

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

TÍTULO DEL PROYECTO

Determinación antimicótica de extractos hexánicos de *Hedyosmum* sp., recolectadas en el bosque Jaracón - Ecuador, 2019.

Autor: Nelson Javier Chagnama Cuñas.

Tutora Académica: Dra. Adriana Monge Moreno

Riobamba – Ecuador

2019

REVISIÓN DEL TRIBUNAL

Los miembros del tribunal de graduación del proyecto de investigación de título: “Determinación antimicótica de extractos hexánicos de *Hedyosmum* sp., recolectadas en el bosque Jaracón - Ecuador, 2019” presentado por: Nelson Javier Chagnama Cuñas y dirigida por: la Dra. Adriana Monge Moreno y la Dra. María Eugenia Lucena PhD.

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, Adriana Monge Moreno docente de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico, en calidad de Tutora del Proyecto de Investigación con el Tema: “Determinación antimicótica de extractos hexánicos de *Hedyosmum* sp., recolectadas en el bosque Jaracón - Ecuador, 2019”, propuesto por el Sr. Nelson Javier Chagnama Cuñas 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 uso del presente para trámites correspondientes.



.....
Dra. Adriana Monge Moreno

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: *Nelson Javier Chagnama Cuñas* con cédula de identidad N° 060431914-5, dirigida por la docente encargada del proyecto Dra. Adriana Monge Moreno y la Dra. María Eugenia Lucena PhD con el patrimonio intelectual de la misma a la Universidad Nacional de Chimborazo.”



.....
Nelson Javier Chagnama Cuñas

CI: 060431914-5

AGRADECIMIENTO

Por medio del presente proyecto de investigación, quiero agradecer ante todo a Dios, por bendecir y guiar los pasos que doy en esta vida, de la misma manera quiero agradecer a mis padres por ser mi pilar fundamental brindándome su apoyo moral y económica durante mi formación universitaria. A mis hermanos que han estado conmigo en los buenos y malos momentos. A la Universidad Nacional de Chimborazo que ha sido mi segundo hogar, así como a todos los docentes de la Universidad de quienes he aprendido mucho ya que me han sabido impartir los valores y además me compartieron todos sus conocimientos para formarme y proyectarme como un profesional de calidad y poder servir a la sociedad.

También Agradezco a mis docentes tutoras como son la Dra. Adriana Monge Moreno por el apoyo y las recomendaciones dadas durante la realización de este proyecto de investigación y a la Dra. María Eugenia Lucena por su guía y sugerencias durante la realización del mismo.

Nelson Javier Chagnama Cuñas

DEDICATORIA

Este proyecto se lo dedico principalmente a Dios por darme la vida y la oportunidad de superarme a través de mis queridos padres Carlos Chagnama León y María Cuñas Yautibug, quienes con mucho cariño, amor y perseverancia han hecho de mí una persona con valores para poder desenvolverme en todos los ámbitos que la vida me ha permitido conocer. A mis hermanos, que han estado a mi lado dándome su confianza y apoyo incondicional para seguir adelante y alcanzar otra etapa más de mi vida. Y a todos quienes de alguna u otra forma fueron partícipes de este proceso, preparándome como profesional de calidad.

Nelson Javier Chagnama Cuñas

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	4
General.....	4
Específicos.....	4
CAPÍTULO I	5
MARCO TEÓRICO O ESTADO DEL ARTE	5
PLANTAS MEDICINALES	5
Criterios de elección de plantas medicinales de interés	5
Principios activos y utilizaciones	6
EXTRACTOS NATURALES DE PLANTAS	6
Mecanismo de Acción	6
Eficacia	7
Extracción.....	7
CHLORANTHACEAE	7
<i>HEDYOSMUM</i>	7
HONGOS	8
Características generales.....	8
Estructura.....	9
MICOSIS HUMANA	9
Mecanismos de patogenicidad.....	9
Clasificación	10
CÁNDIDA	11
<i>Cándida albicans</i>	11
Especies de <i>Cándida</i>	12
Infecciones por <i>Cándida</i> spp.	14
CANDIDIASIS	15
PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICÓTICOS	17
ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA	18
Resistencia a los antimicrobianos.....	18
CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)	19

CAPÍTULO II	20
DISEÑO METODOLÓGICO DE LA INVESTIGACIÓN	20
Tipos de investigación	20
Nivel o Alcance	20
Diseño.....	20
Secuencia Temporal o Corte.....	20
Enfoque o Carácter	20
Cronología de los hechos.....	21
Población	21
Variables de estudio.....	21
Variable Independiente.....	21
Variable Dependiente	21
Técnicas e Instrumentos	21
PROCEDIMIENTOS DE LA INVESTIGACIÓN	22
Obtención del Extracto Hexánico de las hojas y ramas de la especie vegetal <i>Hedyosmum</i> sp., mediante la técnica de Maceración	22
Procedimiento para realizar la solución madre o Stock del extracto.....	22
Preparación de extractos a diferentes concentraciones.....	22
Determinación de la actividad antimicótica	23
Prueba de la actividad antimicrobiana mediante el Método Kirby Bauer modificado	24
PROCESAMIENTO ESTADISTICO	25
CAPÍTULO III	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
Rendimiento de los extractos hexánicos.....	26
Análisis general de la actividad antimicótica aplicada a las hojas y a las ramas o tallos del extracto hexánico de <i>Hedyosmum</i> sp.	26
CONCLUSIONES	31
RECOMENDACIONES	32
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	
ANEXOS	

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Hedyosmum racemosum</i>	8
Figura 2: Especies de <i>Cándida</i> y su localización específica.....	14
Figura 3: Clasificación de candidosis.....	16
Figura 4: Candidiasis orofaríngea.....	16

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Actividad antimicótica del extracto hexánico de las hojas de <i>Hedyosmum</i> sp., expresado por los halos de inhibición (mm), frente a las especies de <i>Cándida</i>	27
Tabla 2: Valor de CMI de las hojas de <i>Hedyosmum</i> sp., de cada una de las especies de <i>Cándida</i> estudiadas con su respectivo control.....	27
Tabla 3: Actividad antimicótica del extracto hexánico de las ramas o tallos de <i>Hedyosmum</i> sp., expresado por los halos de inhibición (mm), frente a las especies de <i>Cándida</i>	29
Tabla 4: Valor de CMI de las ramas o tallos de <i>Hedyosmum</i> sp., de cada una de las especies de <i>Cándida</i> estudiadas con su respectivo control.	29

RESUMEN

La medicina ancestral ha sido una ayuda desde la antigüedad en la prevención y tratamiento de muchas enfermedades infecciosas. El valor curativo de las plantas medicinales procede de principios activos, los cuales producen diferentes efectos biológicos. El aumento de las infecciones por hongos, unido a la resistencia que han empezado a tener a los agentes antimicóticos, ha llevado a una constante búsqueda de alternativas curativas, eficaces que puedan evitar futuras infecciones. El objetivo de esta investigación fue determinar la actividad antimicótica de los extractos hexánicos de *Hedyosmum* sp., frente a ciertas especies de *Cándida*. Para la obtención del extracto se utilizaron hojas y ramas o tallos de *Hedyosmum* sp, triturándolos y procesando mediante la técnica de maceración con hexano, luego fueron filtradas y sometidas a rotaevaporación para concentrar la sustancia a estudiar. La determinación de la actividad antimicótica se realizó mediante el método Kirby Bauer, ensayando el extracto a distintas concentraciones desde 1.0 hasta 0.0077 g/mL partiendo de la solución concentrada, además se utilizaron controles positivos y negativos. La interpretación fue determinada mediante las zonas de inhibición observadas y en la medición de los halos (mm). Todas las especies de *Cándida* estudiadas presentaron sensibilidad a los extractos hexánicos de *Hedyosmum* sp., siendo las más sensibles la *Cándida tropicalis* y *glabrata*, en las hojas con una CMI de 0.031 g/mL, y en los tallos con una CMI de 0,125 g/mL. En conclusión el extracto hexánico ensayado de *Hedyosmum* sp., resulto tener actividad antimicótica en todas las especies de estudio.

Palabras clave: *Hedyosmum*, Chloranthaceae, extracto hexánico, actividad antimicótica, prueba de susceptibilidad.

Abstract

Ancestral medicine has been an aid since ancient times in the prevention and treatment of many infectious diseases. The curative value of medicinal plants comes from active ingredients, which produce different biological effects. The increase in fungal infections, together with the resistance they have begun to have antifungal, has led to a constant search for curative alternatives, effective that can prevent future infections. The objective of this investigation was to determine the antifungal activity of the hexane extracts of *Hedyosmum* sp. against certain species of *Candida*. To obtain the extract, leaves, and branches or stems of *Hedyosmum* sp. were used, crushing and processing using the hexane maceration technique, then filtered and subjected to rot evaporation to concentrate the substance to be studied. The antifungal activity was determined using the Kirby Bauer method, testing the extract at different concentrations from 1.0 to 0.0077 g / mL starting from the concentrated solution, plus positive and negative controls used. The interpretation determined by the inhibition zones observed and the measurement of the halos (mm). All the *Candida* species studied presented sensitivity to the hexane extracts of *Hedyosmum* sp, the most sensitive being *Candida tropicalis* and *glabrata*, in the leaves with a MIC of 0.031 g / mL, and the stems with an MIC of 0.125 g / mL. In conclusion, the hexane extract tested from *Hedyosmum* sp. proved to have antifungal activity in all the study species.

Keywords: *Hedyosmum*, Chloranthaceae, hexane extract, antifungal activity, susceptibility test.



Reviewed by: Chavez, Maritza

Language Center Teacher



INTRODUCCIÓN

El valor medicinal de las plantas curativas procede de sustancias químicas o principios activos que se localizan en el tejido de la planta, los cuales producen diferentes efectos biológicos. La mayoría de estos principios activos son sumamente complejos y desconocidos en su totalidad. Sin embargo han podido ser aislados, sintetizados o limitados por la química actual en la elaboración de medicamentos. Dentro de dichos principios activos encontramos: aceites esenciales o esencias, extractos, alcaloides, glucósidos, gomo o resinas y sustancias antibióticas⁽¹⁾.

La medicina ancestral está basada principalmente en productos naturales como es la sabia de las hojas de muchas plantas con poderes medicinales y curativos, las cuales solas y en conjunto con otros productos naturales, son usadas por las personas interesadas en encontrar mejoría a sus dolencias⁽²⁾. La medicina tradicional no solo es empleada para el diagnóstico clínico sino también para la prevención y supresión de trastornos físicos, mentales o sociales⁽³⁾.

Hoy en día, una gran atención se centra en las plantas medicinales, de determinar sus fitoconstituyentes, con el objetivo de utilizarlos para la prevención y el tratamiento de las infecciones microbianas y no microbianas. Esto ha llevado a los países desarrollados a la extracción y el desarrollo de varios fármacos y agentes quimioterapéuticos de las plantas⁽¹⁾.

El uso inadecuado e indiscriminado de antibióticos en el control y prevención de enfermedades ha provocado la aparición de nuevas formas clínicas, así como localizaciones no habituales y diseminación de nuevos mecanismos de resistencia antimicrobianas, lo que justifica los diferentes cambios en el perfil de sensibilidad y resistencia presentados por los agentes etiológicos de infecciones nosocomiales.

Esto conlleva a un problema que va cada vez en aumento y que plantea una grave amenaza a la salud pública, involucrando nuevas especies bacterianas y fúngicas consideradas antiguamente como no patógenas pero que excepcionalmente producían enfermedad en individuos inmunodeprimidos⁽⁴⁾.

