



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

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

TRABAJO DE TITULACIÓN

Análisis antimicrobiano del aceite volátil de *Hedyosmum cuatrecasaznum* O cchioni frente
a cepas de interés clínico

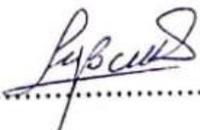
Mishell Alexandra Fiallos Vallejo
PhD. María Eugenia Lucena Ustariz

Riobamba - Ecuador
2021

REVISIÓN DEL TRIBUNAL

Los miembros del tribunal de graduación del proyecto de investigación de título: "Análisis antimicrobiano del aceite volátil de *Hedyosmum cuatrecasum* O cchioni frente a cepas de interés clínico" presentado por: Mishell Alexandra Fiallos Vallejo y dirigida por: PhD. María Eugenia Lucena Ustariz, una vez escuchada la defensa oral y revisado el informe final del proyecto de investigación con fines de graduación 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



.....

Mgs. Yisela Ramos Campi
Miembro del Tribunal



.....

Mgs. Félix Falconí Ontaneda
Miembro del Tribunal



.....

CERTIFICADO DEL TUTOR

Yo, PhD. María Eugenia Lucena Ustariz, docente de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico en calidad de Tutora del Proyecto de Investigación titulado: “Análisis antimicrobiano del aceite volátil de *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni frente a cepas de interés clínico”, propuesto por Mishell Alexandra Fiallos Vallejo, egresado de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico de la Facultad Ciencias de la Salud, luego de haber realizado las debidas correcciones, certifico que se encuentra apto para la defensa pública del proyecto.

Riobamba, 22 de diciembre de 2021



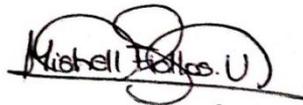
Firmado electrónicamente por:

**MARIA EUGENIA
LUCENA DE
USTARIZ**

.....
PhD. María Eugenia Lucena Ustariz
Docente tutor de la carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico

AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN

La responsabilidad del contenido de este Proyecto de Graduación corresponde exclusivamente a la autora Mishell Alexandra Fiallos Vallejo con cedula de ciudadanía N.º 060517187-5 y el patrimonio intelectual de la misma a la Universidad Nacional de Chimborazo.



.....
Mishell Alexandra Fiallos Vallejo
C.C: 0605171875
AUTORA

Agradecimiento

Por medio de este proyecto de investigación quiero agradecer ante todo a Dios, por bendecir y guiar mis pasos, de la misma manera quiero agradecer a mis padres por ser mi pilar fundamental brindándome todo su apoyo moral y económico durante mi formación universitaria. A mis hermanos que me han brindado su compañía en los buenos y malos momentos. A la Universidad Nacional de Chimborazo que ha sido mi segundo hogar, así como también a los docentes que han sido participes de mi proceso quienes me han impartido sus conocimientos para formarme y proyectarme como profesional para servir a la sociedad.

También agradezco a mi docente tutora la Dra. María Lucena por guiarme en este proceso y su participación a la culminación de mis estudios y realización como profesional.

Dedicatoria

La presenta investigación va dedicada primeramente a Dios por darme la oportunidad de superarme a través de mis queridos padres Armando Fiallos y Amanda Vallejo quienes a base de mucho amor, dedicación y esfuerzo constante han hecho de mí una persona con valores para poder desenvolverme en todos los ámbitos de mi vida. A mis hermanos quienes han estado impulsándome y brindando su apoyo incondicional para seguir adelante.

Y a todos quienes de alguna u otra forma fueron partícipes de este proceso preparándome como profesional.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| OBJETIVOS | 3 |
| General: | 3 |
| Específicos: | 3 |
| CAPÍTULO I..... | 4 |
| MARCO TEÓRICO | 4 |
| Antecedentes históricos de plantas con fines medicinales: | 4 |
| Plantas medicinales en Ecuador: | 4 |
| Biodiversidad Ecuatoriana | 4 |
| Plantas antimicrobianas | 5 |
| Familia Chloranthaceae | 5 |
| Género <i>Hedyosmum</i> | 5 |
| Taxonomía: | 6 |
| Estudios realizados a la planta <i>Hedyosmum</i> | 7 |
| Aceites esenciales | 7 |
| Resistencia a antimicrobianos | 8 |
| Bacterias con resistencia antimicrobiana | 8 |
| Bacterias Gram positivas | 9 |
| <i>Staphylococcus aureus:</i> | 9 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 10 |
| Bacterias Gram negativas | 10 |
| <i>Escherichia coli</i> | 10 |
| <i>Proteus mirabilis</i> | 10 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 11 |
| Concentración mínima inhibitoria | 11 |
| CAPÍTULO II..... | 12 |

| | |
|---|----|
| METODOLOGÍA | 12 |
| Tipo de investigación: | 12 |
| Población: | 12 |
| Muestra: | 12 |
| Variables de estudio | 12 |
| Métodos de estudio: | 12 |
| Técnicas y procedimientos: | 12 |
| Procedimientos | 12 |
| Procesamiento estadístico | 16 |
| Consideraciones éticas. | 16 |
| CAPÍTULO III | 17 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 17 |
| CONCLUSIONES | 22 |
| RECOMENDACIONES | 23 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS: | |
| ANEXOS | |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Taxonomía de <i>Hedyosmum cuatrecazanum</i> O cchioni | 6 |
| Tabla 2. Antibióticos utilizados para el control positivo | 15 |
| Tabla 3. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de <i>Hedyosmum cuatrecazanum</i> O cchioni expresado por los halos de inhibición (mm), frente a bacterias Gram positivas | 18 |
| Tabla 4. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de <i>Hedyosmum cuatrecazanum</i> O cchioni expresado por los halos de inhibición (mm), frente a bacterias Gram negativas. | 19 |
| Tabla 5.: Valor de CMI del aceite esencial de <i>Hedyosmum cuatrecazanum</i> O cchioni, de cada una de las bacterias estudiadas con su respectivo control. | 19 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|---|
| Figura 1: <i>Hedyosmum cuatrecazanum</i> O cchioni..... | 6 |
| Figura 2: Bacterias Resistentes a los antibióticos | 9 |

