



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 Licenciado en Ciencias de la Salud en Laboratorio Clínico e Histopatológico

TRABAJO DE TITULACIÓN

Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de *Hedyosmum* sp. frente a cepas de interés clínico. Abril – Agosto 2019

Autor: Byron Patricio Paredes Parco

Tutora: 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 etanólicos de *Hedyosmum* sp. frente a cepas de interés clínico. Abril – Agosto 2019” presentado por: Byron Patricio Paredes Parco y dirigida por: Dra. María Eugenia Lucena Ph.D, una vez escuchada la defensa oral y revisado el informe final del proyecto de investigación con fines de graduación escrito en el cual se ha constatado el cumplimiento de las observaciones realizadas, remite la presente para uso y custodia en la biblioteca de la Facultad de Ciencias de la Salud de la UNACH. Para constancia de lo expuesto firman:

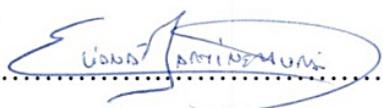
Mgs. Mercedes Balladares Saltos

Presidente del Tribunal


.....
Firma

Lic. Eliana Martínez Duran

Miembro del Tribunal


.....
Firma

Mgs. Félix Falconí Ontaneda

Miembro del Tribunal


.....
Firma

DECLARACIÓN DEL TUTOR

Yo, Dra. María Eugenia Lucena Ph.D en calidad de tutora del proyecto de investigación con el tema “Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de *Hedyosmum* sp. frente a cepas de interés clínico. Abril – Agosto 2019”, propuesto por el Sr. Byron Patricio Paredes Parco 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 apta para la defensa pública del proyecto. Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad facultando al interesado hacer uso del presente para trámites correspondientes.



Dra. María Eugenia Lucena 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 al autor Byron Patricio Paredes Parco con cédula de identidad N.2300420870 y el patrimonio intelectual de la misma a la Universidad Nacional de Chimborazo.”



.....
Byron Patricio Paredes Parco
CI: 2300420870

AGRADECIMIENTO

Ofrezco mi agradecimiento en primer lugar al creador por ser mi guía día a día, mi fuerza en todo momento e iluminarme para la toma de cualquier decisión. A la Universidad Nacional de Chimborazo por permitirme formar parte de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico para conseguir uno de mis objetivos personales y agradezco de manera especial a mi Tutora Dra. María Eugenia Lucena, cuyos esfuerzos ayudaron en la realización de este proyecto, a los docentes que ayudaron a formarme no solo como profesional sino también como un ser humano aplicando los conocimientos enseñados con ética y profesionalismo.

Byron Patricio Paredes Parco

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mi familia en especial a mi madre Clara Parco por las enseñanzas, buenos consejos y apoyo incondicional brindado, a mis tíos Ana, Marco, Blanca, Enrique por la ayuda mostrada en cada uno de los obstáculos enfrentados a lo largo de mi vida estudiantil. A mis compañeros de tesis por ser mi motivación y apoyo diario para mejorar cada día y culminar este proyecto con total éxito.

Byron Patricio Paredes Parco

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	5
Objetivo General:	5
Objetivos Específicos:	5
CAPÍTULO I.....	6
MARCO TEÓRICO	6
Microorganismos Bacterianos	6
Estructura bacteriana	6
Infecciones bacterianas.....	7
<i>Salmonella</i> sp.....	8
<i>Serratia marcescens</i>	8
<i>Enterobacter</i> sp.	8
Infecciones Micóticas	9
<i>Cándida</i> sp.....	9
Generalidades de los antibióticos	10
Clasificación de acuerdo a la interacción germen-antibiótico.....	10
Clasificación según el espectro de acción	10
Clasificación según el mecanismo de acción	10
Mecanismos de resistencia a los antibióticos	12
Métodos para la determinación de actividad antimicrobiana	13
Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	14
Extractos etanólicos.....	14
Propiedades biológicas de las plantas.....	14
Antecedentes históricos plantas medicinales.....	15
Familia Chloranthaceae	15
Género <i>Hedyosmum</i>	16

Especies <i>Hedyosmum</i>	16
Taxonomía del género <i>Hedyosmum</i>	16
CAPÍTULO II.....	17
METODOLOGÍA.....	17
Tipo de investigación:	17
Población y muestra	17
Variables de estudio.....	18
Métodos de estudio:.....	18
Técnicas y procedimientos:	18
Material y métodos	18
Procedimiento.....	19
Extracción etanólica por maceración.....	19
Preparación de la solución madre del Extracto etanólico y diluciones	19
Preparación del preinóculo	20
Preparación del inóculo	20
Siembra en placas con Agar Mueller Hinton (AMH)	20
Ensayo microbiológico: antibiograma.....	21
Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	21
Consideraciones éticas.....	21
CAPÍTULO III.	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
Rendimiento de los extractos etanólicos de ramas y hojas de <i>Hedyosmum</i> sp	22
Actividad antimicrobiana de Extracto etanólico	22
CONCLUSIONES.....	26
RECOMENDACIONES	27
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
ANEXOS.....	34

Índice de figuras

Figura 1. Estructura Bacteriana.....	7
Figura 2. Frecuencia de especies de <i>Cándida</i> patógenas	9
Figura 3. Estrategia de resistencia Bacteriana.....	13
Figura 4. Taxonomía del género <i>Hedyosmum</i> sp.	16

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de ramas de *Hedyosmum* sp. expresado por los halos de inhibición en milímetros (mm) con su respectivo valor de CMI, $\bar{X} \pm SD$ frente a las bacterias: *Serratia marcescens*, *Salmonella* sp. *Enterobacter* sp 24

Cuadro 2. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de Hojas de *Hedyosmum* sp. expresado por los halos de inhibición en milímetros (mm) con su respectivo valor de CMI, $\bar{X} \pm SD$ frente a las bacterias: *Serratia marcescens*, *Salmonella* sp. *Enterobacter* sp 24

RESUMEN

La resistencia antimicrobiana es un serio problema de salud pública mundial, que se genera por el uso incorrecto de antimicrobianos también denominado automedicación, se reduce el efecto microbicida lo que genera multiresistencia. Los extractos obtenidos de las plantas se consideran como fuente principal para la búsqueda de nuevos antimicrobianos. El objetivo del estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de *Hedyosmum* sp., del bosque Jacarón Chimborazo-Ecuador, frente a especies infecciosas: *Cándida albicans*, *Cándida glabrata*, *Cándida krusei*, *Cándida tropicalis*, *Cándida parapsilosis*, *Serratia marcescens*, *Salmonella* sp., *Enterobacter* sp. Los extractos se obtuvieron a partir de ramas y hojas del material vegetal, mediante el método de maceración etanólica y rotavaporación. El rendimiento fue de 1,27% en ramas y 1.57% en hojas. La actividad antimicrobiana fue detectada a través del método Kirby-Bauer e interpretada mediante la medición de los halos de inhibición. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) empleando diluciones desde 250000 µg/mL hasta 15625 µg/mL. Las bacterias, *Serratia marcescens* y *Enterobacter* sp. fueron los microorganismos más sensibles a la acción de los extractos, mientras que los microorganismos levaduriformes no mostraron susceptibilidad a ninguno de los extractos estudiados. La CMI aproximada frente a *Serratia marcescens* y *Enterobacter* sp. fue de 31250 µg/mL. Se concluye que los extractos etanólicos estudiados de *Hedyosmum* sp. resultaron ser activos frente a las bacterias gramnegativas *Serratia marcescens* y *Enterobacter* sp., microorganismos como la *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* no presentaron sensibilidad probablemente a la mayor complejidad de su pared celular.

Palabras clave: actividad antimicrobiana, extracto etanólico, *Hedyosmum* sp.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance has been transformed into a serious global public health problem, which is generated by the incorrect use of antimicrobials also called self-medication, the microbicidal effect is reduced which generates multiresistance. Extracts obtained from plants are considered as the main source for the search for new antimicrobials. The objective of the study was to evaluate the antimicrobial activity of ethanolic extracts of *Hedyosmum* sp. of the Jacarón Chimborazo-Ecuador forest, against infectious species: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Serratia marcescens*, *Salmonella* sp., *Enterobacter* sp. The extract was obtained from branches and leaves of the plant material, using the method of ethanolic maceration and rotavaporation. The yield was 1.27% in branches and 1.57% in leaves. The antimicrobial activity was detected through the Kirby-Bauer method and interpreted by measuring the inhibition halos. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using dilutions from 250000 $\mu\text{g} / \text{mL}$ to 15625 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Bacteria, *Serratia marcescens* and *Enterobacter* sp were the microorganisms most sensitive to the action of the extract, while the levaduriform microorganisms showed no susceptibility to the antifungal action of the extract. The approximate WCC against *Serratia marcescens* and *Enterobacter* sp. It was 31250 $\mu\text{g} / \text{mL}$, It concluded that the extract of *Hedyosmum* sp. It turned out to be active against the gram-negative bacteria *Serratia marcescens* and *Enterobacter* sp., microorganisms such as *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* did not show antifungal activity due to the greater resistance of their cell Wall.

Keywords: antimicrobial activity, ethanolic extract, *Hedyosmum* sp.



Reviewed by:
Danilo Yépez Oviedo
English professor UNACH.



INTRODUCCIÓN

En la actualidad, diversos extractos naturales de plantas que presentan actividad antimicrobiana se usan en el tratamiento de enfermedades infecciosas, estos constituyen un desafío en el campo de la medicina y se ofrece como una opción especialmente para aquellos microorganismos que han desarrollado mecanismos de resistencia a antibióticos comerciales⁽¹⁾.

El propósito de este proyecto de investigación se centró en el estudio de la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de las partes aéreas (hojas, tallos) de *Hedyosmum* sp. conocida con el nombre de ‘Tarqui’ de la reserva natural Jacarón, ubicado en la provincia de Chimborazo-Ecuador, frente a cepas de interés clínico que contribuyan con el estudio de nuevos antibióticos naturales⁽¹⁾.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) 2018, mencionó que la Medicina Natural es la más inofensiva, de buena acción y además de bajo costo. La OMS, sostiene que se debe garantizar la inocuidad y la calidad de este tipo de fármacos que podrían ser eficaces en el tratamiento y prevención de primera línea, para patologías como diarreas, dolores de estómago, infecciones de la piel entre otras⁽²⁾.

