



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

CARRERA DE LABORATORIO CLINICO E HISTOPATOLOGICO

Proyecto de investigación previo a la obtención del título de: Licenciado en ciencias de la salud Laboratorio Clínico e Histopatológico.

TRABAJO DE TITULACION

Efecto antibacteriano de los extractos etanólicos de la especie vegetal de *Hedyosmun* sp. de la provincia de Chimborazo, Ecuador. Octubre 2018 - Febrero 2019

Autor: Jonatán David Paredes León

Tutor: PhD. Morella Lucia Guillén Ferraro

Tutor Científico: PhD. María Eugenia Lucena

Riobamba – Ecuador

2019

REVISION DEL TRIBUNAL

Los miembros del tribunal de graduación del proyecto de investigación de título: “Efecto antibacteriano de los extractos etanólicos de la especie vegetal de *Hedyosmum* sp. Chimborazo, Ecuador, Octubre 2018 - Febrero 2019” presentado por Jonatán David Paredes León y dirigida por la: PhD. Guillén Ferraro Morella Lucía 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

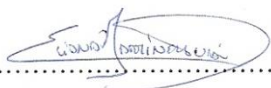


Firma

.....

Lic. Eliana Martínez Duran

Miembro del Tribunal

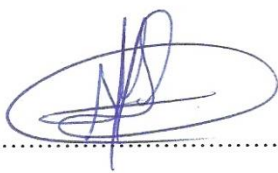


Firma

.....

Ing. Félix Atair Falconi Ontaneda

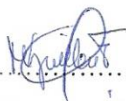
Miembro del Tribunal



Firma

DECLARACIÓN DEL TUTOR

Yo, Morella Lucia Guillen Ferraro docente de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico en calidad de Tutor del proyecto de investigación “Efecto antibacteriano de los extractos etanólicos de la especie vegetal de Hedyosmun sp. Chimborazo, Ecuador, Octubre 2018 - Febrero 2019”, propuesto por el Sr. Jonatán David Paredes León, egresado 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 apto para la defensa pública del proyecto. Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad facultando al interesado hacer el uso del presente para los trámites correspondientes.



.....
PhD. Morella Lucia Guillen Ferraro

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: Jonatán David Paredes León con cedula de ciudadanía N° 1400476352 y la directora del Proyecto Dra. María Eugenia Lucena PhD; y el patrimonio intelectual de la misma a la Universidad Nacional de Chimborazo.



Jonathan David Paredes León

C.C. 1400476352

AUTOR

AGRADECIMIENTO

Agradezco en primer lugar a Dios por darme la fuerza el valor y la oportunidad de estudiar a mis padres que a pesar de mis tropiezos me brindaron su apoyo incondicional para formarme; agradezco de igual manera a la Universidad Nacional de Chimborazo, Facultad de Ciencia de la Salud, a la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico por darme la oportunidad de estudiar en esta prestigiosa institución que me ha guiado por el camino hasta alcanzar mis aspiraciones académicas. De igual manera agradezco a mis tutoras Dra. Morella Guillen y Dra. María Eugenia Lucena que me brindó su apoyo incondicional para el desarrollo de este proyecto de investigación.

DEDICATORIA

Dedico este logro con mucho cariño para mi Madre Nerita Elaudina León Romero y mi Padre Ángel Miguel Paredes Solórzano que gracias a Dios son parte importante de mi vida, siempre estuvieron apoyándome desde lejos a pesar de defraudarles con su apoyo y cariño se han convertido en el motor de mi vida y lo que me motiva a ser mejor, me dan fuerza para continuar y llegar hasta donde ahora estoy gracias por nunca rendirse conmigo.

Jonatán David Paredes León

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	4
Objetivo General:.....	4
Objetivos específicos:	4
CAPITULO I. MARCO TEORICO.....	5
Antecedentes históricos.....	5
Valoración de Género y Familia.....	5
Técnica para la obtención de solventes.....	7
Bacterias de interés clínico.....	8
Bacterias Gram negativas.....	9
Bacterias Gram Positivas	10
Resistencia Antibacteriana	10
Tipos de resistencia.....	10
Técnicas de detección Microbiológica:.....	11
CAPITULO II. METODOLOGÍA.....	13
Tipo de investigación:.....	13
Población y Muestra	13
Técnicas e instrumentos para la recolección de datos.....	13
Procedimientos	15
Preparación de la dilución del stock	16
Método KIRBY - BAUER	17
CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	19

CONCLUSIONES.....	23
RECOMENDACIONES.....	24
BIBLIOGRAFÍA:	25
ANEXOS	30

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Hojas Ramas y Flores de <i>Hedyosmum</i> sp (Tarqui).....	5
Figura 2 Rotavapor.....	7
Figura 3 Estructura de las Bacterias Gram + y Gram – Fuente: Microbiología de Murray	8
Figura 4 Diluciones seriadas	12

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Diámetros de los halos de inhibición y CMI de <i>Escherichia coli</i> , expuesta a los extractos etanólicos de ramas, hojas y flores de <i>Hedyosmum</i> sp.....	20
Tabla 2 Diámetros de los halos de inhibición y CMI de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , expuesta a los extractos etanólicos de ramas, hojas y flores de <i>Hedyosmum</i> sp.	21
Tabla 3 Diámetros de los halos de inhibición y CMI de <i>Staphylococcus aureus</i> , expuesta a los extractos etanólicos de ramas, hojas y flores de <i>Hedyosmum</i> sp.	21

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo, la determinación de la actividad antibacteriana, de los extractos etanólicos de ramas, hojas y flores de la especie vegetal conocida en el vocabulario local como Tarqui (*Hedyosmum* sp) perteneciente al género *Hedyosmum* de la familia *Chloranthaceae*, frente a cepas bacterianas de origen ATCC (American Type Culture Collection), Gram negativas *Pseudomonas aeruginosa* 27853, *Escherichia coli* 25922 y *Klebsiella pneumoniae* 700603 y bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* 25923 y *Enterococcus faecalis* 29212 de interés para la salud pública según la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Esta investigación fue de campo, con un diseño cuasi-experimental y descriptivo. Los extractos etanólicos de *Hedyosmum* sp fue obtenido mediante el proceso de maceración con etanol, para posteriormente someter el solvente a evaporación rotatoria, que consiste en disminuir la presión para bajar el punto de ebullición y separar los solventes, mediante el uso de un rota vapor. El estudio microbiológico se realizó a través del método de Kirby Bauer o difusión en disco. Las muestras utilizadas fueron los extractos etanólicos de rama, hojas y flores de la especie vegetal de *Hedyosmum* sp. Mostrando actividad antibacteriana frente a tres de las cinco cepas bacterianas empleadas para el estudio. El extracto etanólico de las ramas de *Hedyosmum* presentó una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 12 500 ppm, 25 000ppm y 50 000ppm frente a *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* respectivamente. Por otra parte los extractos etanólicos de las hojas de *Hedysmun* sp también mostraron actividad antibacteriana frente *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, con CMI 25 000ppm, 12 500ppm y 50 000ppm respectivamente y los extractos etanólicos de las flores mostraron una CMI de 12 500ppm, para la cepa de *E coli*, 12 500ppm en *P. aeruginosa* y 50 000ppm *S. aureus*. Se concluye que los extractos utilizados presentaron una buena actividad antibacteriana en las diluciones de mayor concentración, evidenciando buenos halos de inhibición. Cabe recalcar que ninguno de los extractos, presentó actividad antibacteriana frente a las cepas bacterianas *Klebsiella pneumoniae* y *Enterococcus faecalis*.

Palabras clave: *Hedyosmum*, Extracto Etanólico, actividad antibacteriana, Kirby Bauer, Tarqui.

ABSTRACT

The objective of this research work was to determine the antibacterial activity of the ethanolic extracts of branches, leaves and flowers of the plant species known in the local vocabulary as Tarqui (*Hedyosmun sp*) belonging to the genus *Hedyosmun* of the family *Chloranthaceae*, against bacterial strains of ATCC origin (American Type Culture Collection), Gram negative *Pseudomonas aeruginosa* 27853, *Escherichia coli* 25922 and *Klebsiella pneumoniae* 700603 and Gram positive bacteria *Staphylococcus aureus* 25923 and *Enterococcus faecalis* 29212 of interest for public health according to the World Health Organization Health (WHO).

This was A field research, with a quasi-experimental and descriptive design. The ethanolic extracts of *Hedyosmun sp* was obtained through the process of maceration with ethanol, to later subject the solvent to rotary evaporation, which consists of lowering the pressure to lower the boiling point and separate the solvents, by using a broken steam. The microbiological study was carried out using the Kirby Bauer method or disk diffusion. The samples used were the ethanolic extracts of branches, leaves and flowers of the plant species of *Hedyosmun sp*. Showing antibacterial activity against three of the five bacterial strains used for the study. The ethanolic extract of the *Hedyosmun* branches showed a minimum inhibitory concentration (MIC) of 12,500 ppm, 25,000 ppm and 50,000 ppm compared to *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus* respectively. On the other hand, the ethanolic extracts of the leaves of *Hedysmun sp* also showed antibacterial activity against *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*, with MIC 25 000ppm, 12 500ppm and 50,000ppm respectively and the ethanolic extracts of the flowers showed a MIC of 12 500ppm, for the *E coli* strain, 12 500ppm in *P. aeruginosa* and 50 000ppm *S. aureus*. It is concluded that the extracts used showed a good antibacterial activity in the dilutions of higher concentration, evidencing good halos of inhibition. It should be noted that none of the extracts showed antibacterial activity against the bacterial strains *Klebsiella pneumoniae* and *Enterococcus faecalis*.

Review of the abstract translation by PhD Narcisca Fuertes

Professor at Competencias Linguisticas UNACH.



INTRODUCCIÓN

Este proyecto de investigación se centra en el estudio de la actividad antibacteriana de los principios activos presentes en los extractos etanólicos de la especie vegetal *Hedyosmum* sp conocida en el Ecuador con el nombre de Tarqui, característica de bosques interandinos de América del Sur, contribuyendo de esta manera en el futuro al desarrollo de nuevos fármacos que sirvan para la lucha contra las enfermedades de tipo bacteriano que afectan a la población a nivel mundial y constituyen uno de los principales problemas de salud pública^{1,2}.