A pesar de los avances científicos logrados en el presente siglo en lo referente a sustancias medicinales de origen sintético, la búsqueda de sustancias con actividad antimicrobiana en fuentes no tradicionales como las plantas medicinales es importante⁽³⁾.

La realización de este estudio es muy importante debido a que desde su origen, las personas vieron a las plantas como una ayuda esencial en el campo de la salud y se sirvieron de ellas para cuidarse y prevenirse de muchas enfermedades que parecían incurables o intratables ⁽⁵⁾.

En todo el mundo, la medicina tradicional es la principal estrategia de un servicio de salud más eficiente, evitando así tratamientos largos y una sobredosis de medicina química que llegan a afectar la salud de los pacientes ⁽⁵⁾. En el mundo se ha venido explorando y valorando el uso de los productos naturales como fuente de nuevos y variados agentes antimicóticos ⁽⁶⁾.

En la resolución de la Asamblea Mundial de la Salud sobre medicina tradicional, según la normativa (WHA62.13) adoptada en el 2009, se ha solicitado a la Directora General de la Organización Mundial de la Salud (OMS) que se actualicen las estrategias sobre la medicina tradicional establecida para el periodo (2002-2005), sobre la base de los progresos que se han dado en muchos países y los nuevos problemas que se suscitan actualmente en el campo de la medicina. Por lo tanto, la estrategia de la OMS sobre la medicina tradicional para el periodo (2014-2023) se han modificado varios aspectos del reglamento anterior, señalando el rumbo de la medicina tradicional y complementaria (MTC), especialmente para la próxima década, así como también según la normativa (WHA56.31), los estados miembros han solicitado a la OMS que brinde apoyo técnico, con el fin de elaborar una metodología para vigilar o garantizar la calidad, eficacia y seguridad de los productos; preparar directrices y promover el intercambio de información ⁽⁷⁾.

En Ecuador hay cerca de 3.200 plantas con beneficios medicinales, pueden ser un complemento al tratamiento. Un estudio de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) (2018) reveló esta cifra y mostró que casi todas son nativas, excepto un 20 % que han sido introducidas en el país ⁽⁸⁾. Las plantas medicinales del Ecuador, al menos las que se dan en Chimborazo, han traspasado fronteras, hasta que sus beneficios aparecieron en la Revista africana de medicina tradicional, complementaria y alternativa (2017), luego de un estudio que lideró Temple University, de Estados Unidos ⁽⁹⁾.

En Riobamba, un grupo de agricultores se han dedicado a la siembra de especies que sirven para preparar remedios naturales. Las mujeres indígenas están dedicadas a este tipo de actividades en las que se incluyen las limpias; algunas de las plantas medicinales que se cultivan en la parroquia Cebadas, Cantón Guamote, provincia de Chimborazo son la achira, ajenjo, manzanilla, llantén ⁽¹⁰⁾.

En la actualidad, una de las preocupaciones de los países de la subregión andina es conservar este saber ancestral; por otra parte, intentar integrar la medicina tradicional en los sistemas de salud más sofisticados y a su vez a los lugares más recónditos del planeta con una economía muy baja⁽¹¹⁾.

El aumento de las infecciones por hongos, unido a la resistencia que han empezado a tener estos agentes a los antimicóticos, ha llevado a una constante búsqueda de alternativas terapéuticas eficaces que puedan brindar más y mejores opciones en las farmacopeas actuales que protege a estos microorganismos de la lisis osmótica y de la acción de enzimas líticas⁽⁶⁾.

En los últimos años se han descubierto antimicóticos obtenidos de hongos cuyo blanco de acción es la pared celular, estructura⁽²⁾.

En comparación con la terapia antibacteriana, los tratamientos antifúngicos son limitados en cuanto a su eficacia y también son pocos los fármacos disponibles.

Por otra parte, a diferencia de las bacterias, cuya resistencia emerge rápidamente, los hongos no se vuelven resistentes prontamente, debido a su largo tiempo de replicación.

En la actualidad, la emergencia de resistencia antimicótica se debe principalmente al reciente aumento de especies con resistencia natural y a la selección de cepas resistentes durante la terapia antimicótica. Sin embargo, con el uso crónico de tratamientos antifúngicos, principalmente en pacientes inmunosuprimidos, se ha generado menor susceptibilidad y se ha establecido cierta resistencia en ciertos hongos aislados⁽¹²⁾.

Una vez descrita la situación del problema de estudio en la presente investigación se planteó la siguiente interrogante: ¿Tendrá actividad antimicótica sobre el género *Cándida* los extractos hexánicos de *Hedyosmum* sp?

OBJETIVOS

General:

- Determinar la actividad antimicótica de los extractos hexánicos de las hojas y ramas de *Hedyosmum* sp., recolectadas en el Bosque Natural Jaracón, Chimborazo – Ecuador 2019, frente a ciertas especies de *Cándida* de interés clínico.

Específicos:

1. Obtener el extracto hexánico de las hojas y ramas de la planta *Hedyosmum* sp., mediante la técnica de maceración con hexano para la realización de los ensayos de la actividad antimicótica.
2. Analizar la actividad antimicótica del extracto hexánico de *Hedyosmum* sp., frente a las distintas especies de *Cándida*, mediante el método de difusión en disco o Kirby Bauer modificado.
3. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto hexánico de *Hedyosmum* sp., frente a las cepas micóticas en estudio, a través de la determinación del efecto inhibitorio a diferentes concentraciones.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO O ESTADO DEL ARTE

PLANTAS MEDICINALES

En las últimas décadas el auge por las plantas medicinales ha incrementado notablemente no solo en nuestro país sino también a nivel mundial. Por este motivo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) incentiva la obtención de los medicamentos a partir de los recursos naturales. Algunos laboratorios de Farmacología se han abocado a la obtención de antimicrobianos a partir de recursos microbiológicos y de plantas medicinales ⁽¹³⁾.

La medicina tradicional está presente en todas las culturas del mundo. Se la define como el conjunto de todos los conocimientos y practicas usadas en la prevención, diagnóstico y eliminación de desequilibrios físicos, mentales o sociales, y confiado exclusivamente en experiencia práctica, observación y transmitido de generación a generación, en forma oral o sexual. Las plantas han sido usadas como medicina alrededor del mundo por milenios: fueron la medicina original en todas las culturas y en las civilizaciones más grandes ⁽¹³⁾.

De acuerdo con la OMS del año 2008 una planta medicinal es definida como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos antibióticos ⁽¹³⁾.

Estas plantas también tienen importantes aplicaciones en la medicina moderna. Entre otras, son fuente directa de agentes terapéuticos, se emplean como materia prima para la fabricación de medicamentos semisintéticos más complejos, la estructura química de sus principios activos puede servir de modelo para la elaboración de drogas sintéticas y tales principios se pueden utilizar como indicadores en la búsqueda de nuevos medicamentos ⁽¹³⁾.

Criterios de elección de plantas medicinales de interés

Uno de los primeros criterios tomados en cuenta para la selección de especies es que dichas especies estén presentes en la flora ecuatoriana, por ser autóctonas o naturalizadas, o por haber sido puestas en cultivo en algún momento. Todo ello como forma de contar con una fuente de material vegetal y en cantidad suficiente.

Además del aspecto de planta medicinal se ha hecho una selección de las especies que se han considerado como más representativas de las utilizadas como condimentarias y que están presentes en el mercado, dejando al margen las especies que se cultivan ampliamente como plantas hortícolas (ajo, cebolla, pimentón). Dichas especies también pueden tener usos medicinales⁽¹⁴⁾.

Principios activos y utilizaciones

Los principios activos son los compuestos que, de forma directa o indirecta, son responsables de la acción terapéutica de las especies vegetales. A veces es difícil encuadrar determinados productos en esta definición, dada su complejidad; tal es el caso de aceites esenciales, resinas, etc. En muchas especies no es fácil indicar cuál es el principio activo, sobre todo en aquellas en que interviene las mezclas complejas que constituyen aceites esenciales, resinoides, etc.; de todas formas, como las distintas familias y grupos botánicos tienen cierto parentesco fitoquímico.

En general, los principios activos son metabolitos secundarios del vegetal y no tienen un papel esencial en los fenómenos vitales en las plantas. Sus estructuras químicas son muy diversas, pudiendo tratarse de compuestos bien definidos o de mezclas complejas⁽¹⁴⁾.

EXTRACTOS NATURALES DE PLANTAS

Las plantas y subproductos agroalimentarios son una gran fuente de productos naturales biológicamente activos. Muchos de los beneficios de las plantas y subproductos agroalimentarios son conocidos y utilizados desde la antigüedad como antimicrobiana, insecticida, antioxidante, etc. Estos efectos son debidos a compuestos sintetizados por las células de las plantas que no son estrictamente necesarios para el crecimiento o reproducción, pero cuya presencia ha sido demostrada genéticamente, fisiológicamente o bioquímicamente. Las técnicas de extracción permiten obtenerlos y concentrarlos para su uso en diferentes aplicaciones (medicina, alimentación, perfumería, etc.).

Mecanismo de Acción:

- Inhibición de la biosíntesis de los ácidos nucleicos o de la pared celular.
- Daño a la integridad de las membranas.
- Interferencia con la gran variedad de procesos metabólicos esenciales.

Eficacia:

Depende de factores como el pH, capacidad amortiguadora, el tiempo y la temperatura de almacenamiento, el microorganismo de interés (flora alterante y patógena), y el tipo y concentración del antimicrobiano ⁽¹⁵⁾.

Extracción

Para la elaboración de medicamentos a base de material vegetal se debe tomar en cuenta que existen diferentes métodos para extraer los principios activos contenidos en dicha planta, los cuales necesitan de un líquido extractivo que va a depender del procedimiento técnico y de la naturaleza química del principio activo ⁽¹⁶⁾.

CHLORANTHACEAE

Las familias mencionadas forman una pequeña familia compuesta por cuatro géneros. Esta familia, considerada primitiva entre las angiospermas comparte la aparición de células secretoras en las hojas y los tallos como característica común ^{(17) (18) (19)}.

En la familia Chloranthaceae se incluye principalmente plantas aromáticas agrupadas en cuatro géneros: *Chloranthus*, *Sarcandra*, *Ascarina* y *Hedyosmum*. Esta familia está constituida por aproximadamente 75 especies cuyo ascendiente genético común es una flor fosilizada similar a *Hedyosmun* que proviene del cretáceo temprano y que fue encontrada en Barremian-Aptian (Portugal) ^{(17) (18) (19)}.

Algunos géneros (especialmente de *Chloranthus* y *Hedyosmum*) se usan como plantas ornamentales, cosméticos o medicinales y para fines alimenticios, como bebidas, infusiones de las hojas consumidas en forma de té o sustitutos del café ^{(17) (18) (19)}.

HEDYOSMUM

Es el generó más abundante presentándose solo en América central y meridional comprendiendo 40 especies de árboles, arbustos y hierbas. En el Ecuador se encuentran aproximadamente 12 de las 40 especies del género *Hedyosmum*: *H. anisodorum*, *H. cuatrecazanum*, *H. cumbalense*, *H. goudotianum*, *H. luteynii*, *H. purpurascens*, *H. racemosum*, *H. scabrum*, *H. spectabile*, *H. sprucei*, *H. strigosum*, *H. translucidum* ^{(17) (18) (19)}.



<i>Hedyosmum racemosum</i>	
Taxonomía	
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Chloranthales
Familia:	Chloranthaceae
	R. Br. ex Lindl., 1821
Género:	<i>Hedyosmum</i>
	Sw., 1788S
Especies	
44 especies	

Figura 1: *Hedyosmum racemosum*
Fuente: <https://es.wikipedia.org/wiki/Hedyosmum>

HONGOS

Características generales

Los hongos observados en el Laboratorio clínico por lo general se pueden separar en 2 grupos sobre la base del aspecto de las colonias formadas. Los hongos son microorganismos eucariotas, heterótrofos y de vida saprofita o parasitaria⁽²⁰⁾.