La OMS en 2017, informó que el 80 % del total de población mundial utiliza la medicina natural o también llamada alternativa⁽³⁾. El uso de extractos de plantas es una opción viable a los fármacos (antibióticos) de venta comercial. En el planeta existe alrededor de 391000 especies de origen vegetal y de éstas un menor porcentaje se ha estudiado, de entre un 5 al 15 % obteniendo numerosas alternativas para el descubrimiento y desarrollo de nuevas propiedades antimicrobianas en extractos vegetales⁽⁴⁾.

En los últimos años se han realizado nuevas investigaciones encaminadas a buscar terapias antimicrobianas como opción alternativa a los tratamientos con antibióticos conocidos debido al alto índice de resistencia y multirresistencia que presentan los patógenos microbianos a nivel mundial. Este problema de salud pública involucra a todos los países y estamentos debido a su impacto en la salud, como en el costo-beneficio que implica atender estas patologías⁽⁵⁾.

La industria farmacéutica obtiene del reino vegetal la materia prima necesaria para la producción de casi el 30% de los productos farmacéuticos que se emplea la medicina moderna⁽⁶⁾. Se considera que más de 100000 metabolitos secundarios son producidos por las plantas, y anualmente se describen aproximadamente 1600 nuevas estructuras químicas obtenidas a partir del reino vegetal, de estas un gran porcentaje presentan actividad biológica. Así se muestra la necesidad de extender la búsqueda de nuevos compuestos químicos naturales que permitan dar tratamiento a diversas patologías⁽⁷⁾.

En el informe del Sistema Mundial de Vigilancia Antimicrobiana (GLASS) 2017, informa la presencia de multirresistencia a los antibióticos en 22 naciones y se prevé estaría afectando a unas 500000 personas al año. Entre los microorganismos que fueron notificados con mayor frecuencia están: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Salmonella* sp⁽⁸⁾.

A nivel de Latinoamérica el uso de medicina tradicional para el tratamiento de ciertas enfermedades no es un tema desconocido además, cada región tiene distintos medicamentos de origen natural, es importante el estudio de extractos vegetales porque ayuda y encamina al descubrimiento de nuevos antibióticos en especies endémicas que están consideradas en la medicina ancestral del Ecuador, así también puede contribuir al desarrollo de nuevos principios activos⁽⁹⁾.

En Ecuador las enfermedades infecciosas más frecuentes son las infecciones gastrointestinales con una tasa anual de 2978 casos, neumonía con 2524 casos, enfermedad isquémica del corazón con 1833 casos, bronquitis, enfisema y asma con 1489 casos, y tuberculosis con 1209 casos⁽¹⁰⁾.

En la provincia de Chimborazo-Ecuador las hojas del árbol de Tarqui (*Hedyosmum scabrum*) son utilizadas por los habitantes de la Parroquia Columbe como planta medicinal en el tratamiento de complicaciones como amigdalitis, úlceras estomacales y demás problemas digestivos⁽¹¹⁾.

La reserva natural Jacarón está ubicado en el cantón Colta, a 58 km de la ciudad de Riobamba, este bosque alberga 34 especies forestales nativas identificadas y 12 especies de fauna y avifauna, distribuidas en 123,22 hectáreas. Su altura fluctúa entre los 3160 y 36000 msnm, con temperatura promedio de 10°C y más del 90% de humedad⁽¹²⁾.

Los antibióticos son medicamentos utilizados para prevenir y dar tratamiento a diversas infecciones microbianas, la resistencia a estos se da cuando los microorganismos mutan como respuesta al mal uso de estos fármacos⁽¹³⁾. En los últimos años se ha evidenciado que existe un aumento de infecciones causadas por microorganismos resistentes, multirresistentes y en algunos casos panresistentes, que de no ser contrarrestado a tiempo puede llegar a comprometer la salud de futuras generaciones que hagan mal uso de los mismos⁽¹⁴⁾.

Los antibióticos han contribuido en gran medida al progreso en la medicina. Sin embargo, una amenaza progresiva deteriora la eficacia de estos fármacos, la resistencia microbiana a los antibióticos comunes, se define en esta investigación como la capacidad de un microorganismo para sobrevivir en concentraciones de antibiótico que inhiben a otros de la misma especie⁽¹⁵⁾.

Los hongos conforman un gran grupo de microorganismos, diverso y muy extenso, que incluye a los mohos, las setas y las levaduras. Se han estudiado aproximadamente 100000 especies de hongos y se estima que podrían existir hasta 1.5 millones. Algunos causan enfermedades en animales, incluyendo al hombre. Los hongos también pueden establecer asociaciones simbióticas con muchas plantas, participan además en la síntesis de antibióticos y procesos fermentativos con alta importancia económica para el hombre⁽¹⁶⁾.

La candidosis o candidiasis es una micosis producida por diversas especies de levaduras del género *Cándida*. Varios tejidos pueden ser afectados por lo que se presentan numerosos cuadros clínicos, todos asociados directamente al estado inmunológico del paciente. Las candidiasis de mucosas y piel son las más habituales, mientras que las sistémicas son de evolución aguda o crónica y generalmente presentan complicaciones severas⁽¹⁷⁾.

Ecuador se encuentra entre los 17 países con mayor diversidad a nivel mundial, alberga dos de los 24 hotspots o puntos calientes de biodiversidad, como son los Andes tropicales y el Chocó Darién ecuatoriano. Además existen diferentes factores que establecen la alta biodiversidad del Ecuador, entre ellos se mencionan: la confluencia de varias regiones biogeográficas como el Chocó, Tumbes, los Andes y la Amazonía que atraviesan el país de norte a sur, la variabilidad ambiental en cada una de estas zonas, así como el movimiento de la corriente fría de Humboldt y la cálida del Niño⁽¹⁸⁾.

En Ecuador se menciona 3118 especies vegetales que han sido utilizadas con propósitos medicinales, pertenecientes a 206 familias, siendo el 75% nativas y el 5% endémicas. Una de estas familias es la Chloranthaceae, dentro de esta se encuentra el género *Hedyosmum*, que incluye 40 especies distribuidas primordialmente en las montañas desde Centroamérica en el estado de Veracruz (México) hasta Sudamérica en países como Brasil y Paraguay; una especie se encuentra en el sureste de Asia. En el Ecuador se encontró 15 especies de *Hedyosmum*, de las cuales 12 de ellas están en los bosques andinos y subpáramos⁽¹⁹⁾.

Debido a que no se ha realizado diversos trabajos de investigación sobre la actividad antimicrobiana del género *Hedyosmum* sp. que crecen en Ecuador, se considera transcendental experimentar sobre este tema, con el propósito de establecer nuevas propiedades terapéuticas de dicho género.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, en esta investigación se formuló la siguiente pregunta: ¿Los extractos etanólicos de las partes aéreas del género *Hedyosmum* sp. del bosque natural Jacarón Chimborazo-Ecuador presentaron actividad antimicrobiana frente a cepas de interés clínico? Así este estudio puede significar el punto de partida para la identificación de compuestos con actividad antimicrobiana presentes en *Hedyosmum* sp. que serían fuente de nuevos fármacos (antimicrobianos) o la base estructural para el desarrollo y síntesis de principios activos útiles en el tratamiento de distintas enfermedades infecciosas a nivel local, regional y mundial.

OBJETIVOS

Objetivo General:

- Evaluar la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de las partes aéreas de *Hedyosmum* sp. del bosque natural Jacarón, provincia de Chimborazo frente a cepas microbianas de interés clínico.

Objetivos Específicos:

- Extraer metabolitos secundarios de: hojas y tallos de *Hedyosmum* sp. del bosque natural Jacarón provincia de Chimborazo, por medio de la técnica de extracción etanólica por maceración y rotaevaporación.
- Identificar la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de *Hedyosmum* sp. frente a microorganismos: *Cándida albicans*, *Cándida glabrata*, *Cándida krusei*, *Cándida tropicalis*, *Cándida parapsilosis*, *Serratia marcescens*, *Salmonella* sp. *Enterobacter* sp. mediante el método de Kirby Bauer.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), frente a los microorganismos en estudio mediante la determinación del efecto inhibitorio a diferentes concentraciones por el método de Kirby Bauer.

CAPÍTULO I.

MARCO TEÓRICO

Microorganismos Bacterianos

Las bacterias son células procariotas sin núcleo, que presentan una estructura sencilla en comparación con las células eucariotas; sus formas y tamaños son variados. Algunas bacterias presentan endosporas que las vuelven resistentes para sobrevivir en ambientes extremos en estado de reposo. Según su forma las bacterias pueden ser bacilos, cocos y espirilos ⁽²⁰⁾.

El tamaño puede oscilar desde las bacterias más pequeñas (nanobacterias), que presentan un diámetro menor a 0,2 Pm y de 0.2-0.3µm de longitud, mientras que las bacterias de mayor tamaño poseen un diámetro de 0.1-3µm y alrededor de 5-120 µm longitud (espiroquetas) ⁽²⁰⁾.

Las bacterias no presentan sistemas de membranas internas y en el citoplasma se localizan los cuerpos de inclusión, los ribosomas y el nucleoide con el material genético. Poseen una membrana plasmática y una pared celular que es química y morfológicamente compleja la cual contiene péptidoglicanos. Éstos capacitan a la bacteria para resistir la presión intracelular impidiendo que se origine una lisis osmótica, también las protege frente a sustancias tóxicas, por este motivo es el blanco de acción de varios antibióticos además permite adoptar una forma definida que se transmite de generación en generación ⁽²⁰⁾.

Estructura bacteriana

Las bacterias presentan componentes externos que se denominan como permanentes o constantes los cuales son: la membrana citoplasmática, pared celular y el citoplasma con todos sus elementos. De igual forma la clasificación bacteriana puede ser definida por la aplicación de una técnica denominada '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 presenta su membrana, y se encuentran: las bacterias Gram positivas y las Gram negativas ⁽²¹⁾.