Resumen

La resistencia antimicrobiana es un problema de salud pública mundial, ocasionado por el uso inadecuado de antibióticos, que provoca la reducción del efecto bactericida, multirresistencia, incremento en costos médicos, estancias hospitalarias y mortalidad. El uso de la medicina ancestral ha sido de gran ayuda desde la antigüedad para el uso y tratamiento de las diferentes enfermedades infecciosas, conllevando una constante búsqueda de alternativas curativas y eficaces que contrarresten estas infecciones. El objetivo de esta investigación fue determinar la actividad antimicrobiana del aceite volátil de *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni frente a cepas de interés clínico. Para la obtención del aceite esencial se utilizó la técnica de hidrodestilación mediante la utilización de la trampa de Clevenger, durante 4 a 5 horas a una temperatura de entre 50 - 60°C.

El rendimiento fue del 0,26%. La actividad antibacteriana fue detectada por el método Kirby-Bauer e interpretada por la medición de los halos de inhibición. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) empleando desde el aceite esencial y diferentes concentraciones: 1×10^6 , $0,5 \times 10^6$, $0,25 \times 10^6$, $0,125 \times 10^6$, $0,062 \times 10^6$, $0,031 \times 10^6$ $\mu\text{g/mL}$. Se estudió la actividad del aceite frente a bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*) y Gram negativas (*Klebsiella pneumoniae*; *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis*). El aceite mostró actividad principalmente a *Staphylococcus aureus*, en menor proporción a *Klebsiella pneumoniae*; *Escherichia coli*; *Enterococcus faecalis* y *Proteus mirabilis*. La CMI de *Staphylococcus aureus*, fue de $0,062 \times 10^6$ $\mu\text{g/mL}$; mientras que *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, de $0,125 \times 10^6$ $\mu\text{g/mL}$ y *Proteus mirabilis* de una CMI $0,25 \times 10^6$ $\mu\text{g/mL}$.

Palabras clave: *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni, actividad antimicrobiana, aceite esencial, bacterias.

Abstract

Antimicrobial resistance is a global public health problem, caused by the inappropriate use of antibiotics, which causes a reduction in the bactericidal effect, multi-resistance, increasing medical costs, hospital stays and mortality. The use of ancestral medicine has been of great help since ancient times for the use and treatment of different infectious diseases, leading to a constant search for curative and effective alternatives that neutralize these infections. The objective of this research was to determine the antimicrobial activity of the volatile oil of *Hedyosmum cuatrecasorum* O cchioni against strains of clinical interest. To obtain the essential oil, the hydrodistillation technique was used using the Clevenger trap, for 4 to 5 hours at a temperature between 50 - 60°C.

The yield was 0.26%. The antibacterial activity was detected by the Kirby-Bauer method and interpreted by measuring the inhibition halos. The minimum inhibitory concentration (MIC) used from the essential oil and different concentrations was determined: 1×10^6 , $0,5 \times 10^6$, $0,25 \times 10^6$, $0,125 \times 10^6$, $0,062 \times 10^6$, $0,031 \times 10^6$ $\mu\text{g/mL}$. The activity of the oil against Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*) and Gram-negative bacteria (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*) was studied. The oil showed activity mainly against *Staphylococcus aureus*, and in a smaller proportion against *Klebsiella pneumoniae*; *Escherichia coli*; *Enterococcus faecalis* and *Proteus mirabilis*. The MIC of *Staphylococcus aureus* was 0.062×10^6 $\mu\text{g/mL}$, while *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* was 0.125×10^6 $\mu\text{g/mL}$ and *Proteus mirabilis* had a MIC of 0.25×10^6 $\mu\text{g/mL}$.

Keywords: *Hedyosmum cuatrecasorum* O cchioni, antimicrobial activity, essential oil, bacteria



Firmado electrónicamente por:

GABRIELA MARIA DELA
CRUZ FERNANDEZ

Reviewed by:

Gabriela de la Cruz F. Msc

ENGLISH PROFESSOR C.C.

0603467929

INTRODUCCIÓN

La presente investigación tuvo como objetivo la determinación de la actividad antimicrobiana del aceite volátil de *Hedysmum cuatrecasum* O cchioni frente a cepas de interés clínico.

El uso y abuso de antimicrobianos se ha suscitado como una problemática a nivel mundial, como lo comunica el último reporte de la Organización Mundial de la Salud (OMS), las tasas de mortalidad en pacientes infectados con patógenos resistentes se han incrementado en un 50% (1).

La OMS, 2011; ha designado la resistencia antimicrobiana (RAM) como uno de los tres problemas más importantes que desafía la salud humana al establecer una de las mayores amenazas para la salud mundial (2).

