



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

Informe final de investigación previo a la obtención del título de Licenciada en Ciencias de
la Salud en Laboratorio Clínico e Histopatológico

TRABAJO DE TITULACIÓN

Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Hedyosmum* sp. del bosque natural Jacarón,
Provincia de Chimborazo. Octubre 2018 - febrero 2019

Autora: Erika Gabriela Collaguazo Enriquez

Tutora: Dra. Liliana Araujo Baptista Ph.D

Tutora científica: Dra. María Eugenia Lucena Ph.D

Riobamba – Ecuador

2019

REVISIÓN DEL TRIBUNAL

Los miembros del tribunal de graduación del proyecto de investigación de título: “Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Hedyosmum* sp. del bosque natural Jacarón, Provincia de Chimborazo. Octubre 2018 - febrero 2019” presentado por: Erika Gabriela Collaguazo Enriquez y dirigida por: Dra. Liliana Araujo Baptista Ph.D, una vez escuchada la defensa oral y revisado el informe final del proyecto de investigación con fines de graduación escrito en el cual se ha constatado el cumplimiento de las observaciones realizadas, remite la presente para uso y custodia en la biblioteca de la Facultad de Ciencias de la Salud de la UNACH. Para constancia de lo expuesto firman:

Mgs. Mercedes Balladares Saltos

Presidente del Tribunal



Firma

Lic. Eliana Martínez Duran

Miembro del Tribunal



Firma

Mgs. Félix Falconí Ontaneda

Miembro del Tribunal



Firma

DECLARACIÓN DEL TUTOR

Yo, Dra. Liliana Araujo Baptista Ph.D en calidad de tutora del proyecto de investigación con el tema “Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Hedyosmum* sp. del bosque natural Jacarón, Provincia de Chimborazo. Octubre 2018 - febrero 2019”, propuesto por la Srta. Erika Gabriela Collaguazo Enriquez egresada de la carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico de la Facultad de Ciencias de la Salud, luego de haber realizado las debidas correcciones certifico que se encuentra apta para la defensa pública del proyecto. Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad facultando al interesado hacer uso del presente para trámites correspondientes.



Dra. Liliana Araujo Baptista Ph.D

**DOCENTE DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO E
HISTOPATOLÓGICO**

AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN

“La responsabilidad del contenido de este Proyecto de Graduación, corresponde exclusivamente a la autora Erika Gabriela Collaguazo Enriquez con cédula de identidad N.0604852517 y el patrimonio intelectual de la misma a la Universidad Nacional de Chimborazo.”



Erika Gabriela Collaguazo Enriquez

CI: 0604852517

AGRADECIMIENTO

Ofrezco mi agradecimiento en primer lugar a Dios por ser mi guía día a día, mi fuerza en todo momento e iluminarme para la toma de cualquier decisión.

A la Universidad Nacional de Chimborazo por permitirme formar parte de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico para conseguir uno de mis objetivos personales y a los docentes que ayudaron a formarme no solo como profesional sino también como un ser humano aplicando los conocimientos enseñados con ética y profesionalismo.

Erika Gabriela Collaguazo Enriquez

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a Dios por ser uno de los pilares fundamentales para la culminación de este éxito.

A mi familia en especial a mis abuelitos Margoth y Armando por las enseñanzas, consejos y apoyo moral en todo momento, a mi madre Ligia y mi tía Mary por la ayuda brindada en cada uno de los obstáculos enfrentados a lo largo de mi vida.

A mis hermanos Andrés, Vivi y Dani por ser mi motivación y apoyo diario para mejorar cada día y que puedan ver en mí un modelo a seguir.

Erika Gabriela Collaguazo Enriquez

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
Problema y justificación.....	2
OBJETIVOS.....	5
Objetivo general.....	5
Objetivos específicos.....	5
CAPITULO I.....	6
MARCO TEÓRICO.....	6
Estructura bacteriana.....	7
Bacterias de importancia clínica utilizadas en esta investigación.....	8
Grampositivas.....	8
Gramnegativas.....	8
Infección bacteriana.....	9
Antimicrobiano.....	10
Mecanismos de acción de los antimicrobianos y toxicidad.....	11
Mecanismos de resistencia a los antibióticos.....	11
Métodos para la determinación de actividad antibacteriana.....	12
Aceites esenciales (AEs).....	13
Métodos de obtención de los AEs.....	14
Propiedades terapéuticas de los AEs.....	14
Taxonomía de la especie vegetal <i>Hedyosmum</i> sp.....	14
Familia.....	14
Género.....	15
CAPITULO II.....	16
METODOLOGÍA.....	16
Tipo de investigación.....	16
Determinación de la población y muestra.....	16
Población.....	16
Muestra.....	16
Técnicas e instrumentos para la recolección de datos.....	17
Material y métodos.....	17
Procedimiento de la investigación.....	18
Extracción y aislamiento del AE.....	18
Preparación de la solución madre del AE y diluciones seriadas.....	18
Conservación de las bacterias.....	18
Determinación de la actividad antibacteriana del AE de <i>Hedyosmum</i> sp.....	18

Preparación del preinóculo bacteriano	18
Preparación de los inóculos bacterianos y siembra en placas con AMH	18
Incorporación de los discos impregnados con el aceite puro y las diluciones seriadas.....	19
Preincubación, incubación de las placas y lectura de resultados.....	19
Análisis de datos	19
CAPITULO III	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
Extracción y aislamiento del AE	20
Actividad antibacteriana del AE.....	20
CONCLUSIONES.....	23
RECOMENDACIONES	24
BIBLIOGRAFÍA	25
ANEXOS	30

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura bacteriana.....	7
Figura 2. Mecanismos de acción de los antimicrobianos.....	11
Figura 3. Estrategias de resistencia.....	12
Figura 4. Género <i>Hedyosmum</i>	15

Índice de Tablas

Tabla 1. Actividad antibacteriana del AE de <i>Hedyosmum</i> sp. expresado por los halos de inhibición (mm) con su respectivo valor de CMI, frente a bacterias gramnegativas.....	21
Tabla 2. Actividad antibacteriana del AE de <i>Hedyosmum</i> sp. expresado por los halos de inhibición (mm) frente a bacterias grampositivas.....	21

RESUMEN

Uno de los principales problemas que existe en el siglo XXI es la resistencia a los antibióticos, el cual es atribuido principalmente al uso indebido de los medicamentos también denominado automedicación, con esto se reduce su efecto y también su mecanismo de acción, lo que hace a las bacterias multirresistentes. Los aceites esenciales se han considerado como una fuente principal para la búsqueda de nuevos antimicrobianos por su alto contenido de compuestos terpénicos. El objetivo principal de este estudio fue evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de *Hedyosmum* sp. del bosque natural Jacarón frente a cinco especies bacterianas incluyendo *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. El aceite fue obtenido a partir de las hojas frescas mediante el método de hidrodestilación usando la trampa de Clevenger y se obtuvo un rendimiento de 0,09%. La actividad antibacteriana fue detectada a través del método Kirby-Bauer o de difusión en agar e interpretada mediante las zonas de inhibición observadas. Se realizó un primer ensayo empleando el aceite puro y la concentración mínima inhibitoria (CMI) aproximada se determinó desde la concentración de 500000 µg/dL. *P. aeruginosa* fue la bacteria más sensible a la acción del aceite puro, seguida de *E. coli* y *K. pneumoniae*, y las bacterias grampositivas no mostraron susceptibilidad a este. La CMI aproximada del aceite frente *P. aeruginosa* fue de 250000 µg/mL, y para el resto de las cepas fue ≥ 500000 µg/mL. Se concluye que el aceite esencial de *Hedyosmum* sp. a las concentraciones ensayadas resultó ser activo solo frente a las bacterias gramnegativas empleadas en este estudio.

Palabras clave: *Hedyosmum* sp., actividad antibacteriana, aceite esencial

ABSTRACT

One of the main problems that exists in the XXI century is resistance to antibiotics, which is attributed mainly to the misuse of medicines, also called self-medication, with this reduces its effect and also its mechanism of action which makes, the multiresistant bacteria. Essential oils have been considered as a main source for the search for new antimicrobials due to their high content of terpene compounds. The main objective of this study was to evaluate the in vitro antibacterial activity of the essential oil of *Hedyosmum* sp. of the Jacarón natural forest against five bacterial species that include *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. The oil was obtained from the fresh leaves by the hydrodistillation method using the Clevenger trap and a yield of 0,09% was obtained. The antibacterial activity was detected through the Kirby-Bauer method or diffusion in agar and interpreted by the zones of inhibition observed. A first test using pure oil and the approximate minimum inhibitory concentration (BMI) was determined from the concentration of 500000 $\mu\text{g} / \text{dL}$. *P. aeruginosa* was the bacteria most sensitive to the action of pure oil, followed by *E. coli* and *K. pneumoniae*, and gram-positive bacteria are not susceptible to it. The approximate MIC of the oil against *P. aeruginosa* was 250000 $\mu\text{g} / \text{mL}$, and for the rest of the strains it was $\geq 500000 \mu\text{g} / \text{mL}$. It is concluded that the essential oil of *Hedyosmum* sp. to the applications tested to the grammatical persons used in this study.

Key words: *Hedyosmum* sp., Antibacterial activity, essential oil.



Reviewed by: Chávez, Maritza

Language Center Teacher



INTRODUCCIÓN

Esta investigación se basa principalmente en la determinación de actividad antibacteriana del aceite esencial (AE) *Hedyosmum* sp. frente a cepas ATCC de interés clínico facilitadas por la Facultad de Ciencias de la Salud de la UNACH.

En la actualidad numerosas investigaciones se han direccionado a la exploración, obtención e identificación de compuestos biológicos que constituyen fuentes potenciales para el desarrollo de agentes terapéuticos, esto con el objetivo primordial de contrarrestar distintas enfermedades infecciosas causadas por bacterias, lo que constituye un problema de salud pública fundamentalmente en los países en vías de desarrollo.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), considera a la Medicina Natural y Tradicional como la medicina más inofensiva, efectiva y además con un costo racional, accesible y aceptada por la población. La OMS, sostiene que se debe garantizar la inocuidad y la calidad de este tipo de medicamento que podría ser eficaz como tratamiento y prevención de primera línea, para afecciones tales como diarreas, dolores de estómago, fiebres ligeras, entre otras¹.

En la actualidad más del 70% de la población mundial recurre a las plantas para la solución de problemas básicos de salud. La industria farmacéutica ha obtenido del reino vegetal la materia prima necesaria para la elaboración de casi el 30% de los productos farmacéuticos que hoy emplea la medicina moderna².

