



**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 antimicrobiana de extractos de tallos y flores del *Hedyosmum* sp. recolectadas en el bosque Jacarón, Chimborazo. Octubre 2018-febrero 2019

**Autora:** Stefanye Anahy Valarezo Flores

**Tutora:** Dra. Liliana Araujo Baptista Ph.D

**Tutora Científica:** Dra. María Eugenia Lucena Ph.D

**Riobamba – Ecuador**

**2019**

## REVISIÓN DEL TRIBUNAL

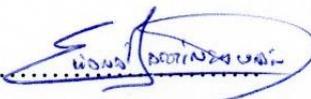
Los miembros del tribunal de graduación del proyecto de investigación de título: “Actividad antimicrobiana de extractos de tallos y flores del *Hedyosmum* sp. recolectadas en el bosque Jacarón, Chimborazo. Octubre 2018-febrero 2019”, presentado por Stefanye Anahy Valarezo Flores, dirigido por: Dra. Liliana Margarita Araujo Baptista PhD. Una vez escuchada la defensa oral y recibido 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 firma:

Mgs. Mercedes Balladares  
Presidenta del tribunal



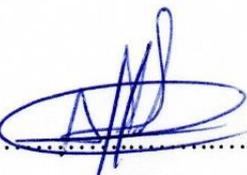
.....  
Firma

Lic. Eliana Martínez  
Miembro del tribunal



.....  
Firma

Mgs. Félix Falconí  
Miembro del tribunal



.....  
Firma

## DECLARACIÓN DEL TUTOR

Yo, Liliana Araujo Baptista docente de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico en calidad de Tutora del proyecto de investigación con el tema “Actividad antimicrobiana de extractos de tallos y flores del *Hedyosmum* sp. recolectadas en el bosque Jacarón, Chimborazo. Octubre 2018-febrero 2019”, propuesto por la Srta. Valarezo Flores Stefanye Anahy, egresada de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico de la Facultad de Ciencias de la Salud, luego de haber realizado las debidas correcciones, certifico que se encuentra apta para la defensa pública del proyecto. Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad facultando a la interesada hacer el uso del presente para los 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 Valarezo Flores Stefanye Anahy con cédula de identidad número 230072276-2 y la directora del proyecto Dra. María Eugenia Lucena Ph.D; y el patrimonio intelectual de la misma a la Universidad Nacional de Chimborazo”.



Stefanye Anahy Valarezo Flores

C.I. 2300722762

## **AGRADECIMIENTO**

En primer lugar, agradezco a Dios por darme fuerzas para seguir adelante y no darme por vencida, agradezco de manera especial a mis Tutoras Dra. Liliana Araujo y Dra. María Eugenia Lucena, cuyos esfuerzos ayudaron en la realización de este proyecto, a mis docentes, de quienes he aprendido mucho, gracias por su paciencia y enseñanzas. Finalmente, a esta prestigiosa Universidad, la cual abre sus puertas para que los jóvenes sigan preparándose para un futuro competitivo y cumpliendo sus sueños de ser profesionales de calidad.

**Stefanye Valarezo**

## **DEDICATORIA**

Dedico este Proyecto de Investigación a mis padres y hermano, quienes han sido mi apoyo en todo momento y nunca dudaron de mis capacidades, son mi más grande motivación para seguir adelante, a mis abuelitos, quienes han sido como mis segundos padres y con sus sabios consejos supieron guiarme, siempre me motivaron a cumplir mis sueños y no rendirme. A mis mejores amigos: Cory y Luis, que estuvieron a mi lado todo este tiempo, los amo demasiado.

**Stefanye Valarezo**

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>OBJETIVOS</b> .....	5
Objetivo general .....	5
Objetivos específicos.....	5
<b>CAPÍTULO I</b> .....	6
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	6
Infecciones bacterianas.....	6
Bacterias .....	6
Estructura bacteriana .....	6
Bacterias Gram positivas .....	7
Bacterias Gram negativas .....	8
Generalidades de los antibióticos .....	8
Mecanismos de acción de los antibacterianos .....	9
Mecanismos de resistencia de las bacterias a los antibióticos.....	10
Importancia de las plantas medicinales .....	12
Plantas medicinales en Ecuador .....	12
Plantas antimicrobianas .....	12
Extractos vegetales .....	13
Familia Chloranthaceae .....	14
Género <i>Hedyosmum</i> .....	14
Usos medicinales y antecedentes.....	14
Métodos para la determinación de actividad antibacteriana.....	15
<b>CAPÍTULO II</b> .....	17
<b>METODOLOGÍA</b> .....	17
Tipo de investigación.....	17
Población y muestra.....	17
Variables de estudio.....	18
<b>Procedimientos de la investigación: material y métodos</b> .....	18
Material.....	18
Medios de cultivo .....	18
Equipos .....	19
Reactivos .....	19

Material vegetal .....	19
Cepas bacterianas ATCC .....	19
Obtención de los extractos hexánicos de hojas y flores de la especie vegetal <i>Hedyosmum</i> sp.....	19
<b>Determinación de la actividad antibacteriana</b> .....	19
Mantenimiento y conservación de los microorganismos .....	19
Preparación del preinóculo .....	20
Preparación del inóculo .....	20
Preparación solución stock .....	20
Preparación de los extractos a diferentes concentraciones .....	20
Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) .....	21
<b>CAPÍTULO III</b> .....	22
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	22
Rendimiento de los extractos hexánicos.....	22
Actividad antibacteriana de los extractos hexánicos .....	22
<b>CONCLUSIONES</b> .....	27
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	28
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	29
<b>ANEXOS</b> .....	36

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura de las bacterias Gram positivas y Gram negativas. ....	7
<b>Figura 2.</b> Mecanismos de acción de los antimicrobianos .....	10
<b>Figura 3.</b> Mecanismos de resistencia de las bacterias a los antibióticos. ....	11
<b>Figura 4.</b> Especie vegetal <i>Hedyosmum</i> sp. y su taxonomía.....	15
<b>Figura 5.</b> Bosque natural Jacarón ubicado en el cantón Colta, en donde se encontró la especie vegetal <i>Hedyosmum</i> sp.....	15

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Actividad antibacteriana del extracto hexánico de las flores de <i>Hedyosmum</i> sp. expresado por los halos de inhibición (mm) con su respectivo valor de CMI, frente a las bacterias Gram negativas. ....	23
<b>Tabla 2.</b> Actividad antibacteriana del extracto hexánico de los tallos de <i>Hedyosmum</i> sp. expresado por los halos de inhibición (mm) con su respectivo valor de CMI, frente a las bacterias Gram negativas. ....	24
<b>Tabla 3.</b> Actividad antibacteriana del extracto hexánico de las flores de <i>Hedyosmum</i> sp. expresado por los halos de inhibición (mm) con su respectivo valor de CMI, frente a las bacterias Gram positivas. ....	25
<b>Tabla 4.</b> Actividad antibacteriana del extracto hexánico de los tallos de <i>Hedyosmum</i> sp. expresado por los halos de inhibición (mm) con su respectivo valor de CMI, frente a las bacterias Gram positivas. ....	25

## RESUMEN

A lo largo de la historia las plantas medicinales han tenido un potencial invaluable y la información sobre su rol en la prevención y cura de enfermedades se ha transmitido de generación en generación. Los compuestos bioactivos de plantas medicinales han sido estudiados ampliamente. El objetivo de esta investigación fue determinar la actividad antibacteriana de extractos hexánicos de flores y tallos de la especie vegetal *Hedyosmum* sp. frente a las cepas ATCC *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*. Las partes secas de la planta fueron molidas y maceradas en hexano durante 72 horas, y los extractos fueron filtrados, rotaevaporados y concentrados. Mediante el método de Kirby Bauer la actividad antibacteriana de los extractos hexánicos fue ensayada a las concentraciones de 500.000, 250.000, 125.000, 62.500 y 31.250 µg/mL a partir de una solución concentrada. Los rendimientos de los extractos de tallos y flores fueron de 0,9% y 1,79%, respectivamente. La actividad que mostraron los extractos fue superior frente a las bacterias Gram negativas, resultando *P. aeruginosa* la más sensible a estos, ya que se obtuvo un valor de CMI de 31.250 µg/mL para ambos, inferior a los encontrados frente a *E. coli* y *K. pneumoniae*. El efecto observado frente a las bacterias Gram positivas ensayadas indicó que los extractos son poco o nada activos a las concentraciones probadas, ya que solo *S. aureus* resultó sensible a la acción del extracto de las flores (CMI 250.000 µg/mL). Estos extractos hexánicos podrían ser fuentes naturales de compuestos antibacterianos.

**Palabras clave:** *Hedyosmum* sp., extractos, actividad biológica, antibacteriano.

## Abstract

Throughout history, medicinal plants have had invaluable potential and information about their role in the prevention and cure of diseases has been transmitted from generation to generation. The bioactive compounds of medicinal plants are studied extensively. The objective of this research was to determine the antibacterial activity of hexanic extracts of flowers and stems of the plant species *Hedyosmum sp.* against strains ATCC *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, and *Enterococcus faecalis*. The dried parts of the plant were milled and macerated in hexane for 72 hours, and the extracts were filtered, rotaevaporated and concentrated. Using the Kirby Bauer method, the antibacterial activity of the hexane extracts was tested at concentrations of 500,000, 250,000, 125,000, 62,500 and 31,250  $\mu\text{g} / \text{mL}$  from a concentrated solution. The yields of stems and flowers extracts were 0.9% and 1.79%, respectively. The activity showed by the extracts was higher than the Gram-negative bacteria, with *P. aeruginosa* being the most sensitive to these, since a MIC value of 31,250  $\mu\text{g} / \text{mL}$  was obtained for both, lower than those found against *E. coli* and *K. pneumoniae*. The effect observed against the Gram-positive bacteria tested indicated that the extracts are little or not active at the tested concentrations since only *S. aureus* was sensitive to the action of the extract of the flowers (MIC 250,000  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ). These hexanic extracts could be natural sources of antibacterial compounds.

Keywords: *Hedyosmum sp.*, Extracts, biological activity, antibacterial.



Translation reviewed by: Trujillo, Myriam

Language Center Teacher



## INTRODUCCIÓN

Desde el descubrimiento de la penicilina y su uso en la terapéutica hace más de 50 años, se inició una incesante búsqueda de nuevos compuestos antibacterianos con el objetivo de erradicar las enfermedades infecciosas que iban surgiendo<sup>1</sup>. El incremento de las enfermedades infecciosas, que suponen el 25% de todas las citas médicas anuales, amenaza la salud pública y aporta al aumento de los costos de la atención sanitaria. A nivel mundial sigue siendo la principal causa de muerte, seguida a las muertes asociadas con el cáncer y con la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC)<sup>2</sup>.

Los antibióticos son medicamentos usados para prevenir y tratar diversas infecciones bacterianas, la resistencia a los antibióticos se da cuando las bacterias mutan como respuesta al mal uso de estos fármacos<sup>3</sup>. En los últimos años se ha comprobado que existe un incremento cada vez más rápido de infecciones causadas por bacterias resistentes, multirresistentes y en algunos casos panresistentes, que de no ser combatido a tiempo puede llegar a comprometer la salud de las futuras generaciones<sup>4,5</sup>.

En el informe del Sistema Mundial de Vigilancia Antimicrobiana (GLASS), se revela la presencia de resistencia a los antibióticos en 22 países y se presume estaría afectando a unas 500.000 personas. Entre las bacterias que fueron notificadas con mayor frecuencia se encuentran: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*, seguidas de *Salmonella spp*<sup>6</sup>.