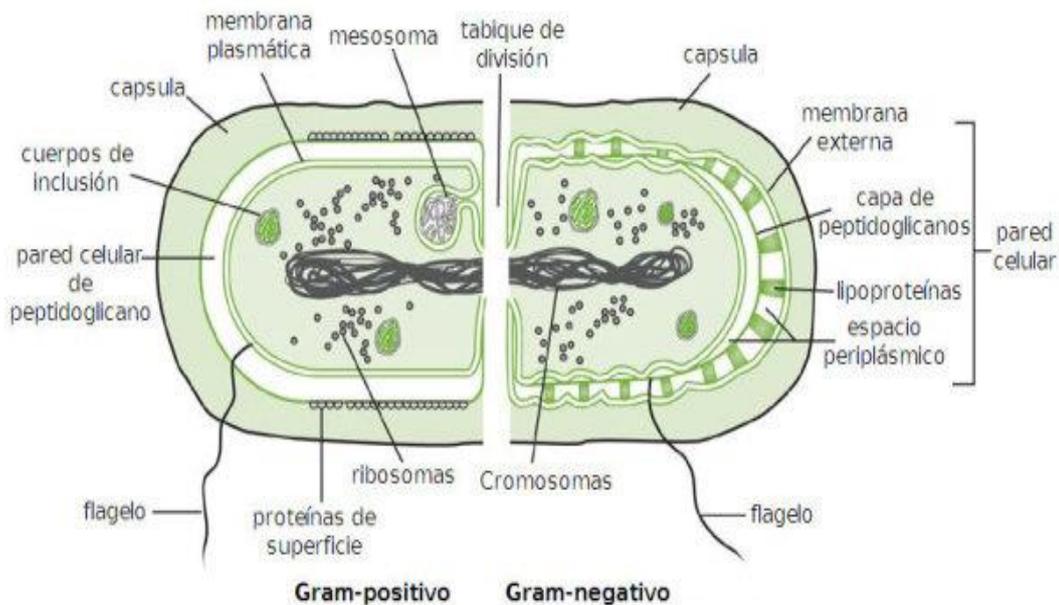


Figura 1. Estructura Bacteriana

Fuente: <http://biogeo.esy.es/BG2BTO/organizacioncelular.htm>

Infecciones bacterianas

Las infecciones bacterianas son un problema de salud pública a nivel mundial, que representan importantes costos tanto en lo económico como en el bienestar de las personas afectadas, la importancia de la prevención y el control en infecciones ocasionadas por bacterias multirresistentes y pan-resistentes se genera debido al mal uso de los antibióticos comerciales (automedicación) ⁽²²⁾.

La prevalencia de enfermedades infecciosas causadas por cepas bacterianas patógenas multirresistentes genera un serio problema de salud pública que se presenta a nivel mundial. Los microorganismos patógenos multirresistentes se han manifestado principalmente en los servicios de salud en consecuencia a varios factores tales como el amplio uso de antibióticos, las dosis utilizadas para el tratamiento, el tiempo de tratamiento, así también se presenta el alto riesgo de transmisión y contagio, además del estado inmunocomprometido que muestran algunos pacientes, entre otros ⁽²²⁾.

Las diversas alternativas de agentes antimicrobianos que se utiliza en las terapias para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por bacterias con resistencia múltiple se encuentran seriamente limitadas. Por tal motivo las principales compañías farmacéuticas se encuentran investigando principios activos de otras fuentes naturales que incluyen a las plantas y los animales ⁽²¹⁾.

***Salmonella* sp.**

El género *Salmonella* sp. pertenece a la familia Enterobacteriaceae, son bacilos gramnegativos, no formadores de esporas, anaerobios facultativos, provistos de flagelos y móviles. Crecen bien en los medios de cultivo habituales ⁽²³⁾.

La fiebre tifoidea es una enfermedad febril de origen entérico producida por la *Salmonella typhi*. En raras ocasiones *Salmonella* paratyphi A, paratyphi B (*Salmonella schottmuelleri*) y *Salmonella* paratyphica C (*Salmonella hirschfeldtii*) pueden producir un cuadro clínico similar, aunque de menor gravedad. Estas *Salmonellas* sólo afectan al ser humano ⁽²³⁾.

Las fuentes de infección suelen ser otros animales portadores infectados, pero también otros mamíferos, aves, roedores, insectos, el hombre, el agua o el alimento contaminado y el ambiente de granja. La principal puerta de entrada de la *Salmonella* es la vía oral, por contacto con heces de animales infectados. Es resistente al pH del estómago, sales biliares y peristaltismo, coloniza el intestino delgado. La *Salmonella* evade las defensas intracelulares de las células intestinales sin ser destruida y comienza a dividirse dentro de la célula. Posteriormente, pasa a la sangre y produce una infección sistémica, multiplicándose en macrófagos, y localizándose en hígado, bazo, médula ósea ⁽²⁴⁾.

***Serratia marcescens*.**

Serratia es un bacilo aerobio gramnegativo de la familia Enterobacteriaceae, que clásicamente había sido considerado una bacteria saprofita; sin embargo, en los últimos 60 años se ha convertido en un agente de gran relevancia clínica, responsable de brotes nosocomiales, provocando una gran diversidad de infecciones como: neumonía, infección de vías urinarias, infección de heridas quirúrgicas, meningitis, y sepsis. Se encuentra en la flora intestinal del hombre y los animales, en el medio ambiente y en reservorios como agua, cañerías, llaves, en insumos hospitalarios como jabones y antisépticos ⁽²⁵⁾.

***Enterobacter* sp.**

Las bacterias del género *Enterobacter* son bacilos gramnegativos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, ampliamente distribuidos en la naturaleza. Se les puede encontrar en el suelo, agua y como parte de la microbiota de animales, insectos y tracto gastrointestinal humano, incluye 21 especies ⁽²⁶⁾.

Microorganismos Micóticos

Los hongos constituyen un numeroso grupo de organismos, diverso y variado, que incluye a los mohos, las setas y las levaduras. Algunos son causantes de enfermedades en animales, incluyendo al hombre. Se agrupan filogenéticamente separados de otros organismos, estando más íntimamente relacionados con los animales ⁽¹⁶⁾.

Infecciones Micóticas

Las infecciones producidas por hongos se denominan micosis; la mayor parte de los hongos patógenos son exógenos; las de mayor incidencia son conocidas como candidiasis y dermatofitosis, son causadas por hongos que forman parte de la flora microbiana normal o están muy adaptados para sobrevivir en el huésped humano. Estas enfermedades pueden clasificarse: por conveniencia, superficiales, cutáneas, subcutáneas y sistémicas ⁽²⁷⁾. Para determinar estudios de la actividad biológica sobre hongos se siguen protocolos estandarizados por la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ⁽²⁸⁾.

Cándida sp.

Son levaduras mitospóricas alargadas o ligeramente redondas de 2-6 μm de diámetro 3-9 μm de longitud que se reproducen por gemación (blastoconidios). A excepción de *C. glabrata*, el resto de las especies asociadas a candidosis pueden formar pseudomicelios; *C. albicans* y *C. dubliniensis* además son formadoras de hifas ⁽¹⁷⁾.

Especies de <i>Cándida</i> asociadas patógenas	
Especie	Frecuencia
<i>C. albicans</i>	50%
<i>C. tropicalis</i>	15-30%
<i>C. parapsilosis</i>	15-30%
<i>C. glabrata</i>	15-30%
<i>C. krusei</i>	~1%
<i>C. guilliermondii</i>	~1%
<i>C. lusitaniae</i>	~1%
<i>C. dubliniensis</i>	~1%

Figura 2. Frecuencia de especies de *Cándida* patógenas

Fuente: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/candidosis.html>

Generalidades de los antibióticos

Son moléculas naturales (producida por un organismo vivo, hongo o bacteria), sintéticas o semisintéticas, capaz de producir la muerte o la detención del crecimiento de bacterias, virus u hongos. En la gran industria farmacéutica no se utiliza gran variedad de principios activos de origen natural, por lo cual se establece mayor diferenciación con quimioterápicos, término usado para referirse a las moléculas de origen sintético y sus derivados ⁽²⁹⁾.

Los antibióticos establecen un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, ejercen una acción determinada sobre alguna estructura o función del microorganismo, tienen elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones. El objetivo de la antibioticoterapia es controlar y disminuir el número de microorganismos posibles, trabajando en conjunto con el sistema inmunológico en la eliminación de los mismos ⁽²⁹⁾.

Clasificación de acuerdo a la interacción germen-antibiótico

- **Bactericidas:** su acción es letal, matan a los microorganismos sin necesidad de destruirlos o lizarlos.
- **Bacteriostáticos:** a las concentraciones que alcanzan en el suero o tejidos impiden el desarrollo y multiplicación bacteriana, pero sin llegar a destruirlas.
- **Bacteriolíticos:** matan a los microorganismos por lisis de su membrana ⁽²⁹⁾.

Clasificación según el espectro de acción

- **Antibióticos de espectro amplio:** son aquellos antibióticos que son activos sobre un amplio número de especies y géneros (aminoglucósidos y carbapenemes)
- **Antibióticos de espectro reducido:** son antibióticos que actúan sobre un grupo reducido y específico de especies (penicilinas) ⁽²⁹⁾.

Clasificación según el mecanismo de acción

Existe una amplia variedad de familias y grupos de antimicrobianos de interés clínico. Los mecanismos por los que los compuestos con actividad antimicrobiana inhiben el crecimiento o causan la muerte de las bacterias u hongos son muy variados y dependen de las dianas afectadas como la pared celular, membrana plasmática, proteínas y ácidos nucleicos ⁽³⁰⁾.

- **Inhibición de la síntesis de la pared celular**

Actúan a distintos niveles de la biosíntesis del peptidoglucano, capa vital para la supervivencia bacteriana, el deterioro se produce por la pérdida de rigidez y estabilidad de la célula, que puede provocar la muerte; por lo tanto, son considerados como agentes bactericidas. La síntesis del peptidoglucano se da en tres etapas y los antimicrobianos pueden afectar en cada una de ellas. Los representantes de este grupo son las cefalosporinas ⁽³⁰⁾.

- **Daño a nivel de la membrana citoplasmática**

Numerosos agentes catiónicos y aniónicos pueden producir la desorganización de la membrana. Dentro de los antibióticos que actúan a este nivel, está la polimixina B y la colistina, inhiben bacterias que tienen lípidos de carga negativa en su superficie. Su acción es desorganizar la permeabilidad de la membrana ocasionando la salida de cationes ⁽³⁰⁾.

- **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 mensajero) (ARNm) ⁽³⁰⁾.

- **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 los compuestos. Los aminoglucósidos (estreptomicina, neomicina, amikacina, tobramicina, gentamicina, espectinomina, paromomicina), son azúcares complejos obtenidos de varias especies de *Streptomyces* e interfieren con la función ribosomal bacteriana, con la subunidad 30S ⁽³⁰⁾.

- **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 ⁽³⁰⁾.

Mecanismos de resistencia a los antibióticos

Una complicación que se muestra en el tratamiento de enfermedades infecciosas es la resistencia a los antibióticos, esta se define como la capacidad adquirida de un organismo para resistir los efectos de un agente quimioterapéutico al que es sensible habitualmente ⁽¹⁶⁾. Ésta es ocasionada por mutaciones en el cromosoma bacteriano, plásmidos o transposones que pueden transferir determinada resistencia a diversas especies de microorganismos más rápido que los nuevos fármacos que se desarrollan para contrarrestarlos ⁽³¹⁾.