Hedyosmum pertenece a uno de los 4 géneros de especies, vegetales con flor pertenecientes a la familia *Chloranthaceae*, los otros 3 géneros son *Ascarina*, *Chloranthus* y *Sarcandra*. La *Hedyosmum* sp es una planta característica de la región interandina localizándose de forma silvestre en bosques montañosos. Existen en el Ecuador aproximadamente 12 de 40 especies de género *Hedyosmum*: *H. anisodorum* Todzia, *H. cuatrecazanum* Occh, *H. cumbalense* Karsten etc. De las 40 especies, al menos 10 han sido estudiadas por distintos autores y tienen un gran uso en la medicina alternativa con distintas propiedades médicas. Es importante mencionar que no existe un estudio de la actividad antibacteriana de la *Hedyosmum* sp (Tarqui), a pesar de ser utilizada en el Ecuador en la medicina tradicional para aliviar infecciones de tipo digestivo, diarreico y respiratorio, que tienen un alto índice de morbilidad y mortalidad en la población^{1,2}.

Según estadísticas de la OMS, se establece que un 80 % del total de la población a nivel mundial utiliza la medicina natural o también llamada tradicional². El uso de plantas es una alternativa viable a los fármacos de venta comercial. En todo el planeta existe alrededor de 391.000 especies vegetales conocidas y entre éstas un mínimo porcentaje se han estudiado de entre un 5 al 15 % originando un sin número de posibilidades para el estudio y descubrimiento de nuevas propiedades antibacterianas presentes en extractos vegetales³.

La medicina natural es parte importante del acervo cultural de la historia humana. Esta medicina se ha desarrollado con diferentes características dependiendo del lugar, país y región del mundo en dependencia propia de la condición económica y desarrollo cultural del país. En la historia de la medicina se puede denotar los dos rumbos, mientras la parte oriental del mundo mantuvo su cultura y la práctica de la medicina natural, en el lado occidental del

globo se ha disminuido el uso de plantas como medicina alternativa, y se ha elevado el uso de medicamentos de venta comercial ⁴.

Desde la antigüedad las plantas se han utilizado de forma empírica para contrarrestar enfermedades, debido a sus múltiples propiedades antimicrobianas, en la actualidad se realiza el estudio de los extractos y aceites esenciales de diferentes plantas de múltiples especies alrededor de todo el mundo, en la búsqueda de nuevas propiedades antimicrobianas, que ayuden a solucionar los problemas de salud originados por las bacterias ³.

En el último siglo se ha alcanzado la síntesis de compuestos, principios activos y sustancias medicamentosas, sumadas al gran desarrollo tecnológico de las industrias actuales han generado una competencia farmacéutica, inundando el mercado de fármacos de venta libre, sin restricción muchas veces mal utilizados ocasionando más daño que un bienestar en los pacientes, un claro ejemplo es la resistencia que desarrollan los pacientes a los antibióticos mal utilizados ⁴.

En Latinoamérica el uso de plantas medicinales para el tratamiento de ciertas dolencias no es desconocido y cada país tiene medicamentos naturales distintos a base de plantas, es por este motivo que este estudio de plantas consideradas en la medicina ancestral es importante ya que ayuda y encamina al descubrimiento de nueva actividad antibacteriana en extractos de plantas no estudiadas y consideradas en la medicina ancestral del Ecuador, que puedan contribuir a la lucha en contra de las enfermedades bacterianas ⁵.

Dentro de nuestro país sea documentado el uso en medicina tradicional de aproximadamente 3000 plantas nativas de un total de 17000 que son las plantas detalladas según algunos autores ⁶.

Es muy común utilizar plantas como medicina alternativa para tratar ciertas afecciones debido a sus propiedades médicas que como son utilizadas de forma empírica no se conoce realmente su composición química, principios activos, actividad antibacteriana y mecanismos de acción lo que limita su estudio farmacológico este estudio está encaminado a la búsqueda de actividad antibacteriana en extractos de una planta usada en la medicina ancestral en el Ecuador conocida como Tarqui (*Hedyosmum* sp) ⁷.

Uno de los principales problemas de salud, son los de origen infeccioso ya que estos microorganismos son capaces de infectar los seres humanos provocando una gran variedad

de enfermedades. Ciertas bacterias de interés clínico que son expuestas al uso indebido de fármacos desarrollan resistencia a los medicamentos ⁷.

En el mes de febrero de 2017 la Organización Mundial de la Salud (OMS) detalla una lista de bacterias patógenas principales, que han desarrollado resistencia a los fármacos para dar prioridad a su estudio y al desarrollo de nuevos antibióticos que sean efectivos en el tratamiento de estas patologías y sean la solución ante la resistencia desarrollada por estas bacterias de interés. En la lista se encuentran detalladas *Klebsiella pneumoniae* causante de infecciones de tipo nosocomial que adquieren gran resistencia a los antibióticos comunes como (Carbapenémicos), también microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* estos implican infecciones con índices muy altos de morbilidad y mortalidad también se encuentran los *Enterococcus faecalis* que generan una resistencia a las cefalosporina, penicilina y los aminoglucósidos como la vancomicina, originando un problema muy grave de salud tanto a nivel intrahospitalario como también en pacientes ambulatorios ².

A mediados del siglo pasado se descubrió las propiedades antibacterianas de los extractos y aceites esenciales abriendo una puerta muy grande a la industria farmacéutica porque no se obtiene sólo de las hojas, sino que se pueden obtener de otros órganos de la planta (flores, tallo, raíz, etc.) y conociendo que existen alrededor de 391 000 especies catalogadas, se presenta así una posible solución a los problemas de salud ocasionados por estos microorganismos ⁶.

La relevancia de este proyecto de investigación tiene su origen en dos raíces, la primera ayudar a solucionar el problema de las enfermedades infecciosas que constituyen uno de los principales problemas de salud a nivel mundial con tasas muy altas de morbilidad y mortalidad ocasionadas por bacterias que infectan a los seres humanos; y la segunda pretende contribuir en la solución al problema de resistencia que desarrollan las bacterias por el uso indiscriminado de fármacos de venta libre, mediante el uso de ensayos microbiológicos que favorezcan al descubrimiento de nueva actividad antibacteriana, en los extractos etanólicos de ramas, hojas y flores de *Hedyosmum* sp que favorezcan al estudio y desarrollo de fármacos (antibióticos).

OBJETIVOS

Objetivo General:

- Determinar la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos etanólicos de la especie vegetal *Hedyosmum* sp encontrada en la parroquia Juan de Velazco Cantón Colta, Provincia de Chimborazo frente a cepas bacterianas de interés clínico.

Objetivos específicos:

- Describir la familia y el género de *Hedyosmum* sp (tarqui) y su uso en la medicina tradicional de Ecuador y otros países de América del Sur.
- Obtener extractos etanólicos de los órganos aéreos (ramas, hojas y flores) de *Hedyosmum* sp.
- Realizar una breve descripción de las bacterias Gram negativas y Gram positivas, que son el objeto de estudio de esta investigación.
- Aplicar ensayos microbiológicos en los extractos etanólicos de *Hedyosmum* sp en distintas bacterias patógenas al humano Gram positivas y Gram negativas.
- Valorar la concentración mínima inhibitoria de los extractos etanólicos de *Hedyosmum* sp frente a cepas bacterias ATCC, asociadas a infecciones con altos índices de morbilidad y mortalidad en la población Ecuatoriana.

CAPITULO I. MARCO TEORICO

Antecedentes históricos

Desde la antigüedad las plantas han sido utilizadas por el ser humano no solo con fines alimenticios y ornamentales sino también médicos, estos conocimientos ancestrales han sido heredados desde hace cientos de años y han perdurado generación tras generación y se utilizan aproximadamente desde hace 6000 años ⁸.

La medicina actual es fundamentada en la medicina ancestral y conocimientos ancestrales de culturas como la mesopotámica, china y egipcia, que son las primeras en utilizar las plantas como medicina, las primeras pruebas documentadas de especies vegetales usadas medicinalmente tienen aproximadamente unos 5000 Años de antigüedad descritas en una tabla de arcilla que asevera que los pioneros en utilizar las plantas como medicina fueron los egipcios y los chinos ⁹.

Otra cultura que se beneficiaba del uso de plantas, es la griega siendo utilizadas por dos grandes iconos de la medicina como lo son Hipócrates, el llamado padre de la medicina griega y su discípulo Aristóteles quienes daban tratamientos a sus pacientes por medio del uso de plantas, gracias a estos conocimientos empíricos sumados a la ciencia y la tecnología actual se ha pulido la ciencia médica a lo que es hoy en día ¹⁰.

Valoración de Género y Familia

La *Hedyosmum* sp conocida en el Ecuador como Tarqui (figura 1), pertenece a una de las especies no catalogadas de la familia *Chloranthaceae*, del género *Hedyosmum* nombre referido a uno de los 4 géneros de esta familia (*Ascarina*, *Chloranthus*, *Hedyosmun* y *Sarcandra*). Esta es una extensa familia vegetal constituida por cerca 75 especies cuyo antecedente genético es una flor fosilizada que corresponde al cretáceo temprano y fue encontrada en Portugal ¹.



Figura 1 Hojas Ramas y Flores de *Hedyosmun* sp (Tarqui)

En el territorio ecuatoriano se han documentado 12 de las 40 especies del género *Hedyosmum*: *H. anisodorum* Todzia, *H. cuatrecazanum* Oscch, *H. cumbalence* Karsten, *H. goudotianum* Solms- Laub, *H. luteynii* Todzia, *H. purpurascens*, Todzia, *H. racemosum*, *H. scabrum*, *H. spectabile* Todzia, *H. Sprucei* Solms-Laub, *H. strigosum* Todzia y *H. translucidum* Cuatrec¹.

Uso en la medicina Tradicional del Ecuador y otros países.

Las *Hedyosmum* constituyen varias especies pertenecientes a la familia *Chloranthaceae*, se ha documentado el uso de este género vegetal en la medicina tradicional, para aliviar dolores abdominales, también se puede utilizar como diurético, antiséptico incluso se ha detallado actividad en contra de células neoplásicas. Esta planta no ha sido catalogada ni estudiada solo ha sido utilizada en el Ecuador de forma empírica y como parte de la medicina ancestral de la sierra ecuatoriana, a diferencia de algunas otras especies de este género que ya han sido catalogadas, encontrándose grandes propiedades farmacológicas. Es por este motivo que este estudio es muy prometedor debido a los antecedentes de familia y género vegetal¹¹.

Que es un extracto vegetal y sus usos.