La resistencia a los antibióticos ha aumentado en todo el mundo, día tras día están apareciendo y propagándose en todo el planeta nuevos mecanismos de resistencia que ponen en peligro nuestra capacidad para tratar las enfermedades infecciosas comunes (3).

La resistencia se produce cuando suceden mutaciones en respuesta al uso prolongado de fármacos. Los microorganismos son los que se vuelven resistentes a los antimicrobianos, situación ésta que provoca un incremento en los costos médicos, que se prolonguen las estancias hospitalarias y aumente la mortalidad (4).

En América Latina se considera extremadamente difícil de vencer, sobre todo en Sudamérica los antibióticos son de venta libre, lo que aporta a su mal uso y abuso por parte de la población, se estima que el 78 % de los antibióticos de América Latina son vendidos sin receta médica. Por eso debe darse cumplimiento de las orientaciones de los expertos de la OMS y a los programas creados (3). Esto hace particularmente importante el poder monitorizar las tasas de resistencia bacteriana en estas zonas (4).

El Ecuador no escapa de esta situación y es muy vulnerable ante el incremento de la resistencia a los antibióticos. El área rural representa un tercio de la población nacional, cuentan con servicios de baja exigencia, sin laboratorios de microbiología lo que imposibilita el diagnóstico acertado de bacterias resistentes. Pacientes con infecciones bacterianas tratados en hospitales o centros de salud rurales son una fuente potencial de cultivos bacterianos no reportados o no identificados de patógenos multirresistentes a los antibióticos, es decir falta información de resultados del análisis de patrones de resistencia en estos microorganismos y el manejo de terapia antibiótica empírica (5).

Ante la alarmante información de la resistencia microbiana es necesario el desarrollo de nuevos compuestos activos que ocasionen muerte bacteriana; es por ello que, basándose en

la medicina ancestral y natural, se realiza investigaciones científicas, la cual es indispensable para aislar componentes bioactivos y realizarse estudios como antimicrobianos.

La población que habita en los páramos andinos, ante el desconocimiento del uso de fármacos comerciales y aunado a esto otros inconvenientes como transporte, distanciamiento de los servicios médicos, etc, han decidido combatir sus patologías y afecciones incluyendo las infecciones con el uso de plantas medicinales, basado en los saberes ancestrales.

En regiones desde el centro de Colombia (cordillera central) hasta la cordillera oriental en el centro de Ecuador, existe un conjunto de plantaciones de la familia Chloranthaceae que son un grupo de árboles de 3 – 16 m de altura, con flores verdes, carente de estambres o carpelos, frutas negras, hojas brillantes y aromáticas. La familia Chloranthaceae posee algunos géneros tales como: *Ascarina*, *Chloranthus*, *Hedyosmum* y *Sarcandra*. El género *Hedyosmum* crece de manera silvestre en bosques montanos a una altitud de 2600 – 3600 m (6).

En el Ecuador el género *Hedyosmum* es endémica del bosque andino alto del sur del país (7). En la Provincia de Chimborazo esta planta es conocida como Tarqui. (7). A esta planta se le ha realizado la extracción de los metabolitos secundarios, para el estudio de la bioactividad, tanto en extractos como en aceites esenciales, siendo el aceite esencial/volátil el más utilizado (7).

Se conoce como aceite esencial/volátil a los principales productos aromáticos que existen en diversas partes de las plantas. Debido a que se evaporan por exposición al aire, temperatura y ambiente, se denominan: aceites volátiles, aceites etéreos, aceites esenciales o esencias (8). Cada vez más se estudian estos aceites obtenidos de diferentes plantas para aislar compuestos con actividades biológicas, entre ellas, antimicrobiana, anticancerígena, antioxidante, etc.

Las enfermedades infecciosas son causadas por microorganismos patógenos como las bacterias, los virus, los parásitos o los hongos. Estas enfermedades pueden transmitirse, directa o indirectamente, de una persona a otra (9).

Tomando en cuenta las consideraciones anteriores este estudio se planteó la siguiente interrogante; ¿El aceite volátil de *Hedyosmum cuatrecazanum* O *cchioni* tendrá compuestos bioactivos que actúen como antimicrobiano frente a cepas de interés clínico?

OBJETIVOS

General:

Determinar la actividad antimicrobiana del aceite volátil de *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni frente a cepas de interés clínico.

Específicos:

- Extraer el aceite volátil de *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni, mediante la técnica de hidrodestilación con trampa de Clevenger para determinar sus características físicas y químicas.
- Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto del aceite de *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni., con las distintas cepas de interés clínico, mediante el método de difusión en agar Kirby Bauer.
- Encontrar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni. frente a cepas de interés clínico mediante la determinación del efecto inhibitorio a diferentes concentraciones.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

En 1928 Alexander Fleming, descubre la penicilina, basándose en la captación de la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus*, en una placa contaminada por *Penicillium notatum* y fue capaz de aislar el producto que fue el encargado de inhibir el crecimiento (10).

Antecedentes históricos de plantas con fines medicinales:

Las plantas medicinales son aquellas que la medicina tradicional cree que posee el dominio de la curación o que fueron usados para dicho propósito. El conocimiento del efecto sanador tuvo su génesis a base de la uso y lecciones de métodos empíricos acontecidos de generación a generación. Algunos de estos métodos ya poseen evidencia científica respaldada por investigaciones de laboratorio o resultados clínicos que han surgido de la necesidad de confirmación ante el uso de la medicina tradicional en las civilizaciones antiguas (11).