En Latinoamérica las plantas medicinales son utilizadas por más del 90% de la población de los países en desarrollo. Su incorporación a las políticas de salud aún se encuentra relegada debido a las barreras de los sistemas, servicios y personal de salud y es poco frecuente integrar en un mismo servicio, las medicinas tradicionales y la alopática¹.

En los últimos años se han desarrollado nuevas tecnologías para la identificación de los principios activos, como la resonancia magnética nuclear y el desarrollo de la quimio-taxonomía, entre otros. Así mismo, la farmacología ha logrado aproximarse a la verdadera función y utilidad de las plantas medicinales, con el descubrimiento en estas de sustancias antioxidantes y limpiadoras de radicales libres, oligoelementos y otros principios².

Los aceites esenciales (AEs) y extractos de hierbas se han convertido en una de las principales fuentes de productos naturales, ya que representan una alternativa a los antimicrobianos y antioxidantes sintéticos en la industria farmacéutica, medicina alternativa y terapias naturales³.

Problema y justificación

La Organización Mundial de la Salud OMS explica que las amenazas a la salud mundial van desde el cólera hasta la peste, en 2017 hubo varias emergencias causadas por conflictos, catástrofes naturales o brotes de enfermedades. Pero en 2018 podría ser aún peor, debido a la falta de preparación, prevención y respuesta a tiempo. En el presente año, la Organización Mundial de la Salud continúa haciendo frente a los brotes de enfermedades y a otras emergencias de salud pública en todo el mundo. No obstante, no dispone de fondos suficientes para llevar a cabo sus actividades, y las necesidades continúan en aumento⁴.

En Ecuador las enfermedades infecciosas más comunes son las infecciosas-intestinales con una tasa anual de 2978 casos, neumonía con 2524, accidentes de tráfico/vehículos 2049, enfermedad isquémica del corazón con 1833, bronquitis, enfisema y asma con 1489, tumor maligno de estómago con 1233, tuberculosis con 1209, homicidio con 1060 y al final se encuentra la diabetes mellitus con 994⁵.

En las enfermedades infecciosas-intestinales la diarrea aguda es uno de los problemas de salud más difíciles de erradicar y controlar, debido a que continúan siendo una de las primeras causas de consulta externa. De acuerdo a la información disponible de 1990 a 2003, se dio un incremento del 40% en los casos notificados como enfermedades diarreicas agudas⁵.

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es un grave problema de salud pública. Muchas de las bacterias, virus o protozoos que causan enfermedades infecciosas ya no responden a los antimicrobianos comunes como antibióticos, medicamentos antivirales y antiprotozoarios⁶. La resistencia a los antibióticos está presente en todos los países. Los pacientes con infecciones causadas por bacterias resistentes a los medicamentos tienen un mayor riesgo de peores resultados clínicos y posteriormente la muerte, y consumen más recursos de atención médica que los pacientes infectados con cepas no resistentes de la misma bacteria⁷.

Entre ellas tenemos la resistencia de *Escherichia coli* a los antibióticos fluoroquinolonas que son los más utilizados para el tratamiento de infecciones del tracto urinario. Se dice que en varios países del mundo este tratamiento no es efectivo en más de la mitad de los pacientes, otro ejemplo constituye la resistencia a los medicamentos de primera línea para tratar las infecciones causadas por el *Staphylococcus aureus*, ya que se estima que el 64% de personas

con *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) tiene más probabilidades de morir que las personas con una forma no resistente de la infección ⁷.

La OMS está trabajando con sectores como la tuberculosis multirresistente, para aplicar un plan de acción mundial con el fin de hacer frente a la resistencia a los antimicrobianos mediante el aumento de la concientización y los conocimientos, la reducción de las infecciones y el fomento del uso prudente de los antimicrobianos⁸, cuyo objetivo es garantizar, mientras sea posible, la continuidad de la prevención y el tratamiento satisfactorios de las enfermedades infecciosas con medicamentos eficaces, seguros y de calidad garantizada, que se usen de modo responsable y sean accesibles a todas las personas que los necesiten⁹.

Entre enero y diciembre de 2011 se llevó a cabo el estudio de la resistencia bacteriana frente a la infección de vías urinarias en pacientes embarazadas que fueron atendidas en el servicio de ginecología y obstetricia en el Hospital General Docente de Riobamba, en el cual se evidenció una elevada resistencia de *E. coli* al tratamiento con ampicilina, fosfomicina, nitrofurantoina, trimetoprim – sulfametoxazol y amoxicilina más ácido clavulánico³.

El género *Hedyosmum* perteneciente a la familia Chloranthaceae está constituido por alrededor de 40 a 45 especies distribuidas principalmente en América intertropical, una sola habita en el Sureste de Asia. La infusión de las hojas de varios representantes de este género se consume en forma de té o sustituto de café. A ciertas especies se les atribuyen propiedades medicinales contra variadas afecciones¹⁰.

Según el estudio preliminar realizado por Ansalon *et al.*¹¹ sobre plantas medicinales utilizadas en algunas Comunidades de las Provincias de Azuay, Cañar y Loja, uno de los resultados se obtuvo con el material vegetal conocido como Guayusa del cerro que es el nombre común de la especie *Hedyosmum cumbalense*, de la que se utilizan las hojas para el dolor estomacal.

Zamora *et al.*¹² explica que algunos géneros (especialmente *Chloranthus* y *Hedyosmum*) se utilizan para fines medicinales como tonificante, estimulante, antifúngicas, vermífugas y antidiarreicas, como alimentarios en bebidas tonificantes y saborizante de licores y como plantas ornamentales. Estos autores reportaron la composición química del AE de hojas de *Hedyosmum translucidum*.

Además, el *H. translucidum* es reportado como el género con un índice de valor de importancia ecosistémica, representado como la sumatoria de los índices de abundancia, cobertura y densidad en muestreos de vegetación realizados en las riberas del río Pasto y río Miraflores en la zona de vida de Páramo sub andino, 3000 - 3600 msnm, cuenca Alta del río Pasto, Las Tiendas, y en la zona de vida Bosque húmedo bajo montano, 2650 - 2950 msnm, cuenca Media del río Pasto, El Retiro y La Laguna¹².

Las especies del género *Hedyosmum* tienen una larga historia de uso en la medicina tradicional con una variedad de propiedades biológicas/farmacológicas interesantes que han sido científicamente confirmadas. Existen reportes de la composición química del AE de *Hedyosmum luteynii*, *Hedyosmum translucidum*, entre otras. Estas especies son muy utilizadas en el campo de la medicina ancestral en el Ecuador para el tratamiento y alivio de infecciones respiratorias agudas y enfermedades diarreicas, que son las enfermedades con mayor tasa de morbilidad en el Ecuador ¹³.

La resistencia a los antibióticos está aumentando a niveles peligrosamente altos en todas partes del mundo. Están surgiendo nuevos mecanismos de resistencia que se están extendiendo a nivel mundial, amenazando nuestra capacidad para tratar enfermedades infecciosas comunes. Una lista creciente de infecciones, como neumonía, tuberculosis y gonorrea entre otras se están volviendo más difícil y a veces imposible de tratar, ya que los antibióticos se vuelven menos efectivos¹⁴.

Tomando en cuenta las consideraciones anteriores, en esta investigación se ha formulado la siguiente pregunta: ¿En la evaluación antibacteriana del AE obtenido mediante hidrodestilación de las hojas de *Hedyosmum* sp. del bosque natural de Jacarón, Colta Provincia de Chimborazo, se detectará actividad frente a las cepas bacterianas ATCC *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*? Así este estudio podría ser el punto de partida en la identificación de compuestos con actividad biológica presentes en el mencionado AE, que serían fuente de nuevos fármacos o la base estructural para el desarrollo y síntesis de principios activos efectivos en el tratamiento de distintas enfermedades infecciosas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial (AE) de *Hedyosmum* sp. del bosque natural Jacarón, Provincia de Chimborazo frente a cepas bacterianas ATCC grampositivas y gramnegativas de interés clínico durante el periodo octubre 2018 - febrero 2019.

Objetivos específicos

1. Extraer el AE de las hojas de la planta *Hedyosmum* sp. mediante la técnica de hidrodestilación para la realización de ensayos de actividad antibacteriana.
2. Evaluar la actividad antibacteriana del AE de *Hedyosmum* sp. frente a las bacterias gramnegativas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* y grampositivas *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, mediante el método de difusión en agar Kirby Bauer.
3. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del AE de *Hedyosmum* sp. frente a las bacterias en estudio mediante la determinación del efecto inhibitorio a diferentes concentraciones.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

Desde los inicios de la vida se ha intentado disminuir los dolores con distintos tipos de medicina como tradicional, ancestral, entre otras, esto ha permitido prolongar la vida de las personas y llegar hasta nuestros días. Y ahora que nos encontramos en un nuevo siglo no se han evitado muertes, solo se ha utilizado para mitigar ciertos síntomas de enfermedades y no causar otras. En la antigüedad el ser humano solo contaba con recursos brindados por el planeta entre ellos minerales, vegetales y animales utilizándolos como su única herramienta en aliviar el dolor y evitar la muerte, estos se consideraron recursos terapéuticos por excelencia hasta mediados del siglo XX¹⁵.

Es por ello, que cada región del mundo desarrolló su forma de curar a partir de plantas medicinales. Con el tiempo estas terapias con características locales pasaron a conformar la denominada medicina tradicional y al ser preservada por los pueblos originarios fue llamada medicina aborígen o autóctona, existiendo estos términos hasta nuestros días, al igual que las recetas tradicionales o autóctonas que agrupan tantos usos, formas de preparación, administración, dosis, entre otros parámetros farmacológicos modernos¹⁶.

Hoy en día y desde hace aproximadamente dos décadas se ha observado un especial interés por el empleo de plantas medicinales en los países desarrollados del mundo occidental. Por ejemplo, en los últimos años, la prevención del cáncer y enfermedades cardiovasculares se han asociado con la ingestión de frutas frescas, vegetales o infusiones ricas en antioxidantes naturales. Existe una gran cantidad de estudios que sugieren que una mayor ingesta de dichos compuestos se asocia con un menor riesgo de mortalidad por estas enfermedades que incluyen, además, la hipertensión arterial, la aterosclerosis y la diabetes mellitus. Estas patologías son las principales causas de muerte en los países industrializados¹⁵.