1. Modificación enzimática del antibiótico: las bacterias expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que éste pierda su funcionalidad. Las β -lactamasas son las más prevalentes. Son proteínas capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico que poseen los antibióticos de esta familia. De igual forma, las enzimas modificadoras de los aminoglucósidos son capaces de modificar estos antibióticos mediante reacciones de acetilación, adenilación y fosforilación ⁽³²⁾.

2. Bombas de salida: operan tomando el antibiótico del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior, con lo cual evitan que llegue a su sitio de acción. Este mecanismo es comúnmente utilizado por las bacterias gramnegativas ⁽³²⁾.

3. Cambios en la permeabilidad de la membrana externa: las bacterias pueden producir cambios de la bicapa lipídica, aunque la permeabilidad de la membrana se ve alterada, principalmente, por cambios en las porinas. Los cambios pueden generar que la membrana externa no permita el paso de estos agentes al espacio periplásmico ⁽³²⁾.

4. Alteraciones del sitio de acción: las bacterias pueden alterar el sitio donde el antibiótico se une a la bacteria para interrumpir una función vital de ésta. Este mecanismo es, principalmente, utilizado por las bacterias grampositivas, las cuales realizan cambios estructurales en los sitios de acción de los antibióticos β -lactámicos a nivel de las proteínas unidoras de penicilinas ⁽³²⁾.



Figura 3. Estrategia de resistencia Bacteriana

Fuente: <https://sites.google.com/site/resistencia-bacterianaajao/4-contenidos/b-resistencia-bacteriana>.

Métodos para la determinación de actividad antimicrobiana

El método de dilución en agar: es utilizado generalmente para establecer si el antibiótico es letal contra un organismo, además se usa con microorganismos aeróbicos y anaeróbicos, con la velocidad variable de evolución. Para esta técnica se disponen diferentes diluciones de los antibióticos en estudio, posteriormente se añaden a los agares, estos son puestos en cajas Petri para su solidificación, finalmente los microorganismos en prueba previamente diluidos son inoculados en los agares e incubados a su temperatura y tiempos óptimos⁽³³⁾.

Dilución y microdilución en caldo: este método es seriado y se lleva a cabo en tubos o micropocillos con medios líquidos, cada uno contiene concentraciones crecientes es decir una serie de diluciones de antibiótico diluido en el caldo en el cual se inocula un número definido de células microbianas, y se mide su densidad óptica⁽³³⁾.

Método de difusión en agar: es el más utilizado para la determinación de actividad antimicrobiana, este tiene dos formas para la identificación. La primera es el agar solidificado se inocula con la suspensión requerida en microorganismos aeróbicos y un papel filtro es impregnado con la solución de concentración conocida del antibiótico y sus diluciones el cual se coloca en una superficie del agar y la segunda se perfora el agar solidificado⁽³³⁾.

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La Concentración Mínima Inhibidora (CMI) 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 ⁽³⁴⁾.

Extractos etanólicos

Son extracto de olor característico, que se obtiene a partir de materia prima desecada de origen vegetal, estos se pueden extraer por maceración o percolación en contacto con etanol, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico. Estos procesos pueden ser sometidos a determinados tratamientos de refinamiento para eliminar algunos de sus componentes y así mejorar notablemente la calidad del producto deseado. Las técnicas que generalmente se utilizan para la obtención de los extractos etanólicos son:

Maceración: Es una extracción que se realiza a temperatura ambiente que consiste en remojar el material vegetal, debidamente triturado en un solvente (agua o etanol) hasta que éste penetre y disuelva las porciones solubles. Se puede utilizar cualquier recipiente con tapa que no interfiera con el solvente; en éste se colocan el material vegetal con el disolvente y tapado se deja en reposo por un período de 2 a 14 días con agitación esporádica. Luego se filtra el líquido, se recupera el solvente mediante la técnica de rotavaporación ⁽³⁵⁾.

Percolación: La percolación es el procedimiento más utilizado para la preparación extractos fluidos. El percolador es un recipiente cónico con una abertura superior en la cual se puede colocar una tapa circular perforada que permite el paso del líquido y somete a una ligera presión a los materiales colocados en él. Por la parte inferior posee un cierre regulable para permitir el paso del líquido a una velocidad conveniente, se deja en reposo por un tiempo aproximado de 24 horas ⁽³⁶⁾.

Propiedades biológicas de las plantas

Los metabolitos secundarios de las plantas, poseen numerosas propiedades farmacológicas como: propiedad antimicrobiana, antimutagénico, antiviral, antimicótica, antioxidante, antiparasitaria e insecticida, además son utilizados en el tratamiento de forúnculos del acné, candidiasis vaginal, para evitar la formación de placa dental y presentan la habilidad de promover la cicatrización ⁽³⁷⁾.

Antecedentes históricos plantas medicinales

Murakami *et al.* 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 *et al.* Refiere que *Hedyosmum bonplandianum* se usa en medicina tradicional como infusión para aliviar el dolor (analgésico) y como febrífugo.

Zamora *et al.* Demuestra que algunos géneros (especialmente *Chloranthus* y *Hedyosmum*) se utilizan para fines medicinales como estimulantes, antifúngicas, y antidiarreicas, como alimentarios en bebidas tonificantes y saborizante de licores. Estos autores reportaron la composición química del aceite esencial (AE) de hojas de *Hedyosmum translucidum*.

Torres *et al.* 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.

Zaruma J. Expresa en su tesis sobre la actividad antibacteriana de *Hedyosmum strigosum*, que se obtuvo resultados positivos, en los cuales los extractos hexánicos y de acetato de etilo presentaron actividad antibacteriana contra microorganismos patógenos como *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*.

Familia Chloranthaceae

Esta familia compone uno de los linajes más antiguos de angiospermas, se distribuye en 75 especies, las plantas de esta familia son reconocidas 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⁽⁴²⁾.

Se caracteriza por ser árboles o arbustos, tallos nudosos, fuertemente aromático. Hojas simples, opuestas, margen aserrado, unidas por las bases de sus pecíolos en una vaina estipular, a menudo con apéndices lineares⁽⁴³⁾.

Género *Hedyosmum*

El género *Hedyosmum*, 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, son dentadas, pecioladas y poseen numerosos caracteres taxonómicos. Son árboles dioicos, unos árboles con flores masculinas y con flores femeninas ⁽⁴⁴⁾. Una especie de este género se encontró en el bosque Jacarón Chimborazo.

Especies del género *Hedyosmum*

El género *Hedyosmum* consta de 40 especies distribuidas principalmente en las montañas desde el estado de Veracruz (México) hasta el Brasil y Paraguay; una especie se encuentra en el sureste de Asia. En el Ecuador están representadas 15 especies, de las cuales 12 se encuentran en los bosques andinos y subpáramos: *Hedyosmum anisodorum* Todzia, *H. cuatrecazanum* Occh., *H. cumbalense* Karsten, *H. goudotianum* Solms-Laub., *H. luteynii* Todzia, *H. purpurascens* Todzia, *H. racemosum* G. Don, *H. scabrum*, Solms-Laub., *H. spectabile* Todzia, *H. sprucei* Solms-Laub., *H. strigosum* Todzia y *H. translucidum* ⁽⁴⁴⁾.

Taxonomía del género *Hedyosmum*

REINO	Plantae
FILO	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
ORDEN	Chloranthales
FAMILIA	Chloranthaceae
GENERO	<i>Hedyosmum</i>
ESPECIE	<i>Hedyosmum</i> sp

Figura 4. Taxonomía del género *Hedyosmum* sp.

Fuente: <https://docplayer.es/82150061-Universidad-tecnica-particular-de-loja-area-biologica.html>

CAPÍTULO II.

METODOLOGÍA

Tipo de investigación:

- **Según el Nivel: Investigación Exploratoria**, se realiza para conocer el contexto sobre un tema que es objeto de estudio. Su objetivo es encontrar todas las pruebas relacionadas con el fenómeno del que no se tiene ningún conocimiento y aumentar la posibilidad de realizar una investigación completa.
- **Investigación Descriptiva**, se recolectó información descrita en la literatura científica acerca del uso tradicional, las propiedades biológicas y se detallará el procedimiento utilizado para el análisis de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de *Hedyosmum* sp.
- **Diseño cuasi experimental**: se modificó la variable independiente ya que se realizaron ensayos utilizando distintas concentraciones de los metabolitos que contiene el extracto etanólico de *Hedyosmum* sp. para evaluar su efecto sobre la variable dependiente, en este caso las cepas de bacterias utilizadas además, se aplicó controles positivos y negativos.
- **Cohorte transversal**: La presente investigación se realizó en un período de tiempo determinado entre Abril – Agosto 2019, en un lugar específico, es decir que no se encuentra sujeto a cambios de tiempo ni lugar.
- **Enfoque Mixto**: ya que se recolectó datos relacionados con la investigación, análisis de datos tanto cualitativos (observación de la inhibición mediante los halos de crecimiento) como cuantitativos (medición de los halos de inhibición) dando respuesta al planteamiento del problema.

Población y muestra

- **Población**: la presente investigación estuvo representada por plantas que pertenecen al género *Hedyosmum* sp. obtenidas en el bosque natural Jacarón.
- **Muestra**: estuvo formada por hojas y tallos de los que se obtuvieron los extractos etanólicos a partir de plantas pertenecientes al género *Hedyosmum* sp.

Variables de estudio

Variable independiente: Diluciones a diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Hedyosmum* sp.

Variable dependiente: actividad antimicrobiana frente a cepas micóticas de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y cepas bacterianas de *Serratia marcescens*, *Salmonella* sp., *Enterobacter* sp.

Métodos de estudio:

Método Teórico: fue un estudio Inductivo que parte de lo particular a lo general, es decir, de la observación para proyectar una teoría.

Técnicas y procedimientos:

Técnicas: observación directa.

Instrumentos: guía de observación, cámara fotográfica.

Material y métodos

- **Materiales:** lápiz graso, asas de platino, micropipetas variables automáticas, puntas amarillas y azules, pipetas de Pasteur, mechero de bunsen, probeta de 250, 500, 1000 mL, Erlenmeyer de 500 y 1000 mL, vasos de precipitación de 100 y 200 mL, hisopos estériles, tubos de tapa rosca 16 x 150, tubos Eppendorf, cajas mono Petri de plástico estériles, cinta adhesiva, discos de antibióticos comerciales, discos en blanco. (Anexo 1)
- **Equipos:** cámara de flujo laminar (marca HFsafe 900), incubadora (marca Memmert), autoclave (marca Tuttnauer), refrigeradora, balanza analítica (marca Adam Equipment), plancha de calentamiento, vortex (marca BenchMixer™), computador portátil, cámara fotográfica (Anexo 1).
- **Solventes:** agua destilada, suero fisiológico al 0.9% estéril, Dimetilsulfóxido (DMSO)
- **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. A continuación se muestra los medios empleados: agar tripticasa soya (TSA), agar nutritivo (AN), agar Mueller Hilton (AMH), agar Mueller Hilton suplementado con Glucosa.

