirtus pantostictus</i> | 3275 | 1 | | Sucumbíos | Santa Bárbara | 2709 | S00.64'4 5''N | 77,52''28'W |
| <i>Hyloscirtus pantostictus</i> | 3072 | 1 | | Sucumbíos | Santa Bárbara | 2586 | 00.38'37. 1''N | 77.31''56.3'W |
| <i>Hyloscirtus pantostictus</i> | 3448 | 2 | 31032 | Napo | Papallacta | 2630 | | |
| <i>Hyloscirtus pantostictus</i> | 3447 | 2 | 31041 31048 | Carchi | | 2806 | S00.48'5 1.8''N | 78.00''52.6'W |
| <i>Hyloscirtus pantostictus</i> | 3446 | 2 | 32519 24310 | Sucumbíos | | 2826 | 0,63286 | -77,52315 |

Anexo 5. Detalles del protocolo para la liofilización de secreciones cutáneas totales de anfibios (Tomado de Dillón, 2012).

Current Recipe: C:\Virtis\peptidos6.rcw Values loaded from disk file

Recipe Number

Extraccion

F2 Synoptic

F3 PC Save

F4 Print

F7 Write

F8 Read

Thermal Treatment

| | Temp | Time | R/H |
|---------|------|------|-----|
| Step 1 | 10 | 20 | H |
| Step 2 | -40 | 240 | R |
| Step 3 | -40 | 30 | H |
| Step 4 | 0 | 0 | |
| Step 5 | 0 | 0 | |
| Step 6 | 0 | 0 | |
| Step 7 | 0 | 0 | |
| Step 8 | 0 | 0 | |
| Step 9 | 0 | 0 | |
| Step 10 | 0 | 0 | |
| Step 11 | 0 | 0 | |
| Step 12 | 0 | 0 | |

Freeze

Extra Freeze

Condenser

Vacuum

Secondary SP

Primary Drying

| | Temp | Time | Vacuum | R/H |
|---------|------|------|--------|-----|
| Step 1 | -40 | 30 | 100 | H |
| Step 2 | -10 | 300 | 100 | R |
| Step 3 | -10 | 20 | 100 | H |
| Step 4 | 20 | 300 | 100 | R |
| Step 5 | 20 | 10 | 100 | H |
| Step 6 | 0 | 0 | 0 | |
| Step 7 | 0 | 0 | 0 | |
| Step 8 | 0 | 0 | 0 | |
| Step 9 | 0 | 0 | 0 | |
| Step 10 | 0 | 0 | 0 | |
| Step 11 | 0 | 0 | 0 | |
| Step 12 | 0 | 0 | 0 | |
| Step 13 | 0 | 0 | 0 | |
| Step 14 | 0 | 0 | 0 | |
| Step 15 | 0 | 0 | 0 | |
| Step 16 | 0 | 0 | 0 | |

Post Ht

Anexo 6. Prueba de ANOVA de *Hyloscirtus lindae* contra *Candida albicans*.

ANOVA

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|-------------------|-----|------------------|--------|------|
| Entre grupos | 2,324 | 11 | 0,211 | 55,783 | 0 |
| Dentro de grupos | 0,814 | 215 | 0,004 | | |
| Total | 3,138 | 226 | | | |

Anexo 7. Prueba de ANOVA de *Hyloscirtus lindae* contra *Escherichia coli*.

| ANOVA | | | | | |
|---------------------|-----------------------------------|-----------|----------------------------------|----------|-------------|
| | Suma de cuadrado s | gl | Media cuadrátic a | F | Sig. |
| Entre grupos | 59,082 | 11 | 5,371 | 306,492 | 0 |
| Dentro de grupos | 4,013 | 229 | 0,018 | | |
| Total | 63,096 | 240 | | | |

Anexo 8. Prueba de ANOVA de *Hyloscirtus lindae* contra *Klebsiella pneumoniae*

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------------|------------------------------|-----------|-----------------------------|----------|-------------|
| Entre grupos | 7,992 | 11 | 0,727 | 104,410 | 0,000 |
| Dentro de grupos | 1,593 | 229 | 0,007 | | |
| Total | 9,585 | 240 | | | |