Las levaduras producen colonias húmedas, cremosas, opacas o pastosas en los medios de cultivo, mientras que los hongos filamentosos producen colonias vellosas, algodonosas, lanosas o pulverulentas. Las diversas especies patógenas de hongos que exhiben tanto una forma de levadura (o levaduriformes) como una forma filamentosa se denominan hongos dimorfos⁽²⁰⁾.

Estructura

Los hongos pertenecen al reino Fungi, separado de los géneros Monera (bacterias, entre otros), Protistas (elementos eucariotas como, por ejemplo, los protozoos), Plantae y Animalia. Son células eucariotas que presentan su estructura de adentro hacia afuera:

- Núcleo, mitocondrias, ADN bacteriano.
- Membrana celular con bicapa lipídica, rica en ergosterol.
- Pared celular, con funciones eminentemente estructurales.
- Destaca la presencia, entre otras moléculas, de beta-D-glucano, manano y celulosa⁽²¹⁾.

MICOSIS HUMANA

Existen más de 50 000 especies de hongos diseminadas por el suelo, el aire, el agua y los seres vivos (animales y, sobre todo, vegetales, de los que unas 175 especies se han descrito como causantes de infecciones en los seres humanos⁽²²⁾.

Las micosis humanas pueden clasificarse en 4 grandes grupos, según las características del hongo invasor (oportunista o patógeno primario) y del órgano o tejido invadido (cutáneas, subcutáneas o sistémicas). Las micosis cutáneas son causados principalmente por los dermatofitos, que son un grupo de hongos capaces de utilizar la queratina de las capas superficiales de la piel, pelo o uñas, y producen infecciones limitadas a estas estructuras⁽²²⁾.

Mecanismos de patogenicidad

Las 2 barreras esenciales para el crecimiento de los hongos en los tejidos humanos son la temperatura y el potencial redox. La mayor parte de los hongos crecen de forma óptima a temperaturas más bajas que las del organismo humano. Por otro lado, la mayor parte de sus sistemas enzimáticos actúan con mayor eficacia con potenciales redox propios de sustratos muertos, que en el estado relativamente más reducido de los tejidos metabólicamente activos. Además, el organismo humano posee un sistema muy eficaz de defensas celulares para combatir la implantación y el desarrollo de los hongos. Así pues, la actividad patógena de los hongos depende, sobre todo, de su capacidad para adaptarse a los tejidos y resistir a las defensas celulares⁽²²⁾.

En estado parasitario, el metabolismo fúngico aumenta y se ven facilitadas determinadas vías metabólicas; el resultado es un microorganismo que crece y se multiplica con mucha mayor rapidez que en su estado natural a temperaturas más bajas. Estas formas parasitarias son más susceptibles a la fagocitosis y destrucción por los macrófagos. Esta la razón por la que muchas de estas infecciones son subclínicas y se resuelven de manera espontánea⁽²²⁾.

En los hongos patógenos primarios o verdaderos causantes de micosis sistémica, la capacidad de adaptación al organismo humano es bastante elevada y se manifiesta por un dimorfismo. El otro grupo de hongos causantes de micosis sistémicas, mucho menos virulentas, las llamadas oportunistas (*Cryptococcus*, *Aspergillus*, etc.) requieren en la mayor parte de las ocasiones, un mayor defecto de las defensas del huésped para poder establecerse en el interior del organismo humano; no presentan dimorfismo térmico, aunque son tolerantes con respecto a la temperatura⁽²²⁾.

Las cepas aisladas de infecciones humanas son metabólicamente más activas a 37°C y en potencial rédox de los tejidos, que cuando son aisladas del suelo. En los hongos causantes de la micosis subcutánea también existe una amplia gama de adaptabilidad. Son microorganismos poco virulentos que, para producir un cuadro de infección, tienen que introducirse de forma mecánica en los tejidos (implantación traumática)⁽²²⁾.

Clasificación:

- 1) Hongos filamentosos.
- 2) Hongos dimórficos⁽²¹⁾.
- 3) Levaduras

Son microorganismos unicelulares, redondos u ovals, con un tamaño que varía de entre 2 y 60 µm, se reproducen por gemación⁽²²⁾.

En la microscopia sus características morfológicas suelen ser similares entre los diferentes géneros y no son de particular ayuda para su diferenciación. En algunos casos esto dificulta la observación microscópica directa y el examen histopatológico de las muestras clínicas. Sin embargo, el tamaño, la presencia de una capsula o su ausencia, o el brote ``con un cuello estrecho'' son características que pueden ser útiles para diferenciar las especies de *Cryptococcus* de las de *Cándida*⁽²²⁾.

CÁNDIDA

Las especies del género *Cándida* son levaduras aunque en circunstancias ambientales concretas pueden diferenciar pseudohifas (falsas hifas), similares a las de los hongos filamentosos⁽²⁰⁾. El género *Cándida* lo forman hongos levaduriformes cuyas células aisladas son de morfología oval o cilíndrica, y se multiplican por gemación. Las levaduras del género *Cándida* se desarrollan rápidamente (24-48 horas) en medios de cultivo ordinarios, tanto a 25°C como a 37°C⁽²²⁾.

La especie más virulenta y de mayor interés en patología humana es la *Cándida albicans*, pero también otras especies pueden producir infecciones oportunistas. Pueden encontrarse como componentes, más o menos transitorios, de la flora comensal de diversas partes del organismo humano (piel, boca, intestino, vagina), exceptuando la *C. albicans*. La mayoría de las infecciones producidas por estos microorganismos suelen ser de origen exógeno⁽²³⁾.

Levaduras del género *Cándida*

- ✚ *C. albicans* ([Robin] Berkhout, 1923)
- ✚ *C. krusei* ([Castellani] Berkhout, 1923)
- ✚ *C. tropicalis* ([Castellani] Berkhout, 1923)
- ✚ *C. kefyr* (*pseudotropicalis*) ([Castellani] Basgall, 1931)
- ✚ *C. (Torulopsis) glabrata* (Lodder De Vries, 1938)
- ✚ *C. guilliermondii* ([Castellani] Langeron, Guerra, 1938)
- ✚ *C. stellatoidea* ([Jones y Martin] Langeron, Guerra, 1939)
- ✚ *C. parapsilosis* ([Ashford] Langeron, Talice, 1959)
- ✚ *C. dubliniensis* (Sullivan et al., 1995)⁽²³⁾.

Cándida albicans

Es la especie más patógena del género *Cándida*. Suele ser flora normal del organismo y pueden asociarse a muy diversas patologías. Causa infecciones, particularmente en individuos inmunocomprometidos: diabéticos, leucémicos, y también en neonatos⁽²⁴⁾.

Es causa frecuente de vaginitis en las mujeres, produciendo enrojecimiento, escozor y secreción vaginal. Son factores predisponentes el embarazo, la diabetes, el tratamiento con antibióticos de amplio espectro y el uso de anticonceptivos orales. En neonatos es frecuente la candidiasis mucocutánea caracterizada por placas de mucosa bucal⁽²⁴⁾.

La mayor parte de los pacientes enfermos de SIDA desarrollan candidiasis orofaríngea y un alto porcentaje de las mismas esofagitis candidiásica. La erradicación de *Cándida albicans* de la mucosa oral es difícil y las reinfecciones son frecuentes. Especialmente en pacientes leucémicos y transplantados, la *C. albicans* puede producir infección diseminada de desenlace fatal. Los órganos implicados son el hígado, los riñones, los pulmones, los ganglios linfáticos, etc^{(24) (25)}.

Especies de *Cándida*

Clase Blastomycetes; orden Moniliales; familia Cryptococcaceae, género *Cándida*.

Aunque tradicionalmente las demás cepas de *Cándida* se consideraban de baja patogenicidad y, en ocasiones se desechaban como contaminantes, cada vez es mayor el número de casos de infecciones producidas por las mismas. Así la *Cándida parapsilosis* se ha asociado a Endocarditis, la *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* y también la *C. parapsilosis*, a las infecciones urinarias, entre otras anomalías^{(23) (26)}.

La adherencia de *Cándida* al epitelio de los tractos gastrointestinales o urinario tiene una importancia fundamental. Las especies de *Cándida* por lo común colonizan las superficies de las mucosas, su capacidad para invadir y producir infección depende en primer lugar de la unión. La fibronectina, un componente de la matriz extracelular del huésped, puede participar en la iniciación y diseminación de la infección por *Cándida albicans*. La patogenia de las infecciones por *Cándida*, en extremo compleja, probablemente varía en cada especie⁽²⁰⁾.

Cándida glabrata

Es una levadura saprófita, que forma parte de la microbiota comensal. Los blastoconidios de esta levadura son considerablemente más pequeños, midiendo de 1 a 4 µm, respecto a los de *C. albicans* que miden de 4 a 6 µm. Otra característica importante es que *C. glabrata* sólo asimila los azúcares glucosa y trealosa, a diferencia de la mayoría de las otras especies de *Cándida* que asimilan más azúcares, y no filamenta en plasma a 37 °C. Cabe señalar que el genoma de *C. glabrata* es haploide (*C. albicans* es diploide), lo cual facilita la rápida adquisición de resistencia secundaria a azoles^{(27) (28)}.

Cándida tropicalis

Es una célula vegetativa con una forma que va desde redonda hasta ovalada y varía de aproximadamente 2 a 10 micrómetros. Un moho exhibe dimorfismo formando una levadura unicelular o blastoconidia que se reproduce por simple brote. Conidia es la unidad asexual que se produce por brote de las puntas o paredes de las hifas. Conidia es un tipo de cuerpo simple y unicelular que podría tomar la forma de una célula multicelular con diferentes formas, tamaños y colores. Esta especie es la segunda más frecuente productora de candidiasis, en algunos centros es más prevalente que *C. albicans*, sobre todo con pacientes de leucemia⁽²⁸⁾.

Cándida krusei

Es una levadura perteneciente al género *Cándida*. Las células mayores son cilíndricas, de hasta 25 mm de largo. Las colonias separadas exceden con frecuencia los 5 mm de diámetro sobre malta-glucosa a 25 °C. Es un patógeno nosocomial que principalmente afecta a los pacientes inmunodeprimidos y aquellos con neoplasias hematológicas. Tiene una resistencia natural a fluconazol, un agente antimicótico estándar⁽²⁹⁾.

Los últimos años han visto un aumento en las infecciones fúngicas invasivas, particularmente las causadas por *Candida spp.* El aumento se acompaña de un cambio hacia una mayor proporción de especies distintas de *Candida albicans*, que con frecuencia son resistentes al fluconazol. *Candida krusei* tiene una resistencia hereditaria al fluconazol e infecta principalmente a pacientes con neoplasias hematológicas y otros pacientes inmunocomprometidos⁽³⁰⁾.

La resistencia al fluconazol en *Candida spp.*, se debe principalmente a una disminución de la sensibilidad de la enzima diana citocromo P450 esterol 14 α -desmetilasa (CYP51) a la inhibición por los agentes azólicos. En el caso de *C. krusei*, un estudio que utiliza dos cepas multirresistentes sugiere un mecanismo alternativo de resistencia basado en bombas de flujo⁽³⁰⁾.

Cándida parapsilosis

Es un microorganismo diploide morfológicamente caracterizado por células redondeadas, ovals o alargadas y producción de pseudohifas.