Plantas medicinales en Ecuador:

Las plantas medicinales han tomado un mayor grado de interés en la actualidad. Hace siglos, los pueblos ancestrales encontraron en la tierra sus "farmacias" naturales. En el Ecuador cada vez son más las personas que recolectan sus plantaciones y las utilizan ya sea para tratar enfermedades o aliviar dolencias (12).

Biodiversidad Ecuatoriana

El Ecuador es considerado uno de los países con mayor biodiversidad en el mundo por ello se le confiere un gran potencial en el uso de las plantas como principio de la medicina tradicional siendo importante conocer la forma de uso y favores curativos que brindan, en las diferentes comunidades del país. En este sentido, la etnobotánica es una herramienta importantemente utilizada para el rescate del conocimiento sobre el uso del recurso vegetal y la relación entre el hombre y las plantas, a través del tiempo, adquiriendo interés en el estudio de bosques tropicales (13).

Las plantas medicinales son las que más se han estudiado en la región andina. Tales como lo demuestran los estudios realizados por Misael Acosta-Solís, 2017 científico de la Misión de Cinchona que contribuyeron al conocimiento de especies medicinales de uso tradicional. Cuantiosas investigaciones han aportado al conocimiento de una gran cantidad de plantas medicinales de uso habitual entre la población (14).

Actualmente, en Ecuador están registradas 3118 plantas con fines medicinales. Según estudios de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE), Las plantas medicinales

son usadas en diferentes categorías siendo el 45% para tratar síntomas, el 26% en afecciones causadas por bacterias, virus, hongos o protozoos, y otro grupo de plantas tratan heridas, lesiones y problemas del sistema digestivo. Son los kichwas de la Amazonía la población que más especies de plantas medicinales utilizan, seguidos de los kichwas de la Sierra y mestizos (12).

Dentro del "vademécum" etnobotánico del Ecuador existen una gran cantidad de especies, plantas, hierbas y remedios caseros, que se usan con fines medicinales para aliviar las manifestaciones de enfermedades (12).

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 la planta, dicha extracción va a depender del procedimiento utilizado y de la naturaleza química del principio activo (15).

Plantas antimicrobianas

Las plantas poseen una gran cantidad de compuestos químicos que pueden funcionar como bactericidas, son sustancias que pueden ser usadas directamente o como base para la elaboración de desconocidos principios útiles para el tratamiento de origen sistémico o cavidad oral principalmente. La fitoterapia es una disciplina medica cada vez más utilizada y eficaz puesto que se evidencia que casi el 25% del total de las prescripciones médicas se basan en plantas medicinales, uso artesanal y terapéutico que alcanza casi el 80% (16).

Familia Chloranthaceae

Chloranthaceae, consta con 4 géneros (*Ascarina*, *Chloranthus*, *Hedyosmum* y *Sarcandra*), son árboles y arbustos aromáticos de madera blanda con hojas opuestas en forma de sierra y nudos hinchados. Las flores son muy pequeñas, unisexuales, carecen de pétalos, aunque a veces están sostenidas por brácteas en forma de hojas. Las flores tienen de 1 y 5 estambres o un solo carpelo que se convierte en una drupa (17).

Género *Hedyosmum*

Existen entre 40 a 45 especies distribuidas principalmente en América intertropical, tan solo una de estas reside en el sureste de Asia. Es el género más abundante presentándose en América central y meridional comprendido por 40 especies de árboles, arbustos y hierbas. En el Ecuador se encuentran aproximadamente 12 de las 40 especies del género *Hedyosmum*.

Las cuales son: *H. anisodorum* Todzia, *H. cuatrecazanum* Occh., *H. cumbalense* Karsten, *H. goudotianum* Solms-Laub., *H. luteynii* Todzia, *H. purpurascens* Todzia, *H. racemosum* (Ruiz & Pavón) G. Don, *H. scabrum* (Ruiz & Pavón) Solms-Laub., *H. spectabile* Todzia, *H. sprucei* Solms-Laub., *H. strigosum* Todzia y *H. translucidum* Cuatrec (15-18).



Figura 1: *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni

Fuente: <https://colombia.inaturalist.org/photos/105904899>

Taxonomía:

Tabla 1. Taxonomía de *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni

| <i>Hedyosmum cuatrecazanum</i> O cchioni | |
|--|----------------------|
| <u>Reino:</u> | <u>Plantae</u> |
| <u>División:</u> | <u>Magnoliophyta</u> |
| <u>Clase:</u> | <u>Magnoliopsida</u> |
| <u>Orden:</u> | <u>Chloranthales</u> |
| <u>Familia:</u> | Chloranthaceae |
| <u>Género:</u> | <i>Hedyosmum</i> |
| <u>Especies</u> | <i>cuatrecazanum</i> |

Fuente: <https://es.wikipedia.org/wiki/Hedyosmum>

Una de las formas de uso de este tipo de plantas es mediante la extracción de su aceite volátil; el cual se realiza mediante un proceso físico-químico.

Los aceites volátiles son las sustancias aromáticas naturales, encargados de aportar con la fragancia de las flores y otros vegetales. Generalmente son mezclas complejas de componentes muy variables que pertenecen, en mayor porción a terpenos y, en menor medida, al grupo de los compuestos aromáticos derivados del fenilpropano.