Un estudio realizado en el año 2015 en el Hospital Pediátrico Alfonso Villagómez Román de Riobamba, cuyo objetivo de determinar la resistencia antibiótica en niños con DEA, se encontró que los valores porcentuales de resistencia microbiana obtenidos para enterobacterias se ubican entre el 17,3% y 65,4% , en el caso concreto de *Escherichia coli* entre 16,9% y 64,9%, demostrando un problema actual y un futuro poco prometedor en caso de que la tendencia de aparición e incremento en las resistencias se mantenga en los próximos años<sup>7</sup>.

Un informe del Reino Unido, explica que aproximadamente para el año 2050, si no se logra controlar la resistencia a los antimicrobianos (RAM), las infecciones causadas por bacterias causarían diez millones de muertes anuales, esto sería mucho más que el número de personas que fallecen a causa del cáncer en un año, lo cual traerá consigo una consecuencia no solo

en la salud, sino también en la economía mundial, llegando a cifras que alcanzarían los 100 mil millones de dólares al año<sup>8</sup>.

El uso de la medicina tradicional en el tratamiento de distintas enfermedades es una práctica que se ha llevado a cabo desde tiempos ancestrales y ha demostrado que es una de las mejores opciones, ya que beneficia a las personas y comunidades que mantienen y conservan su uso con el fin de buscar un tratamiento alternativo a las diferentes patologías existentes<sup>9</sup>.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), gran parte de la población de los países en desarrollo recurre a la medicina tradicional como fuente de atención primaria en salud. A mediados de 1978 a través de la Declaración de Alma-Ata, se evidencia el interés de la OMS en incorporar las plantas en el ámbito sanitario<sup>2</sup>.

Las plantas han sido desde siempre una fuente imprescindible para la adquisición de productos beneficiosos en la historia de la humanidad. El constante desarrollo tecnológico favoreció no sólo una mejor utilización de todos estos recursos, sino también un mayor conocimiento de sus virtudes y posibilidades<sup>10</sup>.

En la actualidad, los aceites esenciales y diversos extractos de plantas han causado interés como fuentes de productos naturales, mismos que han sido evaluados por sus usos potenciales como remedios alternativos para el tratamiento de muchas enfermedades infecciosas. En particular, las actividades antimicrobianas de los aceites y extractos de plantas han formado la base de muchas aplicaciones, incluidas la conservación de alimentos, productos farmacéuticos, medicina alternativa y terapias naturales<sup>11</sup>.

Se estima que más de 100.000 metabolitos secundarios son producidos por las plantas, y anualmente se describen aproximadamente 1.600 estructuras químicas nuevas obtenidas a partir de plantas, de las cuales un gran número posee actividad biológica<sup>12</sup>. Los productos naturales han realizado grandes contribuciones a la salud humana por medio de la utilización de compuestos como los mencionados anteriormente; sin embargo, se evidencia la necesidad de continuar la búsqueda de nuevos compuestos que permitan dar tratamiento a diferentes enfermedades<sup>13,14</sup>.

Uno de los motivos que apoyan la probabilidad de obtener compuestos antimicrobianos originados a partir de plantas, es el hecho de que dichos compuestos podrían inhibir el crecimiento bacteriano por un mecanismo diferente que el de los antibióticos convencionales

y el resultado de estudiar dicho mecanismo, podría tener valor clínico en el tratamiento de cepas microbianas resistentes<sup>15</sup>.

Ecuador posee gran cantidad de especies vegetales por km<sup>2</sup>, su flora es muy rica y variada. Se han identificado 46 ecosistemas, entre los más importantes están: los bosques occidentales, manglares, bosques andinos, la Amazonía y Galápagos, es por esto, que se encuentra entre los 12 países megadiversos que contienen el 70% de la biodiversidad total del planeta<sup>12</sup>.

La presencia de los Andes como factor altitudinal, ha dado al territorio ecuatoriano una gran ventaja, ya que le ha proporcionado el tener diferentes climas y formas de vida, así como también una vegetación única. Ecuador no es completamente tropical o tórrido a pesar de estar situado en la zona ecuatorial<sup>12</sup>.

En Ecuador se reportan 3.118 especies que han sido usadas con propósitos medicinales, pertenecientes a 206 familias, siendo el 75% nativas y el 5% endémicas<sup>16</sup>. Una de estas familias es Chloranthaceae, dentro de la cual se encuentra el género *Hedyosmum*, que incluye 40 especies distribuidas principalmente en las montañas desde el estado de Veracruz (México) hasta Brasil y Paraguay; una especie se encuentra en el sureste de Asia. En el Ecuador se encontró 15 especies, 12 de ellas están en los bosques andinos y subpáramos<sup>17</sup>.

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<sup>18</sup>. Se utilizan como plantas ornamentales y medicinales como: tonificante, estimulante, antifúngicas, vermífugas, antidiarreicas, contra las infecciones y también con fines alimentarios<sup>19</sup>.

Existen diversas investigaciones alrededor del mundo, en las cuales se han demostrado las diferentes propiedades que poseen los aceites esenciales y extractos de algunas de las especies del género *Hedyosmum*. Un estudio realizado en España acerca de *Hedyosmum bonplandianum* del cual se aisló un nuevo flavonoide glicosídico que, al ser probado en ratones, mostró una actividad analgésica significativa<sup>20</sup>.

Sobre la base de estas consideraciones, este estudio permitió conocer la actividad antibacteriana del extracto de *Hedyosmum* sp. frente a cepas bacterianas American Type Culture Collection (ATCC) Gram positivas y Gram negativas de interés, ya que dichos

extractos podrían ser fuentes de elaboración de nuevos fármacos contra diversas enfermedades infecciosas presentes en el ser humano.

Por los antecedentes descritos resultó interesante el planteamiento de la siguiente interrogante: ¿Presentarán actividad antibacteriana los extractos hexánicos de tallos y flores obtenidos de la especie vegetal *Hedyosmum* sp. que crecen en Ecuador, frente a las cepas bacterianas ATCC de interés clínico?

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Determinar la actividad antibacteriana de los extractos hexánicos de tallos y flores del *Hedyosmum* sp. recolectados en el bosque Jacarón, provincia de Chimborazo, frente a cepas bacterianas de interés clínico.

### **Objetivos específicos**

1. Extraer de tallos y flores del *Hedyosmum* sp. mediante maceración con hexano la materia cruda, para llevar a cabo la evaluación antimicrobiana.
2. Analizar la actividad antibacteriana de los extractos hexánicos de tallos y flores de *Hedyosmum* sp. frente a bacterias ATCC Gram negativas: *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* ATCC 700603 y bacterias Gram positivas: *S. aureus* ATCC 25923 y *E. faecalis* ATCC 29212, mediante el método de Kirby Bauer.
3. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos hexánicos de los tallos y flores de *Hedyosmum* sp. frente a las cepas en estudio, a través de la medición de halos de inhibición obtenidos a diferentes concentraciones.

## **CAPÍTULO I**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **Infecciones bacterianas**

La permanencia de las enfermedades infecciosas causadas por cepas patógenas bacterianas resistentes es un grave problema de salud que se presenta a nivel mundial. Las cepas patógenas resistentes se han manifestado principalmente en los hospitales como consecuencia de múltiples factores tales como el amplio uso de antibióticos, las dosis utilizadas para el tratamiento, el tiempo de tratamiento, otros elementos que intervienen son las altas posibilidades de transmisión y contagio, así como también el estado inmunocomprometido de algunos pacientes, entre otros. Las opciones de agentes antimicrobianos utilizadas en las terapias para el tratamiento de las enfermedades infecciosas causadas por bacterias con resistencia múltiple están por lo tanto seriamente limitadas. Por tal motivo las compañías farmacéuticas están investigando principios activos de otras fuentes incluyendo a las plantas y los animales, las plantas medicinales han sido considerados como fuente potencial de nuevas drogas quimioterapéuticas, debido a su contenido de fitoquímicos y a su poco o nulo efecto tóxico<sup>21</sup>.

#### **Bacterias**

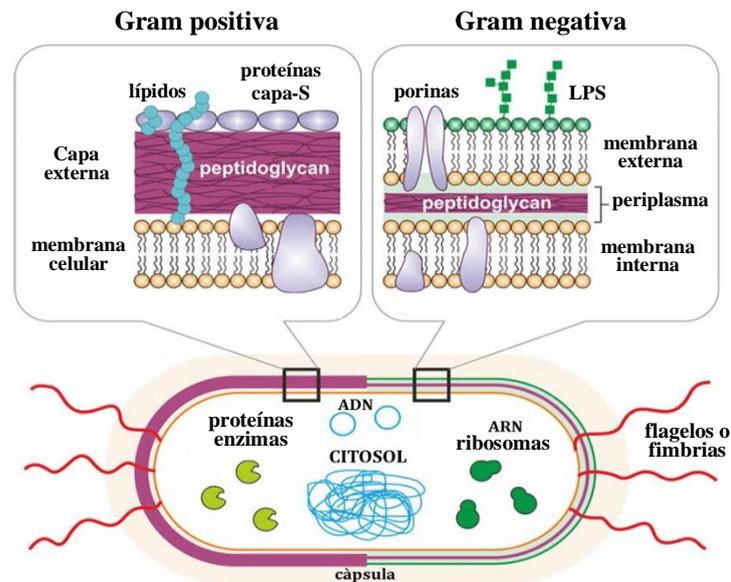
Las bacterias son estructuras unicelulares que presentan un tamaño de aproximadamente entre 0,5 y 5  $\mu\text{m}$  de longitud, se reproducen por medio de un proceso asexual denominado fisión binaria, que poseen generalmente una pared celular y esta se compone de peptidoglucano. Las bacterias son los microorganismos más abundantes del planeta<sup>22</sup>.

#### **Estructura bacteriana**

Las bacterias presentan componentes externos que son denominados permanentes o constantes y son la membrana citoplasmática, pared celular y el citoplasma con todos sus componentes. De igual manera la clasificación bacteriana puede ser realizada por la aplicación de un procedimiento denominado tinción Gram que utiliza como colorantes principales a la violeta de genciana y a la safranina, para dotar de color a las bacterias. Por medio de esta técnica se realiza la división de las bacterias en dos grandes grupos de acuerdo a la capacidad de tinción que presentan, y se encuentran: las bacterias Gram positivas y las Gram negativas<sup>22</sup>.

Las bacterias Gram positivas tienen una gruesa capa de peptidoglucano y dos tipos de ácidos teicoicos: el ácido lipoteicoico (ubicado en la cara interna de la pared celular y unido a la membrana plasmática) y el ácido teicoico (que se halla en la superficie, anclado solamente en el peptidoglucano)<sup>23</sup>.

Las bacterias Gram negativas no retienen el colorante de cristal violeta durante el proceso de coloración porque presentan una capa muy fina de peptidoglucano en su pared celular y su capa más externa está cubierta por una membrana de lipoproteínas (figura 1)<sup>23</sup>.



**Figura 1.** Estructura bacteriana de Gram positivas y Gram negativas

**Fuente:** [https://www.researchgate.net/figure/Figura-2-1-Estructura-bacteriana-on-LPS-son-els-lipopolisacarids-Basat-en-figura-2\\_fig2\\_308653548](https://www.researchgate.net/figure/Figura-2-1-Estructura-bacteriana-on-LPS-son-els-lipopolisacarids-Basat-en-figura-2_fig2_308653548)

## Bacterias Gram positivas

***Staphylococcus aureus*:** pertenecen a un grupo muy amplio de bacterias Gram positivas, su característica principal es que se dividen en agrupaciones que son similares a racimos de uva, su diámetro oscila entre 0,5 y 1,5 micras. Actualmente se han reportado 35 especies conocidas con 17 subespecies en el género *Staphylococcus*. Este género posee una gran capacidad de adaptación, por lo cual afectan a todas las especies conocidas de mamíferos<sup>24</sup>.