Es un producto que se obtiene de cualquier órgano vegetal, frutos, ramas, hojas, semillas o raíces de una planta, los cuales están formados de componentes de la planta en estudio, que se manifiestan en el organismo cuando son ingeridos. También actúan realizando actividades de conservación y antioxidación en alimentos. Para citar un ejemplo, un extracto vegetal con fuertes propiedades antioxidantes y varios beneficios para la salud es el extracto de fruto de olivo, que contiene altas concentraciones de la molécula llamada Hidroxitirosol. Los extractos están formados de los componentes activos más importantes de la especie vegetal que se está estudiando, la concentración en un extracto de algunos de esos compuestos activos puede ser miles de veces mayor a la que encontramos originalmente en la planta¹².

Se pueden utilizar sus compuestos activos, para mejorar la vida útil de un alimento, también pueden ayudar a disminuir ataques microbianos. Como un claro ejemplo se puede mencionar al romero que es utilizada como antimicrobiano y antioxidante para la elaboración de alimentos procesados^{12,13}.

Los extractos vegetales en la actualidad son utilizados para la síntesis y elaboración de fármacos, son una fuente de nuevas moléculas con efectos farmacológicos, de igual forma

desde la antigüedad se han utilizado para tratar dolencias musculares, separando porciones biológicamente activas de la planta, a través de un solvente ¹³.

Técnica para la obtención de Extractos.

La obtención de extractos se puede realizar por distintos métodos como: percolación, maceración, infusión y digestión etc. Detallaremos el método de maceración que fue utilizado para el desarrollo de este proyecto de investigación. Este método consiste en dejar reposar las partes vegetales, en un solvente durante determinado tiempo, con ayuda de un papel filtro se procede a filtrar los restos vegetales extrayendo solo el solvente con las propiedades de la planta, conseguidas con el proceso de macerado. Para poder extraer los solventes se pueden detallar algunos métodos ¹⁴.

Destilación a vacío: Los líquidos alcanzan el punto de ebullición al ser expuesto al calor, su presión de vapor se iguala con la presión atmosférica. Esta destilación se realiza disminuyendo la presión atmosférica del equipo, buscando que los componentes de la mezcla a separar se destilen a una temperatura mucho menor a su punto de ebullición normal ^{14,15}.

La evaporación rotatoria: En el presente trabajo se utilizó esta técnica. Es un tipo de destilación muy utilizado en laboratorios, esta técnica de destilación se realiza en equipos compactos comerciales, llamados rotavapores y se utilizan para separar el solvente de una disolución en la que se encuentra presente un soluto poco volátil, generalmente a una temperatura aproximada a la del ambiente, con lo que disminuimos el riesgo de descomposición del producto de interés, que se obtiene en la matraz de destilación ¹⁵.



Figura 2 Rotavapor

Fuente: Laboratorio de la Facultad de ingeniería de la Universidad Nacional de Chimborazo.

Bacterias de interés clínico

La OMS ha clasificado las bacterias en tres grupos de principales que necesitan el desarrollo de nuevos fármacos según su prioridad se clasifican en: crítica, elevada y media.

Crítica: *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a los Carbapenémicos y Enterobacteriaceae, resistentes a los Carbapenémicos. **Elevada:** *Enterococcus faecium*, resistente a la vancomicina, *Staphylococcus aureus*, resistente a la meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina, *Helicobacter pylori*, resistente a la claritromicina, *Campylobacter* spp., resistente a las fluoroquinolonas, *Salmonellae*, resistentes a las fluoroquinolonas, *Neisseria gonorrhoeae*, resistente a la cefalosporina, resistente a las fluoroquinolonas. **Media:** *Streptococcus pneumoniae*, sin sensibilidad a la penicilina, *Haemophilus influenzae*, resistente a la ampicilina, *Shigella* spp., resistente a las fluoroquinolonas ².

Para detallar las bacterias objeto de esta investigación las dividiremos en Gram negativas y Gram positivas, según la técnica de Tinción Gram, las bacterias consideradas Gram positivas se tiñen de color violeta y las bacterias Gram negativas de color rosa ¹⁶.

Las diferencias entre unas y otras radica en la estructura la pared celular, las Gram negativas poseen una pared celular delgada unida mediante lipoproteínas a una membrana plasmática, soluble ante solventes orgánicos mientras, que las Gram positivas presentan una gruesa capa de peptidoglicanos (Ver Figura 3), clasificados en dos grupos: los ácidos teicoicos. El ácido lipoteicoico localizado en la cara interna de la pared celular y el ácido teicoico que se encuentra la superficie anclado a los peptidoglicanos ^{17,18}.

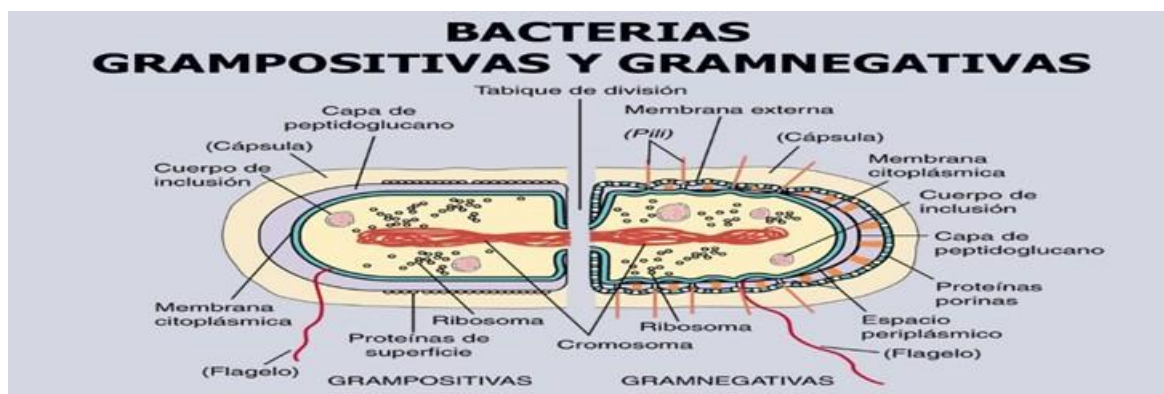


Figura 3 Estructura de las Bacterias Gram + y Gram – Fuente: Microbiología de Murray ⁽¹⁹⁾.

Bacterias Gram negativas

Estas Bacterias poseen una pared celular muy delgada, unida mediante lipoproteínas a una membrana plasmática que es soluble ante solventes orgánicos. A continuación detallaremos la *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* que son las bacterias Gram negativas objeto de este estudio ¹⁷.

Klebsiella pneumoniae

Pertenece al grupo de la enterobacterias, *Klebsiella pneumoniae* es uno de los principales patógenos aislado en infecciones nosocomiales, es la especie más estudiada y con mayor relevancia clínica debido a su resistencia. Este microorganismo presenta una resistencia natural a la ampicilina y a la carbenicilina, la creciente adquisición de plásmidos R lo dotan de una resistencia creciente a las cefalosporinas y a los aminoglucósidos ^{19,20}.

Klebsiella pneumoniae es asociada a la neumonía, de carácter necrotizante, que afecta por lo general a pacientes con enfermedades asociadas a las vías respiratorias. Puede existir una tendencia importante a la formación de abscesos, cavitación, empiema y adherencias pleurales. En los países poco desarrollados se presenta como neumonía bacteriémica en pacientes no inmunodeprimidos. Los pacientes con enfermedad pulmonar por *Klebsiella* presentan una bronconeumonía o una bronquitis, con frecuencia de origen nosocomial ²⁰.

Escherichia coli

La *Escherichia coli* forma parte de la flora bacteriana habitual del intestino de distintos animales, incluidos los humanos. Se puede agrupar en tres cepas según el huésped: comensales, prototipos intestinales y patógenos extraintestinales (tipos B2 y D). El grupo de patógenas extraintestinales es el más importante y causante principal de infecciones abdominales, urinarias, puede ocasionar meningitis, neumonía, bacteriemias incluso puede llegar a provocar osteomielitis. *E. coli* tiene gran relevancia socioeconómica y una alta generación de resistencia los antibióticos, ocasionada por su incidencia y el uso inapropiado de antibióticos ²¹.

Pseudomonas aeruginosa

Es el principal patógeno de la familia *Pseudomonadaceae*, es un bacilo Gram negativo que está dotado de una gran capacidad de defensa, por la gran cantidad de factores de virulencia, estructurales, y enzimáticos que posee, lo que explica la gran variedad de infecciones nosocomiales. La *Pseudomonas aeruginosa* es capaz de crear mecanismos de resistencia

conocidos como mutaciones, también cabe recalcar la facilidad de la *Pseudomonas aeruginosa* sobrevivir en naturaleza, y a nivel hospitalario, permitiéndole ser una de las principales causas de infecciones nosocomiales ²².

Bacterias Gram Positivas

Presentan una gruesa capa de peptidoglicanos divididos en dos grupos los ácidos teicoicos y los lipoteicoicos, esta gruesa capa brinda una gran resistencia a estas bacterias y es la que retiene el colorante durante la tinción. Detallaremos dos *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* que son las bacterias Gram positivas objeto de este proyecto de investigación ¹⁸.

Staphylococcus aureus

Son cocos Gram positivos de 0,5 a 1,5 μm de diámetro, que característicamente se agrupan en parejas y en tétradas, y se dividen en más de un plano para agruparse en racimos irregulares. Es un patógeno humano muy importante que afecta a pacientes hospitalizados, inmunodeprimidos y produce distintas patologías, desde un absceso en la piel, una septicemia mortal y hasta un choque tóxico estafilocócico (SSTS). Puede ser causante de intoxicación alimentaria, la cual ocurre en epidemias y es ocasionada por la ingestión de la enterotoxina B termoestable preformada, producida por una cepa toxigénica de *S. aureus* que crece en el alimento ²³.

Enterococcus faecalis

Microbiológicamente, son clasificados como: cocos Gram positivos, anaerobios facultativos, catalasa negativos. Se los puede encontrar en agua, suelos, alimentos y forman parte de la microbiota normal del hombre y otros animales, donde permanecen habitualmente en el tracto digestivo y urogenital. El aumento de la incidencia de infecciones intrahospitalarias por esta bacteria, son una importante causa de morbilidad en áreas clínicas y quirúrgicas de los hospitales, especialmente en pacientes inmunodeprimidos, mencionado como la tercera causa más importante de infecciones nosocomiales ²⁴.