Algunos aceites son monomoleculares, ya que poseen un solo componente, otros son ricos en 2 a 3 moléculas. Pero la mayoría son polimoleculares, puesto que contienen 3 a 4 moléculas y, en ocasiones, centenares de moléculas diferentes que sólo están presentes en

trazas (19). El proceso de destilación es el método principal utilizado en la extracción de los aceites esenciales de las plantas.

Estudios realizados a la planta *Hedyosmum*

Un estudio que se realizó a base de la obtención de *Hedyosmum scabrum*, planta nativa de América tropical, un árbol del bosque nativo de Jacarón, ubicado en la parroquia de Columbe de la provincia de Chimborazo en Ecuador, lo cual por los antecedentes que posee constituye una vía segura, rápida y adecuada para la búsqueda de nuevos compuestos que mejoren la salud del hombre debido a la aparición de nuevas enfermedades y gran cantidad de patógenos resistentes a principios activos utilizados como antibióticos (2).

En el aceite esencial de *H. luteynii* contuvo algunos componentes bioactivos pero los más abundantes fueron: α -felandreno (32.72%), (Z)- β -pineno (13.20%), (Z)- β -ocimeno (10.99%), silvestreno (6.51%), biciclogermacreno (5.05%), 1.8-cineol (4.95%), α -ocimeno (3.88%) y germacreno D (3.20%). Los constituyentes más abundantes del aceite esencial de *H. luteynii* son diferentes de los reportados para otras especies del género *Hedyosmum* en el Ecuador, Perú, Bolivia, Colombia, Venezuela, Brasil y Costa Rica. (20).

Los constituyentes del aceite esencial de *H. luteynii* y de otras especies del género *Hedyosmum*; permitió descartar los compuestos comunes. Este análisis arrojó como resultado que de los 28 compuestos identificados en el aceite esencial de *H. luteynii*, se han identificado como exclusivos de la especie *H. luteynii*: silvestreno (6.51%), cis-muurolo 3-5-diene (0.45%), amorpho-4.9-diene <7,14-anhidro-> (0.65%) (21).

Aceites esenciales

La destilación por arrastre con vapor también se emplea para separar aceites esenciales de tejidos vegetales. Los aceites esenciales son mezclas complejas de hidrocarburos, terpenos, alcoholes, compuestos carbonílicos, aldehídos aromáticos y fenoles y se encuentran en hojas, cáscaras o semillas de algunas plantas.

En el vegetal, los aceites esenciales están almacenados en glándulas, conductos, sacos, o en reservorios dentro del vegetal, por lo que es beneficioso desmenuzar el material para exponer esos reservorios a la acción del vapor de agua. Los aceites esenciales son productos naturales aplicados en diferentes industrias, como; la farmacéutica, alimenticia, en perfumería, entre otros. Actualmente, se constituyen en productos alternativos para la elaboración de biopesticidas o bioherbicidas. La obtención de los aceites esenciales es realizada comúnmente por la destilación por arrastre con vapor, en sus diferentes modalidades. La pureza y el rendimiento del aceite esencial dependerán de la técnica que se utilice para su extracción (22).

Resistencia a antimicrobianos

La resistencia bacteriana en América latina ha mostrado algunos datos de cómo la resistencia se está diseminando especialmente en los hospitales (23).

Los datos han sido extraídos del Programa Sentry, programa mundial de vigilancia de resistencia patrocinado por Bristol Myers Squibb, probablemente se habla del sistema de vigilancia más completo que tenemos en el mundo, con más de 80 centros. Solo América latina cuenta con 10 centros. En el plazo de 3 años se estudiaron más de 11.000 muestras bacterianas que en su mayor parte vienen de hospitales. Las bacterias fueron recolectadas de cinco tipos de infecciones: bacteremias, infecciones respiratorias, neumonías hospitalarias, heridas quirúrgicas, e infecciones de tracto urinario (23).

La resistencia bacteriana, es un fenómeno que crece cada día en todo el mundo, hace algunas décadas la gran mayoría de los antimicrobianos funcionaban tanto para las infecciones comunitarias como para las infecciones nosocomiales, pero debido al uso irracional de los antibióticos, su funcionalidad se ha visto afectada. Entre las bacterias implicadas en este fenómeno creciente, son: Gram positivas como: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sp* coagulasa negativa, *Enterococcus sp*, etc y Gram negativos: Enterobacterias y bacterias no fermentadoras (24).

Bacterias con resistencia antimicrobiana

La OMS se ha pronunciado ante la urgencia en la necesidad de encontrar nuevos antibióticos colocando a las bacterias en una lista por prioridad: crítica, elevada o media.

En el nivel de prioridad crítica están bacterias multirresistentes. Estas son peligrosas y pueden provocar enfermedades como: gonorreas, gastroenteritis, infecciones en la piel, úlceras y meningitis neonatal. Existe alto riesgo de contagio en hospitales en pacientes ancianos e inmunodeprimidos. Entre algunas bacterias se incluye: *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y varias enterobacteriáceas como *Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia*, y *Proteus*.

Las categorías de prioridad elevada y media contienen otras bacterias que exhiben una farmacorresistencia y provocan enfermedades comunes como la gonorrea o intoxicaciones alimentarias por salmonela. (24).

Bacterias resistentes a los antibióticos

“La resistencia a los antibióticos está creciendo y nos estamos quedando rápidamente sin opciones de tratamiento”.