Ecuador es uno de los países con mayor biodiversidad del mundo y en este momento sufre una parte de la demanda externa en plantas medicinales y aromáticas abriéndose un gran potencial para la exportación de productos como los extractos y AEs vegetales. Las plantas aromáticas y medicinales son un recurso natural que posee grandes valores ecológicos y un importante potencial de desarrollo socioeconómico local. Combinando a estos factores positivos, se puede llegar a una situación de desarrollo sostenible, pudiendo aprovechar este tipo de plantas y obteniendo unos claros beneficios, tanto económicos como ecológicos¹⁷.

En Ecuador están registradas 3118 plantas que pertenecen a 206 familias con fines medicinales. Según estudios de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE), el 45% se registra en la categoría de síntomas, mientras que el 26% se encarga de las afecciones causadas por bacterias, virus, hongos o protozoos, y otro grupo de plantas tratan las heridas, lesiones y desórdenes del sistema digestivo. Son los kichwas de la Amazonía los que más especies usan, seguidos de los kichwas de la Sierra y de los mestizos. Entre las principales plantas medicinales con un efecto inflamatorio e infeccioso tenemos las siguientes: achira, tepazan, llantén, nogal y ruda¹⁸.

Estructura bacteriana

Las diferentes estructuras bacterianas que se observa (figura 1) se dividen en: si son constantes o no, en estructuras permanentes o variables, en internas o citoplásmicas y externas o de la envoltura celular. Dentro de las primeras se destaca la pared celular, membrana celular, ribosomas y material genético, en las estructuras variables están los flagelos, fimbrias o pilis, cápsula y esporas, en las estructuras internas está el material genético, ribosomas y cuerpos de inclusión y finalmente en la envoltura celular engloba la membrana plasmática, pared celular que la recubre, cápsula y apéndices como fimbrias o pilis y flagelos. Además, se puede clasificar mediante la utilización de una tinción Gram distinguiéndolas en dos grupos grampositivas y gramnegativas¹⁹.

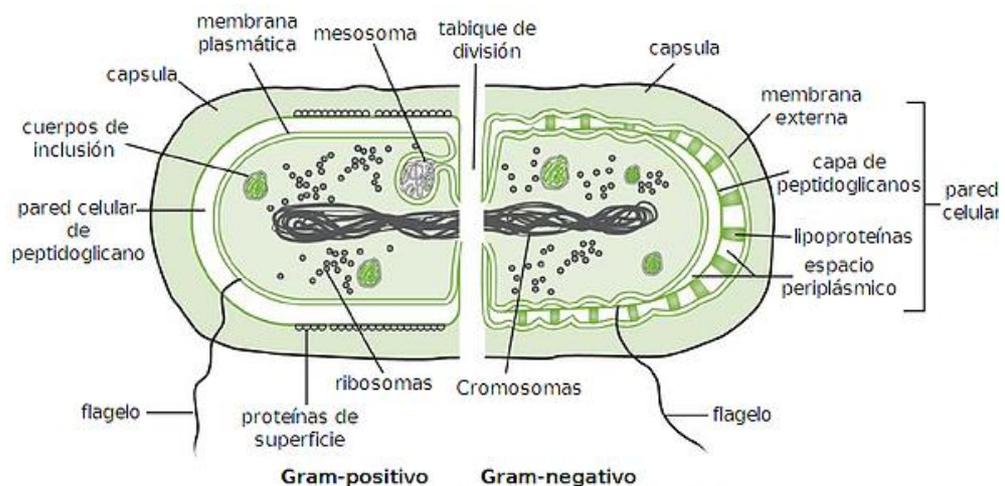


Figura 1 Estructura bacteriana

Fuente: <http://labdemicrobiologia.wixsite.com/scientist-site/morfolog-a-y-estructura-bacteriana>

Bacterias de importancia clínica utilizadas en esta investigación

Grampositivas

Son aquellas que toman el primer colorante (Cristal de violeta) utilizado en la tinción de Gram con color azul oscuro o morado.

Staphylococcus aureus también llamado estafilococo dorado pertenece a la familia Staphylococcaceae. Es grampositivo, aunque las cepas viejas o microorganismos fagocitados se tiñen como gramnegativo. Tiene forma de coco y puede aparecer en parejas, en cadenas o en racimos. Su tamaño oscila entre 0,8 a 1,5 micras de diámetro, es inmóvil y algunas cepas producen una cápsula externa mucoide que aumenta su capacidad para producir infección. En relación con su metabolismo, es anaerobio facultativo, coagulasa positiva, catalasa positivo y oxidasa negativa²⁰.

Enterococcus faecalis es el patógeno humano más frecuente representando de 60 - 90% de los aislamientos clínicos de enterococos, son cocos grampositivos, que se encuentran aislados, en pares o formando cadenas cortas. Ellos pertenecieron clásicamente a *Streptococcus* grupo D de Lancefield, sin embargo, a mediados de la década de 1980 fueron oficialmente clasificados en su propio género. Son catalasa negativa, anaerobios facultativos, capaces de crecer en condiciones un tanto extremas. Las características bioquímicas sobresalientes incluyen: la habilidad de crecer en presencia de NaCl al 6,5%, a temperaturas entre 10°C y 45°C, y hasta en un pH de 9,6²¹.

Gramnegativas

Son aquellas que toman el último colorante (safranina) utilizado en la tinción de Gram con color rosado y consta de tres elementos: la membrana citoplasmática, la membrana externa y, entre ambas, un espacio periplásmico constituido por peptidoglicano. Esta última estructura confiere a la bacteria su forma y rigidez y le permite resistir presiones osmóticas ambientales relativamente elevadas²².

Escherichia coli se caracteriza por ser un bacilo gramnegativo, no esporulante, productor de indol a partir de triptófano, que no utiliza citrato como fuente de carbono y no produce acetoina. Además, fermenta la glucosa y lactosa con producción de gas²².

Klebsiella pneumoniae es una bacteria de forma bacilar gramnegativa, anaerobia facultativa, inmóvil y usualmente encapsulada, ampliamente esparcida en el ambiente, y presente de manera especial en las superficies mucosas de mamíferos, en los seres humanos coloniza la

nasofaringe y el tracto gastrointestinal. La tasa de detección de adultos portadores de *K. pneumoniae* en materia fecal es de 5 - 38%, y en nasofaringe entre 1 - 6%; en los niños el estado de portador fecal puede alcanzar el 100%²³. Es un patógeno de importancia en el ámbito hospitalario, frecuentemente relacionado con infecciones nosocomiales en unidades de cuidado intensivo y salas de pediatría, desde donde se aíslan cada vez con más frecuencia cepas resistentes a cefalosporinas de tercera generación con resistencia combinada (corresistencia) a múltiples antibióticos. Con la proliferación de cepas multirresistentes, el problema de las infecciones intrahospitalarias causadas por *K. pneumoniae* es aún mayor, ya que al ser más difíciles de tratar dan lugar a incrementos de las tasas de mortalidad, de las estancias hospitalarias y de los costos de atención²⁴.

Pseudomonas aeruginosa pertenece a la familia Pseudomonaceae. Se trata de un bacilo recto o ligeramente curvado gramnegativo, con un tamaño de 2-4 x 0,5-1 micras, y móvil gracias a la presencia de un flagelo polar. En relación con su metabolismo, es aerobio (aunque puede desarrollarse en condiciones anaerobias utilizando nitrato), produce catalasa y oxidasa. La transmisión se produce principalmente a través del contacto de la piel lesionada y de las mucosas con el agua o con los objetos contaminados. En el ámbito sanitario, constituyen una fuente de infección para los pacientes el instrumental quirúrgico, respiradores, catéteres o manos del personal sanitario contaminadas, entre otros²⁵.

Infección bacteriana

Es aquella infección causada por bacterias que son microorganismos unicelulares sin núcleo y que se encuentran en todos los ambientes, también existen especies que se alojan dentro del cuerpo humano y los animales como por ejemplo las bacterias que habitan en la piel, boca, vías respiratorias, sistema digestivo, sistema reproductor o urinario. Existe una gran cantidad de microorganismos que no causan daño y una pequeña cantidad de bacterias provocan enfermedades mediante la producción de toxinas (sustancias nocivas), transmitiéndose, invadiendo tejidos del organismo, adhiriéndose a las células del huésped o invadiendo el sistema inmunitario ²⁶.

Las bacterias infecciosas se reproducen rápidamente dentro del cuerpo y pueden causar enfermedades. Muchas producen sustancias químicas llamadas toxinas, que pueden dañar los tejidos y así ocasionan enfermedades²⁷.

Antimicrobiano

Es un término que incluye los compuestos obtenidos de forma natural o biosintética, así como los conseguidos totalmente en el laboratorio. La actividad antimicrobiana tiene la capacidad de impedir la proliferación de bacterias que pueden causar infecciones graves o incluso la muerte de los seres humanos³. Los agentes antimicrobianos se comportan de diferentes maneras:

- Bactericidas producen la muerte de los microorganismos responsables del proceso infeccioso entre estos tenemos los β -lactámicos, aminoglucósidos, vancomicina, quinolonas, entre otros.
- Bacteriostático inhiben el crecimiento bacteriano, de forma que el microorganismo permanece vivo cuando se suspende el tratamiento puede recuperarse y multiplicarse²⁸.

En la actualidad, existen tres categorías de antimicrobianos:

* Los que producen una acción bactericida poco relacionada con la concentración, como es el caso de los β -lactámicos y los aminoglucósidos, con los que se obtiene la máxima acción bactericida cuando se alcanzan concentraciones de 5 a 10 veces superiores que las CMI. El aumento en la concentración por encima de esto no se acompaña de mayor actividad ni de mayor duración del efecto postantibiótico.

* Los que poseen actividad bactericida concentración-dependiente, como los aminoglucósidos y las fluorquinolonas.

* Los que se comportan como bacteriostáticos: macrólidos, tetraciclinas y cloranfenicol, entre otros.

La actividad antibacteriana exige una normalización o cuantificación, que se consigue mediante los métodos utilizados in vitro para comprobar la susceptibilidad del microorganismo en relación con el antibiótico. Con estos métodos se define:

- La concentración mínima inhibitoria (CMI). Es la concentración mínima de la mezcla de compuestos (antibiótico) que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento 10^5 bacterias en 1 ml de medio de cultivo, después de 18-24 horas de incubación
- La concentración mínima bactericida (CMB). Es la concentración mínima capaz de destruir o matar 10^5 bacterias en 1 ml de medio de cultivo, después de 18-24 horas de incubación²⁸

Mecanismos de acción de los antimicrobianos y toxicidad

Los agentes antimicrobianos usados en el tratamiento de infecciones causadas por gérmenes patógenos, deben de tener, como característica óptima, efectos deletéreos para el microorganismo, y nula o poca toxicidad para los tejidos del hombre. Esta "toxicidad selectiva" va a depender de la acción que tenga la droga sobre las estructuras del microorganismo, que no estén presentes o sean diferentes de las encontradas en el ser humano²⁹. Tienen la capacidad de actuar en diferentes niveles como: inhibición de la síntesis de la pared celular (en la biosíntesis del peptidoglucano), proteínas, ácidos nucleicos e inhibidores de betalactamasas³⁰(figura 2).