Resistencia Antibacteriana

Tipos de resistencia

La resistencia antibiótica puede ser natural (intrínseca) o adquirida. La resistencia natural es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano. Por ejemplo, todas las bacterias Gram negativas tienen resistencia a la vancomicina, esta situación no es variable. Por otro lado la

resistencia adquirida es variable y se adquiere por una cepa de una especie bacteriana. Existen cepas de neumococo que generan resistencia a la penicilina, cepas de *Escherichia coli* resistentes a la ampicilina, cepas de estafilococos resistentes a la meticilina. Esta resistencia puede incluso ocasionar fracasos terapéuticos cuando se utiliza un antibiótico supuestamente activo sobre un germen que ha adquirido resistencia al mismo ²⁵.

Genética de la resistencia

Las bacterias son microorganismos capaces de adquirir resistencia en función de su variabilidad genética. Estos novedosos mecanismos pueden ser adquiridos por medio de mutación o mediante transferencia de material genético entre células bacterianas de especies relacionadas o diferentes. Estos genes de resistencia pueden estar codificados en el material genético cromosómico o extracromosómico (plásmidos) ²⁶.

Técnicas de detección de la sensibilidad microbiológica:

El método de difusión con disco (Kirby-Bauer): es una técnica muy utilizada, además de ser económica y sencilla, entrega información cualitativa de la sensibilidad de un microorganismo frente un antimicrobiano (sensible o resistente). Consiste en difundir un antimicrobiano impregnado en un disco de papel estéril, sobre la superficie de una placa de agar previamente sembrada con el microorganismo a estudiar. Si el microorganismo presenta sensibilidad al antimicrobiano, ocasiona una inhibición de su crecimiento alrededor del disco conocida como “halo de inhibición” que es visible y medible, de 18 a 20 horas de incubación. El diámetro del halo de inhibición si existe sensibilidad o resistencia al antimicrobiano, si no existe halo de inhibición el microorganismo se considera resistente ²⁷.

Epsilometría: este ensayo entrega información cuantitativa de la sensibilidad del microorganismo, determinando la concentración mínima del antimicrobiano que es capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo determinado. Este método consiste en colocar una tira, impregnada con concentraciones crecientes del antimicrobiano, la cual se coloca en la superficie de una placa de agar sembrada previamente con el microorganismo en estudio. El antimicrobiano se dispersa en el agar produciendo inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de la tira. La CIM corresponde al punto donde el crecimiento bacteriano alcanza la tira ²⁸.

Dilución: es el método más utilizado para determinar la CMI. Consiste en disminuir las concentraciones a partir de una solución madre, realizando diluciones seriadas de un antimicrobiano en un medio líquido o sólido, los cuales se ponen en contacto con una concentración estándar del microorganismo en estudio (Figura 4). Luego de incubarlos de 18 a 20 horas. Se observa el crecimiento del microorganismo y se establece la CIM, la cual corresponde a la mínima concentración del antimicrobiano donde no se ve crecimiento del microorganismo en estudio ²⁹.

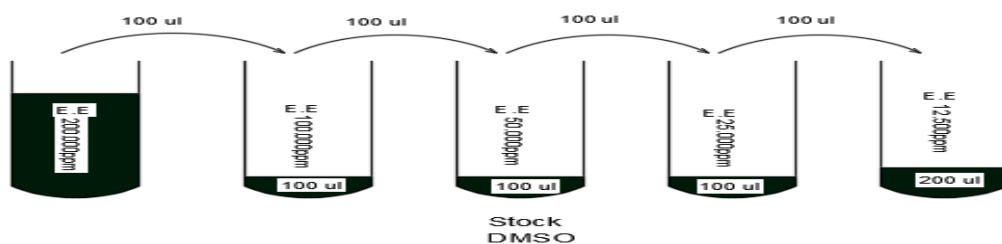


Figura 4 Diluciones seriadas

CAPITULO II. METODOLOGÍA

Tipo de investigación:

- **De campo:** Recolección de las ramas, hojas y flores de *Hedyosmum* sp. del bosque natural Jacarón ubicada en la parroquia Juan de Velazco, Cantón Colta en la Provincia de Chimborazo, Ecuador.
- **Cuasi experimental:** Se realizó por medio de ensayos microbiológicos determinando, mediante experimentos científicos, la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de la especie *Hedyosmum* sp frente a cepas de interés clínico, entre estas tres Gram negativas *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* y dos Gram positivas, *Stafilococos aureus* y *Enterococcus faecalis*.
- **Descriptiva:** Se documentó la información descrita en la literatura científica acerca de las propiedades biológicas atribuidas a esta especie vegetal, para discutir los resultados encontrados en esta investigación con los reportados.

Corte Transversal: El proyecto se realizó con los extractos etanólicos de ramas, hojas y flores de la planta *Hedyosmum* sp conocida como Tarqui. Recolectadas de un lugar específico y en un tiempo determinado durante el periodo octubre 2018- febrero 2019.

Población y Muestra

- **Población:** Muestras vegetales aéreas (ramas, hojas y flores) de Tarqui (*Hedyosmum* ap) recogidas en el bosque de Jacaron, parroquia Juan de Velazco, Cantón Colta Provincia de Chimborazo Ecuador, pertenecientes a una de las especies no catalogadas del género *Hedyosmum* y cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas ATCC.
- **Muestra:** La muestra representa todo el universo de la Población. La planta *Hedyosmum* sp sus extractos etanólicos de hojas tallo y fruto, frente a cepas bacterianas ATCC Gram positivas de interés clínico como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* y Gram negativas como *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*.

Técnicas e instrumentos para la recolección de datos

Técnicas:

- Observación.

Instrumentos

Ficha de observación, cámara fotográfica.

Material de Laboratorio:

Cajas mono Petri estériles, micropipetas automáticas de 1000 y 100 μ l, puntas desechables, matraces, tubos de ensayos con tapa de rosca, frascos de boca ancha con tapa, gradillas, mecheros, matraz, probeta, alcohol, toallas desechables, tubos Eppendorf, medios de cultivo, solución salina fisiológica al 0,9%, agua destilada, cinta testigo, hisopos estériles, asa, discos estériles sin antibiótico discos con antibiótico amikacina 30 μ g y ciprofloxacina 5 μ g para los controles.

Equipos:

Campana de flujo laminar, incubadora a 37°C, agitador orbital, vortex, balanza analítica, congelador a -20 ° C, autoclave, ultrasonido, estufa eléctrica.

Material Vegetal:

Fueron utilizadas las partes aéreas (ramas, hojas y flores) de la especie vegetal *Hedyosmum* sp, que crecen en el bosque de Jaracon ubicado en la parroquia Juan de Velazco perteneciente al cantón Colta provincia de Chimborazo Ecuador. De estas ramas, hojas y flores se obtuvieron los extractos etanólicos que fueron utilizados para el ensayo antibacteriano (Anexo1).

Medios de Cultivo:

Para preparar los medios de cultivo es necesario guiarse en las instrucciones detalladas en el envase. Una vez preparados y disueltos en la estufa eléctrica, es necesario que sean esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 minutos para poder utilizarlos en la réplica de cepas bacterianas. La composición de cada uno de los medios empleados y el detalle de la preparación se describen continuación según el orden en que realizamos el experimento.

Infusión cerebro corazón (BHI) (*brain heart infusión*): Infusión de cerebro de ternero 200 g, infusión de corazón de ternera 250 g, proteína peptona 10 g, glucosa (dextrosa) 2 g, cloruro sódico 5 g, fosfato disódico 2,50 g.

Tripticasa soja Agar (TSA): tiene un estimado por litro: 15 g digerido enzimático de caseína, 5 g digerido enzimático de harina de soja 5 g cloruro de sodio y 15 g de agar.

El agar Müller-Hinton: utilizado comúnmente para realizar la prueba de susceptibilidad a antibióticos. Contiene: 2.0 g de extracto de carne, 17.5g de hidrolizado de caseína, 1.5 g de almidón y 17.0 g de agar³⁰.

Cepas Bacterianas ATCC:

Las bacterias empleadas en este estudio 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). El ensayo incluyó las bacterias Gram negativas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603 y bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (Anexo 4).

Procedimientos

Obtención de las muestras

Se recolectaron ramas, hojas y flores frescas, en perfecto estado de la planta conocida como Tarqui (*Hedyosmum* sp). Por el Ing. Franklin Enrique Cargua Catagña del bosque natural de Jacaron en Colta provincia de Chimborazo.

Una vez separadas las hojas de las ramas y sus flores se procedió a secar cada uno de los órganos vegetales antes mencionados por separado, hasta que se encuentren completamente secas dichas partes vegetales, este proceso se realizó en el techo de la facultad de ingeniería.

Preparación de las Muestras

Una vez seco cada órgano vegetal ramas, hojas y flores libres de humedad fueron trituradas utilizando un molino analítico que pulverizó cada órgano vegetal, posteriormente se procedió a pesar 200 gr de cada órgano y se colocaron en recipientes de vidrio individuales, secos y estériles, aforados con 500 ml del solvente a reposar durante 72 horas, proceso conocido como maceración este proceso se replicó tres veces. (Ver Anexo1).

Obtención de los extractos de ramas hojas y flores

Para la obtención de los extractos hexánicos y etanólicos se realizó por la técnica de maceración explicada anteriormente. Antes de obtener los extractos etanólicos primero se realizó la maceración de cada una de las partes aéreas por separado con hexano para de esta

manera obtener los principios activos hidrofóbicos y posteriormente se realizó con etanol para obtener los compuestos menos hidrofóbicos y más hidrófilos (Ver Anexo 2) ¹⁴.

Para su preparación fue necesario 200 gr molidos de cada parte vegetal, los cuales estaban contenidos en frascos de vidrio individuales como se mencionó anteriormente, los aforamos con 500 ml de etanol hasta que se cubrió por completo ramas, hojas y flores por separado. Posteriormente dejamos reposar durante 72 horas una vez cumplido el tiempo se filtró y se sometió al rotavapor. Utilizando el mismo solvente resultante de la evaporación rotatoria y los mismos restos vegetales, repetimos el proceso dos veces más, una vez filtrada por tercera vez fue sometida por última vez al rotavapor, para obtener los extractos etanólicos. (Ver Anexo 1).

Preparación de la dilución del stock

Para preparar la dilución stock los extractos fueron previamente pesados utilizando la balanza analítica, para obtener un concentrado de 200 000 ppm se pesó 0,2 g o 200 mg de cada extracto, disueltos en 1 ml o 1000µl de dimetilsulfoxido (DMSO). Así conseguimos la solución madre a 200 000 ppm o µg/ml. Para poder diluir los extractos en el DMSO fue necesario utilizar el vortex debido a su consistencia viscosa, también fueron sometidos durante algunos minutos al ultrasonido y otra vez al vortex hasta que se logró homogenizarlos completamente (Ver Anexo 3).