Los investigadores necesitan encontrar nuevos antibióticos para estas «superbacterias»

Dra. Marie-Paule Kieny, asistente del director general de la OMS

Riesgo mayor en hospitales

| Prioridad | Bacteria | Puede causar | Resistente a |
|----------------|---------------------------------|--|-------------------------|
| Crítica | <i>Acinetobacter baumannii</i> | Infección de heridas <input type="checkbox"/> | Carbapenémicos |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Infecciones <input type="checkbox"/> | |
| | <i>Enterobacteriaceae</i> | Infecciones estomacales <input type="checkbox"/> | Carbapenémicos, BLEE |
| Alta | <i>Enterococcus faecium</i> | Meningitis neonatal <input type="checkbox"/> | Vancomicina |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | Infecciones de la piel <input type="checkbox"/> | Meticilina, vancomicina |
| | <i>Helicobacter pylori</i> | Problemas gástricos, úlceras | Claritromicina |
| | <i>Campylobacter</i> | Gastroenteritis | Fluoroquinolona |
| | <i>Salmonellae</i> | Salmonela | |
| | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | Gonorrea | |
| Media | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | Neumonía, meningitis, bacteriemia febril | Penicilina |
| | <i>Haemophilus influenzae</i> | Meningitis, epiglotitis | Ampicilina |
| | <i>Shigella</i> | Disenteria | Fluoroquinolona |



Figura 2:Bacterias Resistentes a los antibióticos

Fuente: <https://www.paginasiete.bo/planeta/2017/2/28/publica-lista-doce-familias-bacterias-resistentes-128862.html>

Bacterias Gram positivas

Las bacterias Gram positivas poseen una pared celular gruesa que consiste en varias capas, pero en mayor proporción de peptidoglucano que se encarga de rodear la membrana citoplasmática de la célula. El peptidoglucano es considerado un exoesqueleto en forma de malla, es suficientemente poroso como para permitir la difusión de los metabolitos a la membrana plasmática, este es un elemento importante de la estructura, replicación supervivencia de la célula (25).

Staphylococcus aureus:

Es un patógeno importante que coloniza e infecta a pacientes hospitalizados y a personas inmunocompetentes. Produce patologías diversas, desde un absceso de piel hasta septicemias mortales y choque tóxico estafilocócico (SSTS). Puede ser causante de intoxicación por alimentos, debido a la ingestión de la enterotoxina B termoestable preformada, producida por una cepa toxigénica. La mayoría de los niños y adultos están colonizados por *S. aureus* en forma interrumpido, que son habitantes normales de las vías respiratorias superiores, piel, intestino y vagina (27).

Su patogenia surge cuando se produce la combinación de los factores de virulencia con la disminución de la efectividad del sistema inmunológico. Estas condiciones son óptimas propician que *S. aureus* posea características de virulencia bastante específicos (28).

Enterococcus faecalis

Es un coco Gram positivo que forma parte de la flora normal del tracto intestinal y genital humano, posee un mínimo potencial patogénico en el hospedador, sin embargo, en paciente inmunocomprometidos se convierten en patógenos oportunistas, pudiendo causar diferentes enfermedades tales como endocarditis, bacteriemias enterocócicas, infecciones del tracto urinario, neonatales, del sistema nervioso central, intrabdominal y pélvicas (28). *E. faecalis* es el patógeno humano más frecuente representando el 60% al 90% de los aislamientos clínico por enterococos (29).

Bacterias Gram negativas

La pared celular de las bacterias Gram negativas se considera la más compleja desde el punto de vista estructural como químico, por fuera de la membrana citoplasmática se encuentra una delgada capa de peptidoglucano, a diferencia de las bacterias Gram positivas estas bacterias no poseen ácidos teicoicos ni lipoteicoicos (25).

Escherichia coli

Constituye la mayor parte del microbiota habitual del intestino en animales y humanos, se agrupa en cepas comensales, prototipos intestinales y patógenas extraintestinales (30).

E. coli es un bacilo Gram negativo, que se mantiene de forma inocua y confinado en el lumen intestinal, en pacientes inmunosuprimidos o cuando las barreras gastrointestinales son invadidas por cepas de *E. coli* patogénicos pueden limitarse a superficies mucosas o diseminarse por todo el organismo (31).

Dicha bacteria actúa como patógeno causante de diarrea y representa uno de los problemas de salud pública más importante en los países en vía de desarrollo; afectando principalmente a menores de edad, lo cual es indispensable para el diagnóstico temprano y adecuado, reconociendo los prototipos causantes de cuadros diarreicos y así lograr diferir de la flora normal del tracto gastrointestinal (32).

Proteus mirabilis

Es una bacteria Gram negativa responsable de infecciones del tracto urinario e infecciones cutáneas en humanos, sin embargo, suele estar implicado en septicemias en pacientes inmunocomprometidos y ocasionalmente produce infección pulmonar (33).

P. mirabilis en infecciones en el tracto urinario suele ser provocado por su habilidad para causar litiasis urinaria gracias a su capacidad de producción de ureasa que cataliza la urea en CO₂ y amonio y logra afectar así mismo a los catéteres urinarios (33-34).

Las infecciones del tracto urinario provocadas por *P. mirabilis* intervienen la expresión de factores de virulencia tales como: la adherencia, motilidad y evasión de la respuesta inmune del huésped que promueve la colonización en la vejiga y riñones (34).