Éstas últimas se encuentran vinculadas de manera importante a un conjunto específico de aminoácidos, particularmente citrulina, la cual origina cambios importantes en la morfología celular y colonial del microorganismo. *C. parapsilosis* es incapaz de formar hifas verdaderas. Este microorganismo se ha aislado frecuentemente de piel y uñas de las manos de enfermeras y otros profesionales del área de salud, de donde forma parte de la flora comensal humana normal. También se ha aislado de dispositivos médicos tales como catéteres intravasculares, líneas de nutrición parenteral, entre otros dispositivos prostéticos. Recientemente se le ha considerado a *C. parapsilosis* como un importante patógeno emergente, asociado de manera creciente a un amplio espectro clínico de infecciones^{(31) (28)}.

ESPECIE	ONIQUIA	PARONIQUIA	VAGINITIS	ENDOCARDITIS	OTRAS
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+
<i>C. parapsilosis</i>		+		+	
<i>C. tropicalis</i>	+		+		
<i>C. guilliermondii</i>	+			+	
<i>C. pseudotropicalis</i>			+		
<i>C. krusei</i>			+	+	

Figura 2: Especies de *Cándida* y su localización específica.

Fuente: <https://es.slideshare.net/PrincipeMestizo666/candidiasis-29120736>

Autores: Dr. Roberto Arenas y Dra. Tamar Hagar

Infecciones por *Cándida* spp.

Desde que se generalizó el uso de sustancias antimicrobianas en los establecimientos de salud a partir de los años 50-60, se produjo, un incremento de las infecciones profundas por hongos y en concreto por *Cándida* spp⁽²¹⁾.

Tradicionalmente la especie que suponía un mayor número de aislamientos era *Cándida albicans*. Dos circunstancias en los últimos años han cambiado el panorama: parece haber una tendencia a una mayor frecuencia relativa en el aislamiento de especies de *Cándida* no *albicans* (habitualmente *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*, y con mucho menos frecuencia *C. usitane*), y la sensibilidad de los aislamientos de *Cándida albicans* muestran una resistencia progresivamente creciente a azoles, debido al uso masivo y generalizado de estos desde que se dispone de formulaciones orales. Además, determinadas

especies de *Cándida* no *albicans* presentan baja sensibilidad a azoles, especialmente la *C. glabrata* y *C. krusei* ⁽²¹⁾ ⁽²⁶⁾.

Existen algunas patologías asociadas a las distintas especies de *Cándida*:

- ✚ Candidemia hematogena diseminada/candidemia asociada a catéter
- ✚ Infección urinaria por *Cándida*
- ✚ Neumonía
- ✚ Endocarditis
- ✚ Artritis séptica ⁽²⁰⁾.

CANDIDIASIS

Los hongos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, pero la *C. albicans*, la más frecuente, solo se encuentra como hospedero en el interior del tubo digestivo de mamíferos y aves y se desarrolla dentro de ella; la segunda es la *C. tropicalis*, se aísla en la orofaringe y la *C. glabrata* en la vagina ⁽³²⁾.

La *Cándida* causa 10-16% de los casos de sepsis en unidades de cuidado intensivo neonatal (UCIN). Esta incidencia es inversamente proporcional al peso del recién nacido ⁽³²⁾.

Las onicomycosis y los intertrigos (afección de pliegues cutáneos) predominan en mujeres.

Los factores predisponentes son múltiples y muchas veces pueden combinarse; por ejemplo, en la boca se relacionan con aplicación local de antibióticos o pérdida del espacio interdentario por uso de prótesis inapropiadas; las formas intestinales, con consumo de dietas abundantes en frutas; la onicomycosis de manos, con humedad, contacto con alimentos que tienen alto contenido de azúcares, hábito de chuparse los dedos, o acudir al manicuro; las lesiones en pliegues o pies, con prendas de material sintético como fajas, botas de plástico y pañales desechables; intervención quirúrgica cardiovascular o uso de drogas por vía intravenosa, como heroína ⁽²³⁾ ⁽³³⁾.

Las manifestaciones clínicas son localizadas, diseminadas o sistémicas; pueden afectar piel, mucosas, estructuras profundas y órganos internos. Las alteraciones histopatológicas varían desde una inflamación mínima hasta la supuración o formación de granuloma. La evolución es aguda, subaguda o crónica ⁽²³⁾ ⁽³³⁾.

La transmisión de una persona a otra ocurre en el recién nacido a partir de la madre que padece vaginitis, o puede ser de transmisión sexual a la pareja ⁽²³⁾.

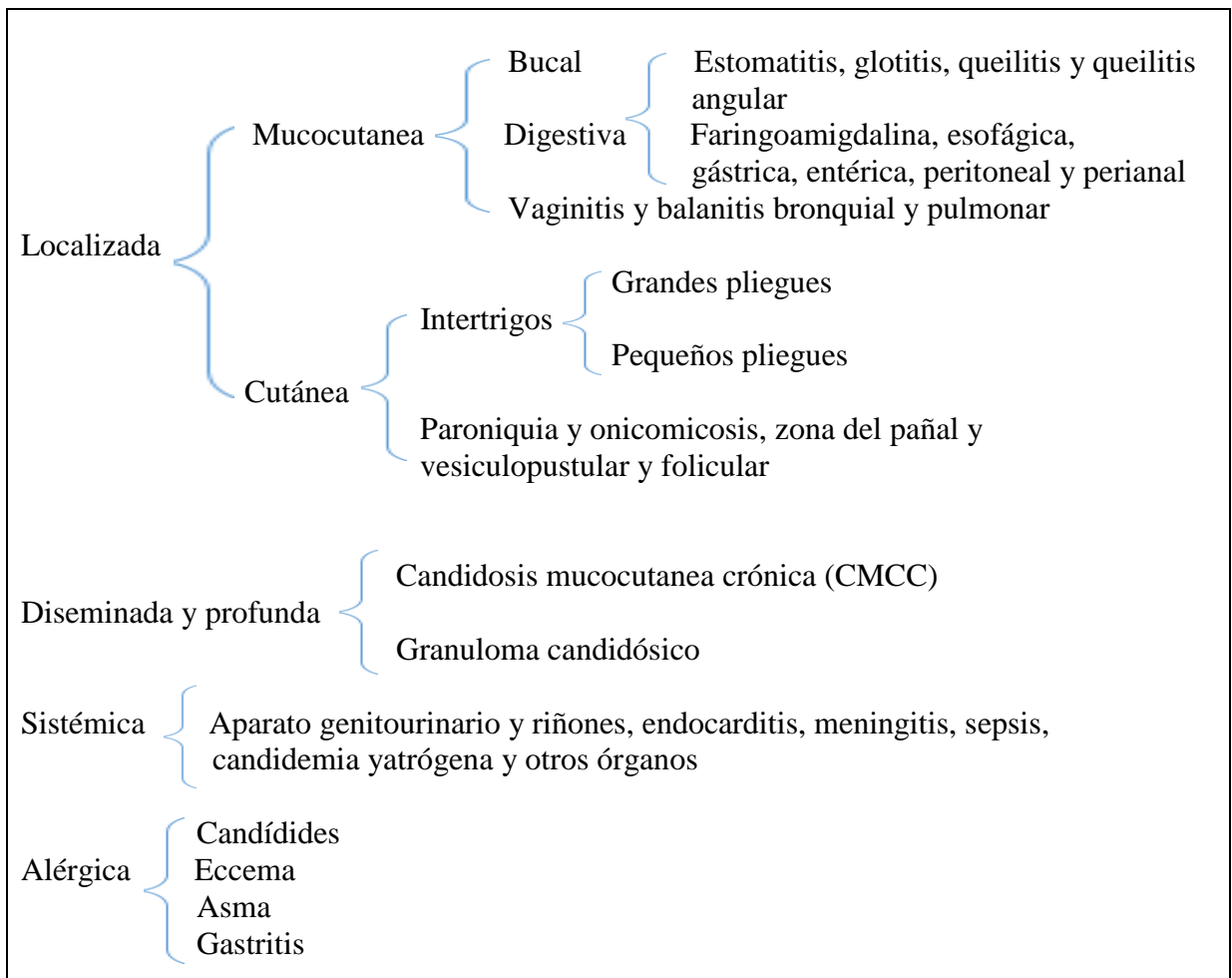


Figura 3: Clasificación de candidosis

Fuente:

<https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1448§ionid=96275198>



Figura 4: Candidiasis orofaríngea

Fuente: <https://www.alamy.es/imagenes/candidiasis-oral.html>

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICÓTICOS

Las pruebas de sensibilidad a los antimicóticos están destinadas a proporcionar información que ayudara al médico a seleccionar el agente antimicótico adecuado, útil para tratar una infección específica. Lamentablemente, las pruebas de sensibilidad a los antimicóticos no progresaron del mismo modo que las de sensibilidad a los agentes antibacterianos. El National Committee for Clinic Laboratory Standards (NCCLS) acepto en forma preliminar el documento M27-A, que son normas actuales para las pruebas de sensibilidad para los antimicóticos contra *Cándida* y *Cryptococcus* ⁽²⁰⁾.

Debe hacerse hincapié en que la metodología y la interpretación de las pruebas de sensibilidad para los antimicóticos aún se encuentran en evolución. Son pruebas costosas y que consumen tiempo, pero pueden ser de valor en las siguientes circunstancias:

- Cuando dentro de una institución se determinan los antibiogramas para los aislamientos.
- Para optimizar el manejo de pacientes con candidiasis orofaríngea refractaria al tratamiento.
- Para optimizar el manejo de pacientes con candidiasis invasora cuando se cuestiona el empleo de azoles en infecciones causadas por otras especies de *Cándida* y no la *albicans* ⁽²⁰⁾.

Los límites para la interpretación de fluconazol, el itraconazol y la flucitosina se basan en las experiencias en pacientes con infecciones de las mucosas, pero parecen ser compatibles con la información obtenida de las infecciones invasoras.

Los problemas que complican las pautas de interpretación incluyen lo siguiente:

- Condición física del paciente (estado inmune)
- Tipo de infección y capacidad de penetración del fármaco en espacios cerrados (en caso de un absceso)
- Dosis del fármaco y su farmacocinética

- Método utilizado para determinar la prueba de sensibilidad y el nivel sérico del fármaco administrado⁽²⁰⁾.

Muchos aislamientos de la misma especie tienen CIM diferente. Algunos aislamientos de *Cándida glabrata* son sensibles al fluconazol, mientras que otros no lo hacen; la tendencia es que la mayoría de los aislamientos son resistentes. Con el método de NCCLS no puede determinar la sensibilidad o la resistencia de la anfoterisina B. Se sugiere que CIM de por lo menos 1,0 ug/mL se considere resistencia; sin embargo, esta información es preliminar. Las pruebas de sensibilidad para el ketoconazol sugirieron que los aislamientos con una CIM entre 0,313 y 16 ug/mL se consideren sensibles⁽²⁰⁾.

La experiencia anecdótica proporciona la mejor experiencia con la quimioterapia con antimicóticos. Por ejemplo, se sabe que los pacientes con infección por *Cándida krusei* no responden al tratamiento con fluconazol⁽²⁰⁾.

ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA

En los últimos años las infecciones micóticas han mostrado un incremento importante en todo el mundo debido al aumento del número de pacientes inmunodeprimidos por diversas causas, como el SIDA, la quimioterapia en pacientes con cáncer, las neutropenias y los receptores de trasplantes sometidos a terapia inmunosupresora. Además, por el uso frecuente de procedimientos invasores como la nutrición parenteral, la diálisis y la hemodiálisis, y por los tratamientos prolongados con antibióticos de amplio espectro y el uso de glucocorticoides.