Preinóculo.

Para preparar los preinóculos fueron necesarios dos tipos de medio de cultivo detallados a continuación:

Agar Infusión Cerebro corazón (BHI): se utilizó para replicar la cepa de *Enterococcus faecalis* 29212 que es más exigente.

Agar Tripticasa soya (TSA): se utilizó para realizar el preinóculo a 4 cepas bacterianas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603 y bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* 25923. Luego fueron incubadas de 18 a 20 horas a 37°C, buscando la fase exponencial o estacionaria de las cepas bacterianas proceso llamado preinóculo (Ver Anexo 4).

Inóculo.

Para la preparación del inóculo necesitamos las cepas del preinóculo, por ello las bacterias deben encontrarse en su fase exponencial de 18 a 20 horas, como se mencionó anteriormente. Se utilizaron 5 ml de solución fisiológica en tubos de ensayo estériles y con la ayuda de un asa estéril, un mechero y la campana de flujo laminar procedimos a tomar muestras de bacterias y a mezclarlas con la solución fisiológica buscando que tenga la misma característica del patrón de McFarland $0,5 \cdot 10^6$ ufc/ml. La muestra del inóculo en suero fisiológico no debe ser más turbia que el patrón y se debe comparar contra la luz, asegurando que la muestra tenga el mismo contraste con respecto al patrón (Ver Anexo 5).

Siembra.

Con ayuda de los inóculos esterilizados previamente se realizó la siembra de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70060, *Staphylococcus aureus* 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Se replicaron las cepas bacterianas en agar Müller-Hinton, utilizado comúnmente para realizar la prueba de susceptibilidad a antibióticos (Ver Anexo 5).

Preparación de las diluciones a diferentes concentraciones.

A partir de la solución stock preparada a 200 000 ppm realizamos una dilución sencilla para efectuar esta parte del experimento. Se necesitaron 4 tubos Eppendorf estériles para cada extracto, cada uno en su interior contenía 200µl de DMSO. Colocamos en una gradilla la solución madre y a continuación los tubos con 200µl de DMSO respectivamente rotulados, a continuación homogenizamos la solución madre con ayuda de un vortex, y con una pipeta de 1000µl y puntas azules pipeteamos 200µl de solución madre al siguiente tubo Eppendorf, realizando diluciones seriadas hasta el último tubo que debería contener 400 µl de extracto diluido en DMSO, dando como resultado 5 tubos Eppendorf a diferentes concentraciones desde 200 000ppm de la solución Stock, van reduciéndose las concentraciones respectivamente 100 000, 50 000, 25 000, 12 500 ppm en cada tubo Eppendorf rotulado colocado en orden en la gradilla (Ver Anexo 3).

Método KIRBY - BAUER

Este método consiste depositar discos de diferentes antibióticos y a diferentes concentraciones, en la superficie de una placa de Petri que contiene agar Müller Hinton previamente inoculado con el microorganismo a estudiar y tras un periodo de incubación (24

horas) y a 37°C, se observa la zona o halo de inhibición que aparece redondeando al disco de antibiótico²⁸.

El medio de cultivo más frecuentemente es el Müeller - Hinton, que permite el crecimiento de casi todas las bacterias. El medio de cultivo debe tener un grosor entre 4 y 6 mm y un pH entre 7'2 y 7'4. El reporte se realiza midiendo el radio del halo y se expresa en milímetros³⁰.

Para llevar a cabo este ensayo fueron necesarios 5 discos por cada una de las placas de Petri cada uno de los discos fue impregnado con 15 µl de extracto etanólicos de flor, ramas y hojas a las distintas concentraciones estudiadas: 200 000, 100 000, 50 000, 25 000, 12 250, respectivamente distribuidas en orden en cada una de las placas (Ver Anexo 6).

El estudio se realizó frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Para realizar los controles se utilizaron 5 cajas Petri con las distintas cepas antes mencionadas, se colocaron dos discos por caja, un disco de Amikacina a 30µg para el control positivo de Gram negativos y Ciprofloxacina a 5µg para el control positivo de las Gram positivas.

CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSIONES

Identificación de especie a *Hedyosmum* sp (Tarqui).

La *Hedyosmum* sp conocida vulgarmente como Tarqui, pertenece a una de las especies no catalogadas de la familia *Chloranthaceae*, del género *Hedyosmum* nombre referido a uno de los 4 géneros de esta familia (*Ascarina*, *Chloranthus*, *Hedyosimun* y *Sarcandra*).

Rendimiento de los extractos etanólicos de ramas hojas y flores de *Hedyosmum* sp

Partiendo de 200 g de ramas secas de *Hedyosmum* sp, utilizando la técnica de maceración y recuperado el solvente mediante la técnica de evaporación rotatoria con en el equipo conocido como rotavapor se extrajo 2,5571 gr de extracto etanólico de rama obteniéndose un rendimiento de 1,27 %.

Partiendo de 200 g de hojas secas de *Hedyosmum* sp, utilizando la técnica de maceración y recuperado el solvente mediante la técnica de evaporación rotatoria con en el equipo conocido como rotavapor se extrajo 3,144 gr de extracto etanólico de hojas obteniéndose un rendimiento de 1,57 %.

Partiendo de 200 g de flores secas de *Hedyosmum* sp, utilizando la técnica de maceración y recuperado el solvente mediante la técnica de evaporación rotatoria con en el equipo conocido como rotavapor se extrajo 0,4884 gr de extracto etanólico de flor obteniéndose un rendimiento de 0,24 %. El rendimiento en porcentaje de las flores fue mucho menor por lo que se necesita más muestras vegetales para obtener mayor cantidad de extracto.

Concentración mínima inhibitoria (CMI), mediante la técnica de Kirby Bauer de los extractos etanólicos de *Hedyosmum* sp, frente a cepas Bacterianas ATCC.

La actividad antimicrobiana de los extractos de ramas, hojas y flores de Tarqui (*Hedyosmum* sp), se evaluó frente a cinco cepas bacterias ATCC, facilitadas por el área de investigación de la Universidad Nacional de Chimborazo. Mediante el método de Kirby Bauer, aplicando diluciones seriadas a los extractos, que son difundidos en discos estériles de 0,5mm y distribuidas en cajas de agar Muller Hinton inoculadas con las cepas bacterianas, incubadas de 18 a 20 horas para valorar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada una de las bacterias.

Los resultados presentaron actividad frente *E. coli* ATCC 25922, observando una CMI a una concentración de 25 000 ppm en ramas y 50 000 ppm en extractos de flores y hojas, para *P.*

aeruginosa ATCC 27853, una CMI a los 50 000 ppm en rama y 25 000 en hojas y flores, *S. aureus* la CMI en ramas, hojas y flores fue de 50 000 ppm. Las otras dos cepas bacterianas *K. pneumoniae* ATCC 700603 y *E. fecalis* no presentaron ninguna actividad, las cepas bacterias crecieron sin generar ningún halo de inhibición, por este motivo estas dos bacterias no se tabularon en los resultados.

Tabla 1 Diámetros de los halos de inhibición y CMI de *Escherichia coli*, expuesta a los extractos etanólicos de ramas, hojas y flores de *Hedyosmum* sp.

Cepas ATCC	Extractos etanólicos	Halos de inhibición en (mm).					Control +	Control -	CMI ppm
		200 000ppm	100 000ppm	50 000ppm	25 000ppm	12 500ppm			
<i>Escherichia coli</i> 25922	Ramas	18	15	12	10	8	30	0	12 500
	Hojas	15	13	10	8	SA	30	0	25 000
	Flores	15	13	11	9	7	30	0	12 500

Control + amikacina a 30µg, (SA) Sin actividad y las concentraciones en partes por millón (ppm).

En la tabla 1 se observa que a mayor concentración 200 000 ppm, aumenta el diámetro de los halos de los halos de inhibición y se presentan con un mayor diámetro, van decreciendo respectivamente mientras bajamos la concentración del extracto mediante diluciones seriadas, hasta llegar a 12 500 ppm expresadas en cinco diluciones.

La actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de ramas, hojas y flores de Tarqui, fueron evaluados frente a *E. coli*. En la Tabla 1 se evidencia que los extractos etanólicos de rama mostraron una CMI a las 12 500 ppm y el mayor halo de inhibición a la concentración más alta 200 000 ppm en los extractos etanólicos de hojas mostraron una CMI a las 25 000 ppm y el mayor halo de inhibición, a una concentración de 200 000 ppm y las flores expresaron una CMI a las 12 500 ppm y el mayor halo de inhibición de igual forma se pudo observar a la mayor concentración.

El resultado de los extractos etanólicos de ramas, hojas y flores de la planta conocida como Tarqui (*Hedyosmum* sp), nos muestran una buena actividad frente a la cepa *Escherichia coli* 25922, observando halos de inhibición de 18mm en ramas, 15mm en hojas y 15mm en flores (Ver Anexo 7).

Además se ha demostrado que este género vegetal no solo presentan actividad antibacteriana, también algunas plantas de este género muestran actividad frente a células neoplásicas. Mediante un estudio realizado por Nelson Sutherland y Deyfa Ivy, publicado en el 2014 los extractos de acetato de metanol de las especies vegetales *Hedyosmum purpurascens*, *Hedyosmum racemosum* y *Hedyosmum scabrum* mostraron un favorable resultado de

inhibición ante células tumorales, cancerígenas de colon, mama y próstata demostrando el gran potencial que tiene este género vegetal para el desarrollo de fármacos ^{31,32}.

Tabla 2 Diámetros de los halos de inhibición y CMI de *Pseudomonas aeruginosa*, expuesta a los extractos etanólicos de ramas, hojas y flores de *Hedyosmum* sp.

Cepas ATCC	Extractos etanólicos	Halos de inhibición en (mm)					Control +	Control -	CMI Ppm
		200 000ppm	100 000ppm	50 000ppm	25 000ppm	12 500ppm			
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i> 27873	Ramas	14	12	10	8	SA	37	0	25 000
	Hojas	18	16	13	10	8	37	0	12 500
	Flores	17	14	12	10	8	37	0	12 500

Control + Amikacina a 30µg, (SA) Sin actividad y las concentraciones en partes por millón (ppm).