Klebsiella pneumoniae

Es un bacilo Gram negativo, no móvil que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Es la bacteria que representa un mayor problema por lo tanto es de gran importancia clínica, se desarrolla una capsula que actúa como factor determinando de virulencia de la bacteria. Existe alrededor de 77 serotipos diferentes (35).

Esta bacteria se encuentra en la naturaleza, así como en la superficie de aguas, tierra y plantas además se la halla en las mucosas de los humanos, caballos y cerdos, En el humano se encuentra específicamente en la mucosa nasofaríngea y del intestino gracias a ello su detección en heces es posible. Los principales reservorios para la transmisión bacteriana son en el ambiente hospitalario afectando al tracto gastrointestinal de pacientes y las manos del personal de salud, es por ello la importancia del lavado de manos entre un paciente y otro (36).

Concentración mínima inhibitoria

Es un método muy utilizado en los laboratorios de Microbiología Clínica, siendo esta la medida de la sensibilidad de una bacteria ante un antibiótico y consiste en la mínima concentración microbiana de un compuesto que logra la inhibición del crecimiento visible de un microorganismo en condiciones normales (37).

Para llevar a cabo la comparación se debe utilizar cepas de control con el fin de comparar los resultados después de las condiciones necesarias para un microorganismo (37).

La interpretación de los resultados debe ser lo más exacta posible en la determinación de la concentración mínima inhibitoria, además es indispensable que el personal esté entrenado además se recomienda derivar los estudios a laboratorios de referencia (37).

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

Tipo de investigación:

- **Nivel Exploratorio:** En la literatura científica consultada revela pocos estudios acerca de la actividad antimicrobianas de la especie vegetal *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni., razón por la cual se analiza las características de los resultados y se los expone adecuadamente utilizando medidas de posición con su correspondiente mensurabilidad.
- **Diseño Cuasi experimental:** Se modificó la variable independiente ya que se realizó ensayos microbiológicos utilizando distintas concentraciones del aceite esencial obtenido de *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni., para determinar la actividad antimicrobiana en cepas de interés clínico.
- **Cohorte:** El proyecto fue de carácter transversal ya que se da en un solo tiempo y lugar
- **Carácter Mixto:** Se analizó datos cuantitativos (medición de los halos de inhibición y concentraciones) y cualitativos (observación de inhibición a partir de los halos de crecimiento).

Población: Bacterias Gram positivas y Gram negativas nosocomiales

Muestra: El ensayo incluyó las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* ATCC 25922 y, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 y bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Variables de estudio

Variable Independiente: Diferentes concentraciones del Aceite Esencial de *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni.

Variable Dependiente: Diámetro del halo de inhibición de las cepas bacterianas frente al aceite esencial de *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni.

Métodos de estudio:

- **Método Teórico:** Fue un estudio inductivo que parte de lo particular a lo general, es decir, parte de la observación para proyectar una teoría.

Técnicas y procedimientos:

Técnicas: Observación

Instrumentos: Guía de observación, cámara fotográfica.

Procedimientos

Extracción del Aceite Esencial de *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni: La extracción se realizó de partes las aéreas (tallo, hojas, flores frescas) de la planta que fue recolectada bajo la

respectiva autorización (Anexo 1); fueron pesadas y sometidas a la extracción del aceite esencial por el método de hidrodestilación mediante la utilización de la trampa de Clevenger, durante 4 a 5 horas a una temperatura entre 50 - 60 °C. El aceite que se obtuvo debe ser reservado en refrigeración a 4 °C en tubos Eppendorf estériles hasta su análisis. (Ver anexo 2).

Cepas Microbianas ATCC: Las bacterias empleadas en el estudio fueron facilitadas por el Laboratorio de Investigación y corresponden a cepas de la Colección de Cultivo Tipo Americano con sus siglas en inglés ATCC. El ensayo incluyó las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* ATCC 25922; *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 y bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. (Ver anexo 3).

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

- **Agar Mac Conkey:** Peptona de carne 1,5g; Tripteína 1,5g; Lactosa 10g; Sales biliares 1,5g; cloruro de sodio 5,0 g; rojo neutro 0,03g; Cristal violeta 0,001g y agar 13,5 g.
- **Infusión cerebro corazón (BHI), brain heart infusion marca Himedia:** Infusión de cerebro de ternero 200 g/L, infusión de corazón de ternera 250 g/L, proteína peptona 10 g/L, glucosa (dextrosa) 2 g/L, cloruro sódico 5 g/L, fosfato disódico 2,50 g/L.
- **Caldo nutritivo (CN), nutrient broth marca Difco™:** Extracto de carne de vaca 3 g/L, peptona 5 g/L agar 15 g/L.
- **Medio de Cultivo Mueller Hinton:** Casina acida hidrolizada 17,5 g/L; pasta de extracto de corazón 5,0 g/L; Almidón 1,5g/L y agar 12,0 g/L

Actividad antimicrobiana:

La actividad antimicrobiana se realizó por el método de Kirby Bauer y colaboradores, debido a que es uno de los métodos que el CLCI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos (38). Por otra parte, el método de Kirby Bauer permite encasillar directamente a un microorganismo como sensible o resistente, además de ser uno de los métodos más utilizados en la práctica, por su reproducibilidad y confianza (39).