Un aspecto que ha complicado la situación es el desarrollo de mecanismos de resistencia primaria y secundaria a los antimicóticos por algunas especies de hongos, explicada en parte porque la mayoría de los fármacos son fungistáticos y por la administración prolongada de los tratamientos en el tiempo, que permite la selección de clones resistentes. Entre los mecanismos de resistencia utilizados por los hongos es importante hacer referencia a la sobreproducción de blancos enzimáticos, la implementación de vías metabólicas alternas y la producción de bombas de flujo externo que expulsan los medicamentos al espacio extracelular^{(6) (34) (35)}.

Resistencia a los antimicrobianos

Las bacterias adoptan una serie de estrategias para escapar a la acción de los antimicrobianos. Se pueden distinguir cinco tipos principales:

- Alteraciones de la permeabilidad: Impidiendo que el agente penetre en la bacteria. Es el mecanismo más frecuente. Ej.: Las Pseudomonas son responsables del 15 por 100 de las resistencias a aminoglucósidos. Puede depender:
 - Microorganismo: Por presencia de capsula, por alteraciones en las porinas (canales que existen en la membrana externa de los gramnegativos)
 - Fármaco: Hidrofobia, peso molecular, grado de ionización.
- Alteración del blanco o diana (donde debe actuar el antibiótico): Por ejemplo, la resistencia a macrólidos-lincosamidas viene determinada por una simple metilación del ARN ribosómico. También ocurre esto en aminoglucósidos que, por mutaciones en un solo paso o múltiples pasos se modifica el ARN ribosómico.
- Vía metabólica alterada.
- Hiperproducción de metabolitos.
- Inactivación enzimática: Consiste en la producción de enzimas que inactiven a los antibióticos⁽²⁰⁾.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

Es el método habitual utilizado en los laboratorios de Microbiología Clínica. Es la medida de la sensibilidad de una bacteria a un antibiótico. Consiste en la mínima concentración microbiana de un compuesto que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo en condiciones normalizadas.

Para llevarlo a cabo es necesario utilizar cepas control (de referencia) con el fin de que los resultados sean reproducibles y comparables, después de 24 horas de incubación a 37°C⁽³⁶⁾.

La interpretación de los resultados debe ser cuidadosa pues la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) es muy difícil para hongos, hay factores del hospedero involucrados y no siempre hay una correlación entre la CIM y la respuesta a tratamiento. Como estas técnicas, en general, son laboriosas y requieren de personal entrenado, es recomendable derivar los estudios de susceptibilidad a un laboratorio de referencia⁽³⁷⁾.

CAPÍTULO II

DISEÑO METODOLÓGICO DE LA INVESTIGACIÓN

Tipos de investigación:

NIVEL O ALCANCE

Investigación Descriptiva: Se describieron variables y conceptos por medio de la recolección de información de la literatura científica acerca de ciertas propiedades biológicas y se detalló el procedimiento utilizado para la determinación de la capacidad antimicótica del extracto hexánico de *Hedyosmum* sp., frente a ciertas especies de *Cándida*, pudiendo justificar la investigación realizada y discutir los resultados con lo que dicen otros autores.

DISEÑO

Investigación Cuasi-experimental: Se ha modificado una variable independiente como es la concentración de los extractos estudiados, para observar cómo afecta la variable dependiente (sensibilidad de las especies de *Cándida*). Por otro lado se utilizaron controles positivos y negativos.

SECUENCIA TEMPORAL O CORTE

Investigación Transversal: La investigación se realizó con el extracto hexánico obtenido de la planta *Hedyosmum* sp., recolectada en un lugar específico (bosque natural Jaracón) y en un período de tiempo determinado (Abril - Agosto 2019).

ENFOQUE O CARÁCTER

Investigación Mixta: Se recolectaron datos relacionados con la investigación, tanto del análisis de datos cualitativos (observación del grado de susceptibilidad o halos de inhibición), como de los cuantitativos ya que se han efectuado detecciones numéricas (medición de halos y la concentración mínima inhibitoria), lo que nos permitió realizar la evaluación, interpretación y comparación de los resultados, así como la determinación de la causalidad de una enfermedad microbiana o infecciosa.

CRONOLOGÍA DE LOS HECHOS

Investigación Prospectiva: Debido a que el inicio del estudio es anterior a los hechos estudiados.

MÉTODO Inductivo: Esta investigación parte de lo general a lo particular, mediante un procedimiento analítico sintético.

Población:

- Especie vegetal perteneciente al género *Hedyosmum* y cepas de *Cándidas*.

Muestras:

Material vegetal:

- Hojas y ramas de *Hedyosmum* sp. a distintas concentraciones, que se recolectaron en la comunidad de Jaracón del Cantón Colta, Provincia de Chimborazo – Ecuador.

Cepas Micóticas:

- Cepas de *Cándida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, que fueron donadas por la Máster Lenis Buela de la Universidad de Cuenca, Ecuador.
(Ver anexo 1)

Variables de estudio:

- **Variable Independiente:** Diferentes concentraciones del extracto hexánico de las hojas y ramas o tallos de *Hedyosmum* sp.
- **Variable Dependiente:** Actividad antimicótica frente a las cepas de *Cándida* de interés clínico.

Técnicas e Instrumentos:

- **Técnica:** Observación directa
- **Instrumentos:** guía de observación, cámara fotográfica.

PROCEDIMIENTOS DE LA INVESTIGACIÓN

Obtención del Extracto Hexánico de las hojas y ramas o tallos de la especie vegetal *Hedyosmum* sp., mediante la técnica de Maceración:

1. Se recolectaron 200 g de hojas y ramas de la planta *Hedyosmum*, los cuales se limpiaron y secaron a una temperatura de 37°- 40°C.
2. Se realizó la trituration de las plantas recolectadas en un mortero con pistilo.
3. Se procedió a realizar la técnica de Maceración trasvasando en un matraz erlenmeyer las hojas y en otro erlenmeyer las ramas, a las cuales se adicionaron 200 mL del solvente (Hexano); posteriormente se los agitó y tapó.
4. Se dejó reposar a temperatura ambiente durante 3 días, agitando el contenido esporádicamente hasta obtener los extractos.
5. Pasado los 3 días se procedió a filtrar en otros erlenmeyer los extractos hexánicos obtenidos con la ayuda de una malla (proceso realizado 3 veces), la última filtración realizándolo en un balón aforado.
6. Se aplicó un proceso de rota-evaporación utilizando un evaporador rotativo.
7. Se pesaron los productos obtenidos y se almacenaron en una refrigeradora a 4°C en unos envases herméticamente cerrados.
8. El rendimiento de cada extracto se determinó en función del peso del producto obtenido al final del proceso. (Ver anexo 2)

Procedimiento para realizar la solución madre o Stock del extracto:

1. La solución madre de los extractos se preparó con Dimetil-sulfóxido (DMSO) a la concentración de 1 g/mL.
2. Se pesó 1g del extracto hexánico de las hojas y ramas de *Hedyosmum* sp., colocándolos posteriormente en unos envases adecuados.
3. Se añadió 1 mL de DMSO a los envases que contenían los extractos pesados, luego se mezclaron con un Vortex para homogenizar la solución (Solución madre).
4. Se dejó reposar a temperatura ambiente envueltos con papel Parafilm. (Ver anexo 3)

Preparación de extractos a diferentes concentraciones:

1. Se colocó 500 uL de DMSO y 500 uL de la S. Stock en unos tubos Eppendorff.
2. Se mezcló con la ayuda de un Vórtex hasta su total homogenización.

3. Las soluciones se guardaron en una nevera a 4 °C cubiertos con papel Parafilm hasta el momento de su uso.
4. Las concentraciones estudiadas fueron de 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.062, 0.031, 0.0155, 0.0077 g/mL. (Ver anexo 4)

Determinación de la actividad antimicótica

Mantenimiento y conservación de las *Cándidas* estudiadas:

1. Las cepas micóticas fueron conservadas en agar Sabouraud a 4 °C, llevándose a cabo resiembras periódicas o replicaciones de las cepas.

Preparación del pre-inóculo:

1. El pre-inóculo es un cultivo fresco, la cual se preparó a partir de cultivos sólidos de las cepas micóticas replicadas y conservadas.
2. Dentro de la cámara de flujo laminar se encendió el mechero y se desinfecto el asa con algodón y alcohol flameándolo hasta que se caliente y se vea un rojo intenso.
3. Se recogió y transfirió 1 o 2 colonias de las cepas a unas placas mono Petri que contenían un medio sólido de Agar Sabouraud.
4. Se realizó una siembra por rastro o agotamiento de las colonias de las cinco especies de *Cándida* en su respectiva placa Petri (cada una con su respectiva rotulación), obteniendo así colonias aisladas.
5. Se guardó en refrigeración durante 30 min – 2 horas a 4°C (correcta difusión).
6. Se puso a incubar durante un periodo de 18 - 24 horas a 37°C. (Ver anexo 5)

Preparación del inóculo:

1. El inóculo se preparó a partir del pre-inóculo obtenido (crecimiento en medio sólido con un óptimo crecimiento)
2. Se colocó 18 mL de solución salina estéril al 0,89% en unos tubos herméticos y se realizó una suspensión de cada una de las cepas micóticas replicadas.
3. Transcurrido el periodo de incubación del pre-inóculo, con la ayuda de un asa estéril se recogió 1 o más colonias aisladas de las cepas de *Cándidas* (todas las especies) y se transfirieron a los tubos con solución salina
4. Se homogenizo hasta obtener la turbidez necesaria.

5. Se comparó la turbidez de las cepas con el patrón McFarland (utilizado como patrón de turbidez en la preparación de suspensiones de microorganismos) de escala 1 que corresponde a un cultivo de una densidad celular aproximada de $3,0 \times 10^9$ UFC/mL.
6. Se guardó en refrigeración a 4°C hasta el momento de su uso. (Ver anexo 6)

Prueba de la actividad antimicrobiana mediante el Método Kirby Bauer modificado

Preparación del medio de cultivo (MHA modificado):

1. Se pesó 38g de Agar Müller Hinton y se colocó en un matraz Erlenmeyer con agitador, se adiciono 1000 mL de agua destilada (preparación para 1L, si se requiere en menor cantidad se realiza los cálculos correspondientes) (Solución de trabajo).
2. La preparación se calentó en una plancha térmica, esperando 10 – 15 minutos hasta que llegue a su punto de ebullición. Luego se dejó reposar la preparación, esperando que baje la temperatura.
3. Se pesó 20g de Glucosa pura y se agregó en la solución de trabajo, después se adiciono 0,25 mL de Azul de Metileno puro.
4. Se dispenseo 25 mL de la solución de trabajo en unos tubos de tapa rosca.
5. Se esterilizaron los medios durante 10 minutos, debido a que la Solución contiene glucosa y se puede caramelizar. (Ver anexo 7)

Siembra e impregnación de discos de los extractos, pre-incubación e incubación de las placas:

1. Se colocaron 1 mL de las suspensiones de las cepas de *Cándida* en los tubos con los medios preparados y esterilizados de Agar Müller Hinton.
2. Se homogenizaron los medios resultantes.
3. Se colocaron los medios en las placas Petri, distribuyéndolos homogéneamente por toda la placa para que se solidifique en unos 10 min (repetir el proceso con los demás tubos para todas las especies de *Cándida* en estudio).
4. Con una pinza estéril se colocó los discos fabricados manualmente con papel filtro sumergiendo en las diferentes concentraciones del extracto hexánico correspondiente (1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.062, 0.031, 0.0155, 0.0077 g/mL), luego se impregno los discos en su concentración correspondiente, colocándolos en distancias adecuadas.