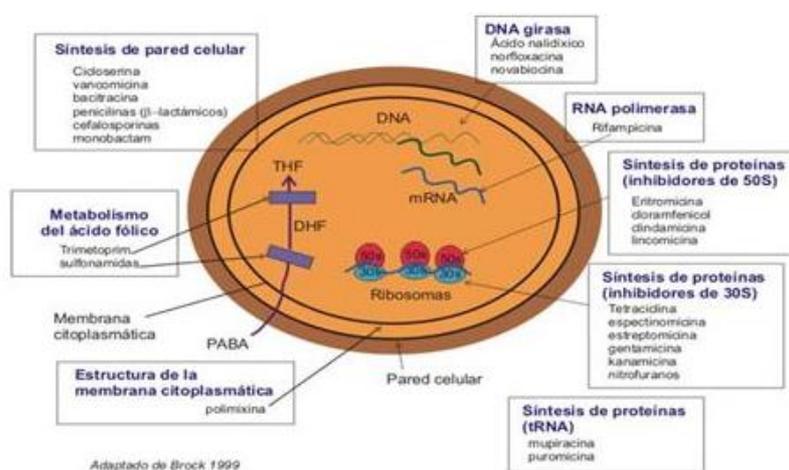


Figura 2 Mecanismos de acción de los antimicrobianos

Fuente: https://www.monografias.com/trabajos81/resistencia-bacteriana/resistencia-bacteriana_image006.jpg

Mecanismos de resistencia a los antibióticos

Como podemos observar en la figura 3 se resumen en cuatro categorías:

- 1. Modificación enzimática del antibiótico:** las bacterias expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que éste pierda su funcionalidad. Las β -lactamasas son las más prevalentes. Son proteínas capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico que poseen los antibióticos de esta familia. De igual forma, las enzimas modificadoras de los aminoglucósidos son capaces de modificar estos antibióticos mediante reacciones de acetilación, adenilación y fosforilación.

2. **Bombas de salida:** operan tomando el antibiótico del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior, con lo cual evitan que llegue a su sitio de acción. Este mecanismo es frecuentemente utilizado por las bacterias gramnegativas.
3. **Cambios en la permeabilidad de la membrana externa:** las bacterias pueden generar cambios de la bicapa lipídica, aunque la permeabilidad de la membrana se ve alterada, principalmente, por cambios en las porinas. Las porinas son proteínas que forman canales llenos de agua embebidos en la membrana externa que regulan la entrada de elementos, entre ellos, los antibióticos. Los cambios pueden llevar a que la membrana externa no permita el paso de estos agentes al espacio periplásmico.
4. **Alteraciones del sitio de acción:** las bacterias pueden alterar el sitio donde el antibiótico se une a la bacteria para interrumpir una función vital de ésta. Este mecanismo es, principalmente, utilizado por las bacterias grampositivas, las cuales generan cambios estructurales en los sitios de acción de los antibióticos β -lactámicos a nivel de las proteínas unidoras de penicilinas³¹.

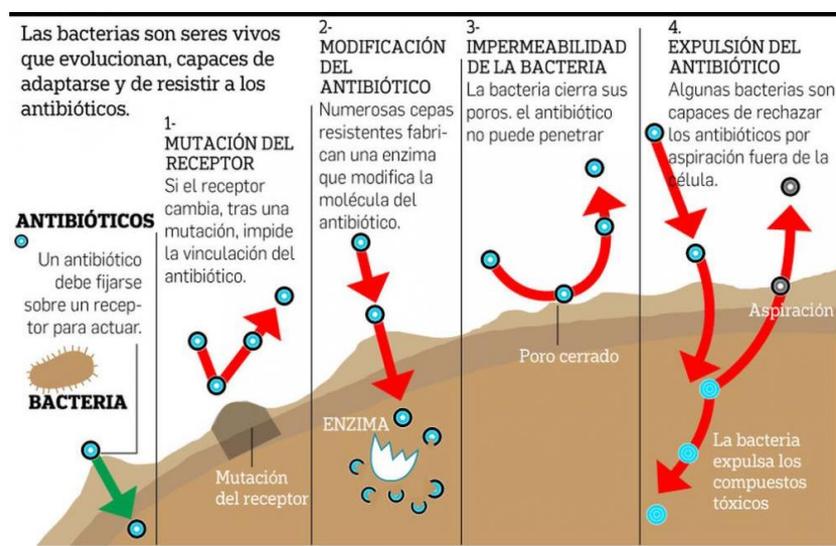


Figura 3 Estrategias de resistencia

Fuente: <https://www.solomamitis.com/tipos-de-resistencia-antibi%C3%B3tica>

La utilización de los AEs y extractos obtenidos de especies vegetales se han convertido en pilares fundamentales en la exploración de antimicrobianos debido a la presencia de compuestos bioactivos, entre elementos terpénicos que tienen actividad frente a bacterias patógenas de interés clínico³.

Métodos para la determinación de actividad antibacteriana

Se describen los principales métodos a continuación:

1. El método de dilución en agar es utilizado generalmente para determinar si el AE es letal contra un organismo, además se usa con microorganismos aeróbicos y anaeróbicos con la velocidad variable de crecimiento. Para esta técnica se preparan diferentes soluciones de los AEs, posteriormente las diluciones y se añaden a los agares, estos son puestos en cajas Petri para su solidificación finalmente los microorganismos en prueba previamente diluidos son inoculados en los agares e incubados a su temperatura y tiempos óptimos³².
2. Dilución y microdilución en caldo este método es seriado y se lleva a cabo en tubos o pocillos con medios líquidos, cada uno contiene concentraciones crecientes es decir una serie de diluciones de AE diluido en el caldo en el cual se inocula un número definido de células bacterianas³².
3. Generalmente el método de difusión en agar o Kirby Bauer el más utilizado para la determinación de actividad antimicrobiana, este tiene dos formas para la identificación. La primera es el agar solidificado se inocula con la suspensión requerida en microorganismos aeróbicos y un papel filtro es impregnado con la solución de concentración conocida del aceite y sus diluciones el cual se coloca en una superficie del agar y la segunda se perfora el agar solidificado y previamente inoculado usando un perforador estéril y se vierte una solución de cierta concentración del AE en las perforaciones³².

Aceites esenciales (AEs)

Los AEs o también denominados volátiles - “la quinta esencia”, como los solían llamar los griegos en la antigüedad-, se producen en cantidades apreciables (0,5 – 6%) en las llamadas plantas “aromáticas”, aquellas, que generalmente son hierbas o arbustos, poseen un fuerte y característico olor o fragancia y a menudo son atractores de insectos³³.

Un AE es un líquido aromático de aspecto fluido o espeso y de color variable según las plantas de las que esté extraído. Es segregado por células especiales que se encuentran tanto en las hojas (menta piperita, albahaca linalol), como en las flores (lavanda, ylang ylang), la madera (cedro del atlas, sándalo blanco), las raíces (jengibre, valeriana, vetiver) o las semillas (cilantro, anís verde, zanahoria). El tamaño de esas gotas es de unos pocos micrones, motivo por el cual no podemos verlas³⁴.

Estas sustancias son sintetizadas por las plantas como metabolitos secundarios y pueden ser extraídas mediante métodos físicos como la destilación a vapor o hidrodestilación. Los AE tienen un papel importante en la protección de las plantas, pues actúan como agentes

antibacterianos, antivirales, antifúngicos e insecticidas. Poseen una composición química compleja que consiste en una mezcla de sustancias orgánicas como hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, entre otros³⁵.

Métodos de obtención de los AEs

Los AEs pueden ser obtenidos a través de distintos métodos entre ellos tenemos la extracción mediante disolventes, por fluidos supercríticos, por microondas y la más utilizada es el arrastre por vapor de agua³⁶.

El arrastre por vapor de agua consiste en la utilización de una cuba de metal inerte como el cobre o el acero inoxidable como una olla de presión, con un tamiz en el fondo para que las plantas no entren en contacto directo con el agua. El vapor generado atraviesa la planta y extrae las microgotas del AE. Este vapor de agua aromático se enfría en un serpentín mediante un circuito de agua fría. A la salida del serpentín, se obtiene una mezcla de agua aromática y AEs. El AE, de menor densidad que el agua, flota, lo que permite recuperarlo fácilmente³⁴.

Propiedades terapéuticas de los AEs

Desde el punto de vista farmacológico, las propiedades de los AEs son muy variables debido a la heterogeneidad de sus componentes. Algunas de las moléculas presentes en los AEs de ciertas plantas poseen gran interés terapéutico, lo que ha dado origen a la aromaterapia. Algunas de estas acciones, por sus efectos sobre la piel, han encontrado también su aplicación en cosmética. Por otro lado, desde el punto de vista toxicológico, los AEs son potencialmente tóxicos ya que fácilmente puede darse una sobredosificación, incluso con AEs de plantas que en sí mismas son muy poco tóxicas. Además, algunos muestran una toxicidad específica por tener componentes que atraviesan la barrera hematoencefálica y que afectan al sistema nervioso central, como ocurre con la tuyona, que abunda en las esencias de ajeno, tuya y salvia³⁷.

Taxonomía de la especie vegetal *Hedyosmum* sp.

Familia Chloranthaceae: se caracteriza por ser árboles o arbustos o hierbas, tallos nudosos, fuertemente aromático. Hojas simples, opuestas, margen aserrado, unidas por las bases de sus pecíolos en una vaina estipular, a menudo con apéndices lineares. Inflorescencias espigas, racimos. Flores unisexuales, el perianto (sépalos y pétalos) ausente o con 3 lóbulos;

estambres 1 - 3; ovario desnudo o ínfero. Frutos drupáceos; 1 semilla, muy dura, conteniendo abundante aceite³⁸.