Anexo 9. Prueba de ANOVA de *Hyloscirtus lindae* contra *Serratia marcescens*.

| | Suma de cuadrado s | gl | Media cuadrátic a | F | Sig. |
|---------------------|-----------------------------------|-----------|----------------------------------|----------|-------------|
| Entre grupos | 42,73 | 11 | 3,885 | 396,579 | 0 |
| Dentro de grupos | 2,096 | 214 | 0,01 | | |
| Total | 44,827 | 225 | | | |

Anexo 10. Prueba de ANOVA de *Hyloscirtus lindae* contra *Staphylococcus aureus*

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|-------------------|-----|------------------|--------|-------|
| Entre grupos | 2,727 | 11 | 0,248 | 63,495 | 0,000 |
| Dentro de grupos | 0,902 | 231 | 0,004 | | |
| Total | 3,629 | 242 | | | |

Anexo 11. Prueba de ANOVA de *Hyloscirtus pantostictus* contra *Candida albicans*

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|-------------------|-----|------------------|-------|-------|
| Entre grupos | 1,329 | 11 | 0,121 | 9,059 | 0,000 |
| Dentro de grupos | 2,894 | 217 | 0,013 | | |
| Total | 4,224 | 228 | | | |

Anexo 12. Prueba de ANOVA de *Hyloscirtus pantostictus* contra *Escherichia coli*

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|-------------------|-----|------------------|---------|-------|
| Entre grupos | 52,787 | 11 | 4,799 | 562,213 | 0,000 |
| Dentro de grupos | 1,835 | 215 | 0,009 | | |
| Total | 54,622 | 226 | | | |

Anexo 13. Prueba de ANOVA de *Hyloscirtus pantostictus* contra *Klebsiella pneumoniae*

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|-------------------|-----|------------------|---------|-------|
| Entre grupos | 7,980 | 11 | 0,725 | 113,394 | 0,000 |
| Dentro de grupos | 1,414 | 221 | 0,006 | | |
| Total | 9,394 | 232 | | | |

Anexo 14. Prueba de ANOVA de *Hyloscirtus pantostictus* contra *Serratia marcescens*

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|-------------------|-----|------------------|---------|-------|
| Entre grupos | 44,023 | 11 | 4,002 | 491,562 | 0,000 |
| Dentro de grupos | 1,840 | 226 | 0,008 | | |
| Total | 45,863 | 237 | | | |

Anexo 15. Prueba de ANOVA de *Hyloscirtus pantostictus* contra *Staphylococcus aureus*

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|-------------------|-----|------------------|--------|-------|
| Entre grupos | 3,473 | 11 | 0,316 | 73,596 | 0,000 |
| Dentro de grupos | 0,927 | 216 | 0,004 | | |
| Total | 4,399 | 227 | | | |

Anexo 16. Prueba de TUKEY de *Hyloscirtus pantostictus* contra *Staphylococcus aureus*.

| Concentración | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | | | | | |
|---------------|----|------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| C- | 21 | 0,04481 | | | | | | |
| 512 | 16 | | 0,18519 | | | | | |
| 256 | 18 | | | 0,29606 | | | | |
| 32 | 17 | | | 0,31553 | 0,31553 | | | |
| 128 | 19 | | | 0,32147 | 0,32147 | 0,32147 | | |
| 64 | 18 | | | 0,32944 | 0,32944 | 0,32944 | | |
| 8 | 20 | | | 0,3559 | 0,3559 | 0,3559 | 0,3559 | |
| 16 | 18 | | | | 0,36678 | 0,36678 | 0,36678 | |
| 4 | 20 | | | | 0,37245 | 0,37245 | 0,37245 | |
| 2 | 20 | | | | | 0,39075 | 0,39075 | |
| 1 | 20 | | | | | | 0,41535 | |
| C+ | 21 | | | | | | | 0,56 |
| Sig. | | 1 | 1 | 0,185 | 0,249 | 0,059 | 0,193 | 1 |