5. Además se colocaron discos de antibióticos para los controles (discos comerciales de Fluconazol de 25 ug para el control positivo y discos manuales con DMSO para el control negativo).
6. Estas pruebas de susceptibilidad se realizaron por duplicado para cada ensayo.
7. Las placas fueron pre-incubadas en refrigeración a 4°C durante 30 min - 2 horas para una correcta difusión de los componentes de trabajo.
8. Posteriormente fueron incubadas a 37°C durante 24 horas, si no hay crecimiento durante el periodo mencionado hay que incubarlos por otras 24 horas (48 horas).
(Ver anexo 8)

Lectura de resultados:

1. Al pasar las 24 horas de incubación se realizó la lectura de los resultados para ver si hubo presencia o ausencia de halos de inhibición (cuyo diámetro fue medido en mm) alrededor de los discos que contenían las distintas concentraciones de extracto hexánico.
2. Las CMIs fueron determinadas mediante la evaluación de la menor concentración en la cual el extracto presentó actividad antimicótica, partiendo de la concentración inicial de 1 g/mL, frente a cada una de las especies de *Cándida*.
3. Los resultados fueron tabulados en el programa de procesamiento de datos Excel.
(Ver anexo 9)

PROCESAMIENTO ESTADISTICO:

Se realizaron tablas descriptivas de los resultados obtenidos y el porcentaje, en la cual se utilizó las hojas de cálculo aplicando el programa estadístico Excel para el registro interno del trabajo realizado.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimiento de los extractos hexánicos

El análisis se comenzó con la recolección de 200 g de hojas de *Hedyosmum* sp., posteriormente fueron trituradas y se realizó la técnica maceración usando la solución Hexano, y por último aplicando la evaporación rotativa. Se obtuvo 1,50 g de extracto, lo que indicó un rendimiento de 1,5%, estos resultados concuerdan con lo descrito por Pazmiño⁽³⁸⁾ quien ha realizado el mismo ensayo. Mientras que Zaruma⁽³⁹⁾, en su investigación acerca de la actividad antibacteriana del extracto hexánico de las hojas de *Hedyosmum strigosum*, obtuvo 10,33 g de extracto a partir de 500 g de las hojas secas, con un rendimiento de 2,06%, siendo superior al obtenido en el ensayo.

De igual manera se realizó el mismo procedimiento con los 200 g de las ramas o tallos triturados de *Hedyosmum* sp., del cual se obtuvo 1,82 g de extracto, por lo que el rendimiento fue de 0,9%, coincidiendo con Valarezo⁽⁴⁰⁾ pues ha realizado este mismo ensayo. Mientras este rendimiento es menor al obtenido por Tinoco⁽⁴¹⁾, quien en un estudio realizado con *Hedyosmum racemosum* indicó un rendimiento de 1,95%, ya que a partir de 660 g de tallos secos, obtuvo 12,88 g de extracto hexánico.

Análisis general de la actividad antimicótica aplicada a las hojas y a las ramas o tallos del extracto hexánico de *Hedyosmum* sp.

En la tabla 1 se muestran los valores resultantes de la actividad antimicótica de los extractos hexánicos en todas las concentraciones utilizadas de las hojas de *Hedyosmum* sp., determinadas frente a las distintas cepas micóticas, También se puede destacar los controles utilizados en cada una de las cepas micóticas estudiadas, en la cual, como control positivo se utilizó el Fluconazol de 25 µg (disco de antibiótico comercial) y como control negativo el Dimetil Sulfóxido (DMSO).

Tabla 1. Actividad antimicótica del extracto hexánico de las hojas de *Hedyosmum* sp., expresado por los halos de inhibición (mm), frente a las especies de *Cándida*.

EXTRACTO HEXÁNICO DE LAS HOJAS DE <i>HEDYOSMUM</i> SP.										
CÁNDIDAS	Halos de inhibición (mm) $\bar{X} \pm SD$								Control Positivo	Control negativo
	Concentraciones g/mL								Fluconazol (25µg)	DMSO
	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,0155	0,0077		
<i>C. albicans</i>	14 ± 0,18	12 ± 0,08	13 ± 0,16	11 ± 0,14	10 ± 0,10	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	16	0
<i>C. glabrata</i>	14 ± 0,22	13 ± 0,24	12 ± 0,23	11 ± 0,21	10 ± 0,17	9 ± 0,15	0 ± 0	0 ± 0	38	0
<i>C. tropicalis</i>	15 ± 0,13	14 ± 0,13	13 ± 0,15	12 ± 0,14	11 ± 0,06	9 ± 0,10	0 ± 0	0 ± 0	20	0
<i>C. parapsilosis</i>	12 ± 0,18	12 ± 0,17	10 ± 0,06	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	37	0
<i>C. krusei</i>	11 ± 0,10	10 ± 0	10 ± 0,05	10 ± 0,07	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	18	0

Fuente: Resultados de la Prueba de susceptibilidad o Kirby Bauer

Realizado por: Nelson Javier Chagnama Cuñas

En la tabla 2 se puede apreciar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) del extracto hexánico de las hojas de *Hedyosmum* sp., que se obtuvieron realizando ensayos en diferentes concentraciones (1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.062, 0.031, 0.0155, 0.0077 g/mL) frente a cada una de las cepas micóticas analizadas.

Tabla 2. Valor de CMI de las hojas de *Hedyosmum* sp., de cada una de las especies de *Cándida* estudiadas con su respectivo control.

CÁNDIDAS	Extracto hexánico de las hojas de <i>Hedyosmum</i> sp.
	CMI (g/mL)
<i>Cándida albicans</i>	0,062
<i>Cándida glabrata</i>	0,031
<i>Cándida tropicalis</i>	0,031
<i>Cándida parapsilosis</i>	0,25
<i>Cándida krusei</i>	0,125

Fuente: Interpretación de la CMI

Realizado por: Nelson Javier Chagnama Cuñas

Los resultados obtenidos indican que el extracto hexánico de las hojas de *Hedyosmun* sp fue activo, mostrando un efecto inhibitorio del crecimiento frente a todas las cepas de *Cándida* estudiadas, resultando *Cándida tropicalis* la levadura más sensible a la acción del extracto a la máxima concentración estudiada (1g/mL) presentando un halo de inhibición de 15 mm, seguido de *Cándida albicans* y *Cándida glabrata* con un halo de inhibición de 14 mm, *Cándida parapsilosis* 12 mm y por último *Cándida krusei* con 11 mm de halo de inhibición.

El valor obtenido de las CMI de las hojas de *Hedyosmun* sp., mostraron que *C. glabrata*, y *C. tropicalis* fueron mucho más sensible a la acción del extracto hexánico de las hojas de *Hedyosmun* sp obteniendo así una CMI de 0,031 g/mL para ambas cepas, seguido de *Cándida albicans* con una CMI de 0,062 g/mL, *Cándida krusei* con una CMI de 0,125 g/mL y por último *C. parapsilosis* con una CMI de 0,25g/mL.

Según Kirchner et al. ⁽⁴²⁾ en su estudio realizado de *Hedyosmun brasiliense* en aceite esencial, determinan que su actividad es buena contra los dermatofitos específicamente estudiaron *T. mentagrophytes* , obteniendo un valor de CMI de 0,25 µg/mL y para *T. rubrum* un valor de 0,125 µg/mL. En la actividad antifúngica analizada por Solano ⁽⁴³⁾ con extractos metanolico presentó moderada actividad antifúngica contra *T. rubrum* con un valor de CMI de 500µg/ml; mientras que, fue inactivo para *T. mentagrophytes*. Esta actividad antifúngica ha sido reportada en otros estudios de extractos de algunas plantas de la familia Chlorantaceae. Con estos resultados se demuestra que la obtención de extractos en especies del mismo género no es la misma, atribuyéndole esta variación a la eliminación del solvente, ya que al eliminar los residuos del mismo en el extracto húmedo posiblemente no se realizó en la misma proporción ⁽⁴²⁾.

En la tabla 3 se muestran los valores resultantes de la actividad antimicótica de los extractos hexánicos en todas las concentraciones utilizadas de las ramas o tallos de *Hedyosmun* sp., determinadas frente a las distintas cepas micóticas. También se puede destacar los controles utilizados en cada una de las cepas micóticas estudiadas, en la cual, como control positivo se utilizó el Fluconazol de 25 µg (disco de antibiótico comercial) y como control negativo el Dimetil Sulfoxido (DMSO).

Tabla 3. Actividad antimicótica del extracto hexánico de las ramas o tallos de *Hedyosmum* sp., expresado por los halos de inhibición (mm), frente a las especies de *Cándida*.

EXTRACTO HEXÁNICO DE RAMAS O TALLOS DE <i>HEDYOSMUM</i> SP.								
CÁNDIDAS	Halos de inhibición (mm) $\bar{X} \pm SD$						Control Positivo	Control negativo
	Concentraciones g/mL						Fluconazol 25 μ g	DMSO
	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031		
<i>C. albicans</i>	12 \pm 0,14	11 \pm 0,56	10 \pm 0,52	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	16	0
<i>C. glabrata</i>	10 \pm 0,26	11 \pm 0,30	10 \pm 0,29	9 \pm 0,06	0 \pm 0	0 \pm 0	38	0
<i>C. tropicalis</i>	12 \pm 0,13	12 \pm 0,05	10 \pm 0,07	9 \pm 0,07	0 \pm 0	0 \pm 0	20	0
<i>C. parapsilosis</i>	10 \pm 0,05	10 \pm 0,05	10 \pm 0,07	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	37	0
<i>C. krusei</i>	10 \pm 0,07	10 \pm 0,07	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	18	0

Fuente: Resultados de la Prueba de susceptibilidad o Kirby Bauer
Realizado por: Nelson Javier Chagnama Cuñas

En la tabla 4 se puede apreciar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) del extracto hexánico de las ramas o tallos de *Hedyosmum* sp., que se obtuvieron realizando ensayos en diferentes concentraciones (1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.062 y 0,031 g/mL) frente a cada una de las cepas micóticas analizadas.

Tabla 4. Valor de CMI de las ramas o tallos de *Hedyosmum* sp., de cada una de las especies de *Cándida* estudiadas con su respectivo control.

CÁNDIDAS	Extracto hexánico de ramas o tallos de <i>Hedyosmum</i> sp.
	CMI (g/mL)
<i>Cándida albicans</i>	0,25
<i>Cándida glabrata</i>	0,125
<i>Cándida tropicalis</i>	0,125
<i>Cándida parapsilosis</i>	0,25
<i>Cándida krusei</i>	0,5

Fuente: Interpretación de la CMI
Realizado por: Nelson Javier Chagnama Cuñas

Los resultados obtenidos de la Tabla 3 indican que la actividad del extracto hexánico de las hojas de *Hedyosmum* sp., a concentraciones ≤ 1 g/mL mostraron, en mayor o menor

proporción, un efecto inhibitorio del crecimiento de todas las cepas micóticas ensayadas, resultando la *Cándida glabrata* y la *Cándida tropicalis* las levaduras más sensibles a la acción del extracto debido a que se formaron halos de inhibición en la mayoría de las concentraciones analizadas, seguido de la actividad encontrada frente a *Cándida albicans*; para la *Cándida parapsilosis*, mientras que la menos activa para la actividad del extracto fue la *Cándida krusei*.

El valor obtenido de las CMI se identifica en la Tabla 4, observándose una CMI menor para *C. glabrata* y *C. tropicalis* de 0,125 g/mL, seguida de *Cándida albicans* y *C. parapsilosis* de 0,125 y por último *Cándida krusei* con una CMI de 0,5 g/mL.

Comparando la actividad de los dos extractos hexánicos de *Hedyosmum* sp estudiados (hojas y ramas) podemos observar que ambos extractos mostraron actividad inhibitoria frente a todas las cepas micóticas estudiadas, sin embargo el extracto de las hojas fue mucho más activo mostrando CMI de menor concentración.