***Enterococcus faecalis*:** es una bacteria anaerobia facultativa, inmóvil, fermenta la glucosa sin producir gas. No presenta una reacción con la catalasa en presencia de peróxido de hidrógeno, puede vivir en ambientes extremos que incluyen pH altamente alcalino de 9,6. Los enterococos causan infecciones de las vías urinarias (IVU) de naturaleza oportunista y en ocasiones, infecciones en heridas y tejidos blandos que en gran medida, se asemejan a las producidas por las enterobacterias<sup>25</sup>.

## **Bacterias Gram negativas**

***Escherichia coli***: las enterobacterias constituyen una familia grande y diversa de bacilos Gram negativos, que pertenecen tanto a las formas de vida libre como a la flora normal de seres humanos y animales, se encuentran entre las bacterias más grandes, pues miden 2 a 4 µm de longitud con bordes paralelos y extremos redondeados. Las enterobacterias son con mucho la principal causa de infección de vías urinarias y la bacteria más común es *E. coli*<sup>25</sup>.

***Pseudomonas aeruginosa***: es un bacilo aerobio, móvil, Gram negativo que es más delgado y más pálido a la tinción que otras enterobacterias. Su característica bacteriológica más notable es la producción de pigmentos hidrosolubles de color, también muestra resistencia a los antimicrobianos de manera más consistente que todas las demás bacterias de importancia médica. *K. pneumoniae* es un patógeno oportunista que puede causar enfermedades tales como sepsis, neumonía e infecciones del tracto urinario y de los tejidos blandos<sup>25</sup>.

***Klebsiella pneumoniae***: es un bacilo Gram negativo, no móvil, de la familia Enterobacteriaceae. Es la especie de mayor importancia clínica y más estudiada dentro del género *Klebsiella*. Esta bacteria causa infección del tracto urinario y neumonía en personas sin enfermedades de base, pero la mayoría de las infecciones son adquiridas en el hospital y/o en pacientes con alguna condición debilitante<sup>26</sup>.

## **Generalidades de los antibióticos**

Las infecciones comunitarias y nosocomiales siguen constituyendo hoy en día una de las principales causas de morbilidad a nivel mundial. Desde su aparición, los antibióticos han sido y son una importante arma para el tratamiento de muchas dolencias infecciosas, algunas de las cuales causaban gran mortalidad, y su uso permitió disminuir en forma importante y notable la morbimortalidad de alguno de estos males. Un primer problema con su uso fue la aparición de reacciones adversas entre leves a severas, posteriormente se ha sumado la aparición cada vez más frecuente de bacterias resistentes y multirresistentes a uno o a varios antibióticos<sup>27</sup>.

Los agentes antimicrobianos pueden actuar en una o más áreas del funcionamiento del microorganismo y producir dos principales efectos, llamándose entonces:

**Agentes bactericidas**: cuando producen la muerte de la bacteria.

**Agentes bacteriostáticos**: sólo inhiben el desarrollo y reproducción de la bacteria<sup>27</sup>.

## **Mecanismos de acción de los antibacterianos**

### **• Inhibición de la síntesis de la pared celular**

Actúan a distintos niveles de la biosíntesis del peptidoglucano, capa esencial para la supervivencia de las bacterias, y el daño se produce por la pérdida de la rigidez de la célula bacteriana que puede causarle la muerte; por lo tanto, son considerados como agentes bactericidas. La síntesis del peptidoglucano se lleva a cabo en tres etapas y los distintos antimicrobianos pueden afectar cada una de ellas. Los representantes de este grupo son las penicilinas y cefalosporinas<sup>28</sup>.

### **• Daño a nivel de la membrana citoplasmática**

Numerosos agentes catiónicos y aniónicos pueden causar la desorganización de la membrana. Dentro de los antibióticos que actúan a este nivel, está la polimixina B y la colistina, inhibidores de bacterias gramnegativas que tienen lípidos de carga negativa en su superficie. Su acción es desorganizar la permeabilidad de la membrana ocasionando la salida de cationes de la célula bacteriana. Las polimixinas no son de uso sistémico, pues pueden unirse a varios ligandos de células del tejido corporal y son tóxicas para aparato renal y sistema nervioso<sup>28</sup>.

### **• Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos**

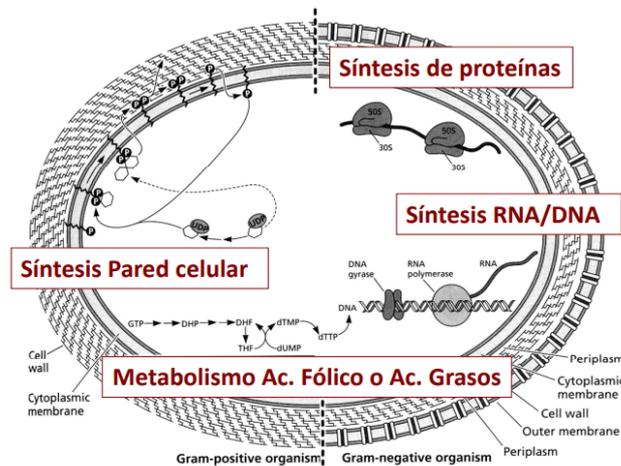
Entre estos: rifampicina, actinomicina D, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, norfloxacina. El ácido nalidíxico produce bloqueo enzimático a nivel de la "gyrasa" (necesaria para la síntesis del ácido dextrirribonucleico-ADN-). La rifampicina lo hace a nivel de la "ARN polimerasa" (enzima que normalmente inicia la síntesis de ácido ribonucleico mensajera) (ARNm)<sup>29</sup>.

### **• Inhibición de la síntesis de proteínas**

Entre estos: aminoglucósidos, cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina. Los ribosomas 70S bacterianos están constituidos por dos subunidades designadas como subunidad 30S y subunidad 50S. Estas subunidades constituyen el sitio de acción de agentes antimicrobianos, localizándose en ellas proteínas específicas a las cuales se unen las drogas. Los aminoglucósidos (estreptomina, neomicina, kanamicina, amikacina, tobramicina, gentamicina, espectinomicina, paromomicina), son azúcares complejos obtenidos de varias especies de *Streptomyces* e interfieren con la función ribosomal bacteriana, específicamente con la subunidad 30S<sup>28</sup>.

## • Antibióticos inhibidores de betalactamasas

Las betalactamasas son enzimas producidas por algunas especies bacterianas y son las responsables de la resistencia que presentan dichas bacterias hacia antibióticos que en su estructura química presentan el anillo betalactámico (como penicilinas y cefalosporinas), ya que las betalactamasas rompen ese anillo con lo cual bloquean la actividad antimicrobiana de esos compuestos. Los antibióticos inhibidores de las betalactamasas son el ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam<sup>28</sup> (figura 2).



**Figura 2.** Mecanismos de acción de los antimicrobianos

**Fuente:** [https://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/153022/mod\\_resource/content/1/Clase%20ATB%202018.pdf](https://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/153022/mod_resource/content/1/Clase%20ATB%202018.pdf)

## Mecanismos de resistencia de las bacterias a los antibióticos

Cuando se habla de resistencia antimicrobiana, se refiere al mecanismo y/o capacidad que tiene un microorganismo para resistir y sobrevivir a los efectos de un antibiótico, o mediante el cual la bacteria puede disminuir o inactivar la acción de los agentes antimicrobianos. La resistencia antimicrobiana es un problema continuo y que va en aumento. Se hace aún mayor cuando un microorganismo presenta más de un mecanismo de resistencia y cuando tiene la facultad de transmitirlo a su descendencia o también a otras bacterias de su misma o diferente especie<sup>30</sup>.

Los fenómenos de resistencia antimicrobiana son variados, destacando entre ellos cuatro mecanismos principales (figura 3).

## • Modificación o inactivación del antibiótico mediante enzimas hidrolíticas

Las bacterias sintetizan enzimas que hidrolizan al antimicrobiano, destruyendo su acción antibacteriana, sin tener posibilidad de actuar sobre el microorganismo. El ejemplo más representativo son las betalactamasas, enzimas que inactivan el antibiótico al hidrolizar el

anillo betalactámico de la molécula. Otra clase importante de antibióticos que son destruidos por enzimas son los aminoglucósidos.

- **Bloqueo de la penetración del antibacteriano mediante modificación del sitio activo**

La modificación de un aminoácido genera un blanco diferente y así disminuye la afinidad de unión por el antimicrobiano.

Modificación de PBP: el PBP (*penicillin-binding-protein*) es un complejo enzimático que permite la síntesis del peptidoglucano, un compuesto de la pared celular en bacterias, principalmente en Gram positivas, si se produce mutación del sitio de unión al antimicrobiano como los beta-lactámicos, éstos no pueden actuar y se genera resistencia a ellos.

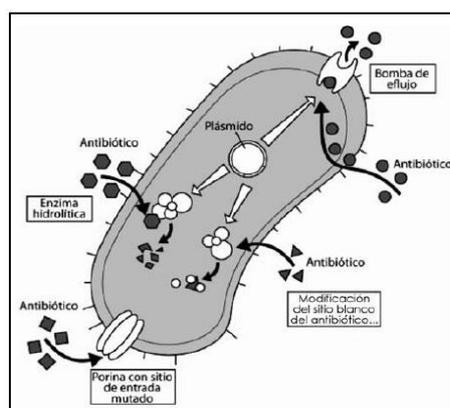
Modificación ribosomal: los genes *erm A* y *erm B* producen modificación del sitio activo del ribosoma, mediante metilación. Este mecanismo es importante en la resistencia a macrólidos en *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*.

- **Disminución de la permeabilidad de la pared celular al ingreso del antimicrobiano**

Cambios en el diámetro y/o número de porinas pueden bloquear el ingreso del antimicrobiano a la bacteria, de esta manera el antibiótico no puede penetrar la superficie bacteriana y alcanzar el núcleo celular, esta es la forma más frecuente de resistencia natural. Es un mecanismo importante en las bacterias Gram negativas, pues poseen canales proteicos denominados porinas que permiten o impiden el paso de moléculas hidrofóbicas.

- **Bombas de flujo o expulsión del antibiótico del interior de la célula bacteriana**

Transporta al antimicrobiano hacia el exterior de la célula sin modificaciones, pero sin acción antimicrobiana. Para ello, la bacteria dispone de bombas de expulsión dependientes de energía, que pueden comportarse como sistemas de eliminación de uno o varios antibióticos<sup>31</sup>.



**Figura 3.** Mecanismos de resistencia de las bacterias a los antibióticos.

**Fuente:** [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-48162009000200014](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-48162009000200014)

## **Antecedentes históricos de la medicina tradicional**

La medicina tradicional se refiere a los conocimientos, habilidades y prácticas basadas en las teorías, creencias y experiencias indígenas de diferentes culturas, utilizadas en el mantenimiento de la salud y en la prevención, diagnóstico, mejora o tratamiento de enfermedades físicas y mentales<sup>32</sup>.

Hoy en día, el conocimiento de las propiedades de las plantas medicinales se ha extendido de tal forma, que mucha gente las sigue utilizando como medicina alternativa y en ocasiones como apoyo a la llamada medicina tradicional<sup>33</sup>.