Frente a *P aeruginosa*. En la Tabla 2 se evidencia que los extractos etanólicos de rama mostraron una CMI a las 25 000 ppm y el mayor halo de inhibición a una concentración de 200 000 ppm en Los extractos etanólicos de hojas mostraron una CMI a las 12 500 ppm y el mayor halo de inhibición a una concentración de 200 000 ppm y las flores expresaron una CMI a las 12 500 ppm y el mayor halo a los 200 000ppm. El resultado de los extractos etanólicos de ramas, hojas y flores de la planta conocida como Tarqui (*Hedyosmum* sp) nos muestran una prometedora actividad frente a la cepa *Pseudomonas aeruginosa* 25922, observando halos de inhibición de 14mm en ramas, 18mm en hojas y 17mm en flores (Ver Anexo 7).

En un estudio realizado a los extractos etanólicos de hojas de la especie vegetal *Hedyosmum scabrum*, nos muestra la inhibición completa del crecimiento de *Pseudomonas Aeruginosa*, inoculada en agar Müeller-Hinton expuesta de extractos etanólicos de hoja a una concentración de (40 mg/ml) confirmando nuestros resultados y las propiedades antibióticas del género vegetal (*Hedyosmum*), frente a esta cepa bacteriana Gram negativa ³³.

Tabla 3 Diámetros de los halos de inhibición y CMI de *Staphylococcus aureus*, expuesta a los extractos etanólicos de ramas, hojas y flores de *Hedyosmum* sp.

Cepas ATCC	Extractos Etanólicos	Halos de inhibición en (mm).					Control +	Control -	CMI Ppm
		200 000ppm	100 000ppm	50 000ppm	25 000ppm	12 500ppm			
<i>Staphylococcus Aureus</i> 25923	Ramas	16	12	8	SA	SA	28	0	50 000
	Hojas	18	14	9	SA	SA	28	0	50 000
	Flores	14	10	9	SA	SA	28	0	50 000

Control + Ciprofloxacina a 5µg, (SA) Sin actividad y las concentraciones en partes por millón (ppm).

De similar forma que en las Gram negativas los halos de inhibición son más grandes de acorde con la concentración es más alta del extracto y va disminuyendo su diámetro mientras disminuye la concentración.

La actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de ramas, hojas y flores de la planta *Hedyosmum* fueron evaluados frente a *S. aureus*. En la Tabla 3 se evidencia que los extractos etanólicos de rama mostraron una CMI a las 50 000 ppm y el mayor halo de inhibición a una concentración de 200 000 ppm en los extractos etanólicos de hojas mostraron una CMI a las 50 000 ppm y el mayor halo de inhibición a una concentración de 200 000 ppm en las flores expresaron una CMI a las 50 000 ppm y evidenciándose el mayor halo de inhibición a la mayor concentración 200 000 ppm.

El resultado de los extractos etanólicos de ramas, hojas y flores de la planta conocida como Tarqui (*Hedyosmum* sp), otorgan una prometedora actividad frente a la cepa *S. aureus* 25923, observando halos de inhibición de 16mm en extractos etanólicos de ramas, 18mm en extractos etanólicos de hojas y 14mm en extractos etanólicos de flores (Ver Anexo 7).

En un artículo realizado por Silvia Hipatia Torres Rodríguez, y col., publicado en el 2016 , expresa que el extracto etanólico de hojas maduras, semimaduras y tiernas de la especie vegetal *Hedyosmum scabrum* muestra inhibición del crecimiento de *S. aureus*, también mostraron actividad frente a *Bacillus subtilis*, otra bacteria Gram positivas evidenciando ausencia completa del crecimiento bacteriano en las placas de agar pero a una concentración de (40 mg/ml) de extracto etanólico mayor a la utilizada en nuestro ensayo demostrando que las plantas de este género vegetal presentan gran actividad antibacteriana sobre algunas cepas Gram positivas ³³.

CONCLUSIONES.

Se concluye que la *Hedyosmum* sp conocida en el Ecuador como Tarqui, pertenece a una de las especies no catalogadas de la familia *Chloranthaceae*, del género *Hedyosmum* nombre referido a uno de los 4 géneros de esta familia, se utiliza en la medicina tradicional del Ecuador para aliviar infecciones de tipo respiratorio y diarreico, infecciones con un alto índice de morbilidad en relación a la población ecuatoriana. Se ha documentado que otras especies de este género vegetal, son utilizadas en otros países de América del Sur para tratar problemas como dolor abdominal, también se puede utilizar como diurético, diaforético, afrodisíaco y antiséptico también para tratar neuralgias, reumatismo, calambres estomacales así como también infecciones respiratorias agudas e infecciones diarreicas.

Se obtuvo extractos etanólicos de los órganos aéreos *Hedyosmum* sp se recolectó 2,5571 gr de extracto y se obtuvo un rendimiento de 1,27 % para las ramas, se extrajo 3,144 gr de extracto etanólico de hojas obteniéndose un rendimiento de 1,57 %, en el caso de las flores el rendimiento fue mucho más bajo que en rama y hojas, obteniendo 0,4884 gr de extracto etanólico de flor y un rendimiento de 0,24 %.

Según este estudio entre las principales bacterias de interés están detalladas en dos grupos, las bacterias Gram negativas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603 y bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* 25923 y *Enterococcus faecalis* 29212.

Según los ensayos microbiológicos realizados, la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de los órganos aéreos *Hedyosmum* sp (ramas, Hojas y flores), frente a las cepas de interés clínico fue evaluada mediante el método de Kirby Bauer, que permitió evidenciar la actividad antibacteriana, los extractos etanólicos de rama mostraron una CMI a las 12 500 ppm para la cepa de *E coli*, 25 000ppm en *P. aeruginosa* y 50 000ppm *S. aureus* 25923, contra los extractos etanólicos de hoja mostraron una CMI a las 25 000ppm, para la cepa de *E coli*, 12 500ppm en *P. aeruginosa* y 50 000ppm *S. aureus* y para los extractos etanólicos de flor la CMI fue de a las 12.500ppm, para la cepa de *E coli*, 12 500ppm en *P. aeruginosa* y 50 000ppm *S. aureus*, observando buena actividad antibacteriana en las concentraciones más altas de los extractos y decrecen respectivamente según disminuye su concentración. *Klebsiella pneumoniae* y *Enterococcus faecalis* no presentaron ninguna actividad.

RECOMENDACIONES

- ❖ Se recomienda trabajar con suma precaución y mantener las normas de bioseguridad requeridas para trabajar en un laboratorio de microbiología para evitar cualquier tipo de contaminación que pueda ocasionar falsos positivos o contaminaciones de cualquier tipo en las placas Petri siempre en condiciones estériles con suma precaución ya que se está tratando con cepas bacterianas directamente.
- ❖ Se recomienda, realizar los ensayos por duplicado para confirmar los resultados y asegurar el correcto reporte de los mismos.
- ❖ Se recomienda seguir realizando nuevas investigaciones con extractos vegetales de plantas usadas en la medicina ancestral del Ecuador ya que se evidenciaron muy buenos resultados con los extractos etanólicos de tarqui (*Hedyosmum* sp), de igual forma se recomienda realizar más ensayos microbiológicos con otras cepas de interés clínico.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Torres S, Tovar M, García V, Lucena M, Araujo L. 2018. Revista Peruana de Biología [Internet]. 2019 [citado 6 Noviembre 2018]; 25(2). Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe>
2. Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2017 [citado 8 Noviembre 2018]. Disponible en: <http://origin.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
3. Darbyshire D, Halski B, Williams J, Baines D, Clubbe D, McCarthy B. El estado de las plantas del mundo 2017 [Internet]. Royal Botanic Gardens, Kew.; 2017 [citado 9 Noviembre 2018]. Disponible en: https://stateoftheworldsplants.org/2017/report/SOTWP_2017.pdf
4. Hernández I. Programa Nacional de medicina Tradicional y Natural [Internet]. 1st ed. Ing. Jorge Hernández Avilés; 1999 [citado 11 Noviembre 2018]. Disponible en: http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/mednat/programa_nacional_de_mnt.pdf
5. Gallegos M, Gallegos D. Plantas medicinales utilizadas en el tratamiento de enfermedades de la piel en comunidades rurales de la provincia de Los Ríos Ecuador. An. Fac. med. [Internet]. 2017 Jul [citado 12 noviembre 2018]; 78(3): 315-321. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832017000300011&lng=es. <http://dx.doi.org/10.15381/anales.v78i3.13767>.
6. De la Torre L, Navarrete H, Muriel P, Macia M. Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador [Internet]. 1st ed. Quito Ecuador: Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador & Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus; 2019 [citado 13 Noviembre 2018]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/310828407_Enciclopedia_de_las_Plantas_Utiles_del_Ecuador
7. El control de las enfermedades transmisibles [Internet]. 17th ed. Washington: James Chin; 2001 [citado 18 Noviembre 2018]. Disponible en: <http://www1.paho.org/hq/dmdocuments/2010/9275315817.pdf>
8. Jamshidi-Kia F, Lorigooini Z, Amini-Khoe H. Plantas medicinales: historia pasada y perspectiva de futuro. 7th ed. Journal of Herbmed Farmacology. Universidad de Ciencias

Médicas de Shahrekord: Sociedad Internacional de Ciencias Fitosométicas.; 2019. p.
<https://plu.mx/plum/a/?doi=10.15171/jhp.2018.01>.

9. Antonelli A, Sanmartin I. Reconstrucción de la evolución espaciotemporal de la antigua angiosperma Género *Hedyosmum* (Chloranthaceae) utilizando enfoques empíricos y simulados. 50th ed. Systematic Biology. Oxford: Susanne Renner; 2011. p.
<https://academic.oup.com/sysbio/article/60/5/596/1646280>.

10. Lips W, Urenda C. La medicina en la civilización griega antigua prehipocrática [Internet]. 1st ed. México: Gaceta Médica de México; 2014 [citado 1 Diciembre 2018]. Disponible en: https://www.anmm.org.mx/GMM/2014/s3/GMM_150_2014_S3_369-376.pdf

11. Ojeda R. Aislamiento caracterización y Actividad biológica de metabolitos secundarios a partir de hojas con flores femeninas de *Hedyosmum racemosum* en la provincia de Zamora Chinchipe [Internet]. 1st ed. Loja; 2019 [citado 3 Diciembre 2018]. Available from: <http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/15881/1/Ojeda%20Herrera%20Richard%20Andr%C3%A9s.pdf>

12. Q&A Todo sobre los extractos vegetales. [Internet]. Nutexa.com. 2017 [citado 15 Febrero 2019]. Disponible en: <https://www.nutexa.com/2017/06/13/qa-todo-sobre-los-extractos-vegetales/>

13. Uso de Extractos Vegetales [Internet]. Drcarpman.com. 2019 [citado 15 Febrero 2019]. Disponible en: <http://www.drcarpman.com/plantas-medicinales/uso-de-extractos-vegetales>

14. Carrión A, García C. “Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica” [tesis previa a la obtención del título de bioquímica y farmacéutica]. Universidad de cuenca facultad de ciencias químicas escuela de bioquímica y farmacia; 2010.