Paredes⁽⁴²⁾ menciona que en la familia Chloranthaceae el género *Hedyosmum* cuenta con pocos estudios, a pesar de ser el más abundante, sin embargo de toda la familia se han obtenido alrededor de 124 compuestos, clasificados en terpenoides, flavonoides, cumarinas, ácidos orgánicos, amidas y esteroides. Muchas plantas de esta familia han presentado actividad antibacteriana y este efecto se atribuye a la composición de los aceites esenciales, presencia de ácidos orgánicos y sesquiterpenos.

Ocampo⁽⁴⁴⁾ dice que el *H. racemosum* no presenta estudios en hongos, se reporta actividad de (125 µg/mL) del aceite esencial de *H. angustifolium* en *C. albicans*, también existe estudios de actividad moderada del extracto *H. mexicanum* contra los hongos *S. schenki* y *F. pedroso* de 0.1 mg/mL y 0.05 mg/mL respectivamente.

Esta actividad antifúngica de extractos ha sido reportada en otros estudios de actividad antimicrobiana de extractos de otras especies de *Hedyosmum* como *H. brasilense* y *H. arborescens*, donde se ha determinado que poseen una buena actividad contra dermatofitos. La actividad antifúngica de este extracto puede deberse a un mecanismo de sinergia entre sus componentes, los cuales interactúan con la pared delgada e irregular de los hongos, el sinergismo se define como la respuesta farmacológica superior, producida cuando dos o más componentes actúan juntos, que cuando actúan por separado⁽⁴¹⁾.

CONCLUSIONES:

1. Se obtuvo 1.50 g de extracto, lo que indicó un rendimiento de 1.5% para el extracto de las hojas, además se obtuvo 1.82 g de extracto con un rendimiento de 0.9% para el extracto de las ramas o tallos de *Hedyosmum* sp.
2. Los extractos hexánicos de *Hedyosmum* sp fueron activos frente a las cepas micóticas estudiadas: *Cándida albicans*, *Cándida glabrata*, *Cándida tropicalis*, *Cándida parapsilosis* y *Cándida krusei*. Siendo mucho más activo el extracto de las hojas frente a *Cándida glabrata* y *Cándida tropicalis* con una CMI de 0,031g/mL.
3. Los extractos hexánicos de *Hedyosmum* sp. arrojaron CMI frente a las especies de *Cándidas* estudiadas desde 0,5 g/mL (*C. Krusei*) hasta 0,031g /mL (*C. glabrata* y *C. tropicalis*), mostrando que son útiles para ser usados como antimicóticos.

RECOMENDACIONES:

1. Los extractos de las plantas medicinales como el *Hedyosmum*, deben ser extraídos con gran precisión aplicando todo el protocolo para obtener a futuro resultados eficaces en los distintos ensayos que se realice, deben ser conservados en recipientes adecuados para evitar la evaporación, guardarlos a una temperatura óptima. Se sugiere esterilizar cada material que se use en el análisis y manipularlos de una manera adecuada. Las cepas de estudio deben utilizarse correctamente para evitar una posible contaminación directa o ambiental.
2. La investigación conjuntamente con el análisis y la interpretación de los resultados de la actividad microbiana contribuye a combatir varias enfermedades especialmente las infecciosas, por ello se debe aplicar el método adecuado para el análisis como es el Kirby Bauer o Difusión en disco mediante la obtención de una buena cepa del microorganismo que se desea analizar (especies de *Cándida*), realizando una adecuada preparación y esterilización de los medios, colocando y fijando correctamente los discos impregnados en los extractos, además realizando una buena lectura e interpretación de los resultados que se obtienen con la medición exacta de los halos y con la CMI de las concentraciones en estudio; entre otros aspectos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Albornoz A. Medicina Tradicional Herbaria. 3rd ed. Caracas: Instituto Farmacoterápico Latino S.A.; 1997.
2. Diario El Norte I. La medicina ancestral y los pueblos indígenas. ecuatorianoen vivo. 2015 Marzo: p. 1.
3. Mantilla J, Sanabria A. Actividad Antibacteriana de Plantas Superiores Colombianas. Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas. 1985; Volumen 4(Número 2): p. p. 25-33.
4. Primo V, Rovera M, Zanon S, Oliva M, Demo M, Daghero J, et al. Determinación de la actividad antibacteriana y antiviral del aceite esencial de *Minthostachys verticillata* (Griseb) Epling. Revista argentina de microbiología. 2001 Abril-Junio; 33(2).
5. Burton A, Falkenberg T, Smith M, Zhang Q, Zhang X, Boerma T, et al. Medicamentos Esenciales y Productos de Salud. [Internet].; 2013 [citado 2019]. Disponible en: <https://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21201es/s21201es.pdf>.
6. Mesa A, Bueno Sánchez J, Betancur L. Productos naturales con actividad antimicótico. Researchgate. 2014 Mayo 22; 22: p. 62-69.
7. Harry H, Simon J, Regalado J. Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales Ginebra (Suiza); 2003.
8. Flores C. Las plantas, el poder de lo natural. Expreso. 2018 Abril: p. 2.
9. Comercio GE. Un estudio de las plantas medicinales de Chimborazo. E IComercio. 2017 Abril: p. 2.
10. Maggi E. Plantas medicinales, la "farmacia" de los pueblos ancestrales. EL TELÉGRAFO. 2018 Mayo: p. 2.
11. Le Loc'h JP. Lista de Plantas Medicinales Comunes en la Subregión Andina. 2nd ed. Lima, Perú; 2014.
12. Zapata F, Cardona N. Lo que debemos saber sobre los métodos de sensibilidad. Scielo. 2012 Junio; Volumen 26(No.1).
13. Cruz D, López V. Sgpwe. [Internet].; 2018. Disponible en: http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/ifig/Plantas_medicinales_Seminario_Final_Silva_Nataly.pdf.

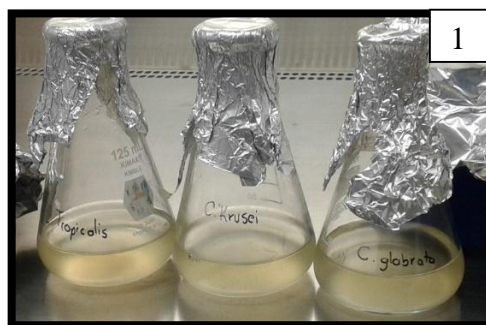
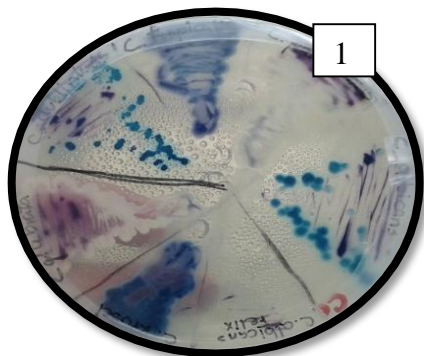
14. Gomez Orea D, Rodriguez Sanchez JJ, Baquero G. Las Plantas de Extractos bases para un Plan de Desarrollo del Sector. 37th ed. Mateos J, editor. Madrid: Ediciones Mundi-prensa; 199.
15. López N. Anfaco. [Internet].; 2011 [citado 2019]. Disponible en: <http://www.anfaco.es/fotos/biblioteca/docs/congresos/transferencia2011.pdf>.
16. Farmacognosia. Farmacognosia. [Internet].; 2018 [citado 2019 Julio 26]. Disponible en: <https://www.plantas-medicinal-farmacognosia.com/temas/m%C3%A9todos-de-extracci%C3%B3n/>.
17. Kubitzki K, Rohwer J, Bittrich V. Fundacion Wikimedia. [Internet].; 2017. Disponible en: <https://es.wikipedia.org/wiki/Hedyosmum>.
18. Moreno Jaramillo V. Determinación fisicoquímica y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *Hedyosmum purpurascens* (Chloranthaceae) de la provincia de Loja. Investigación científica. Loja: Universidad Tecnica Particular de Loja, Biquímica Farceutica; 2014. Report No.: 1.
19. Torres Rodríguez SH, Tovar Torres MC, García V, Lucena ME, Araujo Baptista L. Composición química del aceite esencial de las hojas de *Hedyosmum luteynii* Todzia (Chloranthaceae). Scielo. 2018 Junio; vol.25(no.2).
20. Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. Diagnostico Microbiologico. 11th ed. Elvieser S, editor. Madrid - España: Editorial Medica Panamericana; 2004.
21. Buzon M, Borja M, Anton Santos J, Garcia Pozuelo J, Borja de Miguel C, Alvarez R, et al. Manual AMIR IF Infecciosas y Microbiología. 4th ed.: Grafinter, S.L.; 2012.
22. Delgado A, Polanco A, Amich S, Prieto S, Salve L. Laboratorio Clinico Microbiologia. 2nd ed. Madrid - España: Interamericana; 2001.
23. Arenas Guzman R, Torres Guerrero E, Vasquez del Mercado E. Micologia Medica Ilustrada. 4th ed. Bernal M, editor. Mexico D.F.: Mc Graw Hill; 2011.
24. Pardi G, Cardozo E. Algunas consideraciones sobre *Cándida albicans* como Agente Etiológico de Candidiasis bucal. Actaodontologica. 2012 Febrero; 40(1).
25. Oddo A, Zuñiga C, Fernandez E, Garcia R. Candida Albicans. Blogspot. 2007 Noviembre; 1.
26. Roig Álvarez T. Infección por especies de *Candida* durante los cuidados intensivos neonatales. Scielo. 2008 Julio-Septiembre; v.80(n.3).
27. Tapia C. *Candida glabrata*. Scielo. 2008 Agosto; v.25(n.4).

28. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*. 2012 Marzo; Volume 36(Num. 2): p. 288–305.
29. Hautala T, Pfaller M. Wikipedia. [Internet].; 2019 [citado 2019 Julio 24. Disponible en: https://es.wikipedia.org/wiki/Candida_krusei.
30. Guinea J, Sánchez M, Cuevas O, Peláez T, Bouza E. Mecanismos de resistencia al fluconazol en *Candida krusei* : la contribución de las bombas de reflujo. *Oxford academic*. 2016; Volumen 44(Número 6).
31. Treviño R, González J, Garza E, González G. *Cándida parapsilosis*, una amenaza desafiante. *Elsevier - Revista Medica Universitaria*. 2012 Julio; Vol. 14(Núm. 56).
32. Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. *Diagnostico Microbiológico Texto y Atlas a color*. 5th ed. Alvear M, editor. Buenos Aires - Argentina: Editorial Medica Panamericana; 2004.
33. Castañón Olivares L. *Facmed*. [Internet].; 2016 [citado 2019 Julio. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/candidosis.html>.
34. Torres S, Barbarú A, Lema M. Análisis Fitoquímico de un Extracto de la Especie Forestal Nativa TARQUI (*HEDYOSMUM SCABRUM*). *Mikarimin-Revista Científica Multidisciplinaria*. 2016 Octubre; 1.
35. Kirchner K, Wisniewsk , Cruz A, Biavatti M, Netz D. Composición química y actividad antimicrobiana de *Hedyosmum brasiliense* Miq., *Chloranthaceae*, aceite esencial. *Scielo*. 2010 Mayo; vol.20(no.5).
36. Vitek. *Idex-Actualizacion en diagnóstico*. [Internet].; 2018 [citado 2019 Julio. Disponible en: <https://www.idexx.es/files/mic-gui%CC%81a-microbiolo%CC%81gica-es.pdf>.
37. Cecilia V, Tapia P. Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. *Scielo*. 2009 Abril; v.26(n.2).
38. Pazmiño C. *Dspace*. [Internet].; 2018 [citado 2019 Julio. Disponible en: <http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/5556>.
39. Zaruma J. *Dspace*. [Internet].; 2015 [citado 2019 Julio. Disponible en: <http://dspace.utpl.edu.ec/handle/123456789/13439>.
40. Valarezo S. *Dspace*. [Internet].; 2018 [citado 2019 Julio. Disponible en: <http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/5555>.