## **Importancia de las plantas medicinales**

La Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>34</sup>, indica que la Medicina Tradicional "es la suma completa de conocimientos, técnicas y prácticas fundamentadas en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas y que se utilizan para mantener la salud y prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar trastornos físicos o mentales"

## **Plantas medicinales en Ecuador**

Debido a una múltiple combinación entre ubicación geográfica y geopolítica, características geológicas y topográficas, climáticas, de precipitación y temperatura, factores biológicos y evolutivos, nuestro país se ha configurado como el escenario perfecto para la concentración de la vida expresándose en una altísima diversidad biológica conocida también como megadiversidad<sup>35</sup>.

En Ecuador se reportan 3118 especies que han sido usadas con propósitos medicinales, pertenecientes a 206 familias, siendo el 75% nativas y el 5% endémicas<sup>16</sup>.

Más del 25% de los medicamentos utilizados durante los últimos 20 años se derivan directamente de las plantas, mientras que otro 25% son derivados de productos naturales, químicamente modificados. Cabe recalcar que tan sólo entre el 5% al 15% de las aproximadamente 250,000 plantas de uso medicinal, han sido investigadas para compuestos bioactivos. Esto subraya el gran potencial de las plantas en la búsqueda de nuevos medicamentos<sup>21,35</sup>.

## **Plantas antimicrobianas**

Según la Sociedad Americana de Microbiología, las plantas son las más grandes farmacias del planeta, ya que son capaces de generar un sinnúmero de compuestos bioquímicos y de todas las plantas existentes, se usó apenas el 10%. A medida que las personas desarrollan nuevos

medicamentos para combatir las enfermedades, esos microorganismos desarrollan nuevas formas de fortalecerse y vivir más tiempo. A lo largo de la historia, en las civilizaciones antiguas, las plantas eran consideradas como fuentes para el desarrollo farmacéutico, hasta la década de 1990, aproximadamente el 80% de todos los remedios se producían a partir de raíces, cortezas y hojas de plantas. La medicina es cada vez más receptiva al uso de antimicrobianos y otros medicamentos derivados de las plantas, ya que los antibióticos tradicionales se vuelven ineficaces y las diferentes enfermedades, particularmente virales, siguen siendo intratables a este tipo de medicamento<sup>36</sup>.

### **Extractos vegetales**

Los extractos vegetales se han definido como un concentrado obtenido por tratamiento de productos vegetales con solventes apropiados, tales como agua, etanol o éter, de elementos solubles, constituidos por una mezcla de principios activos y sustancias inertes que producen de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca<sup>37</sup>.

El uso de sustancias de origen vegetal con fines terapéuticos y antimicrobianos ha llevado a investigar nuevas sustancias a partir de plantas consideradas popularmente medicinales. Un gran número de investigaciones revelan que las plantas representan una fuente potencial de agentes antimicrobianos. Teniendo en cuenta las altas tasas de resistencia tanto en bacterias Gram negativas como Gram positivas y después de un período en que la industria farmacéutica se dedicó exclusivamente a la fabricación de fármacos de síntesis, dejando atrás las antiguas medicinas que tenían como base los extractos de plantas medicinales, se hace necesario retomar las investigaciones que apunten a encontrar nuevas moléculas de origen vegetal<sup>14</sup>.

El uso de extractos vegetales con actividades biológicas ha sido de gran importancia a lo largo de los años, destacándose en ellos propiedades antiinflamatorias, antiespasmódicas, antihelmínticas, analgésicas, insecticidas, antifúngicas, antioxidantes, antibacterianas, entre otras<sup>38</sup>.

Diversos productos derivados de las plantas han mostrado un efecto biológico que los caracteriza como principios activos. Entre estos compuestos se destacan los flavonoides, fenoles, terpenos, aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos. Los cuales presentan mecanismos de acción variables; que en muchos casos no han sido dilucidados por completo<sup>39</sup>.

## **Familia Chloranthaceae**

Esta familia representa uno de los linajes más antiguos de angiospermas, esta familia está distribuida en 75 especies, las plantas de esta familia son reconocidas por sus usos tradicionales, por sus efectos analgésicos, antisépticos, antiespasmódicos y antifúngicos, además de sus propiedades anticancerígenas. Con respecto a los constituyentes químicos de la familia Chloranthaceae, se han identificado 124 compuestos obtenidos de diferentes especies de dicha familia, tales como: terpenoides, flavonoides, cumarinas, ácidos orgánicos, amidas y esteroides<sup>40</sup>.

### **Género *Hedyosmum***

El género *Hedyosmum* (figura 4), es el más abundante de la familia Chloranthaceae. Su nombre proviene de dos palabras griegas “hedy” agradable, fragante y “osmum” olor, refiriéndose a la fragancia de las hojas comparada con la fragancia de la pimienta, el limón y el anís. Las especies del género *Hedyosmum* son árboles o arbustos, rara vez plantas herbáceas, fuertemente aromáticas, tienen hojas opuestas, venas pinnadas, son dentadas, pecioladas y poseen numerosos caracteres taxonómicos. Son árboles dioicos, unos árboles con flores masculinas y con flores femeninas. Los frutos son pequeños, carnosos y de color blanco al madurar<sup>12</sup>. Una especie de este género se encontró en el bosque Jacarón en Chimborazo (figura 5).

### **Usos medicinales y antecedentes**

Murakami *et al.*<sup>41</sup> realizaron un estudio químico y farmacológico con las partes aéreas de *Hedyosmum brasiliense* y los resultados obtenidos indicaron que esta especie posee efectos analgésicos, antifúngicos, ansiolíticos, antioxidantes y antidepresivos.

Cárdenas<sup>20</sup> refiere que *Hedyosmum bonplandianum* se usa en medicina popular como infusión para aliviar el dolor y como febrífugo.

Torres *et al.*<sup>19</sup> describen que *Hedyosmum luteynii* tiene un amplio uso en la medicina tradicional del Ecuador, en particular en el tratamiento y alivio de infecciones respiratorias agudas y enfermedades diarreicas.

Zaruna J.<sup>42</sup> expresa en su tesis acerca de la actividad antibacteriana de *Hedyosmum strigosum*, que se obtuvieron resultados positivos, en los cuales los extractos totales de hexano y acetato de etilo presentaron actividad antibacteriana contra bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*.

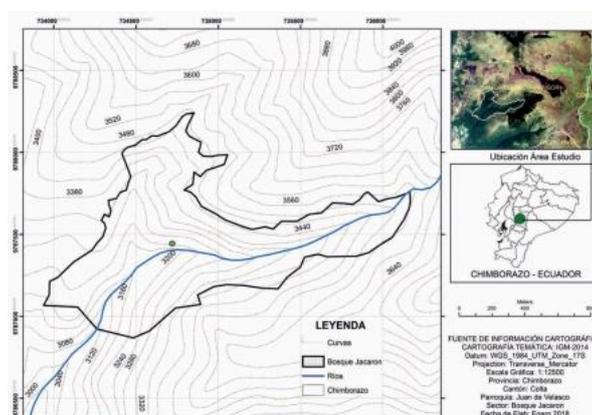
Kirchner *et al.*<sup>19</sup> realizaron una investigación sobre el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Hedyosmum brasiliense*, los resultados obtenidos fueron que la actividad antibacteriana fue baja frente a las bacterias Gram negativas, pero resultó ser extraordinariamente activo contra bacterias y hongos Gram positivos.



Reino	Plantae
Filo	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Chloranthales
Familia	Chloranthaceae
Género	<i>Hedyosmum</i>
Especie	<i>Hedyosmum</i> sp.

**Figura 4.** Especie vegetal *Hedyosmum* sp. y su taxonomía.

**Fuente:** [http://www.efloras.org/object\\_page.aspx?object\\_id=12832&flora\\_id=201](http://www.efloras.org/object_page.aspx?object_id=12832&flora_id=201)



**Figura 5.** Bosque natural Jacarón ubicado en el cantón Colta, en donde se encontró la especie vegetal *Hedyosmum* sp.

**Fuente:** <http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v25n2/a12v25n2.pdf>

## Métodos para la determinación de actividad antibacteriana

### Método de Kirby Bauer

Una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica es el estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos. Su realización se desarrolla mediante las pruebas de sensibilidad, cuyo principal objetivo es evaluar la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos. El antibiograma define la actividad *in vitro* de un antibiótico frente a un microorganismo determinado y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana. Sirve para orientar las decisiones terapéuticas individuales además de seguir la evolución de las resistencias bacterianas. El método Kirby-Bauer (método de difusión en agar), consiste en

depositar en la superficie de agar de una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos, tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. La lectura de los halos de inhibición debe interpretarse como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) según las categorías establecidas por el NCCLS<sup>43</sup>.

### **Concentración mínima inhibitoria**

Es la medida de la sensibilidad de una bacteria a un antibiótico. Es la mínima cantidad de antimicrobiano que es capaz de impedir el crecimiento de un microorganismo en unas condiciones normalizadas. Es el método habitual utilizado en los laboratorios de Microbiología Clínica. Para llevarlo a cabo es necesario utilizar cepas control (de referencia) con el fin de que los resultados sean reproducibles y comparables<sup>43</sup>.

### **Concentración mínima bactericida**

La Concentración Mínima Bactericida (CMB), se define como la mínima concentración de antimicrobiano que elimina a más del 99,9% de los microorganismos viables después de un tiempo determinado de incubación (generalmente 24 horas)<sup>43</sup>.

## CAPÍTULO II

### METODOLOGÍA

#### Tipo de investigación

- **Investigación descriptiva:** ya que se describen variables o conceptos y se detalla el procedimiento utilizado para el análisis de la actividad antibacteriana de los extractos hexánicos de tallos y flores del *Hedyosmum* sp.
- **Diseño cuasiexperimental:** debido a que se modificó la variable independiente, es decir, los extractos hexánicos de tallos y flores del *Hedyosmum* sp. se ensayaron a diferentes concentraciones para evaluar su efecto sobre la variable dependiente, en este caso las cepas de bacterias ATCC Gram positivas y Gram negativas utilizadas. Además, se usaron controles positivos y negativos.
- **Corte transversal:** ya que se realizó en un período de tiempo definido entre octubre 2018– febrero 2019 y en un lugar específico, es decir que no se encuentra sujeto a cambios de tiempo ni lugar.
- **Carácter mixto:** porque tiene un enfoque cualitativo representado por la observación del grado de susceptibilidad (halos de inhibición) que mostraron los extractos sobre los cultivos bacterianos, y cuantitativo ya que se realizaron detecciones numéricas (diámetro del halo y concentraciones mínimas inhibitorias) que permitieron realizar evaluación, interpretación y comparación de resultados, así como la determinación de causalidad.

#### Población y muestra

- **La población** en esta investigación está representada por todas las especies que pertenecen al género *Hedyosmum*, así como las bacterias ATCC Gram positivas y Gram negativas de interés clínico.
- **La muestra** de este estudio está formada por la especie vegetal *Hedyosmum* sp. de la que se obtuvieron los extractos hexánicos a partir de flores y tallos, además por las cepas ATCC Gram positivas *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, y las Gram negativas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*.

## VARIABLES DE ESTUDIO

- **Variable independiente:** extractos hexánicos de tallos y flores de *Hedyosmum* sp. a diferentes concentraciones.
- **Variable dependiente:** actividad antibacteriana de bacterias ATCC de interés clínico.

## PROCEDIMIENTOS DE LA INVESTIGACIÓN: MATERIAL Y MÉTODOS

**Material:** cajas de Petri estériles desechables, micropipetas automáticas y puntas, matraces Erlenmeyer de 500 y 1000 mL, tubos de ensayos con tapa rosca de 16 x 150, frascos de boca ancha con tapa, gradillas, mecheros, cinta testigo para esterilizar, pinzas, asa de siembra.