15. Montero M. Destilación simple y fraccionada como estrategia metodológica para fortalecer el aprendizaje de la separación de los componentes de una mezcla en los estudiantes de primer año de bachillerato del colegio Hernán Gallardo Moscoso de la ciudad de Loja 2013-2014 [Internet]. 1st ed. Loja; 2016 [citado 6 Diciembre 2018]. Disponible en: <http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/10859/1/TESIS%20Magdalena%20Elizabeth%20Montero%20Paccha.pdf>

16. López L, Durán M, Colín C, Ortega S, Cerón G, Franco R. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. 3rd ed. Investigación en discapacidad. México: www.medigraphic.org.mx; 2014. p. <http://www.medigraphic.com/pdfs/invdis/ir-2014/ir141b.pdf>.
17. Mollinedo P, Marcela G, Villalobos C. Bacterias Gram Negativas. Rev. Act. Clin. Med [revista en la Internet]. [Citado 2019 Feb 22]. Disponible en: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-37682014001000005&lng=es.
18. Molina J, Uribarren T. GENERALIDADES DE BACTERIAS - Recursos en Bacteriología - UNAM [Internet]. Facmed.unam.mx. 2017 [citado 9 Diciembre 2019]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidades.html>
19. Biología Médica. Estructura de las Gram Positivas y Gram Negativas [Internet]. 2010 [citado 15 Diciembre 2018]. Disponible en: <http://biologiamedica.blogspot.com/2010/09/bacterias-gram-positivas-y-gram.html>
20. Puerta A, Rodríguez M, F. Actualización Enterobacterias [Internet]. 1st ed. México: Facultad de medicina de la UNAM; 2010 [citado 19 Diciembre 2018]. Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Enterobacterias_Medicine2010.pdf
21. Farfán A, Ariza Sandra, Vargas Andrea, Vargas Viviana. Mecanismos de virulencia de Escherichia coli enteropatógena. Rev. chil. infectol. [Internet]. 2016 Ago [citado 2019 Feb 10]; 33(4):438-450. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182016000400009&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182016000400009>.
22. Montero M. Pseudomonas aeruginosa aspectos, epidemiológicos, clínicos y terapéuticos [Tesis Doctoral]. Universidad autónoma de Barcelona departamento de medicina; 2012.
23. Hurtado M. P., de la Parte M. A., Brito A... Staphylococcus aureus: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. Rev. Soc. Ven. Microbiol. [Internet]. 2002 Jul [citado 17 Diciembre 2018]; 22(2): 112-118. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562002000200003&lng=es.

24. Cercenado E. Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica [Internet]. 29th ed. Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, España: Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas; 2011 [citado 16 Febrero 2019]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/ccs-2010-bacteriologia.pdf>
25. Rodríguez G. Bacteriología y Virología medica [Internet]. 2nd ed. Oficina del libro FEFMUR; 2006 [citado 23 Diciembre 2018]. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/StreptococcusyEnterococcus.pdf>
26. Guatam D, Morten S. Genética de la resistencia microbiana. Investigación y Ciencia [Internet]. 2014 [citado 17 Febrero 2019];(455):<https://www.investigacionyciencia.es/revistas/investigacion-y-ciencia>. Disponible en: <https://www.investigacionyciencia.es/revistas/investigacion-y-ciencia/neurociencia-de-los-hbitos-606/gentica-de-la-resistencia-microbiana-12278>
27. Mühlhauser D, Rivas T. Laboratorio de microbiología: conocimientos básicos para un clínico Clinical microbiology laboratory: basic knowledge to a physician. Revista Médica Clínica las Condes [Internet]. 2019 [citado 4 Enero 2019];(3):575-576. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0716864014700720>
28. Viera T. Evaluación e indicación de las técnicas de difusión-dilución (epsilometría). 19th ed. Revista Chilena de Infectología. Santiago: Laboratorio de Microbiología, Hospital Militar del General Luis Felipe Berieva Aran; 2002. p. 85-86.
29. Diluciones seriadas | cuaderno de laboratorio [Internet]. Www3.uah.es. 2019 [citado 6 Enero 2018]. Disponible en: <http://www3.uah.es/cuadernolab/p/index.php/diluciones-seriadas/>
30. Muller Hinton Agar [Internet]. Britanialab.com. 2019 [citado 10 Enero 2018]. Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a2843836ddd8.pdf
31. Nelson S, Deyfa I. Evaluación de la actividad inhibitoria del crecimiento tumoral de extractos de metanólicos y de acetato de etilo de *Hedyosmum scabrum*, *Hedyosmum racemosum* y *Hedyosmum purpurascens* en las líneas celulares RKO, MCF-7, D834 y PC3 mediante el ensayo MTS [Licenciatura]. Universidad Técnica Particular de Loja; 2014.

32. Paredes M. Composición química y actividad antibacteriana de *Hedyosmum purpurascens* [Licenciatura]. Universidad Técnica particular de Loja; 2013.
33. Análisis fitoquímico de un extracto de la especie forestal nativa tarqui (*Hedyosmum scabrum*), perteneciente al bosque de Jacarón, Mikarimin Revista Científica Multidisciplinaria. 2016;(2):81-82.

ANEXOS

Anexo1. Muestras vegetales aéreas de *Hedyosmum* sp, ramas, hojas y flores expuestas a etanol.

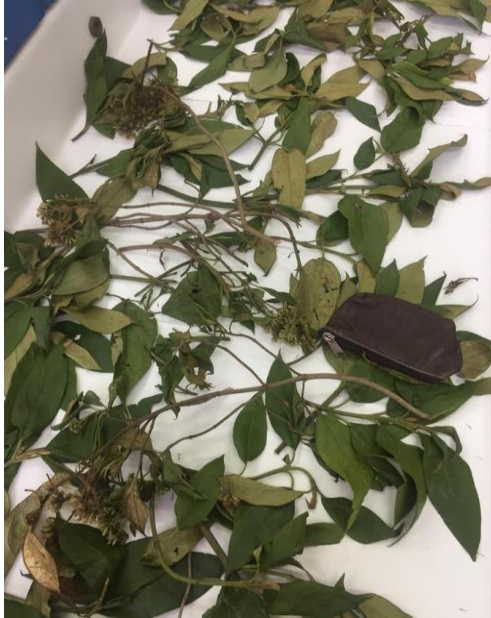


Imagen 1 Ramas, hojas y flores de Tarqui.



Imagen 2 Ramas hojas y Flores Trituradas y aforadas con etanol.

Anexo 2 Evaporación rotatoria y extractos etanólicos.

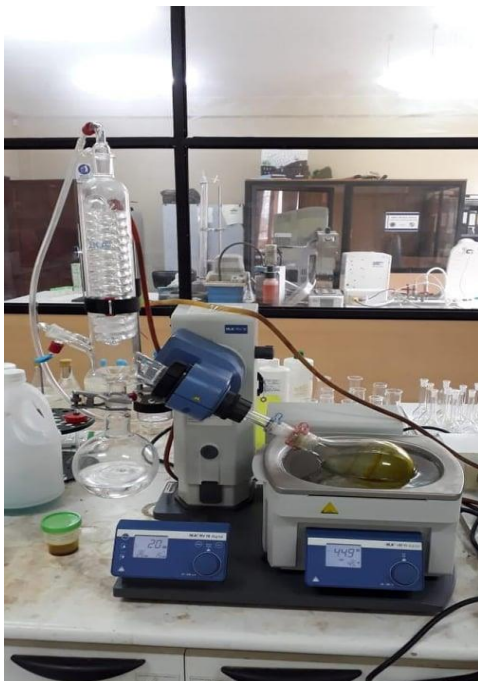


Imagen 4 Rotaevaporador Utilizado para obtener los extractos, Facultad de Ingeniería.



Imagen 3 Extractos etanólicos puros de hojas, ramas y flores.

Anexo 3 preparaciones de la solución STOCK Y diluciones seriadas.



Imagen 6 Peso del extracto etanólico hoja.

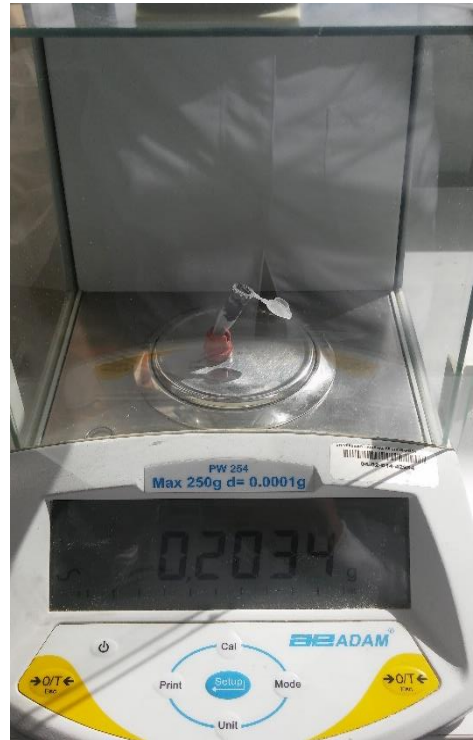


Imagen 5 Peso del extracto etanólico rama.



Imagen 7 Diluciones seriadas de los extractos etanólicos.



Imagen 8 Solución Stock a 200 000ppm de ramas, hojas y flores.

Anexo 4 Cepas Bacterianas y preparación del preinóculo.

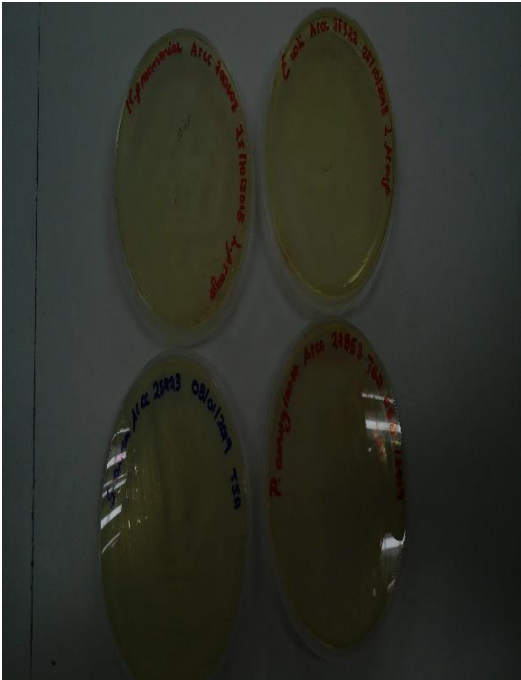


Imagen 9 Cepas bacterianas ATCC.