Muestras biológicas

- Los microorganismos fueron donados por el cepario de la Universidad Católica de Cuenca, de la Carrera de Bioquímica y Farmacia: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *Serratia marcescens*, *Salmonella* sp. y *Enterobacter* sp.
- Extracto etanólico de Hojas y Ramas de *Hedyosmum* sp, especie proveniente del bosque natural Jacarón Chimborazo (Anexo 2).

Procedimiento

Se inició con la recolección, pesaje y extracción del material vegetal en estudio por el método de extracción etanólica por maceración y rotavaporación, seguido del pesaje del material obtenido (extracto) y almacenamiento de la muestra. Luego se realizó las diferentes diluciones a varias concentraciones del extracto etanólico, y se estudió la actividad antimicrobiana, lectura e interpretación de la técnica de difusión en disco.

Extracción etanólica por maceración

Se dejó secar el material vegetal para luego ser triturado, se colocó este material dentro de un embudo agregando alcohol etílico en un volumen mayor al material vegetal y se dejó reposar por 24h.

Se filtró el líquido y se lo colocó en un rotavapor el cual por acción de la temperatura se encargara de separar la sustancia extractora de los metabolitos que estén presentes en la planta y fueron estudiados (Anexo 2).

Preparación de la solución madre del Extracto etanólico y diluciones

El extracto etanólico se disolvió en Dimetil sulfoxido (DMSO) a una concentración inicial de 1000000 µg/mL. Para lo cual se pesó 1 gramo de extracto etanólico y se agregó 1 mililitro de DMSO. A partir de esta solución concentrada se realizaron varias diluciones seriadas en

tubos Eppendorf preparadas a las concentraciones de 250000, 125000, 62500, 31250, 15625, 7812 µg/mL previo a la realización de los ensayos (Anexo 3).

Preparación del preinóculo

La preparación del preinóculo consistió en la siembra por el método de agotamiento de una a dos colonias de los distintos microorganismos en estudio, en agar Trypticase soya (TSA) se sembró las bacterias *Serratia marcescens*, *Salmonella* sp. y *Enterobacter* sp. Mientras que en agar Sabouraud se sembró las especies micóticas de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*. Posteriormente el preinóculo se incubó a 37°C durante 18- 24 horas (Anexo 4).

Preparación del inóculo

La preparación del inóculo se realizó a partir del preinóculo (crecimiento en medio sólido tras 18-24 h de incubación) realizando una suspensión en solución salina 0.9% de cada una de las cepas bacterianas que ajustaron 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 bacterianas establecido en el CLSI.

Las candidas se ajustaron al patrón de McFarland 1 (densidad celular aproximada de 3×10^8 UFC/mL) que se utiliza como patrón de turbidez en la preparación de suspensiones de levaduras (Anexo 4).

Siembra en placas con Agar Mueller Hinton (AMH)

Posteriormente, con un hisopo estéril impregnado en la solución bacteriana preparada y eliminado el exceso contra las paredes del tubo se sembraron placas monopetri con AMH empleando la técnica de tres giros, pasando el hisopo por toda la superficie de la placa de dos a tres veces antes de efectuar cada giro, para distribuir uniformemente el inóculo y ulterior poder interpretar los resultados de mejor forma.

Las especies micóticas de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*. fueron sembradas en Agar Mueller Hinton suplementadas con glucosa al 2% más azul de metileno, medio óptimo para el crecimiento de levaduras.

Ensayo microbiológico: antibiograma

Una vez sembradas todas las placas con cada microorganismo a estudiar se colocaron los discos de papel filtro de manera equidistante, los cuales fueron impregnados con aproximadamente 15 μ L de los extractos a las diferentes concentraciones. Todos los ensayos se realizaron por duplicado teniendo como controles positivos los antibióticos Amikacina para *Serratia marcescens*, *Salmonella* sp. y *Enterobacter* sp. mientras que para las especies de *Cándidas* se utilizó Fluconazol. Como control negativo se empleó un disco impregnado con DMSO. Las placas se refrigeraron durante dos horas a 4 °C y luego se incubaron en estufa a 37 °C durante 24 horas, para finalmente realizar el análisis de susceptibilidad microbiana mediante la observación y medición de los halos de inhibición expresado en milímetros (mm) (Anexo 5).

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

La determinación de la CMI consistió en la menor concentración a la cual los extractos presentaron actividad antimicrobiana partiendo de la concentración inicial de 1000000 μ g/mL frente a cada uno de los microorganismos en estudio. Los cuadros con los datos de CMI obtenidos fueron realizados con el programa de procesamiento de datos Excel 2013 (Anexo 6 y 7).

Procesamiento estadístico

Se realizó cuadros descriptivos de los resultados obtenidos con media y desviación estándar mediante la aplicación de hojas de cálculo aplicando el programa estadístico Excel 2013 para base estadística de la investigación.

Consideraciones éticas.

Este proyecto de investigación cuenta con los permisos emitidos por el ministerio de Ambiente para trabajar con Flora silvestre protegida, la misma que se encuentra en el bosque natural Jacarón en la provincia de Chimborazo – Ecuador.

CAPÍTULO III.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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

A partir de 200 g de ramas secas de *Hedyosmum* sp, utilizando la técnica de extracción etanólica por maceración y recuperado el solvente mediante la técnica de evaporación rotatoria con en el equipo conocido como rotavapor se aisló 2,557 g de extracto etanólico de ramas teniendo un rendimiento de 1,27 %.

Otro estudio similar realizado por Valarezo ⁽⁴⁵⁾ sobre la Actividad antimicrobiana de extractos hexánicos de ramas de *Hedyosmum* sp. demuestra un rendimiento menor que el obtenido en la presente investigación. Partiendo de 200 g de material vegetal de *Hedyosmum* sp. se obtuvo 1,824 g de extracto hexánico con un rendimiento de 0,90 %.

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

Esta investigación tiene resultados similares a los reportados por Solano ⁽⁴⁶⁾ quien en su ensayo sobre actividad antibacteriana del extracto etanólico de las flores de *Hedyosmum strigosmum*, obtuvo un peso de 9,640 g partiendo de 500 g de flores secas, teniendo un rendimiento de 1,93 %.

Actividad antimicrobiana de Extracto etanólico

El efecto inhibitor del extracto etanólico sobre el crecimiento de cepas microbianas gramnegativas y cepas micóticas de interés clínico fue evaluado mediante el método de difusión en disco o Kirby Bauer, los resultados obtenidos en esta investigación se expresan en los cuadros (1 y 2), los cuales fueron realizados a partir de las mediciones de los diámetros de los halos de inhibición en milímetros (mm), así como la determinación de la CMI se obtuvo mediante el análisis de los resultados que arrojaron las pruebas de susceptibilidad ejecutadas a diferentes concentraciones del extracto etanólico (250000, 125000, 62500, 31250, 15625 µg/mL).

La actividad antibacteriana de extracto etanólico de *Hedyosmum* sp. frente a bacterias gramnegativas: *Serratia marcescens*, *Salmonella* sp. y *Enterobacter* sp. se muestra en los cuadros (1 y 2), observándose que el extracto de mayor concentración (1000000 µg/mL) mostró menor halo de inhibición que el resto de las concentraciones estudiadas, resultados que no son los esperados, debido a que a mayor concentración debería obtenerse mayor halo de inhibición, sin embargo estos resultados puede deberse a la alta viscosidad del extracto etanólico vegetal y poca difusión de sus principios activos en el medio de cultivo, evidenciando que al ser diluido el extracto con el DMSO, disminuye su concentración pero también disminuye su viscosidad y mejor difusión de sus componentes, obteniéndose halos de inhibición de hasta 15 y 14 milímetros (mm) en *Serratia marcescens* y *Enterobacter* sp., respectivamente. Este inconveniente se podría evitar realizando la actividad antimicrobiana por el método de microdilución, debido a que el extracto estaría en contacto directo con los microorganismos y ejerciendo su acción, evitando de esta manera la difusión de los mismos. La CMI aproximada en *Serratia marcescens* y *Enterobacter* sp., fue de 31250 µg/mL en las dos especies, la desviación estándar promedio fue mínima de 0,5, lo cual se debe a la precisión con la que se realizó los ensayos (Cuadro 1). Resultados similares se obtuvieron con extracto etanólico proveniente de hojas, que presentaron halos de inhibición de hasta 13 y 15 milímetros (mm) correspondiente a *Enterobacter* sp. y *Serratia marcescens*, obteniendo una CMI aproximada de 31250 µg/mL, de igual forma la desviación estándar no superó de 0,81 (Cuadro 2). Mientras que el extracto etanólico estudiado no mostró actividad antibacteriana frente *Salmonella* sp. a ninguna concentración.

Los resultados obtenidos en este estudio que expresan una mayor sensibilidad de las bacterias gramnegativas coinciden con los reportados por Collaguazo ⁽⁴⁷⁾ quien en su investigación de Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Hedyosmum* sp. muestra que el género *Hedyosmum* sp. presenta resultados positivos de actividad antibacteriana, frente a cepas gramnegativas *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Su CMI fue de 500000 y 250000 µg/mL respectivamente.

Estudios realizados por Rojas ⁽⁴⁸⁾ sobre actividad antibacteriana de *Salmonella* sp. *Serratia marcescens* y *Enterobacter* sp. entre otras, muestran la efectividad de la actividad biológica del extracto etanólico la especie *Melinis minutiflora* del Phylum: Magnoliophyta, con el cual se presentó sensibilidad bacteriana en las cepas mencionadas. Su CMI fue de 500000 µg/mL *Salmonella* sp., 500000 µg/mL *Serratia marcescens* y 62500 µg/mL *Enterobacter* sp.

Cuadro 1. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de ramas de *Hedyosmum* sp. expresado por los halos de inhibición en milímetros (mm) con su respectivo valor de CMI, $\bar{X} \pm SD$ frente a las bacterias: *Serratia marcescens*, *Salmonella* sp., *Enterobacter* sp.