**Medios de cultivo:** para la realización de los ensayos de actividad antibacteriana se emplearon medios de cultivo comerciales cuya preparación se realizó según las instrucciones del envase, los cuales fueron esterilizados en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. La composición de cada uno de los medios empleados se muestra a continuación:

### TRIPTICASA SOYA AGAR

<i>Constituyente</i>	<i>Fórmula (en gramos por litro)</i>
<i>Tripteína</i>	15
<i>Peptona de soya</i>	5
<i>Cloruro de sodio</i>	5
<i>Agar</i>	15

### INFUSIÓN CEREBRO CORAZÓN (BHI), BRAIN HEART INFUSION

<i>Constituyente</i>	<i>Fórmula (en gramos por litro)</i>
<i>Infusión de cerebro de ternera</i>	200
<i>Infusión corazón vacuno</i>	250
<i>Peptona</i>	10
<i>Cloruro de sodio</i>	5
<i>Glucosa</i>	2
<i>Fosfato disódico</i>	2,5

### AGAR MULLER HINTON

<i>Constituyente</i>	<i>Fórmula (en gramos por litro)</i>
<i>Infusión de carne</i>	300
<i>Peptona ácida de caseína</i>	17,5
<i>Almidón</i>	1,5
<i>Agar</i>	15

**Equipos:** campana de flujo laminar (marca HFsafe 900), incubadora (marca Memmert), vórtex (marca BenchMixer™), balanza analítica (marca Adam Equipment), congelador (marca Mabe), autoclave (marca Tuttnauer), plancha térmica (anexo 1).

**Reactivos:** solución salina fisiológica al 0,9%, agua destilada, dimetilsulfóxido (DMSO).

**Material vegetal:** los tallos y las flores de la especie vegetal *Hedyosmum* sp. fueron recolectadas en el cantón Colta, Provincia de Chimborazo, Ecuador por el Ing. Franklin Enrique Cargua Catagña (anexo 2).

**Cepas bacterianas ATCC:** 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 del inglés American Type Culture Collection y con sus siglas ATCC. El ensayo incluyó las bacterias Gram negativas *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* ATCC 700603 y bacterias Gram positivas *S. aureus* ATCC 25923 y *E. faecalis* ATCC 29212 (anexo 3).

**Obtención de los extractos hexánicos de hojas y flores de la especie vegetal *Hedyosmum* sp.**

El material vegetal, 200 g de tallos y 16,8 g de flores, una vez secado en estufa a una temperatura de 37 – 40 °C durante tres días y un día respectivamente, fue triturado con un molino para café y macerado por separado en hexano en matraces de 500 mL durante tres días. Los extractos hexánicos obtenidos fueron filtrados a través de una malla de tela y concentrados en un evaporador rotativo en el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Ciencias de Ingeniería Ambiental de la Universidad Nacional de Chimborazo. Finalmente, los extractos fueron almacenados en refrigeración a 4° C en envases herméticamente cerrados (anexo 4). El rendimiento de cada extracto fue determinado en función del peso del producto crudo obtenido al final del proceso.

**Determinación de la actividad antibacteriana**

**Mantenimiento y conservación de los microorganismos**

Las bacterias fueron mantenidas en agar nutritivo, a excepción de *E. faecalis* que por sus exigencias metabólicas, se usó el agar cerebro corazón. Las placas fueron conservadas a 4 °C, llevándose a cabo resiembras periódicas.

### **Preparación del preinóculo**

La preparación del preinóculo consistió en sembrar de una a dos colonias de las distintas bacterias en estudio, en agar TSA para *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *K. pneumoniae* y agar BHI para *E. faecalis*. Posteriormente el preinóculo se incubó a 37°C durante 18 horas (anexo 5).

### **Preparación del inóculo**

El inóculo fue preparado a partir del preinóculo (crecimiento en medio sólido con un óptimo crecimiento tras 18 h de incubación) realizando una suspensión en solución salina de cada una de las cepas que fue comparada con el patrón de McFarland 0,5 (densidad celular de aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) que se utiliza como patrón de turbidez en la preparación de suspensiones de microorganismos (anexo 5).

### **Preparación solución stock**

La solución madre de los extractos se prepararon con DMSO a la concentración de 500.000 µg/mL, para lo cual se pesó 0,5 g de los extractos hexánicos de tallos y flores en tubos Eppendorf y se añadió a cada tubo 1000 µL de DMSO (anexo 6). Las disoluciones se guardaron en refrigeración a 4 °C hasta el momento de su uso.

### **Preparación de los extractos a diferentes concentraciones**

Las diluciones seriadas de los extractos hexánicos de las flores y tallos de la planta se realizaron en DMSO, a concentraciones de 250.000, 125.000, 62.500 y 31.250 µg/mL a partir de la solución madre (anexo 7).

### **Ensayo bacteriológico: antibiograma**

Se empleó la técnica de difusión de disco en agar o método de Kirby-Bauer para ensayar cada uno de los extractos hexánicos frente a las cepas ATCC en estudio. El primer paso consistió en introducir un hisopo estéril en la suspensión bacteriana (inóculo) el cual fue escurrido por las paredes del tubo de ensayo para evitar los excesos de humedad. Posteriormente se sembró la muestra mediante la técnica de césped o agotamiento en placas con agar Müller Hinton. Una vez sembradas todas las placas con cada bacteria a ensayar se colocaron los discos de papel filtro (marca Oxoid) de manera equidistante, los cuales fueron impregnados con 15 µL de los extractos a las diferentes concentraciones (anexo 8). Todos los ensayos se realizaron por duplicado y como controles positivos se utilizaron los antibióticos Ciprofloxacina para Gram positivas y Amikacina para Gram negativas, y como

control negativo se empleó un disco impregnado con DMSO (anexo 9). Las placas se refrigeran durante dos horas a 4 °C y luego se incubaron en estufa a 37 °C durante 24 horas, para finalmente realizar el análisis de la susceptibilidad bacteriana mediante la observación y medición de halos de inhibición.

### **Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)**

La detección de las CMIs consistió en la menor concentración a la cual los extractos presentaron actividad antibacteriana partiendo de la concentración inicial de 500.000 µg/mL frente a cada una de las bacterias en estudio. Las tablas con los datos de CMIs obtenidos fueron realizados con el programa de procesamiento de datos Excel.

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Rendimiento de los extractos hexánicos

Partiendo de 16,8g de flores secas y trituradas de *Hedyosmum* sp. usando la técnica de maceración en hexano y posterior evaporación rotatoria, se obtuvo 0,3022 g de extracto, lo que indicó un rendimiento de 1,79%. Este resultado es similar al reportado por Solano<sup>44</sup> quien en su investigación acerca de la actividad antibacteriana del extracto hexánico de las flores de *Hedyosmum strigosum*, obtuvo un peso de 9,64 g, a partir de 500 g de las flores secas, teniendo de esta manera un rendimiento de 1,93%.

De igual manera se realizó el procedimiento con los tallos, partiendo de 200 g del material seco y triturado, del cual se obtuvo 1,8249 g de extracto, por lo que el rendimiento fue de 0,9%; el cual es inferior al obtenido por Tinoco<sup>45</sup> quien en un estudio realizado con *Hedyosmum racemosum* indicó un rendimiento de 1,95%, ya que a partir de 660 g de tallos secos de obtuvo 12,88 g de extracto hexánico.

#### Actividad antibacteriana de los extractos hexánicos

En las tablas 1 y 2 se muestra la actividad antibacteriana de los extractos hexánicos de los tallos y flores de *Hedyosmum* sp. determinada frente a las bacterias ATCC Gram negativas, y las tablas 3 y 4 revelan los resultados de estos dos extractos frente a las Gram positivas. Los ensayos de susceptibilidad microbiana fueron realizados mediante el método de Kirby-Bauer como se mencionó en el apartado de material y métodos y que, por tanto, se ha expresado en mm de diámetro de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano. Así mismo, las CMI's determinadas mediante el desarrollo de los ensayos de actividad de los dos extractos a diferentes concentraciones (500.000, 250.000, 125.000, 62.500 y 31.250 µg/mL) frente a cada una de las cepas bacterianas, se obtuvieron del promedio de determinaciones realizadas por duplicado intra e interensayo, destacando en cada uno el uso de controles positivos (discos de antibióticos comerciales: Amikacina 30 µg y Ciprofloxacina 5 µg) y de un control negativo (DMSO).

El efecto inhibitorio de los extractos de las flores y tallos de *Hedyosmum* sp. sobre el crecimiento bacteriano de las bacterias Gram negativas *E. Coli*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* se evidencia en la tabla 1 y 2, respectivamente.

Los resultados obtenidos indican que tanto el extracto de las flores como el de los tallos a concentraciones  $\leq 500.000 \mu\text{g/mL}$  mostraron, en mayor o menor grado, un efecto inhibitorio del crecimiento de todas las bacterias Gram negativas ensayadas, resultando *Pseudomonas aeruginosa* la bacteria más sensible a la acción de ambos extractos, lo cual se demuestra no solo en la medida del halo de inhibición sino en el valor obtenido de las CMI's aproximado que fue de  $31.250 \mu\text{g/mL}$  para ambos extractos. Por otra parte, la actividad de los extractos hexánicos de flores y hojas determinada frente a *E. coli* arrojó valores de CMI's aproximados de  $62.500$  y  $125.000 \mu\text{g/mL}$ , y frente a *K. pneumoniae* de  $250.000$  y  $62.000 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

**Tabla 1.** Actividad antibacteriana del extracto hexánico de las flores de *Hedyosmum* sp. expresado por los halos de inhibición (mm) con su respectivo valor de CMI, frente a las bacterias Gram negativas.

Bacterias Gram negativas	EXTRACTOS HEXÁNICOS DE FLORES					Control positivo	Control negativo	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )
	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )					Amikacina (30 $\mu\text{g}$ )	DMSO	
	500.000	250.000	125.000	62.500	31.250			
HALOS DE INHIBICIÓN (mm)								
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10	9	8	7	0	30	0	62.500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	16	14	12	10	9	37	0	31.250
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	9	8	0	0	0	28	0	250.000

La Organización Mundial de la Salud<sup>46</sup> afirma que las bacterias resistentes notificadas con mayor frecuencia son *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* y *S. pneumoniae*, seguidas de *Salmonella* spp. Siendo *E. coli* la bacteria con más elevados índices de resistencia, en especial a la ciprofloxacina, cuya resistencia está entre el 8 al 65%. Esta bacteria es la principal responsable de las infecciones del tracto urinario en un porcentaje del 50 al 70% aproximadamente.

**Tabla 2.** Actividad antibacteriana del extracto hexánico de los tallos de *Hedyosmum* sp. expresado por los halos de inhibición (mm) con su respectivo valor de CMI, frente a las bacterias Gram negativas.

Bacterias Gram negativas	EXTRACTOS HEXÁNICOS DE TALLOS					Control positivo	Control negativo	CMI
	Concentración (µg/mL)					Amikacina (30 µg)	DMSO	(µg/mL)
	500.000	250.000	125.000	62.500	31.250			
HALOS DE INHIBICIÓN (mm)								
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	11	9	8	0	0	30	0	125.000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	15	12	11	10	9	37	0	31.250
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	11	10	9	8	0	28	0	62.500

Torres *et al.*<sup>39</sup> en su investigación acerca de la actividad antibacteriana de extractos hexánicos de tallos y hojas de *Hedyosmum scabrum*, reportaron una inhibición del crecimiento de los microorganismos *E. coli* y *P. aeruginosa*, lo cual muestra que las especies de este género si presentan una actividad antibacteriana frente a las bacterias Gram negativas.