Imagen 10 Siembra de las cepas en agar TSA.



Imagen 11 Preinóculo de cepas ATCC incubado 18 horas.

Anexo 5 preparación del inóculo y siembra



Imagen 12 Con una asa estéril tomar colonias del preinóculo.

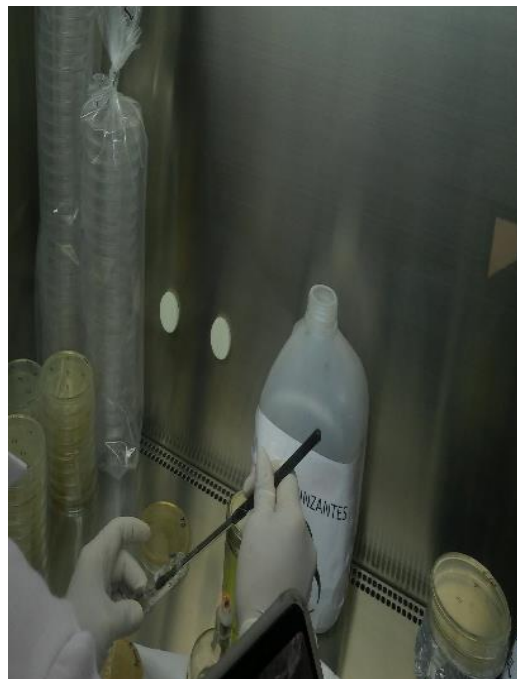


Imagen 13 Diluir las colonias en 5ml de DMSO.



Imagen 14 El inóculo se compara con el patrón Mc Farland.



Imagen 15 Inoculación en agar Muller Hinton.

Anexo 6 métodos de Kirby Bauer distribuciones de los discos difundidos con extracto a diferentes concentraciones.



Imagen 16 Distribución de los discos con extractos a diferentes concentraciones.



Imagen 17 Discos estériles con extracto de ramas.

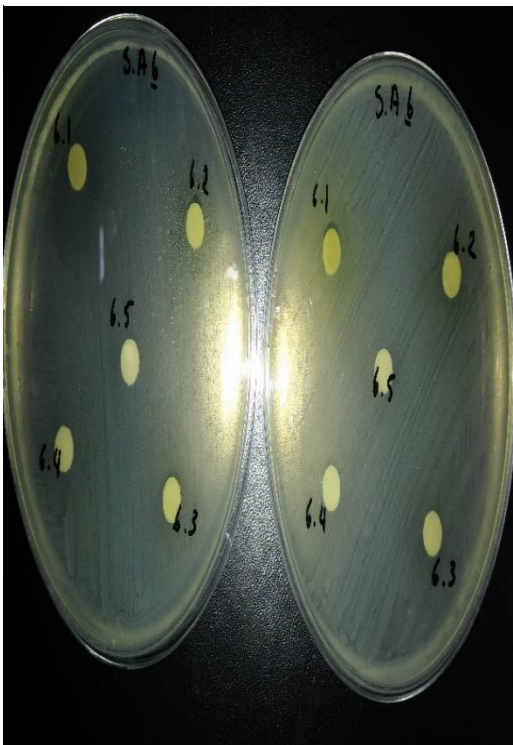


Imagen 18 Discos estériles con extracto de hojas.

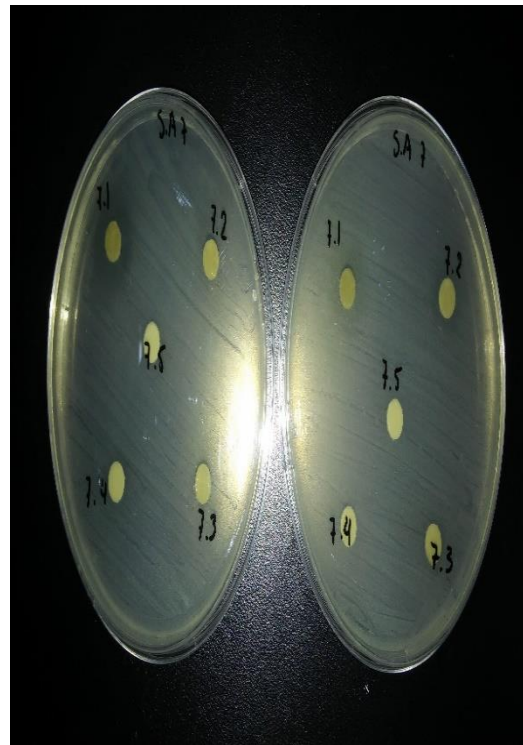


Imagen 19 Discos estériles con extracto de flor.

Anexo 7 Halos de inhibición en las tres cepas con actividad.



Imagen 20 halos de inhibición *Staphylococcus aureus* extractos etanólicos de ramas.



Imagen 21 halos de inhibición *Staphylococcus aureus* extractos etanólicos de ramas.



Imagen 22 halos de inhibición *Staphylococcus aureus* extractos etanólicos de flor.

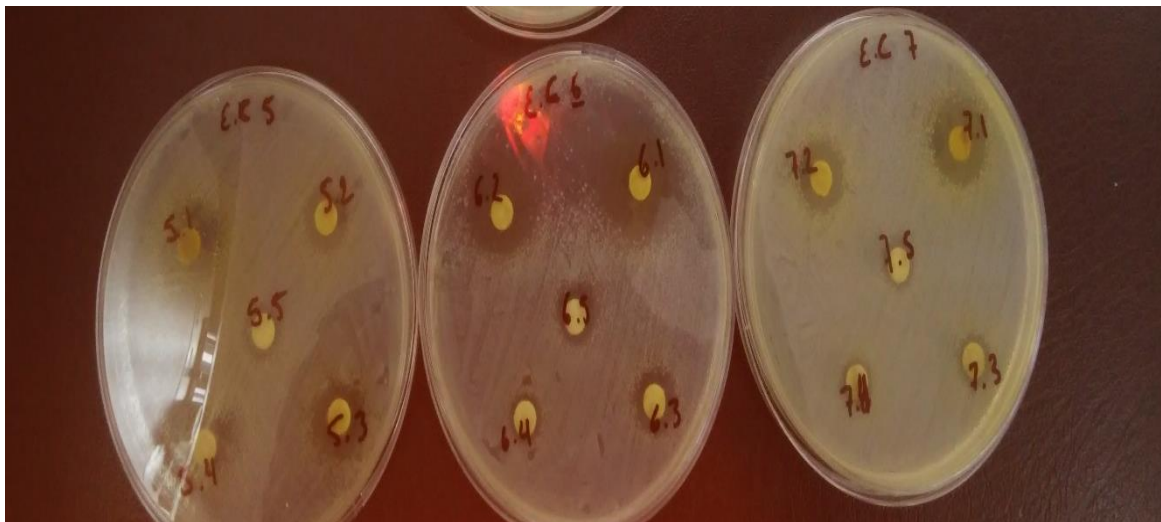


Imagen 23 halos de inhibición ramas hojas y flores respectivamente frente a *Escherichia coli*.

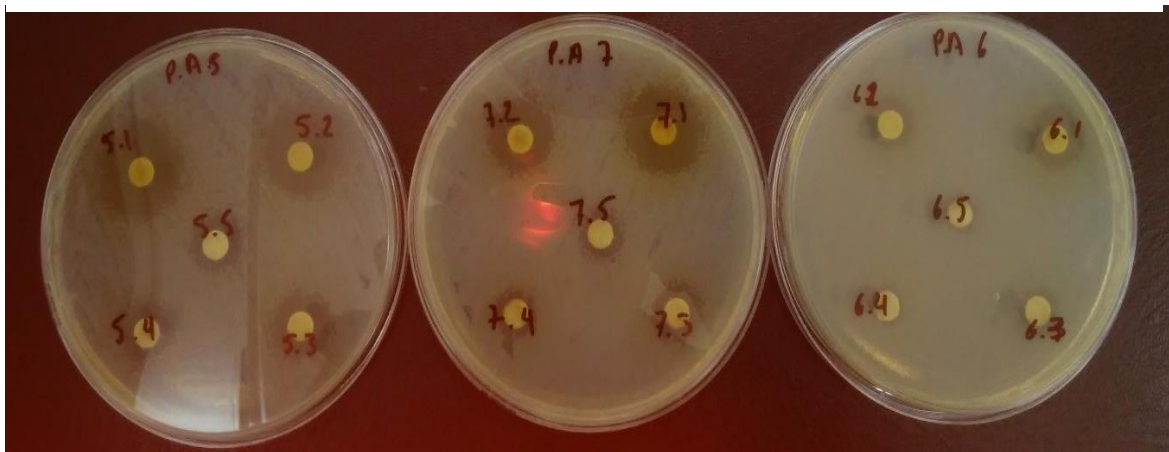


Imagen 24 halos de inhibición de ramas flores y hojas frente *Pseudomonas aeruginosa*.

Anexo 8 controles



Imagen 25 Amikacina a 30µg.



Imagen 26 Amikacina a 30µg.



Imagen 27 Amikacina 5µg.

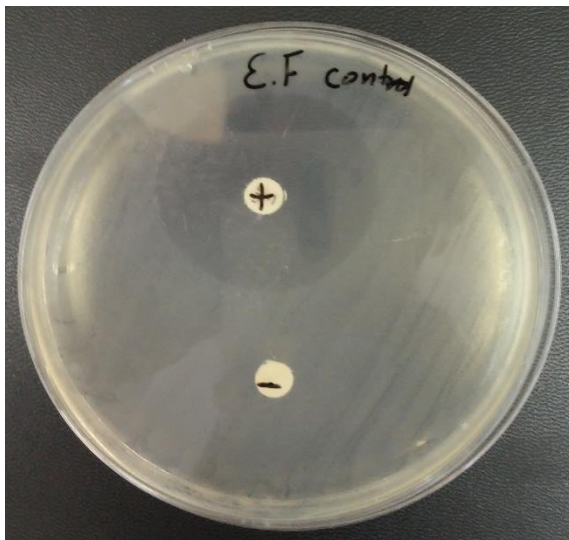


Imagen 28 Ciprofloxacin a 5µg.



Imagen 29 Ciprofloxacin a 5µg.