Género *Hedyosmum*: árboles o arbustos, rara vez plantas herbáceas, monoicas o más frecuentemente dioicas (figura 4), a menudo fuertemente aromáticas, con las ramas quebradizas, articuladas en los nudos, los que suelen ser bastante evidentes; hojas opuestas, con los peciolos connados en la base a manera de vainas alrededor de los tallos, estípulas por lo común presentes, partiendo del margen de la vaina, de formas y tamaños variados, láminas con el borde dentado, de consistencia algo carnosas a coriácea¹⁰.

El género *Hedyosmum* consta de 40 especies distribuidas principalmente en las montañas desde el estado de Veracruz (México) hasta el Brasil y Paraguay; una especie se encuentra en el sureste de Asia. En el Ecuador están representadas 15 especies, de las cuales 12 se encuentran en los bosques andinos y subpáramos: *Hedyosmum anisodorum* Todzia, *H. cuatrecazanum* Occh., *H. cumbalense* Karsten, *H. goudotianum* Solms-Laub., *H. luteynii* Todzia, *H. purpurascens* Todzia, *H. racemosum* G. Don, *H. scabrum*, Solms-Laub., *H. spectabile* Todzia, *H. sprucei* Solms-Laub., *H. strigosum* Todzia y *H. translucidum* Cuatrec³⁹.

Taxonomía del género *Hedyosmum*

Reino: Plantae
Phylum: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Chloranthales
Familia: Chloranthaceae
Género: *Hedyosmum*⁴⁰



Figura 4. Género *Hedyosmum*

Fuente: http://www.efloras.org/object_page.aspx?object_id=12832&flora_id=201

CAPITULO II

METODOLOGÍA

Tipo de investigación

- **Nivel descriptivo:** se recolectó información descrita en la literatura científica acerca del uso tradicional y las propiedades biológicas como la antibacteriana atribuidas al género *Hedyosmum* sp., para justificar esta investigación y discutir los resultados encontrados.
- **Diseño cuasi experimental:** se modificó una de las variables existentes, ya que se realizaron ensayos utilizando distintas concentraciones del AE, además se usaron antibióticos comerciales como controles positivos y dimetilsulfóxido (solvente que usó para preparar el stock del aceite) como control negativo.
- **Corte transversal:** la investigación se ejecutó con el AE obtenido de la planta *Hedyosmum* sp. recolectada un lugar específico (bosque natural Jacarón) y en un tiempo determinado durante el periodo octubre 2018 - febrero 2019.
- **Carácter mixto:** ya que se recolectaron datos relacionados con la investigación, análisis de datos tanto cualitativos (observación de la inhibición mediante los halos de crecimiento) como cuantitativos (medición de los halos de inhibición) dando respuesta al planteamiento del problema.

Determinación de la población y muestra

Población

Especies vegetales pertenecientes al género *Hedyosmum* y especies bacterianas grampositivas y gramnegativas ATCC.

Muestra

La planta *Hedyosmum* sp. y las cepas grampositivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y gramnegativas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Variables de estudio

Variable independiente: diferentes concentraciones del AE de *Hedyosmum* sp.

Variable dependiente: actividad antibacteriana frente a cepas *S. aureus*, *E. faecalis* y *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*.

Técnicas e instrumentos para la recolección de datos

Técnicas: observación directa

Instrumentos: ficha de observación, cámara fotográfica

Material y métodos

- **Materiales:** lápiz graso, asas de platino, micropipetas variables automáticas, puntas amarillas y azules, pipetas de Pasteur, mechero de bunsen, probeta de 250 mL, Erlenmeyer de 500 y 1000 mL, vasos de precipitación de 100 y 200 mL, hisopos estériles, tubos de tapa rosca 16 x 150, tubos Eppendorf, cajas mono Petri de plástico estériles desechables, cinta adhesiva, discos de antibióticos comerciales, discos en blanco (anexo 1).
- **Equipos:** cámara de flujo laminar (marca HFsafe 900), incubadora (marca Memmert), autoclave (marca Tuttnauer), refrigeradora, balanza analítica (marca Adam Equipment), plancha de calentamiento, vortex (marca BenchMixer™), computador portátil, cámara fotográfica (anexo 1).
- **Solventes:** agua destilada, suero fisiológico estéril, DMSO (Dimetilsulfóxido)
- **Medios de cultivo:** agar tripticasa soya (TSA), agar nutritivo (AN), agar Mueller Hilton (AMH), agar infusión cerebro-corazón (BHI) (anexo 2).

Muestras biológicas

- Bacterias ATCC que fueron facilitadas por el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Chimborazo y corresponden a cepas de la Colección de Cultivo Tipo Americano con sus siglas en inglés ATCC (American Type Culture Collection). Las bacterias grampositivas fueron *S. aureus* ATCC 28923 y *E. faecalis* ATCC 29212 y las gramnegativas *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 (anexo 6).
- Aceite esencial obtenido de las hojas de la planta *Hedyosmum* sp.

Procedimiento de la investigación

Extracción y aislamiento del AE

La extracción se realizó a partir de 2000 g de partes aéreas (hojas frescas) recolectadas por el Ing. Franklin Enriquez Cargua Catagnia, después de ser pesadas se sometieron a la extracción por el método de hidrodestilación mediante la utilización de la trampa de Clevenger, durante 4 - 5 horas a una temperatura entre 60 - 70 °C (anexo 3). El aceite obtenido fue guardado en refrigeración a 4 °C en tubos Eppendorf estériles hasta su análisis.

Preparación de la solución madre del AE y diluciones seriadas

El AE se disolvió en DMSO a la concentración de 500000 µg/mL (ppm) para lo cual se pesó 0,503 g de aceite y se añadió 1000 µL de DMSO (anexo 4) se guardó en refrigeración a 4 °C hasta su uso en los ensayos de actividad. A partir de esta solución concentrada se realizaron tres diluciones seriadas (anexo 5) en tubos Eppendorf estériles preparadas a las concentraciones de 250000, 125000 y 62500 µg/mL previo a la realización de los ensayos.

Conservación de las bacterias

Se llevaron a cabo resiembras periódicas para la conservación de las bacterias en AN, a excepción de *E. faecalis* debido a sus exigencias metabólicas se lo realizó en BHI.

Determinación de la actividad antibacteriana del AE de *Hedyosmum* sp.

La actividad antibacteriana se determinó mediante el método de difusión en agar o Kirby Bauer utilizando discos de papel de filtro.

Preparación del preinóculo bacteriano

El preinóculo, que debe ser un cultivo fresco, fue preparado a partir de cultivos sólidos bacterianos de los que se transfirieron una o dos colonias a placas de Petri con TSA para el caso de las bacterias *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *K. pneumoniae*, y con BHI para *E. faecalis* y se incubaron a 37 °C durante 18 horas (anexo 7).

Preparación de los inóculos bacterianos y siembra en placas con AMH

A partir del preinóculo, tras las 18 horas de incubación, se transfirieron unas colonias con la ayuda de un asa esterilizada a un tubo conteniendo solución salina al 0,9% estéril hasta

obtener una turbidez equivalente al patrón McFarland 0,5 que corresponde a una densidad del recuento de células aproximadamente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (anexo 7). Posteriormente, con un hisopo estéril impregnado en la solución bacteriana preparada y eliminado el exceso contra las paredes del tubo se sembraron placas de Petri con AMH empleando la técnica de los tres giros, pasando el hisopo por toda la superficie de dos a tres veces antes de efectuar cada giro, para distribuir uniformemente el inóculo.

Incorporación de los discos impregnados con el aceite puro y las diluciones seriadas

Las placas con el inóculo de cada una de las bacterias se dejaron secar durante 4-5 minutos en posición invertida. A continuación, se colocaron los discos impregnados con 15 μ L de aceite puro y de las diluciones realizadas anteriormente (500000, 250000, 125000 y 62500 μ g/mL). Además, en cada ensayo se colocó un disco impregnado con DMSO que constituía el control negativo, y como control positivo se usaron discos de antibióticos comerciales, de Ciprofloxacina [5 μ g] para los ensayos realizados con las cepas grampositivas y Amikacina [30 μ g] con las cepas gramnegativas (anexo 8). Estas pruebas de susceptibilidad se realizaron por duplicado intra e interensayos.

Preincubación, incubación de las placas y lectura de resultados

Una vez realizadas las siembras de las respectivas especies bacterianas en las placas con AMH y colocados los discos como se mencionó anteriormente, estas fueron preincubadas en refrigeración a 4°C durante 30 minutos y al cabo de este tiempo se incubaron a 37°C durante 24 horas (anexo 9). Finalmente, tras el período de incubación se observaron los resultados de la prueba, en la cual la presencia de un halo de inhibición de crecimiento bacteriano alrededor del disco se consideró un resultado positivo o sensible, cuyo diámetro fue medido (mm) y como negativo o resistente la ausencia de dicho halo (anexo 10). Se midieron los diámetros de los halos de inhibición.

Análisis de datos

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) del aceite frente a cada una de las bacterias ensayadas fueron determinadas mediante la observación directa de los resultados obtenidos en cada prueba y la recopilación de los datos de la medición del diámetro de los halos de inhibición. Los resultados fueron tabulados usando como herramienta el programa de procesamiento de datos Excel.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción y aislamiento del AE

A partir de 2000 g de hojas frescas de *Hedyosmum* sp. que fueron sometidas a un proceso de hidrodestilación fue extraído y aislado 1,8 mL de AE que representó un rendimiento de 0,09%, que fue calculado tomando en cuenta el volumen del aceite y el peso del material fresco utilizado para la extracción. Este resultado fue mayor al rendimiento de 0,071% obtenido por Torres *et al.*¹³ quienes estudiaron la planta *H. luteynii* y aplicaron el mismo método de destilación, así como el rendimiento de 0,26 % reportado en el estudio con la especie *H. racemosum* realizado por Correa⁴². Contrario a esto, Zamora *et al.*⁴³ registraron un rendimiento de 1,2% en el estudio con *H. translucidum*, el cual supera el valor encontrado en esta investigación, sin embargo, estos autores usaron el método asistido por microondas. Resulta importante mencionar que existen factores que influyen en el rendimiento de los diferentes AEs, entre ellos se incluye los factores climáticos y las condiciones en las que se realizó el procedimiento como la temperatura, la presión y la cantidad de material vegetal⁴².