Esta investigación que evidencia una actividad biológica frente a las bacterias Gram negativas ensayadas, refleja una importante contribución al conocimiento científico, sin embargo, se considera necesario probar su efecto frente a otras cepas ATCC o incluso frente a estirpes microbianas aisladas de pacientes que resulten resistentes a los antibióticos comerciales de uso común. Los extractos hexánicos de flores y tallos del *Hedyosmum* sp. podrían ser una fuente natural en la obtención de compuestos bacteriostáticos o bactericidas frente a varias cepas bacterianas Gram negativas.

La razón por la cual los extractos presentaron una buena actividad antibacteriana podría ser debido a la utilización del hexano como solvente de extracción de compuestos no polares, por lo general lípidos, que por su carácter de lipofilicidad pueden difundir fácilmente a través de ella de la pared celular de las bacterias Gram negativas. La capa de peptidoglucano de las bacterias Gram negativas es muy reducida y está rodeada de una membrana externa compuesta de lipoproteínas, lipopolisacáridos y fosfolípidos<sup>25,47</sup>.

Las tablas 3 y 4 muestran los resultados de la actividad antibacteriana de los extractos hexánicos de flores y hojas de *Hedyosmum* sp. frente a las bacterias Gram positivas *S. aureus* y *E. faecalis*. En la tabla 3 se puede apreciar que el extracto de las flores fue débilmente activo frente a *S. aureus*, ya que la CMI obtenida fue de 250.000 µg/mL e inactivo frente a *E. faecalis* a las concentraciones del extracto probadas. Por otra parte, el extracto hexánico de los tallos, al menos hasta la concentración de 500.000 µg/mL, resultó inactivo frente a las dos bacterias Gram positivas que se estudiaron. Estos resultados indican que los extractos hexánicos de flores y tallos de *Hedyosmum* sp. son poco o nada activos frente a las cepas *S. aureus* ATCC 25923 y *E. faecalis* ATCC 29212.

**Tabla 3.** Actividad antibacteriana del extracto hexánico de las flores de *Hedyosmum* sp. expresado por los halos de inhibición (mm) con su respectivo valor de CMI, frente a las bacterias Gram positivas.

Bacterias Gram positivas	EXTRACTOS HEXÁNICOS DE FLORES					Control positivo	Control negativo	CMI (µg/mL)
	Concentración (µg/ml)					Ciprofloxacina (5 µg)	DMSO	
	500.000	250.000	125.000	62.500	31.250			
	HALOS DE INHIBICIÓN (mm)							
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	18	8	0	0	0	35	0	250.000
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0	0	0	0	0	37	0	No hay actividad

**Tabla 4.** Actividad antibacteriana del extracto hexánicos de los tallos de *Hedyosmum* sp. expresado por los halos de inhibición (mm) con su respectivo valor de CMI, frente a las bacterias Gram positivas.

Bacterias Gram positivas	EXTRACTOS HEXÁNICOS DE FLORES					Control positivo	Control negativo	CMI (µg/mL)
	Concentración (µg/ml)					Ciprofloxacina (5 µg)	DMSO	
	500.000	250.000	125.000	62.500	31.250			
	HALOS DE INHIBICIÓN (mm)							
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0	0	0	0	0	35	0	No hay actividad
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0	0	0	0	0	37	0	No hay actividad

Como lo manifiesta Cercenado<sup>48</sup> gran parte de las infecciones que son producidas por el género *Enterococcus* son causadas en un 80% por *E. faecalis*, también revela que entre los patógenos nosocomiales de mayor interés se encuentran especies pertenecientes a este género, esto se debe a la dificultad de tratamiento condicionada por su resistencia intrínseca a la mayoría de antibióticos que han adquirido a lo largo de los años, lo que se relaciona con la adquisición de genes de resistencia en plásmidos o transposones, o por mutaciones espontáneas que aumentan el nivel de resistencia a ciertos antibióticos.

De igual manera Silva *et al.*<sup>49</sup> refieren que *Enterococcus* sp. no solía ser considerado como un patógeno primario, pero en la actualidad se ha manifestado como uno de los principales agentes causales de infecciones intrahospitalarias alrededor del mundo. En Estados Unidos de América *Enterococcus* sp. produce más del 12% de las infecciones nosocomiales y conforma uno de los tres patógenos que se aíslan con más frecuencia en el ambiente intrahospitalario. Su relevancia nosocomial ha aumentado debido a su gran capacidad de adquirir elevados grados de resistencia a antimicrobianos lo cual dificulta su tratamiento.

Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con los reportados por Paredes<sup>12</sup> quien realizó un estudio de la actividad antibacteriana del extracto hexánico de las partes aéreas de *Hedyosmum purpurascens* mediante el método de microdilución en caldo, el cual se probó frente a bacterias Gram positivas: *E. faecalis* y *S. aureus*. Obtuvo resultados de CMI >1000µg/mL. Se consideró que, si los extractos muestran un CMI menos de 100 µg/mL, la actividad antimicrobiana es buena; entre 100 y 500 µg/mL es moderada; de 500 a 1000 µg/mL de la es débil; más de 1000 µg/mL, el extracto se considera inactivo. Por lo tanto, los extractos resultaron inactivos frente a bacterias Gram positivas.

El resultado de una actividad antibacteriana disminuida o nula de los extractos hexánicos de flores y hojas de la especie vegetal *Hedyosmum* sp. frente a las bacterias Gram positivas en estudio no debe ser motivo para detener la investigación, ya que resultaría importante ensayar la actividad de estos frente a otros microorganismos patógenos que infectan al ser humano, con el fin de conocer su espectro de acción.

Por los antecedentes descritos es evidente que los microorganismos que causan infecciones están desarrollando una resistencia a los antibióticos usados comúnmente en la actualidad, lo que constituye un grave problema de salud pública por los elevados índices de morbilidad y mortalidad. Es urgente la necesidad del descubrimiento de nuevos fármacos, y cómo las plantas constituyen una de las principales fuentes naturales de compuestos bioactivos.

## CONCLUSIONES

1. Los extractos hexánicos de tallos y flores de *Hedyosmum* sp. se obtuvieron mediante maceración en hexano y la posterior evaporación rotatoria, partiendo de 16,8 g de flores y 200 g de tallos, previamente secados y triturados, de los cuales se obtuvo un rendimiento de 1,79% y 0,9%, respectivamente.
2. La actividad antibacteriana realizada mediante el método de Kirby-Bauer fue estudiada frente a las cepas Gram negativas *Escherichia coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y a las Gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 permitió evidenciar mediante la medida del halo inhibición (mm) una acción inhibitoria del crecimiento de las bacterias Gram negativas mayor que el observado frente a las Gram positivas.
3. Las determinaciones de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los extractos hexánicos de las flores y de las hojas a distintas concentraciones (500.000, 250.000, 125.000, 62.500 y 31.250 µg/mL) frente a las bacterias Gram negativas y Gram positivas en estudio, mostraron que de las bacterias Gram negativas *P. aeruginosa* fue la más sensible a la acción biológica de los extractos, ya que se obtuvo una CMI de 31.250 µg/mL para ambos. El extracto de las flores mostró CMIs de 62.500 y 250.000 µg/mL frente a *E. coli* y *K. pneumoniae*, respectivamente, mientras que el extracto de los tallos arrojó una CMI de 125.000 µg/mL frente a *E. coli* y de 62.500 µg/mL frente a *K. pneumoniae*. Frente a las bacterias Gram positivas *S. aureus* y *E. faecalis* ambos extractos mostraron una actividad antibacteriana muy baja o nula, ya que solo se observó un efecto inhibitorio reducido del extracto de las flores sobre el crecimiento de *S. aureus* (CMI de 250.000 µg/mL).

## RECOMENDACIONES

1. Continuar realizando ensayos de actividad antimicrobiana de los extractos hexánicos de tallos y flores de *Hedyosmum* sp. frente a un espectro mayor de microorganismos patógenos, no solo empleando cepas de colección como ATCC sino también de aisladas de pacientes que hayan desarrollado uno o más mecanismos de resistencia.
2. Realizar investigaciones de otras actividades biológicas de los extractos hexánicos de las flores y hojas como antioxidante, fungicidas entre otras.
3. Se recomienda a la Universidad Nacional de Chimborazo incentivar a sus alumnos a la investigación y desarrollo de este tipo de proyectos, con los cuales se podrían obtener resultados de gran relevancia que dejen un aporte positivo a la sociedad.
4. Tomar conciencia del uso adecuado de los antibióticos, debido al preocupante incremento de la resistencia bacteriana en los últimos años.
5. Informar los resultados de la investigación en artículos científicos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Chetley A. Medicamentos problema [Internet]: Acción Internacional por la Salud América Latina y el Caribe; 1994 [citado el 3 de diciembre de 2018]. Disponible en:<https://books.google.com.ec/books?id=hp3KGwAACAAJ&dq=medicamentos+problema&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwi8mqalI0c3gAhVGOK0KHQj2CIYQ6AEIKzAA>
2. Gestal J. Enfermedades infecciosas emergentes. Alerta mundial, respuesta mundial. Rev Esp Salud Pública [Internet]. 1997[citado el 3 de diciembre de 2018] ;71(3):225-229. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/resp/v71n3/editorial.pdf>
3. Organización Mundial de la Salud [Internet]. 2018 [citado el 5 de diciembre de 2018]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>
4. Camou T, Zunino P, Hortal M. Alarma por la resistencia a antimicrobianos: situación actual y desafíos. Rev Méd Urug [Internet]. 2017 [citado el 6 de diciembre de 2018]; 33(4):34-41. Disponible en: <http://www.rmu.org.uy/revista/proximo/rmu334889camou-alarma.pdf>
5. Saleem AF, Ahmed I, Mir F, Ali SR, Zaidi AK. Panresistant *Acinetobacter* infection in neonates in Karachi, Pakistan. J Infect Dev Ctries [Internet]. 2010 [citado el 6 de diciembre de 2018]; 4(1):030-037. Disponible en: <https://jidc.org/index.php/journal/article/view/20130376/336>
6. World Health Organization [Internet]. 2017 [citado el 8 de diciembre de 2018]. Disponible en: <http://www.medicosypacientes.com/sites/default/files/9789241513449-eng.pdf>
7. Toaquiza NC, Mera J, Toasa RM, Yuste MM. Rev Cient Inf de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo [Internet]. 2015 [citado el 19 de noviembre de 2018]; 14(2): 9-15. Disponible en: <http://ceaa.esPOCH.edu.ec:8080/revista.perfiles/Articuloshtml/Perfiles14Art2/Perfiles14Art2.xhtml>
8. O'Neill J. The Review on Antimicrobial Resistance [Internet]. 2016 [citado el 22 de noviembre de 2018]; 1-76. Disponible en: [https://amr-review.org/sites/default/files/160518\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf)