41. Tinoco D. Dspace. [Internet].; 2013 [citado 2019 Julio. Disponible en: <http://dspace.utpl.edu.ec/handle/123456789/7887>.
42. Paredes M. Dspace. [Internet].; 2013 [citado 2019 Julio. Disponible en: <http://dspace.utpl.edu.ec/handle/123456789/7896>.
43. Solano de la Sala Lozano E. Dspace. [Internet].; 2015 [citado 2019 Julio. Disponible en:<http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/12133/1/Solano%20de%20la%20Sala%20Lozano%20Estefany%20Sofia.pdf>.
44. Ocampo M. Dspace. [Internet].; 2013 [citado 2019 Julio. Disponible en: <http://dspace.utpl.edu.ec/handle/123456789/7866>.

ANEXOS

ANEXO 1. Muestras a utilizar



1. Cepas Micóticas de *Cándidas* y 2. Extractos de Plantas medicinales.

ANEXO 2. Obtención del Extracto Hexánico



Extracción mediante la técnica de Maceración de los extractos de la planta *Hedysmum* sp.

ANEXO 3. Preparación de la Solución madre o Stock



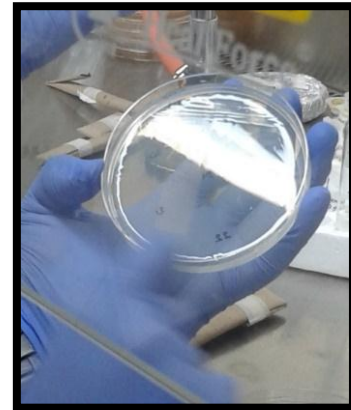
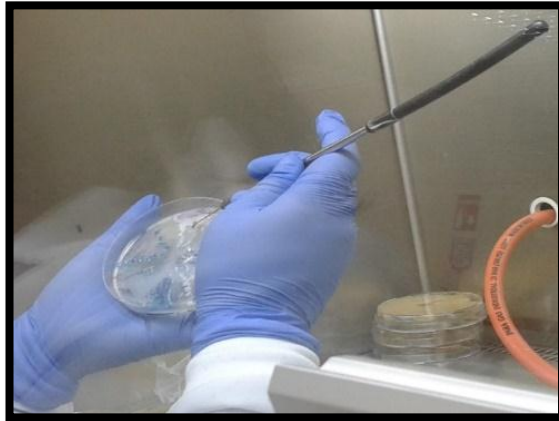
Pesaje de los extractos obtenidos y adición del DMSO para obtener el STOCK.

ANEXO 4. Dilución de los Extractos a distintas concentraciones



Disminución de concentraciones de los extractos hexánicos de las hojas y ramas o tallos de *Hedyosmum* sp.

ANEXO 5. Preparación del pre-inóculo



Transferencia de una o dos colonias a una placa Petri con medio Sabouraud y siembra de las colonias de *Cándida*.

ANEXO 6. Preparación del inóculo



Suspensión en tubos con solución salina de las cepas replicadas y verificación de la turbidez de con el patrón McFarland.

ANEXO 7. Preparación del medio de cultivo (MHA modificado)



Calentamiento del A. MH



Enfriado del medio



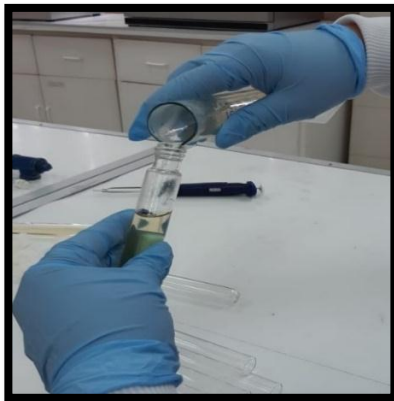
Adición de la Glucosa pura



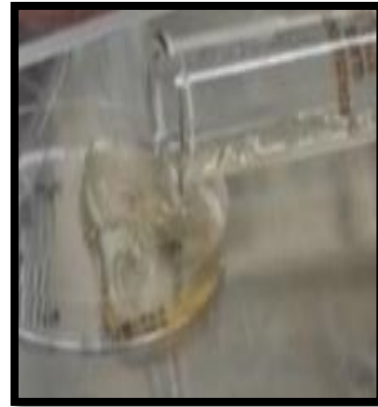
Adición del Azul del metileno



Mezcla de los medios añadidos



Colocando el medio en un tubo rosca



Colocando el medio con cepas en placas Petri

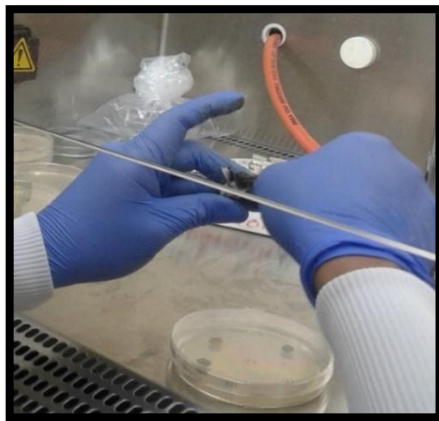
ANEXO 8. Siembra e impregnación de discos



Dispensado del medio en las placas Petri



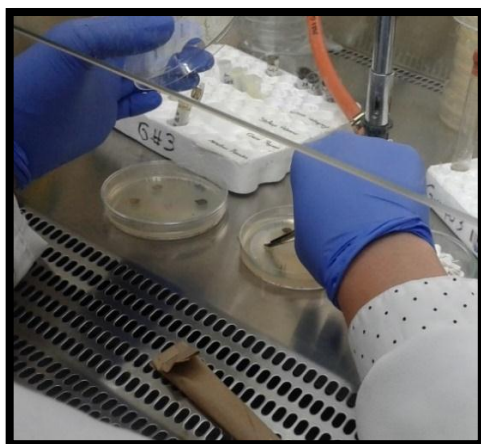
Discos de papel filtro para la prueba de susceptibilidad



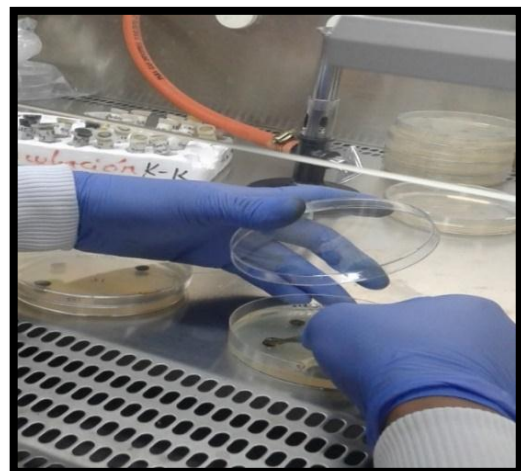
Recolección del extracto con los discos



Recolección del extracto con los discos



Colocando adecuadamente los discos

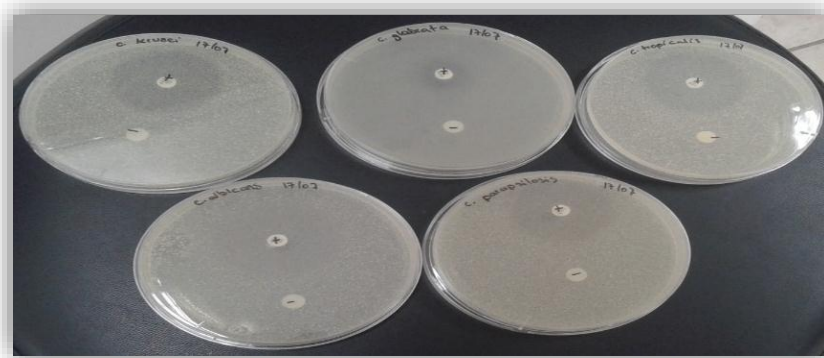


Fijación de los discos en las placas Petri

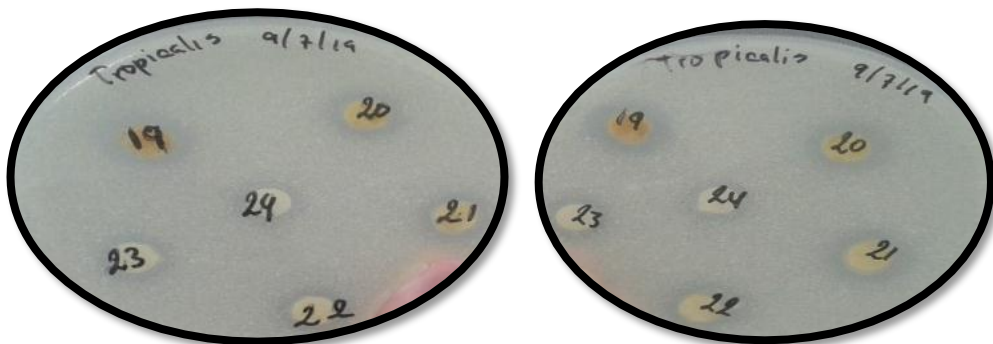
ANEXO 9. LECTURA DE RESULTADOS



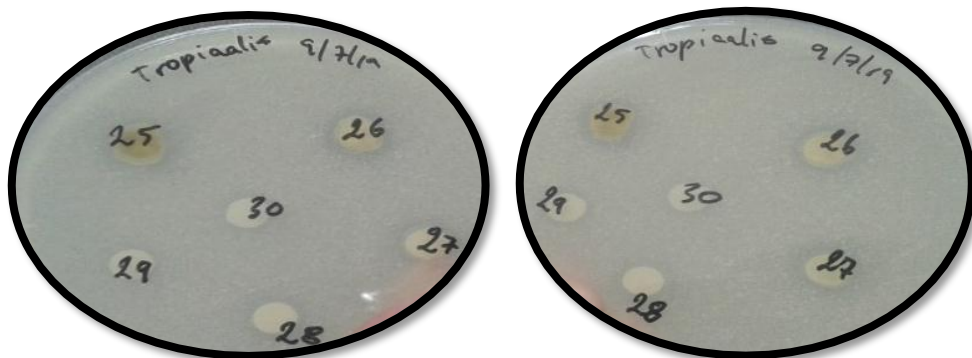
Control de crecimiento



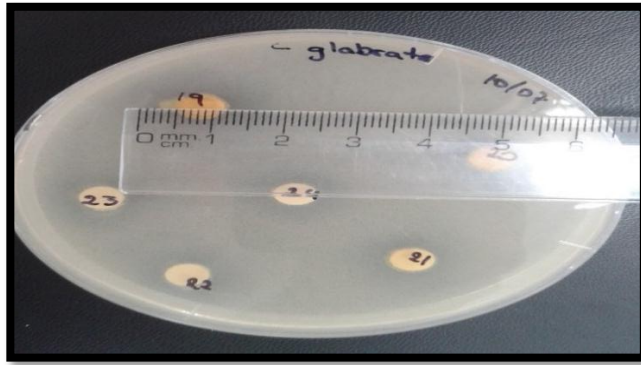
Control positivo con Fluconazol y negativo con DMSO de los extractos



Observación de los halos de inhibición (HOJAS)



Observación de los halos de inhibición (RAMAS)



Medición y Lectura de Halos



Placas realizadas de todos los hongos



Reducción de concentraciones de ciertas muestras fúngicas