Actividad antibacteriana del AE

El efecto inhibitor del AE sobre el crecimiento de cepas bacterianas grampositivas y gramnegativas ATCC de interés clínico evaluado mediante el método de difusión en disco o Kirby Bauer fue indicado en el apartado del procedimiento de la investigación. Los resultados obtenidos en esta investigación se expresan en las tablas 1 y 2, los cuales fueron analizados a partir de las mediciones de los diámetros de los halos de inhibición en mm, así mismo las determinaciones de las CMIs fueron realizadas mediante los resultados que arrojaron las pruebas de susceptibilidad ejecutadas a diferentes concentraciones del aceite (500000, 250000, 125000, 62500 µg/mL).

La actividad antibacteriana del AE de *Hedyosmum* sp. frente a las bacterias gramnegativas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 se muestra en la tabla 1 evidenciándose que el aceite puro resultó más activo frente a *P. aeruginosa* con un halo de inhibición de 21 mm seguido de 14 y 7 mm para *E. coli* y *K. pneumoniae*, respetivamente. Así mismo, este efecto biológico fue corroborado con los valores de CMIs, ya que el aceite mostró una CMI aproximada de 250000 µg/mL frente a *P. aeruginosa* inferior a la determinadas frente *E. coli* que arrojó un

valor de CMI de 500000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La CMI del aceite frente a *K. pneumoniae* resultó >500000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Tabla 1. Actividad antibacteriana del AE de *Hedyosmum* sp. expresado por los halos de inhibición (mm) con su respectivo valor de CMI, frente a bacterias gramnegativas.

Bacterias gramnegativas	Aceite esencial					Control positivo	Control negativo	CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
	Concentraciones ($\mu\text{g}/\text{mL}$)					Amikacina (30 μg)	DMSO	
	Aceite puro	500000	250000	125000	62500			
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	14	7	0	0	0	30	0	500000
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	7	0	0	0	0	28	0	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	21	13	7	0	0	37	0	250000

La tabla 2 muestra el efecto biológico del AE de *Hedyosmum* sp. frente a las bacterias grampositivas *Staphylococcus aureus* ATCC 28923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 observándose que el aceite resultó inactivo frente a estas cepas ya que no inhibió su crecimiento, lo que indica que estas especies bacterianas son resistentes al AE puro y, por tanto, a todas las concentraciones ensayas.

Tabla 2. Actividad antibacteriana del AE de *Hedyosmum* sp. expresado por los halos de inhibición (mm) frente a bacterias grampositivas.

Bacterias grampositivas	Aceite esencial					Control positivo	Control negativo
	Concentraciones ($\mu\text{g}/\text{mL}$)					Ciprofloxacina (5 μg)	DMSO
	Aceite puro	500000	250000	125000	62500		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 28923	0	0	0	0	0	35	0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0	0	0	0	0	37	0

Los resultados obtenidos en este estudio que expresan una mayor sensibilidad de las bacterias gramnegativas no coinciden con los reportados por Kirchner *et al.*⁴⁴ quienes en su investigación indican que el AE de *H. brasiliense* presentó una actividad antibacteriana frente a las bacterias grampositivas *S. aureus*, *S. saprophyticus* y *B. subtilis* mayor a la registrada frente a las gramnegativas. La susceptibilidad de las bacterias grampositivas y la tolerancia relativa de las gramnegativas a los AEs se ha correlacionado con la presencia de una capa externa hidrofílica. Se presume que la penetración de componentes hidrófobos en microorganismos gramnegativos es más difícil debido a la presencia de una segunda barrera física formada por la membrana externa⁴⁵.

Así mismo, en el estudio realizado por Guerrini *et al.*⁴⁶ acerca de la actividad con el AE de *H. sprucei* frente a bacterias patógenas humanas reportaron que las cepas más sensibles fueron las grampositivas *L. grayi* y *S. aureus* con CMI de 250 y 1000 µg/mL respectivamente, siendo esta última responsable de importantes infecciones nosocomiales. Las bacterias gramnegativas con CMI >2000 µg/mL fueron más resistentes a los tratamientos.

Los AEs tienen un uso muy particular en la prevención y tratamiento de varias enfermedades, generalmente en las que son basadas en observaciones de medicina popular. Aproximadamente 300 AEs caracterizados son económicamente importantes debido a su uso extensivo en las industrias farmacéutica, cosmética y de perfumes⁴⁴.

CONCLUSIONES

1. Se aisló 1,8 mL de aceite esencial (AE) a partir de 2000 g de hojas frescas trituradas de la especie vegetal *Hedyosmum* sp. colectada en el bosque natural Jacarón mediante el método de hidrodestilación usando la trampa de Clevenger, lo cual representó un rendimiento de 0,09%.
2. Las pruebas de actividad antibacterianas realizadas empleando el método de Kirby Bauer frente a las bacterias *Escherichia coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (gramnegativas) y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (grampositivas) mostraron que el AE puro fue activo solo frente a las bacterias gramnegativas, siendo mayor el efecto de inhibición del crecimiento sobre *P. aeruginosa*, seguido de *E. coli* y *K. pneumoniae*, resultando en medidas de halos de inhibición de 21, 14 y 7 mm, respectivamente.
3. Los análisis de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) del AE de *Hedyosmum* sp. realizados en las pruebas de actividad frente a cada especie bacteriana en estudio y utilizando concentraciones seriadas del aceite (500000, 250000, 125000 y 62500 µg/mL) confirmaron una mejor actividad frente a *P. aeruginosa*, ya que la CMI fue de 250000 µg/mL inferior a la obtenida con *E. coli* que fue de 500000 µg/mL. Para el resto de las bacterias la CMI del AE fueron superiores a 500000 µg/mL.

RECOMENDACIONES

1. La conservación de los aceites esenciales extraídos de distintas partes de las especies vegetales se debe realizar guardándolos en frascos ámbar bien sellados y en refrigeración a 4°C para evitar la evaporación de compuestos que podrían ser bioactivos, ya que son mezclas volátiles. Es importante la correcta esterilización de los materiales para su utilización y la manipulación idónea de las cepas bacterianas para evitar la contaminación durante los ensayos, tanto con microorganismos del medio ambiente como con aquellos que son comensales de nuestro cuerpo.
2. La motivación a los estudiantes para que realicen investigaciones básicas en este campo de estudio, en las que no solo se amplíe la gama de estirpes bacterianas (que incluya también cepas aisladas de pacientes resistentes o multirresistentes a antibióticos), sino que también se realicen estudios con otras especies vegetales de modo consciente (protegiendo los bosques), debido a que Ecuador cuenta con una diversidad de plantas que aún no han sido estudiadas, que poseen un gran potencial y de las que se podrían obtener principios activos para la creación de nuevos medicamentos.
3. La Universidad Nacional de Chimborazo debería brindar financiamiento o aporte económico para llevar a cabo más investigaciones de este tipo, logrando así generar nuevos productos que permitan llegar a la solución de problemas relacionados con la salud. Además, se sugiere que los estudiantes reciban un reconocimiento que certifique su participación en un trabajo de investigación (titulación) que represente un mérito avalado por las autoridades de la Universidad.
4. La concientización a la sociedad a través de redes sociales como Facebook, Twitter, entre otras, realizando campañas y charlas informativas presenciales a los sitios o grupos de personas que no tienen acceso a esta información sobre el uso adecuado de los antibióticos para evitar la resistencia adquirida de las bacterias a estos, que en la actualidad avanza a pasos agigantados.
5. La publicación de los resultados obtenidos en eventos de difusión científica como un congreso o artículos de revista indexadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Soria N. Las Plantas Medicinales y su aplicación en la Salud Pública. Rev Salud Publica Paraguay [Internet]. 2018;8:7–8. Available from: file:///C:/Users/User/Downloads/500-1630-1-PB.pdf
2. Zuluaga G. Plantas Medicinales en el Mundo Moderno - Espiritualidad [Internet]. 2017 [cited 2019 Feb 17]. Available from: <https://wanamey.org/plantas-medicinales/plantas-medicinales-mundo.htm>
3. Carvajal, L. Vimos K. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Lasiocephalus ovatus* que crece en Ecuador, en el periodo Abril - Agosto 2017 [Internet]. 2017 [cited 2018 Nov 21]. Available from: <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/4160/1/UNACH-EC-FCS-LAB-CLIN-2017-0014.pdf>
4. OMG. 10 amenazas a la salud mundial en 2018 [Internet]. WHO. World Health Organization; 2018 [cited 2019 Feb 16]. Available from: <https://www.who.int/features/2018/10-threats-global-health/es/>
5. Mayorga D. Enfermedades infecciosas más comunes en Ecuador [Internet]. SCRIBD. [cited 2019 Feb 16]. Available from: <https://es.scribd.com/doc/52492103/ENFERMEDADES-INFECIOSAS-COMUNES-EN-EL-ECUADOR>
6. OMS. WHO | Antimicrobial resistance. WHO [Internet]. 2015 [cited 2018 Nov 20]; Available from: http://www.who.int/medicines/areas/rational_use/emp_amr/en/
7. World Health Organization. Resistencia antimicrobiana [Internet]. WHO. 2018 [cited 2018 Nov 20]. Available from: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
8. OMG. Diez cuestiones de salud que la OMS abordará este año [Internet]. WHO. 2019 [cited 2019 Feb 16]. Available from: <https://www.who.int/es/emergencias/ten-threats-to-global-health-in-2019>
9. OMG. OMS | Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos [Internet]. WHO. World Health Organization; 2017 [cited 2019 Feb 16]. Available from: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/es/>
10. Calderon G. Chloranthaceae. flora del bajo y Reg adyacentes [Internet]. 2006 [cited 2018 Nov 16];1–7. Available from: <http://inecolbajio.inecol.mx/floradelbajio/documentos/fasciculos/ordinarios/Chloranthaceae 141.pdf>
11. Ansaloni R, Wilches I, León F, Peñaherrera E, Orellana A, Tobar V, et al. Estudio Preliminar sobre Plantas Medicinales Utilizadas en Algunas Comunidades de las Provincias de Azuay, Cañar y Loja, para Afecciones del Aparato Gastrointestinal. Rev Tecnológica - ESPOL [Internet]. 2010 [cited 2019 Feb 17];23(1). Available from: <http://rte.espol.edu.ec/index.php/tecnologica/article/view/40/12>
12. Zamora A, Perdomo D. Composición química del aceite esencial de hojas de