9. Toscano GY. Uso tradicional de plantas medicinales en la vereda San Isidro, municipio de San José de Pare-Boyacá: un estudio preliminar usando técnicas cuantitativas. *Acta biol. Colomb* [Internet]. 2006 [citado el 15 de diciembre de 2018]; 11(2):137-146. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/63344/pdf>
10. Tabio GD, Díaz YD, Rondón MM, Fernández SE, Piloto RR. Extracción de aceites de origen vegetal [Internet]. 2017 [citado el 17 de diciembre de 2018]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/317007345\\_Extraccion\\_de\\_aceites\\_de\\_origen\\_vegetal](https://www.researchgate.net/publication/317007345_Extraccion_de_aceites_de_origen_vegetal)
11. Tepe B, Donmez E, Mehmet U, Candan F, Dafera D, Vardar-Unlu G, *et al.* Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and metanol extracts of *Salvia cryptantha*. *Food Chemistry* [Internet]. 2004 [citado el 17 de diciembre de 2018]; 84(4): 519-525. Disponible en: <file:///C:/Users/INTEL/Downloads/Salvia-published.pdf>
12. Paredes MM. Composición química y actividad antimicrobiana de *Hedyosmum purpurascens* (Chloranthaceae) de la provincia de Loja [Internet]. 2013 [citado el 20 de diciembre de 2018]. Disponible en: <https://docplayer.es/82150061-Universidad-tecnica-particular-de-loja-area-biologica.html>
13. Corzo BD. Evaluation of antimicrobial activity of ethanol extract of *Cestrum buxifolium Kunth*. *Rev. mex. cienc. Farm* [Internet]. 2012 [citado el 20 de diciembre de 2018]; 43(3): 81-86. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmcf/v43n3/v43n3a9.pdf>
14. Del Castillo PA, Molinares MP, Campo UM, Bettin MA. Actividad antibacteriana del extracto total de hojas de *Cucurbita moschata* Duchesne (Ahuyama). *Rev Cubana Plant Med* [Internet]. 2017 [citado el 21 de diciembre de 2018]; 22(1): 1-13. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v22n1/pla09117.pdf>
15. Eloff J. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants?. *Journal of Ethnopharmacology* [Internet]. 1998 [citado el 23 de diciembre de 2018]; 60(1): 1-8. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874197001232?via%3Dihub>
16. De la Torre L, Navarrete P, Muriel M, Macía J, Balslev H. Enciclopedia de plantas útiles del Ecuador [Internet]. Quito: 2008 [citado el 23 de diciembre de 2018]. Disponible en: <https://scholarspace.manoa.hawaii.edu/handle/10125/100000>

- waii.edu/bitstream/10125/47330/de%20la%20Torre%20et%20al.%202008%20Encyclopedia%20of%20useful%20plants%20of%20Ecuador.pdf
17. Ulloa C, Møller J. Árboles y arbustos de los Andes del Ecuador [Internet]. 2015 [citado el 23 de diciembre de 2018]. Disponible en: [http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora\\_id=201&taxon\\_id=114826](http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=201&taxon_id=114826)
  18. Gupta P. Medicinal plantas originating in the Andean high plateau and Central valleys region of Bolivia, Ecuador and Perú [Internet]. Ecuador: 2006 [citado el 23 de diciembre de 2018]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/326328202\\_The\\_future\\_of\\_products\\_of\\_the\\_high\\_plateau\\_and\\_central\\_valleys\\_of\\_the\\_Andes\\_-\\_Medicinal\\_plants](https://www.researchgate.net/publication/326328202_The_future_of_products_of_the_high_plateau_and_central_valleys_of_the_Andes_-_Medicinal_plants)
  19. Torres RS, Tovar MC, García VJ, Lucena ME, Araujo BL. Composición química del aceite esencial de las hojas de *Hedyosmum luteynii* Todzia (Chloranthaceae). Rev. Peru biol. [Internet]. 2018 [citado el 21 de enero de 2019]; 25(2): 173-178. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v25n2/a12v25n2.pdf>
  20. Cárdenas L, Rodríguez J, Villaverde M, Riguera R, Cadena R, Otero J. The Analgesic Activity of *Hedyosmum bonplandianum*: Flavonoid Glycosides. Planta Médica [Internet]. 1993 [citado el 27 de diciembre de 2018]; 59(01): 26-27. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/14757087\\_The\\_Analgesic\\_Activity\\_of\\_Hedyosmum\\_bonplandianum\\_Flavonoid\\_Glycosides](https://www.researchgate.net/publication/14757087_The_Analgesic_Activity_of_Hedyosmum_bonplandianum_Flavonoid_Glycosides)
  21. García C. Actividad antibacteriana de extractos vegetales en cepas hospitalarias de *Staphylococcus aureus* con resistencia múltiple [Internet]. México: 2006 [citado el 04 de enero de 2019]. Disponible en: <file:///C:/Users/INTEL/Downloads/Dialnet-ActividadAntibacterianaDeExtractosVegetalesEnCepas-13743.pdf>
  22. Lucana MR, Huanca RM. Estructura bacterina. Rev. Act. Clin. Med [Internet]. 2014 [citado el 04 de enero de 2019]; (49): 2589-2593. Disponible en: [http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2304-37682014001000001&script=sci\\_arttext](http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2304-37682014001000001&script=sci_arttext)
  23. Mollinedo PM, Gonzáles VC. Bacterias Gram negativas. Rev. Act. Clin. Med [Internet]. 2014 [citado el 07 de enero de 2019]; (49): 2609-2613. Disponible en: [http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2304-37682014001000005&script=sci\\_arttext](http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2304-37682014001000005&script=sci_arttext)
  24. Zendejas MG, Avalos FH, Soto PM. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. Rev Biomed

- [Internet]. México: 2014 [citado el 06 de enero de 2019]; (25): 129-143. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2014/bio143d.pdf>
25. Ahmad N, Plorde J, Lawrence W. Microbiología Médica. 5 ed. México: Mc Graw Hill; 2011.
  26. López VJ, Toro EL. *K. pneumoniae*: ¿la nueva "superbacteria"? Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia. Latreia [Internet]. Medellín: 2010 [citado el 08 de enero de 2019]; 23(2): 157-165. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/iat/v23n2/v23n2a7.pdf>
  27. Magaña VC, Ugarte GC, Montiel M. Uso adecuado y racional de los antibióticos. Acta méd. peruana [Internet]. Lima: 2006 [citado el 08 de enero de 2019]; 23(1): 15-20. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/amp/v23n1/a04v23n1.pdf>
  28. Molina LJ. Universidad Autónoma de México [Internet]. México: 2006 [citado el 08 de enero de 2019]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/terapeutica.html>
  29. Morales AM. Antimicrobianos: Una revisión sobre mecanismos de acción y desarrollo de resistencia. Act. Med. Costarricense [Internet]. 1985 [citado el 10 de enero de 2019]; 28(2): 79-83. Disponible en: <http://www.binasss.sa.cr/revistas/amc/v28n2/art3.pdf>
  30. Moreno MC, González ER, Beltrán C. Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cuello [Internet]. 2009 [citado el 11 de enero de 2019]; 69(2): 185-192. Disponible en: [https://scihub.tw/https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-48162009000200014](https://scihub.tw/https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-48162009000200014)
  31. Calerón RG, Aguilar UR. Resistencia antimicrobiana: Microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. Rev Med Cos Cen [Internet]. 2016 [citado el 13 de enero de 2019]; 73(621): 757-763. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=69870>
  32. World Health Organization [Internet]. 2017 [citado el 14 de enero de 2019]. Disponible en: <https://www.afro.who.int/health-topics/traditional-medicine>
  33. Hierbatura [Internet]. 2017 [citado el 14 de enero de 2019]. Disponible en: <https://www.hierbatura.com/>
  34. Mora A. Ministerio de Salud [Internet]. 2013 [citado el 16 de enero de 2019]. Disponible en:

- <http://instituciones.msp.gob.ec/somossalud/somossalud/index.php/enterate/210-el-poder-de-las-plantas-medicinales>
35. Morales RC, Cárdenas OM, Verde-Star M. Investigación en plantas de importancia médica. *OmniaScience Monographs* [Internet]. 2016 [citado el 14 de enero de 2019]. Disponible en: <https://www.omniascience.com/monographs/index.php/monograficos/article/view/313/248>
  36. Murphy M. Plants Products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* [Internet]. 1999 [citado el 16 de enero de 2019]; 12(4) : 564-582. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88925/#idm139744435969360title>
  37. Ruiz M, Susunaga C. Actividad antimicrobiana presente en partes aéreas de las especies *Bursera simaoruba* y *Bursera graveolens*, frente a microorganismos como: *Agrobacterim tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma viride* y *Botrytis cinérea*. [Internet]. 2000 [citado el 17 de enero de 2019]. Disponible en: [https://www.javeriana.edu.co/gifuj/BURSERACEAE\\_F.pdf](https://www.javeriana.edu.co/gifuj/BURSERACEAE_F.pdf)
  38. Pájaro N, Granados C, Torrenegra M. Actividad antibacteriana del extracto etanólico del peciolo de *Rheum rhabarbarum*. [Internet]. 2018 [citado el 15 de enero de 2019]; 47(1): 26-36. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rccqf/v47n1/0034-7418-rccqf-47-01-00026.pdf>
  39. Torres RS, Barbarú GA, Lema EM. Análisis Fitoquímico de un extracto de la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum scabrum*), perteneciente al bosque Jacarón, Juan de Velasco, Chimborazo, Ecuador. *Mikarimin Rev. Cientif. Multidisciplinaria* [Internet]. 2016 [citado el 17 de enero de 2019]; 2(3): 75-84. Disponible en: <http://45.238.216.13/ojs/index.php/mikarimin/article/view/470/245>
  40. González JJ. Aislamiento, caracterización y actividad biológica de metabólitos secundarios a partir de hojas de plantas con flores femeninas de *Hedyosmum strigosum* en el cantón Saraguro provincia de Loja [Internet]. Loja: Universidad Técnica Particular de Loja. 2015 [citado el 18 de enero de 2019]; 71 p. Disponible en: <http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/13439/1/Zaruma%20Gonzalez%20Jессica%20Johanna-%20Trabajo%20de%20Titulacion.pdf>
  41. Murakami C, Cordeiro I, Tullius M, Moreno P, Young M. Chemical Composition, Antifungal and Antioxidant Activities of *Hedyosmum brasiliense* Mart. Ex Miq. (Chloranthaceae) Essential Oils. *Medicines* [Internet]. São Paulo: 2017 [citado el 20

- de enero de 2019]; 4(3): 55. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2305-6320/4/3/55/htm>
42. Zaruma J. Aislamiento, caracterización y actividad biológica e metabolitos secundarios a partir de hojas de plantas con flores femeninas de *Hedyosmum strigosum* en el cantón Saraguro provincia de Loja. [Internet]. Loja: Universidad Técnica Particular de Loja. 2015 [citado el 22 de enero de 2019]; 71 p. Disponible en: <http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/13439/1/Zaruma%20Gonzalez%20Jessica%20Johanna-%20Trabajo%20de%20Titulacion.pdf>
43. Herrera M. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana, metodología de laboratorio. Rev. Med. Hosp. Nac. Niños [Internet]. 1999 [citado el 23 de enero de 2019]; 34 p: 33-41. Disponible en: [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1017-85461999000100010](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85461999000100010)
44. Solano LE. Extracción, aislamiento, caracterización y actividad biológica de metabolitos secundarios de *Hedyosmum strigosum* con flores masculinas en la provincia de Loja [Internet]. Loja: Universidad Técnica Particular de Loja. 2015 [citado el 23 de enero de 2019]; 66 p. Disponible en: <http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/12133/1/Solano%20de%20la%20Sal%20Lozano%20Estefany%20Sofia.pdf>
45. Tinoco LD. Aislamiento, caracterización y actividad biológica de los extractos totales y metabolitos secundarios de *Hedyosmum racemosum* de Zamora, Ecuador [Internet]. Loja: Universidad Técnica Particular de Loja. 2013 [citado el 23 de enero de 2019]; 57p. Disponible en: [http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/7887/3/UTPL\\_Tinoco\\_Lara\\_Daniela\\_EstefanIa\\_1133781.pdf](http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/7887/3/UTPL_Tinoco_Lara_Daniela_EstefanIa_1133781.pdf)
46. Opazo P. Organización Mundial de la Salud [Internet]. 2018 [citado el 25 de enero de 2019]. Disponible en: <https://nacionfarma.com/los-datos-la-oms-las-bacterias-mas-resistentes-los-antibioticos-alarmantes/>
47. Muhammad MA, Auwal IM, Babando AA, Sabo AM, Tajuddeen N, *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of hexane leaf extract of *Anisopus manni* (Asclepiadaceae). J Intercult Ethnopharmacol [Internet]. 2015 [citado el 25 de enero de 2019]; 4(2): 129-133. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4566775/#!po=1.31579>
48. Cercenado E. Enterococcus: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología en España. Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet]. 2012 [citado el 25 de enero de