Bacterias	Extracto Etanólico de Ramas					Control positivo Amikacina (25 µg)	Control negativo DMSO	CMI µg/mL
	Concentraciones (µg/mL)							
	250000	125000	62500	31250	15625			
	Halos de inhibición (mm) $(\bar{X} \pm SD)$							
<i>Serratia marcescens</i>	10 (9.5±0.5)	14 (13.7±0.5)	14 (13.7±0.5)	14 (13.7±0.5)	0	21	0	31250
<i>Salmonella</i> sp.	0	0	0	0	0	20	0	-
<i>Enterobacter</i> sp.	10 (9.5±0.5)	13 (13.2±0.5)	14 (13.7±0.5)	15 (14.5±0.5)	0	21	0	31250

Cuadro 2. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de Hojas de *Hedyosmum* sp. expresado por los halos de inhibición en milímetros (mm) con su respectivo valor de CMI, $\bar{X} \pm SD$ frente a las bacterias: *Serratia marcescens*, *Salmonella* sp., *Enterobacter* sp.

Bacterias	Extracto Etanólico de Hojas					Control positivo Amikacina (25 µg)	Control negativo DMSO	CMI µg/mL
	Concentraciones (µg/mL)							
	250000	125000	62500	31250	15625			
	Halos de inhibición (mm) $(\bar{X} \pm SD)$							
<i>Serratia marcescens</i>	12 (12±0.81)	15 (14.5±0.5)	16 (16±0.81)	15 (14.5±0.5)	0	21	0	31250
<i>Salmonella</i> sp.	0	0	0	0	0	20	0	-
<i>Enterobacter</i> sp.	9 (8.7±0.5)	10 (9.5±0.5)	15 (14.5±0.5)	13 (13.2±0.5)	0	21	0	31250

De igual forma Torres *et al.* ⁽¹⁾ en su investigación sobre la actividad antibacteriana de extractos hexánicos de tallos y hojas de *Hedyosmum scabrum*, reportaron una inhibición del crecimiento de los microorganismos *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*, lo cual muestra que existe una mayor sensibilidad por parte de las bacterias gramnegativas a este tipo de extracto.

Por otro lado, la actividad antimicótica del extracto etanólico de *Hedyosmum* sp. frente a especies de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*, mostró que el extracto resultó ser inactivo para las cepas de cándidas estudiadas evidenciándose que no existe actividad antimicótica por parte del extracto etanólico en este tipo de microorganismos levaduriformes.

Estudios de Morales *et al.* ⁽⁴⁹⁾ sobre actividad antimicótica de aceite esencial de romero demostró ser sensible in vitro a las concentraciones de 50000 y 100000 µg/mL. Este aceite presenta, además, un amplio espectro de acción antibacteriana, tanto sobre bacterias grampositivas como gramnegativas, aunque a diferentes concentraciones, posiblemente debido a la menor complejidad de los componentes de la pared celular de las bacterias, como son peptidoglucanos y fosfolípidos, y a través de los diversos componentes de los aceites esenciales.

Otro ensayo de actividad biológica realizado por Condori *et al.* ⁽⁵⁰⁾ sobre la evaluación de la actividad antimicótica de los aceites esenciales de plantas aromáticas, muestra que la especie vegetal *Pinus radiata* (Pino) inhibe el crecimiento a 5000 µg/mL sobre la especie micótica *Trichophyton rubrum*. Por otro lado, las especies vegetales *Aloysia triphylla* (Cedrón) y *Rosmarinus officinalis* (Romero) lograron inhibir el crecimiento con una concentración mínima inhibitoria aproximada de 10000 µg/mL sobre las especies de *Cándida albicans* y *Microsporum canis*. La diferencia en las concentraciones mostradas se debió a que estos hongos presentan mayor crecimiento, resistencia y tiempo de vida. Estos resultados concuerdan con la presente investigación realizada con especies de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*, las cuales no presentaron actividad antimicótica a las concentraciones estudiadas.

CONCLUSIONES

1. Se aisló 2.55 g de extracto etanólico a partir de 200 g de ramas trituradas de la especie vegetal *Hedyosmum* sp. del bosque natural Jacarón mediante el método de extracción etanólica por maceración y recuperado el solvente mediante la técnica de evaporación rotatoria, lo cual representó un rendimiento de 1.27 %. Así mismo se aisló 3.144 g de extracto etanólico a partir de 200 g de hojas que representó un rendimiento de 1.57 %
2. Los ensayos de actividad antimicrobiana empleando el método de Kirby Bauer frente a cepas bacterianas: *Serratia marcescens*, *Salmonella* sp., *Enterobacter* sp. y cepas micóticas: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, mostraron que el extracto etanólico tuvo actividad antimicrobiana únicamente frente a las especies gramnegativas *Serratia marcescens* y *Enterobacter* sp. no así frente a las especies del género de *Cándida*.
3. Los análisis de las CMI del extracto etanólico de *Hedyosmum* sp. realizados en los ensayos de actividad antimicrobiana frente a cada especie bacteriana y micótica en estudio, utilizando diluciones seriadas del extracto a diferente concentración (250000, 125000, 62500, 31.250, 15625, 7812µg/mL) confirmaron una mejor actividad biológica frente a *Serratia marcescens* y *Enterobacter* sp. ya que la CMI fue de 31250 µg/mL en las dos especies.

RECOMENDACIONES

1. Para una mayor confiabilidad de los resultados realizar ensayos sobre actividad antimicrobiana por otros métodos de sensibilidad como por ejemplo el método de micro dilución, de esta manera se evitaría el inconveniente de la difusión de los principios activos en el medio de cultivo.
2. La conservación de los extractos etanólicos extraídos de distintas partes de las especies vegetales se debe realizar guardándolos en frascos ámbar bien sellados y en refrigeración (menor a 4°C) para evitar la evaporación de compuestos que podrían ser bioactivos, ya que son mezclas volátiles.
3. En vista que los extractos etanólicos de *Hedyosmun* sp, mostro ser activo frente a bacterias Gram negativas y existen reportes sobre otras especies bacterianas, se debería seguir realizando nuevas investigaciones de otras actividades biológicas como la actividad antioxidante, actividad antimicótica, actividad anticancerígena, actividad anticoagulante entre otras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Torres Rodríguez SH, García VJ, Lucena ME, Araujo Baptista L, Tovar Torres MC. Composición química del aceite esencial de las hojas de *Hedyosmum luteynii* Todzia. *Peruana de Biología*. 2018; 25(2): p. 173-178.
2. Soria N. Las Plantas Medicinales y su aplicación en la Salud Pública. *Revista Salud Pública Paraguay*. 2018; 7 - 8(8).
3. Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antimicrobianos. [Online].; 2017 [cited 2019 Mayo. Available from: <http://origin.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>.
4. Darbyshire D, Halski B, Williams J, Clubbe D, McCarthy B. *stateoftheworldsplants*. [Online].; 2017 [cited 2019 Mayo. Available from: https://stateoftheworldsplants.org/2017/report/SOTWP_2017.pdf.
5. Ramirez L, Castillo A, Vargas A. Evaluación del potencial antibacterial in vitro de *Croton lechleri* frente a aislamientos bacterianos de pacientes con úlceras cutáneas. *Revista NOVA*. 2013; 11(19): p. 51-53.
6. Zuluaga G. *Wanamey*. [Online].; 2017 [cited 2019 Mayo. Available from: <https://wanamey.org/plantas-medicinales/plantas-medicinales-mundo.htm>.
7. Paredes M. Composición química y actividad antimicrobiana de *Hedyosmum purpurascens* (Chloranthaceae) de la provincia de Loja. Tesis de grado. Loja: Universidad Técnica de Loja, Loja; 2013.
8. World Health Organization. Médicos y pacientes. [Online].; 2017 [cited 2019 Mayo. Available from: <http://www.medicosypacientes.com/sites/default/files/9789241513449-eng.pdf>.
9. 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. *SciELO*. 2017; 78(3).

10. Mayorga D. Scribd. [Online].; 2019 [cited 2019 Mayo. Available from: <https://es.scribd.com/doc/52492103/ENFERMEDADES-INFECIOSAS-COMUNES-EN-EL-ECUADOR>.
11. Torres A, Barbaru A, Lema M. Análisis Fitoquímico de un extracto. ESPECIE FORESTAL NATIVA. 2016; 2(3).
12. El diariode riobamba. “JACARÓN”, UNA DE LAS ÚLTIMAS RESERVAS DE BOSQUE ANDINO EN CHIMBORAZO. [Online].; 2018 [cited 2019 Septiembre. Available from: <http://eldiarioderiobamba.com/2018/04/23/jacaron-una-de-las-ultimas-reservas-de-bosque-andino-en-chimborazo/>.
13. Organización Mundial de la Salud. OMS. [Online].; 2018 [cited 2019 Mayo. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/resistencia%20a-los-antibi%C3%B3ticos>.
14. Saleem A, Ahmed I, Mir F, Ali S, Zaidi A. Pan-resistant Acinetobacter infection in neonates in Karachi, Pakistan. J Infect Dev Ctries. 2010; 4(1): p. 30-37.
15. Alos J. Enfermedades Infecciosas. Microbiología Clínica. 2015; 33(10).
16. Mandigan M, Martinko J, Dunlap P, Clark D. Brock. Biología de los microorganismos. En Pearson Educación (Ed.), Brock. Biología de los Hongos. 2009 Mayo; 12(1): p. 592.
17. Castañon L. facmed. [Online].; 2019 [cited 2019 Julio. Available from: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/candidosis.html>.
18. Aguirre N, Luna T, Eguiguren P, Mendoza Z. Cambio climático y Biodiversidad: Estudio de caso de los páramos del Parque Nacional Podocarpus, Ecuador. [Online].; 2015 [cited 2019 Mayo. Available from: https://nikolayaguirre.files.wordpress.com/2011/12/libro_biodiversidad_cambio_cli.
19. Ulloa C, Moller J. Efloras. [Online].; 2015 [cited 2019 Mayo. Available from: http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=201&taxon_id=114826.