- Hedyosmum translucidum Cuatrec., Chloranthaceae (Granizo). Boletín Latinoam y del Caribe Plantas Med y Aromáticas [Internet]. 2016 [cited 2018 Nov 21];15(3):192–8. Available from: www.blacpma.usach.cl
13. Torres S, Tovar M, García V, Lucena M, Araujo L. Composición química del aceite esencial de las hojas de Hedyosmum lutey nii Todzia (Chloranthaceae). Rev Peru Biol la Fac Ciencias Biológicas. 2018;25(May):173–8.
 14. Antibiotic resistance [Internet]. World Health Organization. 2018 [cited 2018 Nov 20]. Available from: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
 15. Avello M, Cisternas I. Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. Rev Med Chil [Internet]. 2010 Oct [cited 2018 Dec 27];138(10):1288–93. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872010001100014&lng=en&nrm=iso&tlng=en
 16. Bodeker G, Kronenberg F. A public health agenda for traditional, complementary, and alternative medicine. Am J Public Health [Internet]. 2002 Oct [cited 2019 Jan 3];92(10):1582–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12356597>
 17. Bravo L. Análisis del sector de hierbas aromáticas y medicinales del Ecuador y sus potenciales mercados de exportación [Internet]. Universidad Tecnológica Equinoccial; 2010 [cited 2018 Nov 18]. Available from: http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/6713/1/41808_1.pdf
 18. SN. Lista de Plantas Medicinales del Ecuador (y para que sirven) Foros Ecuador 2019 [Internet]. Foros ecuador.ec. 2017 [cited 2019 Feb 15]. Available from: <http://www.forosecuador.ec/forum/aficiones/salud/117954-lista-de-plantas-medicinales-del-ecuador-y-para-que-sirven>
 19. Pérez M, Mota M. Morfología y estructura bacteriana [Internet]. [cited 2019 Jan 3]. Available from: https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/43169930/MorfologiayEstructuraBacteriana.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1546580429&Signature=y7gCK%2B5CdUY4hfwZSUTMfwgnzW8%3D&response-content-disposition=inline%3Bfilename%3DTEMAS_DE_BAC
 20. BDATA BIO. Staphylococcus aureus [Internet]. 2012 [cited 2018 Nov 21]. Available from: [http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas de agentes biologicos/Fichas/Bacterias/Staphylococcus aureus.pdf](http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Bacterias/Staphylococcus%20aureus.pdf)
 21. Acosta S. Enterococcus [Internet]. 2005 [cited 2018 Dec 27]. Available from: <https://codeinep.org/wp-content/uploads/2017/02/Enterococcus.pdf>
 22. Canet J. Escherichia Coli: características, patogenicidad y prevención (I) [Internet]. Seguridad e higiene alimentaria. 2016 [cited 2018 Nov 21]. Available from: <http://www.betelgeux.es/blog/2016/01/19/escherichia-coli-caracteristicas-patogenicidad-y-prevencion-i/>
 23. Echeverri L, Cataño J. Klebsiella pneumoniae como patógeno intrahospitalario: epidemiología y resistencia. IATREIA [Internet]. 2010 [cited 2019

- Jan 3];23(3). Available from: <https://www.redalyc.org/html/1805/180518994006/>
24. Espinal P, Mantilla J, Saavedra C, Leal A, Alpuche C, Valenzuela E. Epidemiología molecular de infección nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de betalactamasas de espectro extendido. *Biomédica* [Internet]. 2004;24:252–61. Available from: <file:///C:/Users/User/Downloads/1271-4892-1-PB.pdf>
 25. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. *Pseudomonas aeruginosa* [Internet]. 2017 [cited 2019 Jan 3]. Available from: [http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas de agentes biologicos/Fichas/Pseudomonas aeruginosa 2017.pdf](http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas_de_agentes_biologicos/Fichas/Pseudomonas_aeruginosa_2017.pdf)
 26. Infección bacteriana [Internet]. MSDsalud. [cited 2018 Nov 21]. Available from: <https://www.msdsalud.es/cuidar-en/infecciones/infecciones-bacterianas/es-una-infeccion-bacteriana.html>
 27. Infecciones bacterianas. [cited 2018 Nov 21]; Available from: <https://medlineplus.gov/spanish/bacterialinfections.html>
 28. Paredes F, Roca J. Acción de los antibióticos. Perspectiva de la medicación antimicrobiana. *Offarm* [Internet]. 2004 Mar 1 [cited 2019 Jan 5];23(3):11–178. Available from: <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-accion-los-antibioticos-perspectiva-medicacion-13059414>
 29. Morales M. Antimicrobianos: una revisión sobre mecanismos de acción y desarrollo de resistencia. *Acta Med Costarric* [Internet]. [cited 2019 Jan 5];28:79–83. Available from: <http://www.binasss.sa.cr/revistas/amc/v28n2/art3.pdf>
 30. Molina J. Drogas Antibacterianas [Internet]. Universidad Nacional Autónoma de Médico. 2015 [cited 2019 Feb 15]. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrmicro3275>
 31. Tafur J, Torres J, Villegas M. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Scielo.org* [Internet]. 2008 [cited 2019 Jan 5];12. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v12n3/v12n3a07.pdf>
 32. Reyes F, Palou E, López A. Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. *Temas Sel Ing Aliment* [Internet]. 2014 [cited 2019 Feb 15];8:68–78. Available from: <http://web.udlap.mx/tsia/files/2015/05/TSIA-81-Reyes-Jurado-et-al-2014.pdf>
 33. Stashenko E. Aceites Esenciales [Internet]. Primera. Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromaticas y Medicinales Tropicales, CENIVAM, editors. Bucaramanga; 2009 [cited 2018 Nov 18]. Available from: www.loviuuu.com/wedesignyouenjoy.
 34. Laboratorio HEVEA. Los Aceites Esenciales [Internet]. España; [cited 2018 Nov 17]. Available from: http://es.labo-hevea.com/downloads/HE_es.pdf
 35. Torrenegra, M. Pájaro NLM. Actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales de diferentes especies del género *Citrus*. *Rev Colomb Cienc Química Farm* [Internet]. 2017;46(2):160–75. Available from:

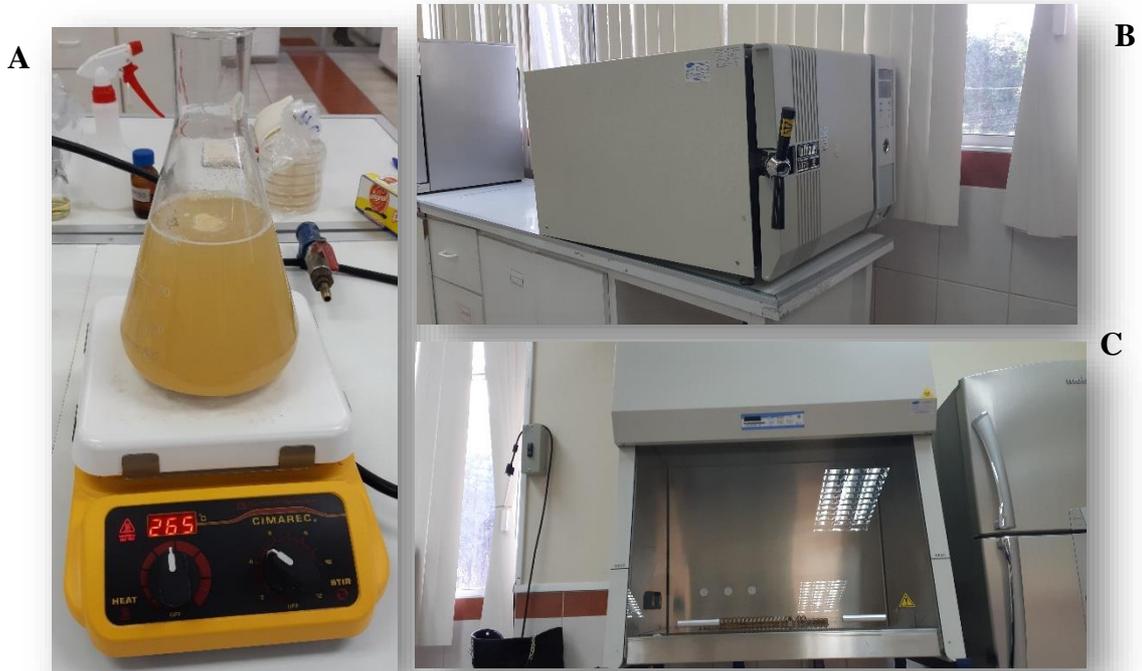
- https://www.google.com.ec/url?sa=t&source=web&rct=j&url=http://www.scielo.org.co/pdf/rccqf/v46n2/0034-7418-rccqf-46-02-00160.pdf&ved=2ahUKEwjG9cbVktreAhXmHjQIHYOUB-sQFjABegQIBxAB&usg=AOvVaw3r9d3DG0ECC_faVwW1ONLD
36. Luna P, Garcia E, Lopez A. Aceites esenciales:métodos de extracción. *Temas Sel Ing Aliment* [Internet]. 2009 [cited 2019 Feb 15];3:24–32. Available from: [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf)
 37. López T. Los aceites esenciales. *OFFARM* [Internet]. 2004 [cited 2018 Nov 18];23(7):88–91. Available from: <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13064296>
 38. Zamora N. Flora digital de la selva. *Organ para Estud Trop* [Internet]. 2006;1–2. Available from: <https://www.google.com.ec/url?sa=t&source=web&rct=j&url=https://sura.ots.ac.cr/local/florula4/families/CHLORANTHACEAE.pdf&ved=2ahUKEwjH04O4jtreAhWyljQIHfKrCJIQFjAAegQIABAB&usg=AOvVaw3KSIoVYwXHd1O1d7dNsXhc>
 39. Ulloa, C. Moller P. *Arboles y arbustos de los Andes del Ecuador* [Internet]. Aarhus University Press, editor. Aarhus, Denmark. 1993 [cited 2018 Nov 16]. 264 p. Available from: http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=201&taxon_id=114826
 40. Karst H. *Hedyosmum cumbalense* [Internet]. Catálogo de la biodiversidad. [cited 2018 Nov 21]. Available from: <http://catalogo.biodiversidad.co/file/56d9a99e3c16479905cba9ab/summary>
 41. EcuRed. *Hedyosmum* [Internet]. EcuRed. [cited 2018 Nov 21]. Available from: <https://www.ecured.cu/Hedyosmum>
 42. Correa M. Determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de actividad biológica del aceite esencial de *Hedyosmum Racemosum* G. Don de la familia Chloranthaceae de la provincia de Loja, a partir de individuos con flores femeninas. [Internet]. Universidad Técnica Particular de Loja; 2014 [cited 2019 Feb 7]. Available from: [http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/10488/1/Correa Conza Magdaly Juliana.pdf](http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/10488/1/Correa%20Conza%20Magdaly%20Juliana.pdf)
 43. Zamora A., Arturo D. Composición química del aceite esencial de hojas de *Hedyosmum translucidum* Cuatrec., Chloranthaceae (Granizo). *Boletín Latinoam y del Caribe plantas Med y aromáticas* [Internet]. 2016 [cited 2019 Feb 7];15:192–8. Available from: www.blacpma.usach.cl
 44. Kirchner K, Wisniewski A, Cruz A, Biavatti M, Netz D. Chemical composition and antimicrobial activity of *Hedyosmum brasiliense* Miq., Chloranthaceae, essential oil. *Rev Bras Farmacogn* [Internet]. 2010 Nov [cited 2019 Feb 12];20(5):692–9. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2010000500007&lng=en&nrm=iso&tlng=en
 45. Mann CM, Cox SD, Markham JL. The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*

NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Lett Appl Microbiol* [Internet]. 2001 Apr 1 [cited 2019 Feb 13];30(4):294–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1472-765x.2000.00712.x>

46. Guerrini, A G, Grandini A, Spagnoletti A, Asanza M, Scalvenzi L. Cytotoxic Effect and TLC Bioautography-Guided Approach to Detect Health Properties of Amazonian *Hedyosmum sprucei* Essential Oil. *Evidence-Based Complement Altern Med* [Internet]. 2016 Mar 28 [cited 2019 Feb 13];2016:1–8. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/ecam/2016/1638342/>

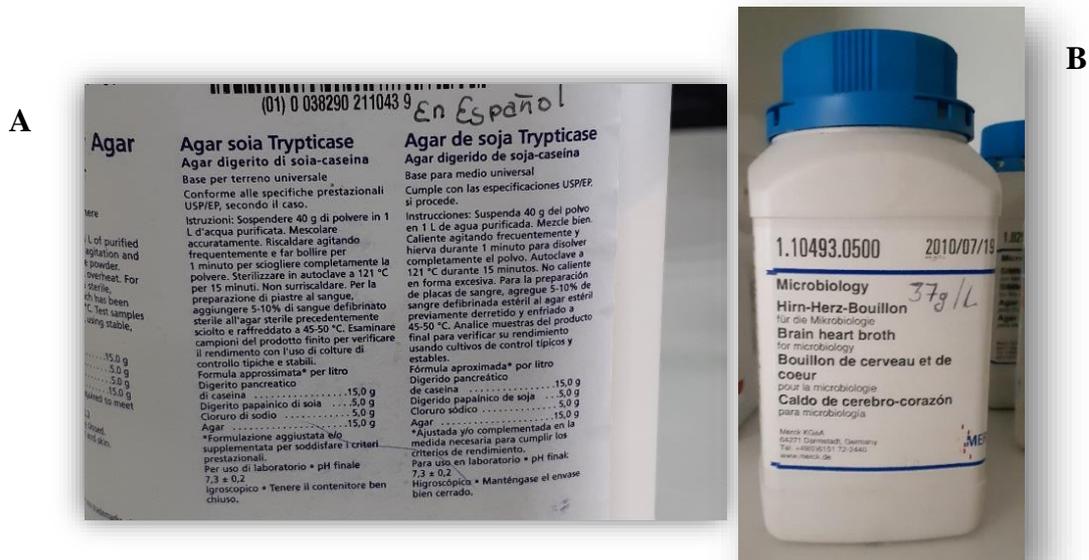
ANEXOS

Anexo 1. Varios materiales y equipos de laboratorio



A. Preparación de Agar B. Autoclave C. Cámara de Flujo Laminar

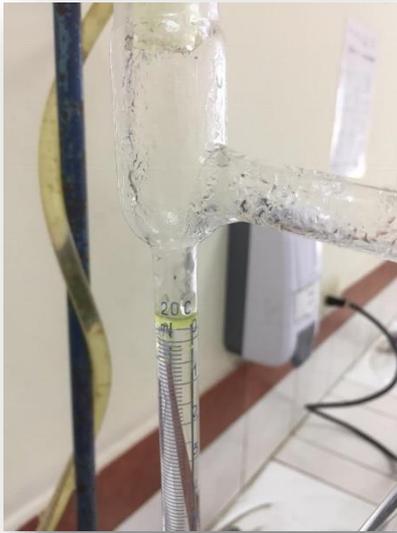
Anexo 2. Agares



A. Agar de Soja Trypticase B. Caldo de cerebro corazón

Anexo 3. Extracción del aceite Hedyosmum

A



B



A. AE en la trampa Clevenger B. Equipo de hidrodestilación

Anexo 4. Preparación de solución madre 500 000 ppm de AE.



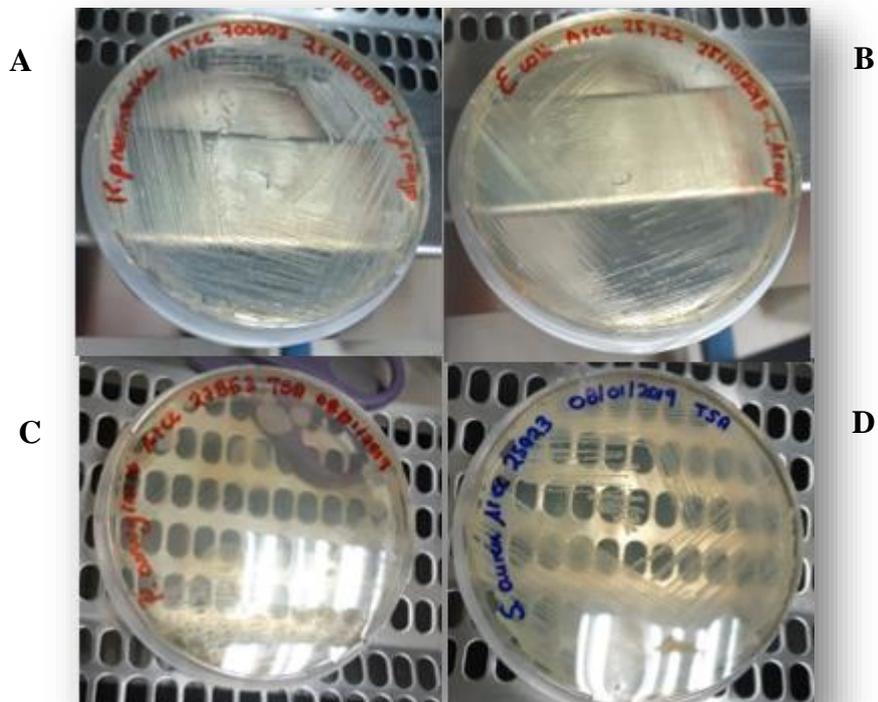
Peso del AE

Anexo 5. Preparación de diluciones en el Eppendorf



Realización de las concentraciones partiendo de la solución madre

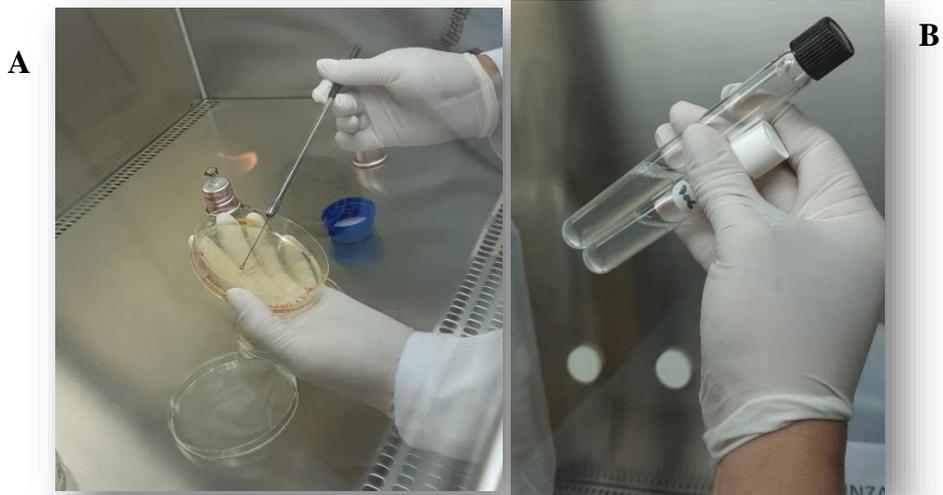
Anexo 6. Bacterias de interés clínico



A. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 **B.** *Escherichia coli* ATCC 25922

C. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 **D.** *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Anexo 7. Preparación del Pre-inóculo e inóculo



A. Siembra de una bacteria **B.** Comparación del inóculo con el patrón de McFarland

Anexo 8. Colocación de los discos impregnados



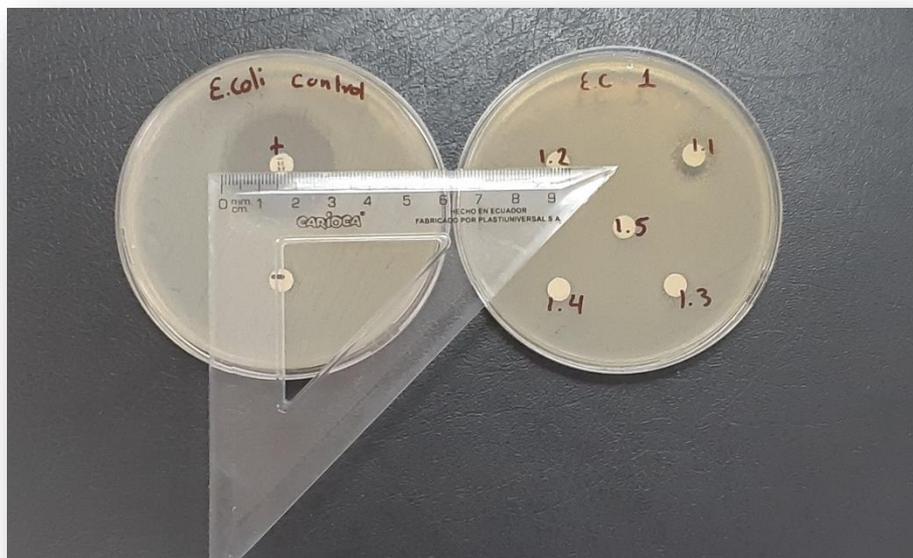
A. Colocación de discos de control **B.** Pipetear 15 µL de aceite y sus concentraciones en los discos en blanco

Anexo 9. Preincubación e incubación de las placas



A. Colocación en refrigeración B. Incubación durante 24 horas a 37°C

Anexo 10. Lectura de las pruebas



Medición de los halos