Anexo 17. Prueba de TUKEY de *Hyloscirtus pantostictus* contra *Serratia marcescens*

| Concentración | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | | | |
|---------------|----|------------------------------|---------|---------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| C- | 21 | 0,04152 | | | | |
| 256 | 18 | | 1,13911 | | | |
| 512 | 15 | | 1,19793 | 1,19793 | | |
| 128 | 18 | | | 1,26244 | | |
| 64 | 20 | | | | 1,4408 | |
| 32 | 20 | | | | 1,46085 | |
| C+ | 21 | | | | 1,52648 | 1,52648 |
| 16 | 21 | | | | | 1,56652 |
| 2 | 21 | | | | | 1,57495 |
| 8 | 21 | | | | | 1,58143 |
| 1 | 21 | | | | | 1,58276 |
| 4 | 21 | | | | | 1,61219 |
| Sig. | | 1 | 0,664 | 0,522 | 0,123 | 0,123 |

Anexo 18. Prueba de TUKEY de *Hyloscirtus pantostictus* contra *Candida albicans*

| Concentración | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | |
|---------------|----|------------------------------|---------|
| | | 1 | 2 |
| C- | 21 | 0,04486 | |
| 512 | 19 | | 0,25989 |
| 256 | 14 | | 0,27 |
| 4 | 19 | | 0,27932 |
| 16 | 20 | | 0,284 |
| 8 | 20 | | 0,28405 |
| 32 | 20 | | 0,28865 |
| 128 | 17 | | 0,29406 |
| 2 | 19 | | 0,29416 |
| 64 | 20 | | 0,29675 |
| 1 | 19 | | 0,30432 |
| C+ | 21 | | 0,36486 |
| Sig. | | 1 | 0,191 |

Anexo 19. Prueba de TUKEY de *Hyloscirtus pantostictus* contra *Escherichia coli*

| Concentración | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | | | |
|---------------|----|------------------------------|---------|---------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| C- | 21 | 0,05443 | | | | |
| 256 | 17 | 0,11371 | 0,11371 | | | |
| 512 | 17 | 0,11394 | 0,11394 | | | |
| 128 | 18 | | 0,17128 | | | |
| 64 | 18 | | | 0,81367 | | |
| 32 | 14 | | | | 1,09029 | |
| 16 | 19 | | | | 1,13179 | 1,13179 |
| 4 | 21 | | | | 1,16229 | 1,16229 |
| 8 | 20 | | | | 1,171 | 1,171 |
| 1 | 20 | | | | 1,17415 | 1,17415 |
| 2 | 21 | | | | 1,17724 | 1,17724 |
| C+ | 21 | | | | | 1,20357 |
| Sig. | | 0,715 | 0,756 | 1 | 0,158 | 0,429 |

Anexo 20. Prueba de TUKEY de *Hyloscirtus pantostictus* contra *Klebsiella pneumoniae*

| Concentración | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | |
|---------------|----|------------------------------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| C- | 21 | 0,04976 | | |
| 512 | 19 | | 0,57495 | |
| 128 | 18 | | 0,65606 | 0,65606 |
| 256 | 19 | | | 0,66237 |
| 64 | 18 | | | 0,66544 |
| 32 | 19 | | | 0,67295 |
| C+ | 21 | | | 0,68029 |
| 16 | 19 | | | 0,68774 |
| 8 | 19 | | | 0,69384 |
| 2 | 20 | | | 0,72295 |
| 4 | 20 | | | 0,72335 |
| 1 | 20 | | | 0,7374 |
| Sig. | | 1 | 0,076 | 0,074 |

Anexo 21. Prueba de TUKEY de *Hyloscirtus lindae* contra *Klebsiella pneumoniae*

| Concentración | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | |
|---------------|----|------------------------------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| C- | 21 | 0,05005 | | |
| 512 | 20 | | 0,61245 | |
| 256 | 17 | | 0,66653 | 0,66653 |
| 8 | 21 | | 0,66967 | 0,66967 |
| 2 | 21 | | 0,67057 | 0,67057 |
| 16 | 19 | | 0,67268 | 0,67268 |
| 64 | 19 | | | 0,68021 |
| 32 | 18 | | | 0,68206 |
| C+ | 21 | | | 0,68395 |
| 4 | 20 | | | 0,6901 |
| 1 | 21 | | | 0,70986 |
| 128 | 20 | | | 0,71195 |
| Sig. | | 1 | 0,072 | 0,414 |