20. Schulz HN, Brinkhoff T, Ferdelman TG, Marine MH. Dense populations of a giant sulfur bacterium in Namibian shelf sediments: *Science* 284; 2009.
21. Lucana M, Huanca R. Estructura bacterina. *Rev. Act. Clin. Med Boliviana*. 2014; 49(1).
22. Jorge P. Las infecciones bacterianas y su resistencia a los antibióticos. Caso de estudio: Hospital Oncológico “Dr. Julio Villacreses Colmont Solca”, Portoviejo. *Revista Científica de la Universidad de Cienfuegos*. 2018; 10(5).
23. Torres Cisneros R, Jurado Jiménez C, Arenas Muñoz A, Doblas Delgado A. Fiebre tifoidea y otras infecciones por salmonellas. *Medicine*. 2010; 10(52).
24. Cresa. Cresa.es. [Online]. [cited 2019 Mayo. Available from: <http://www.cresa.es/granja/salmonelosis.pdf>.
25. David M, Weller T, Lambert P, Fraise A. An outbreak of *Serratia marcescens* on the neonatal unit: átale of two clones. In.; 2006. p. 23-33.
26. Silva F, Pabla Martinez TM. Complejo *Enterobacter cloacae*. *Rev Chilena Infecto*. 2018; 35(3): p. 297-298.
27. Brooks G, Butel J, Morse S. *Microbiología médica de Jawetz*. In.; 2005. p. 621-622.
28. Butu M, Dobre A, Rodino S, Butu A, Lupuleasa M. Testing of the Antifungal Effect of Extracts of Burdock , Thyme and Rough Cocklebur. In.; 2013. p. 65-69.
29. Bado I, Cordeiro N, Garcia V, Robino L, Seija V, Vignoli R. *Higiene 1*. [Online].; 2017 [cited 2019 Julio. Available from: <http://higiene1.higiene.edu.uy/DByV/Principales%20grupos%20de%20antibi%F3tico s.pdf>.
30. Calvo J. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol*. [Online].; 2009 [cited 2019 Julio. Available from: <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-mecanismos-accion-los-antimicrobianos-S0213005X08000177>.

31. Kimpe A, Decostere A, Martel A, Devriese L. Phenotypic and genetic characterization of resistance against macrolides and. *Microbial drug resistance* (Larchmont, N.Y.). 2003; 9(1).
32. Tafur J, Torres J, Villegas M. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en. [Online].; 2008 [cited 2019 Julio. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v12n3/v12n3a07.pdf>.
33. Reyes F, Palou E, Lopez A. Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. *Temas Sel Ing Aliment*. 2014; 8(1): p. 68-78.
34. <http://campus.usal.es>. [Online].; 2015 [cited 2019 Septiembre. Available from: http://campus.usal.es/~micromed/Practicas_odontologia/unidades/labv/LabMicro/Antibiograma.html.
35. Quiñones M, Miguel M, Aleixander A. Los polifenoles, compuestos de origen natural. In.; 2012.
36. Santiago C. Plantas medicinales farmacognosia. [Online].; 2016 [cited 2019 Julio. Available from: <https://www.plantas-medicinal-farmacognosia.com/temas/m%C3%A9todos-de-extracci%C3%B3n/percolaci%C3%B3n/>.
37. Takana H, Sato M. "Antibacterial activity of isoflavonoids isolated from *Erythrina variegata* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In.; 2012. p. 85-87.
38. Murakami C, Coideiro I, Tullius M, Moreno P, Young M. Chemical Composition, Antifungal and Antioxidant Activities of *Hedyosmum brasiliense*. *Essential Oils. Medicines*. 2017; 4(3): p. 55.
39. Cárdenas L, Rodríguez J, Villaverde M, Riguera R, Otero J, Cadena R. The Analgesic Activity of *Hedyosmum bonplandianum*: Flavonoid Glycosides. *planta medica*. 2009; 8(2).

40. Zamora A, Perdomo D. Composición química del aceite esencial de hojas de *Hedyosmum translucidum* Cuatrec., Chloranthaceae (Granizo). Boletín Latinoam y del Caribe Plantas Med y Aromáticas. ; 18(3).
41. Zaruma J. Aislamiento, caracterización y actividad biológica e metabolitos. Tesis de grado. Loja: Universidad Técnica Particular de Loja, Loja; 2015.
42. Zaruma Gonzales J. Aislamiento, caracterización y actividad biológica de metabolitos secundarios a partir de Hojas de plantas con flores femeninas de *Hedyosmum* en el cantón Saraguro de Loja. Tesis de Grado. Loja: Universidad Técnica Particular de Loja; 2015.
43. Zamora N. sura medical. [Online].; 2009 [cited 2019 Mayo. Available from: <https://sura.ots.ac.cr/local/florula4/families/CHLORANTHACEAE.pdf>.
44. Kirchner K, Wisniewski A, Cruz A, Biavatti M, Netz D. Chemical composition and antimicrobial activity of *Hedyosmum brasiliense* Miq., Chloranthaceae, essential oil. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 2013; 20(5): p. 692 - 699.
45. Stefanye V. Actividad antimicrobiana de extractos de tallos y flores del *Hedyosmum* sp. recolectadas en el bosque natural Jacarón. Tesis de grado. Riobamba: Universidad Nacional de Chimborazo, Chimborazo; 2018.
46. Solano Lozano E. Extracción, aislamiento, caracterización y actividad biológica de metabolitos secundarios de *Hedyosmum strigosum* con flores masculinas en la provincia de Loja. Tesis. Loja: Universidad Técnica particular de Loja, Loja; 2015.
47. Collaguazo G. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Hedyosmum* sp. del bosque natural Jacarón. Tesis de grado. Riobamba: Universidad Nacional de Chimborazo, Riobamba; 2019.
48. Rojas Hernandez N, Avellaneda Saucedo S, Cuellar Cuellar A, Fonseca Juarez R. Actividad antibacteriana de *Diphysa minutifolia* Rose. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2005; 10(2).

49. Dentone S, Morales S. Determinación in vitro de la Actividad Antimicótica del Aceite de Romero (*Rosmarinus officinalis*) sobre *Microsporum canis*. *Rev Inv Vet Perú*. 2017; 28(1): p. 56 - 61.

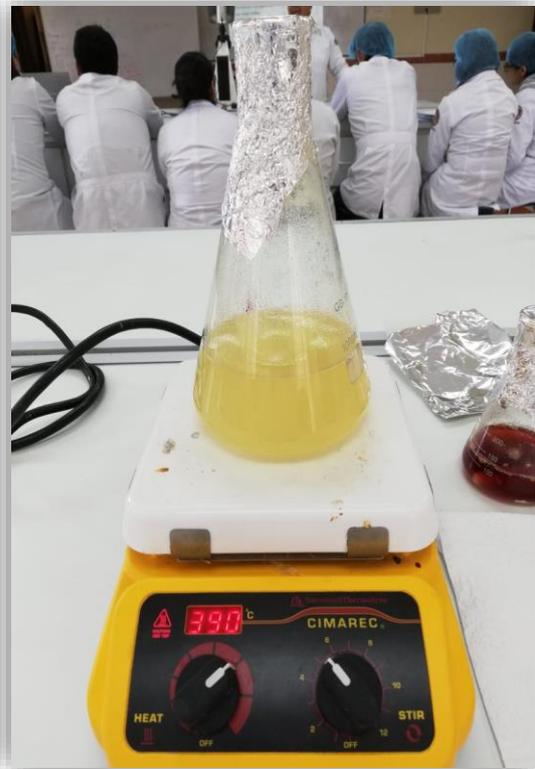
50. Condori I, Benique L. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS AROMÁTICAS. *Investigación Andina*. 2014 Julio; 14(2).

ANEXOS

Anexo 1. Materiales y equipos del Laboratorio de Microbiología la Universidad Nacional de Chimborazo utilizados en la investigación



A: Cámara de flujo laminar



B: Preparación de medios de cultivo



C: Autoclave

Anexo 2. Procedimiento para la obtención del extracto etanólico realizado en el laboratorio de investigación de la Universidad Nacional de Chimborazo



A: Especie Vegetal *Hedyosmum* sp.



B: Maceración Etanólica de *Hedyosmum* sp



C: Proceso de rotavaporación realizado en el Laboratorio de investigación de la facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Chimborazo.

Anexo 3. Procedimiento para realizar la solución madre y sus diluciones



B: Solvente Dimethylsulfoxid



A: Pesaje del extracto para la solución madre

Anexo 4. Preparación del Preinóculo e inóculo dentro de la cámara de flujo laminar



A: Preparación del Preinóculo microbiano



B: Preparación del Inóculo a la escala McFarland indicada

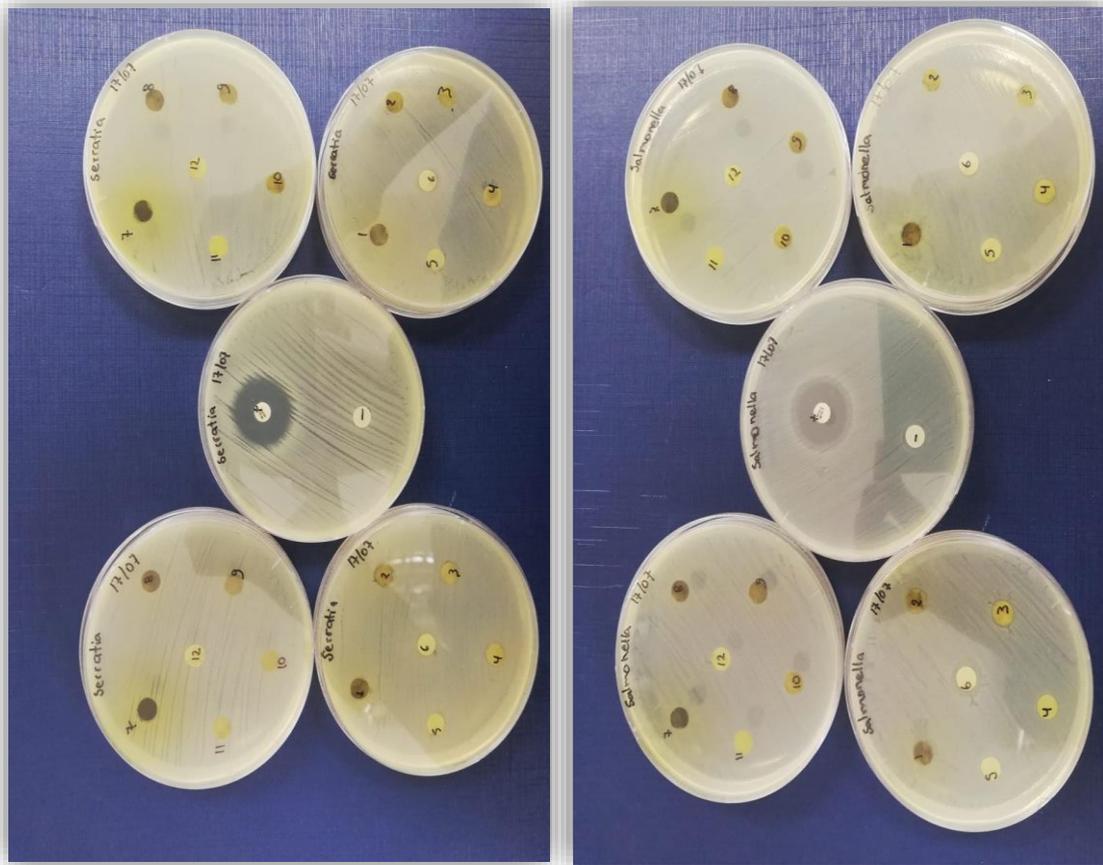
Anexo 5. Colocación de discos impregnados con extractos y discos de control