2019]; 29(5): 59-65. Disponible en:  
<https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/ccs-2010-bacteriologia.pdf>

49. Silva AJ, Asserella RL, Bolados GN, Herrera HN, y Leyton OJ. Resistencia a antimicrobianos en cepas de *Enterococcus* sp aisladas en hospitales del norte de Chile. Rev Chil Infect [Internet]. 2006 [citado el 5 de febrero de 2019]; 23(3): 226-231. Disponible en:  
[https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182006000300005](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182006000300005)

## ANEXOS

### Anexo 1. Algunos equipos de laboratorio usados en la investigación



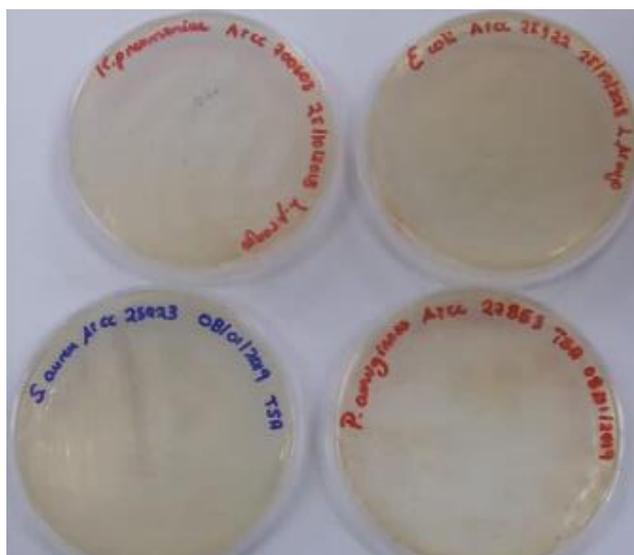
Se observan los equipos necesarios para la realización del proyecto de investigación, tales como: campana de flujo laminar, congelador e incubadora.

### Anexo 2. Especie vegetal utilizada en el proyecto



*Hedyosmum* sp., recolectada en el bosque natural Jacarón en Chimborazo, que será procesada para obtener extractos hexánicos.

### Anexo 3. Cepas ATCC



Se observan las cepas ATCC de bacterias Gram positivas: *S. aureus*, *E. faecalis* y Gram negativas: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*.

### Anexo 4. Proceso de evaporación rotatoria



Rotavapor utilizado para la obtención de extractos hexánicos de flores y tallos de *Hedyosmum* sp.

## **Anexo 5. Preparación de preinóculo e inóculo**



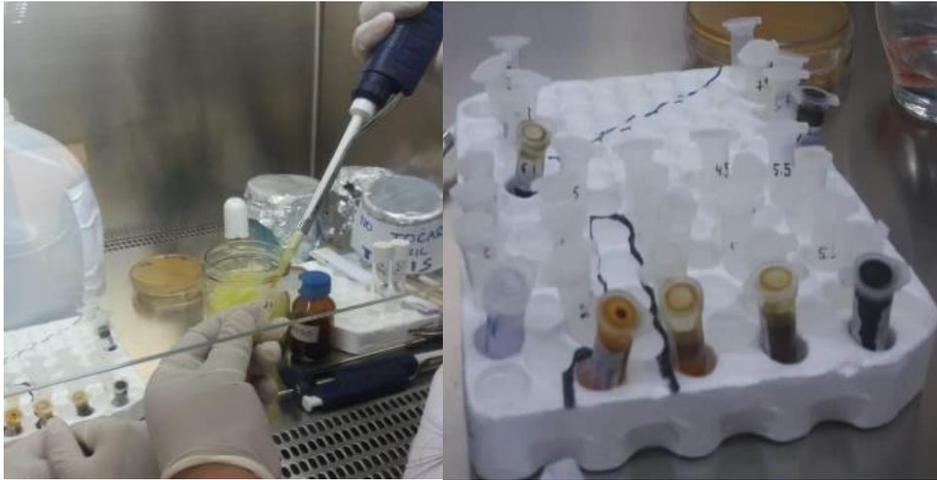
Se realizó el preinóculo e inóculo por cada bacteria, siguiendo el procedimiento adecuado y con el uso de las respectivas normas de bioseguridad.

## **Anexo 6. Pesaje de los extractos obtenidos**



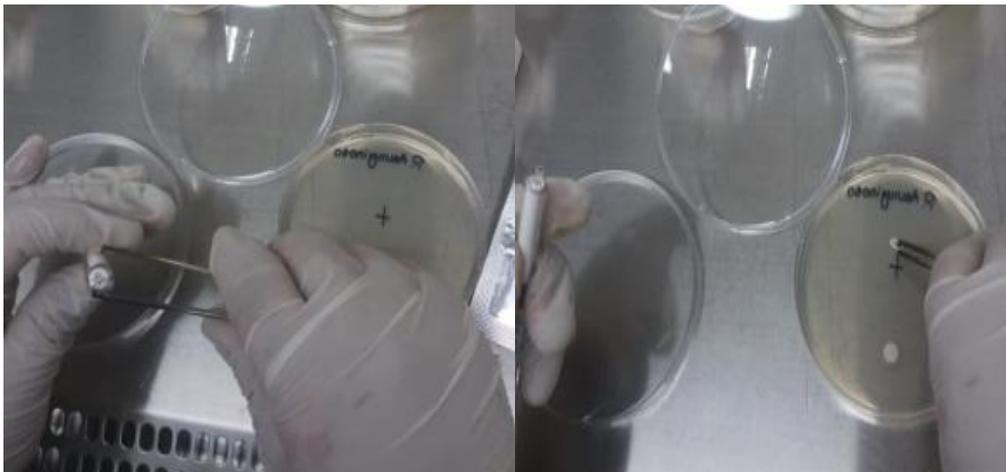
Como primer paso para la preparación de la solución stock, tenemos el pesaje de 0,5 g de los extractos obtenidos.

## Anexo 7. Preparación de las diluciones



A partir de la solución stock se realizó la preparación de diluciones a diferentes concentraciones.

## Anexo 8. Colocación de los discos de antibiograma



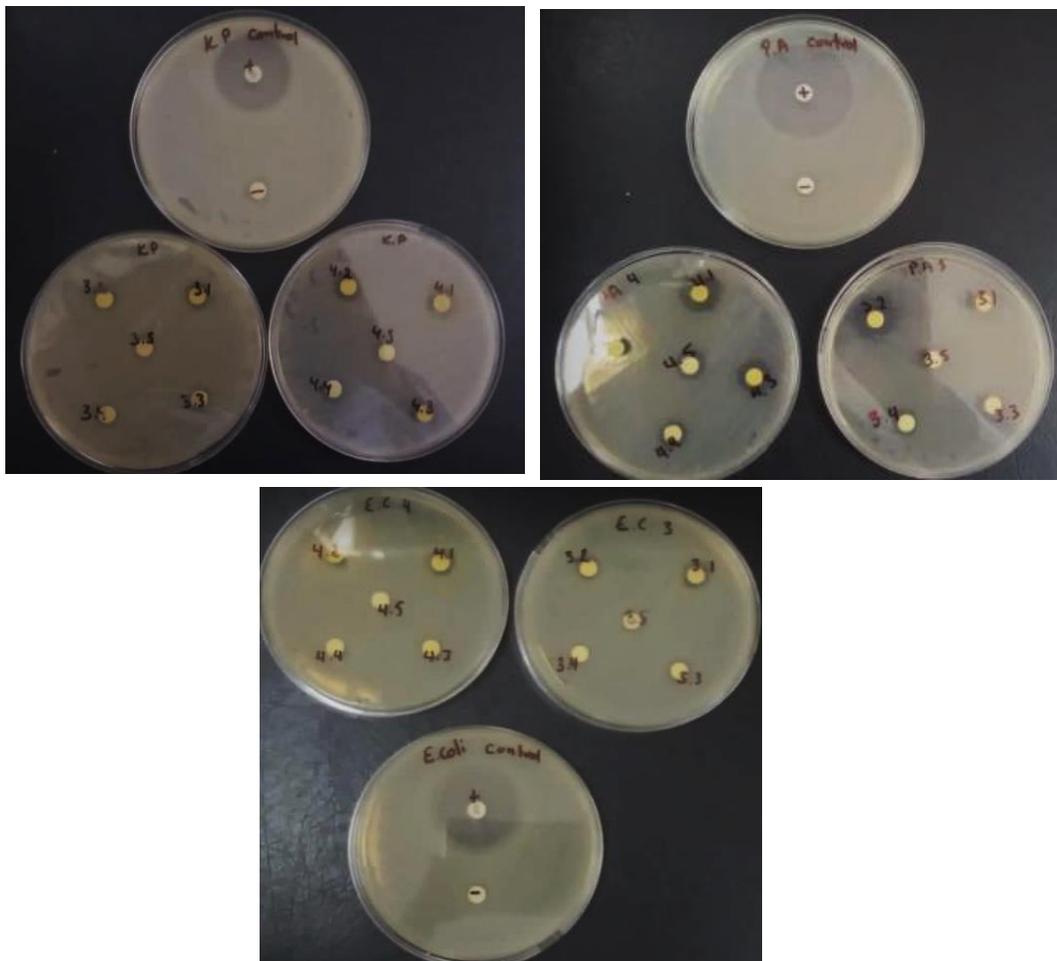
Se colocaron discos de antibiograma en los que se impregnan las diluciones realizadas anteriormente y también discos con antibióticos comerciales y DMSO, para los controles positivos y negativos respectivamente.

## Anexo 9. Controles positivos y negativos



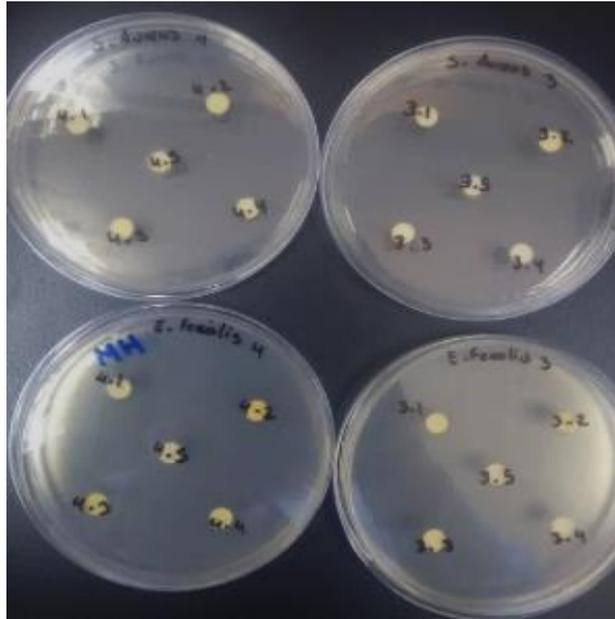
Algunos de los controles positivos y negativos de las bacterias ATCC en estudio.

## Anexo 10. Halos de inhibición de bacterias Gram negativas



Se realizó la medición de los halos de inhibición en mm de las bacterias Gram negativas, para determinar la CMI de cada una de ellas.

## Anexo 11. Halos de inhibición de bacterias Gram positivas



Se realizó la medición de los halos de inhibición en mm de las bacterias Gram negativas, para determinar la CMI de cada una de ellas.