Anexo 22. Prueba de TUKEY de *Hyloscirtus lindae* contra *Staphylococcus aureus*

| Concentración | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | | | |
|---------------|----|------------------------------|---------|---------|---------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| C- | 21 | 0,04838 | | | | |
| 512 | 19 | | 0,18274 | | | |
| 64 | 21 | | | 0,2881 | | |
| 4 | 20 | | | 0,301 | 0,301 | |
| 16 | 20 | | | 0,3019 | 0,3019 | |
| 128 | 20 | | | 0,30895 | 0,30895 | |
| 32 | 21 | | | 0,3091 | 0,3091 | |
| 8 | 20 | | | 0,31075 | 0,31075 | |
| 256 | 20 | | | 0,315 | 0,315 | |
| 2 | 20 | | | 0,3219 | 0,3219 | |
| 1 | 20 | | | | 0,3556 | |
| C+ | 21 | | | | | 0,5239 |
| Sig. | | 1 | 1 | 0,857 | 0,196 | 1 |

Anexo 23. Prueba de TUKEY de *Hyloscirtus lindae* contra *Escherichia coli*

| Concentración | n | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | | |
|---------------|----|----|------------------------------|---------|---------|---------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| C- | 21 | 21 | 0,05171 | | | |
| 256 | 19 | 19 | 0,06763 | | | |
| 512 | 20 | 20 | 0,10305 | | | |
| 128 | 19 | 19 | | 0,48305 | | |
| 64 | 18 | 18 | | | 0,93356 | |
| C+ | 21 | 21 | | | | 1,18414 |
| 1 | 21 | 21 | | | | 1,19648 |
| 4 | 20 | 20 | | | | 1,2075 |
| 8 | 20 | 20 | | | | 1,21555 |
| 2 | 21 | 21 | | | | 1,21833 |
| 16 | 21 | 21 | | | | 1,26905 |
| 32 | 20 | 20 | | | | 1,2748 |
| Sig. | | | 0,986 | 1 | 1 | 0,575 |

Anexo 24. Prueba de TUKEY de *Hyloscirtus lindae* contra *Candida albicans*

| Concentración | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | | |
|---------------|----|------------------------------|---------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| C- | 21 | 0,04976 | | | |
| 512 | 15 | | 0,12287 | | |
| 128 | 19 | | | 0,28884 | |
| 16 | 19 | | | 0,30926 | |
| 8 | 19 | | | 0,31005 | |
| 4 | 19 | | | 0,31063 | |
| 32 | 19 | | | 0,31532 | |
| 256 | 19 | | | 0,31684 | |
| 64 | 18 | | | 0,31806 | |
| 2 | 19 | | | 0,32789 | |
| 1 | 19 | | | 0,34411 | |
| C+ | 21 | | | | 0,45148 |
| Sig. | | 1 | 1 | 0,208 | 1 |

Anexo 25. Prueba de TUKEY de *Hyloscirtus lindae* contra *Serratia marscencens*

| Concentración | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | | |
|---------------|----|------------------------------|---------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| C- | 21 | 0,04186 | | | |
| 512 | 14 | | 1,14379 | | |
| 256 | 16 | | 1,17 | | |
| 128 | 17 | | | 1,29971 | |
| 64 | 17 | | | 1,38647 | |
| 32 | 19 | | | | 1,49468 |
| 8 | 19 | | | | 1,51889 |
| 16 | 19 | | | | 1,54684 |
| 4 | 21 | | | | 1,54767 |
| C+ | 21 | | | | 1,57471 |
| 1 | 21 | | | | 1,577 |
| 2 | 21 | | | | 1,57905 |
| Sig. | | 1 | 1 | 0,249 | 0,289 |