A: Impregnación del disco con el extracto

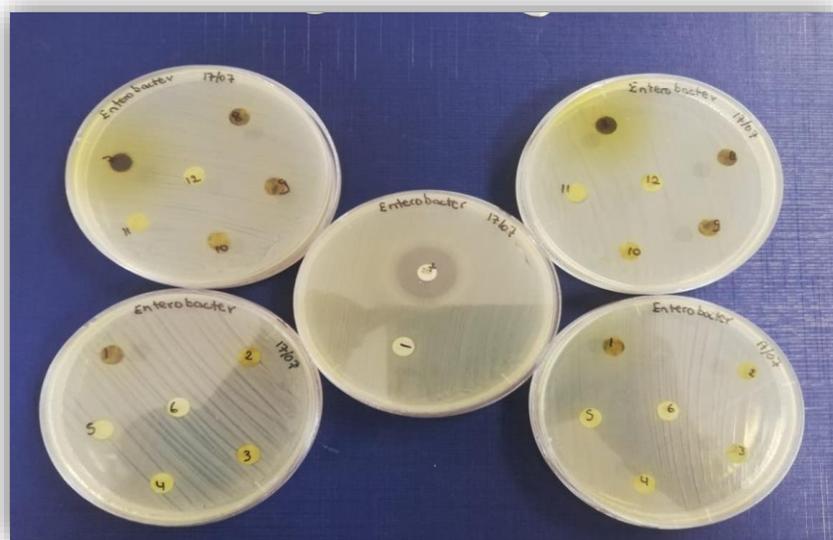
B: Colocación del disco en la placa con AMH

Anexo 6. Resultados bacterias gramnegativas



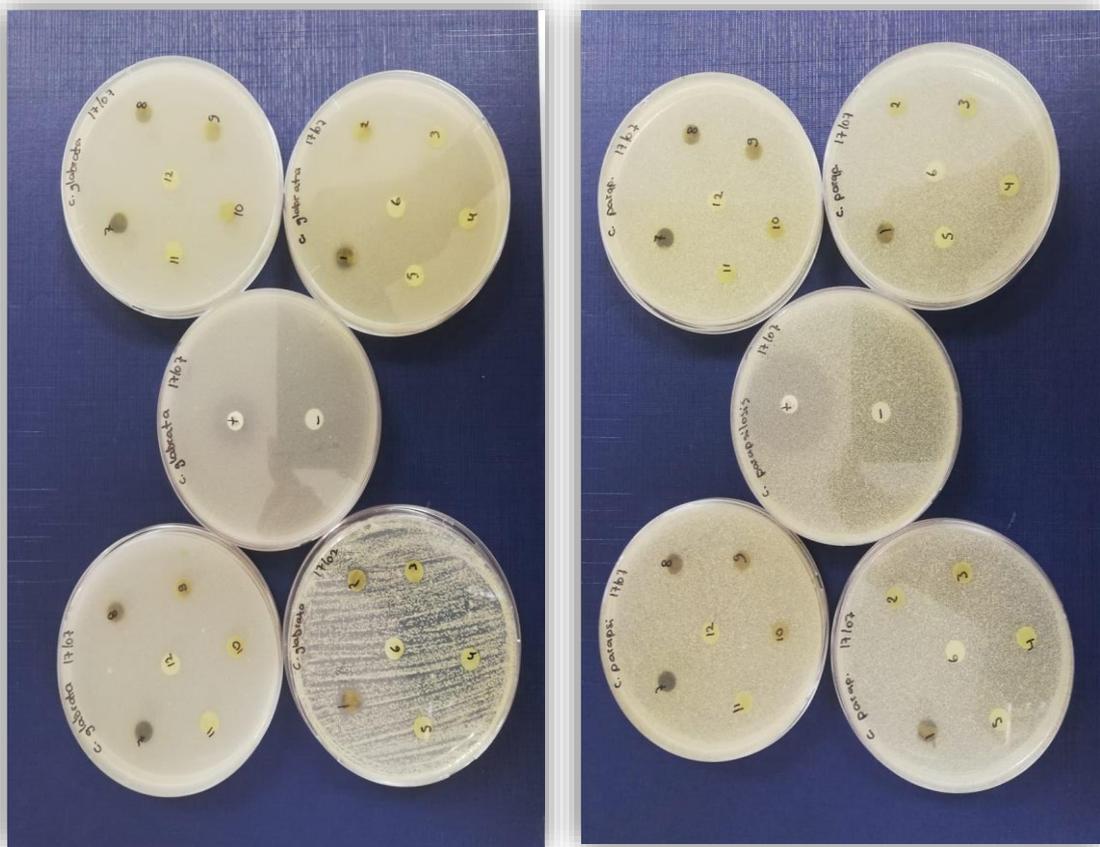
A: Resultados de los halos de *Serratia m.*

B: Resultados de los halos de *Salmonella sp.*



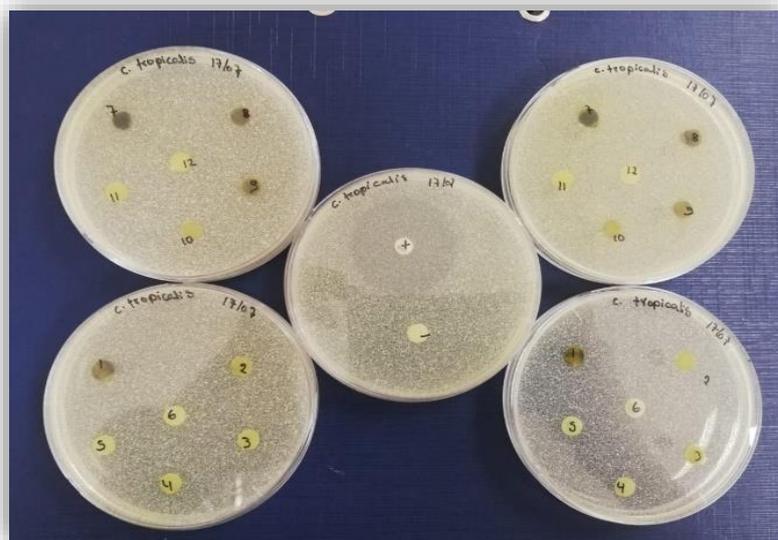
C: Resultados de los halos de *Enterobacter sp.*

Anexo 7. Resultados especies de *Cándidas*

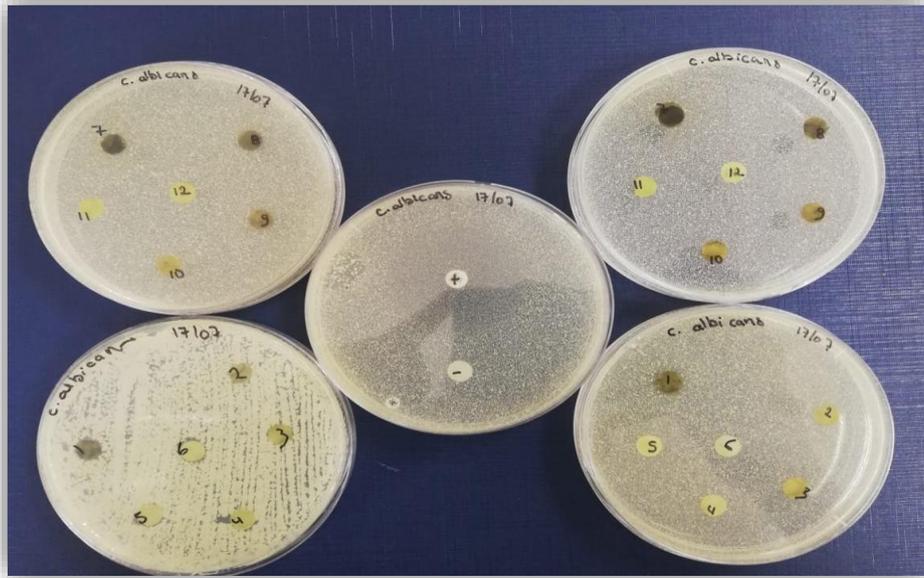


A: Resultados de los halos de *C. glabrata*

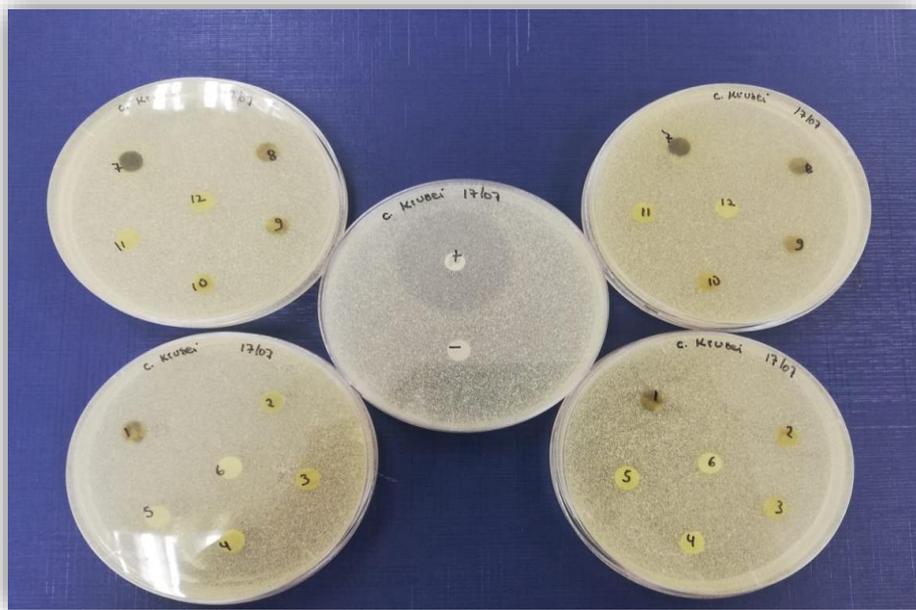
B: Resultados de los halos de *C. parapsilosis*



C: Resultados de los halos de *C. tropicalis*



D: Resultados de los halos de *C. albicans*



E: Resultados de los halos de *C. krusei*