Preparación del aceite a diferentes concentraciones:

Las muestras se enumeraron desde el 0 hasta el 6. En el tubo #0 se colocó el aceite esencial de la planta *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni sin adicionarle DMSO. En el tubo # 1 se pesó 1g del aceite esencial, en el tubo #2 se pesó 0,5g del aceite esencial., en el tubo #3 se pesó 0,25g del aceite esencial, en el tubo #4 se pesó 0,125g del aceite esencial, en el tubo #5 se pesó 0,062g del aceite esencial y en el tubo #6 se pesó 0,031g del aceite esencial. A todos los tubos exceptuando el tubo 0 se le adicionó 1 mL de DMSO (Ver anexo 4). De esta manera se trabajó con las siguientes concentraciones: (1;0,5;0,25;0,125;0,062 y 0,031) $\times 10^6$ $\mu\text{g/mL}$

Determinación de la actividad antimicrobiana

Reactivación de las cepas:

Se preparó agar Mac Conkey, Agar cerebro/corazón y Agar nutritivo

De las cepas comerciales se tomó una asada, se esterilizó previamente y se sembró en las placas. En el Agar Mac Conkey se sembró a las bacterias: *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, y *Escherichia coli*; en el Agar Cerebro/ corazón se sembró las bacterias: *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus* y en el Agar nutritivo se sembró las bacterias: *Klbsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus* y se incubó en una estufa, a 37°C por 24 horas (Ver anexo 5).

Preparación del Pre- inóculo

El pre- inóculo se realizó en Agar nutritivo utilizando las bacterias reactivadas. Dentro de la cámara de flujo laminar se encendió el mechero, se desinfectó el material y se flameó el asa para proceder a la resiembra de las bacterias. Se recogió y transfirió de 1 a 2 colonias de cada una de las bacterias contenidas en las placas mono Petri. Se realizó la siembra por arrastre de las colonias de las cinco bacterias en su respectiva caja Petri con agar nutritivo (cada caja Petri con su respectiva rotulación). Se colocó en la estufa a 37°C y se espera de 18 a 20 horas puesto que es indispensable basarse en la curva de proliferación bacteriana la misma que se debe encontrar en la fase estacionaria para evitar que la bacteria se encuentre al borde del agotamiento nutritivo en el Agar. (Ver anexo 6).

Preparación del inóculo

Se realizó tras el periodo de 18 a 20 horas, donde se colocó 5 ml de solución salina estéril al 0,9% en tubos herméticos en donde se hizo la suspensión de cada una de las cepas bacterianas resembradas. Transcurrido el tiempo determinado de las bacterias de recogió una o más colonias aisladas de cada una de las bacterias con ayuda del asa estéril. Se homogenizó hasta obtener la turbidez necesaria y se comparó la turbidez de las cepas con el patrón de

McFarland (utilizado como patrón de turbidez en la preparación de suspensiones de microorganismos) de escala 0,5 que corresponde a un cultivo de una densidad celular aproximada de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. (Ver anexo 7).

Se homogenizo los inóculos en los tubos herméticos y se introdujo un hisopo estéril, se dejó reposar unos minutos para que absorba el mismo y en las placas mono Petri con Agra Mueller Hinton realizó la siembra con el hisopo en cada una de las bacterias (cada placa con su respectiva rotulación). Con una pinza estéril se colocó los discos fabricados manualmente con papel filtro sumergiendo en las diferentes concentraciones del aceite esencial, luego se colocó respetando la distancia entre disco y disco. En otra placa con Agar Mueller Hinton se colocó discos de antibióticos para los controles (discos comerciales para las diferentes bacterias de diferentes concentraciones) (tabla1) para el control positivo, y discos manuales con DMSO para el control negativo.

Tabla 2. Antibióticos utilizados para el control positivo

| Bacteria | Antibiótico |
|------------------------------|---------------------|
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Amikacina 30 µg |
| <i>Proteus mirabilis</i> | Clindamicina 1 µg |
| <i>Escherichia coli</i> | Amikacina 30 µg |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | Ciprofloxacina 5 µg |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Oxacilina 2 µg |

Fuente: Prueba de susceptibilidad o Kirby Bauer

Estas pruebas de susceptibilidad se realizaron por duplicado en cada ensayo. Las placas fueron pre- incubadas en refrigeración a 4 °C durante 20 minutos para una correcta difusión del aceite en el Agar y posteriormente fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas, si no existió crecimiento durante el período mencionado se incuba por otras 24 horas (48 horas) (Ver anexo 8).

Lectura de resultados

Al pasar las 24 horas de incubación se realizó la lectura de los resultados para la observación de la presencia o ausencia de los halos de inhibición (cuyo diámetro fue medido en mm) alrededor de los discos que contenían las distintas concentraciones del aceite esencial. Las CMI's fueron determinadas mediante la evaluación de la menor concentración en la cual el extracto presento actividad antimicrobiana. Los resultados fueron tabulados en el programa de procesamiento (Ver Anexo 9).

Procesamiento estadístico

Se realizaron tablas descriptivas de los resultados obtenidos con frecuencia y porcentaje mediante la aplicación de hojas de cálculo aplicando el programa estadístico Excel para registro interno del trabajo realizado.

Consideraciones éticas.

Se declararán las consideraciones éticas para la investigación científica, tales como el respeto a los principios bioéticos, permiso del Ministerio de Medio Ambiente para la obtención de la planta. CÓDIGO MAAE-ARSFC-2021-1378. (Ver anexo 10).

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción y aislamiento del Aceite Esencial (AE)

A partir de 5,2 kg de las partes aéreas de la planta *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni que fueron sometidas a un proceso de hidrodestilación fue extraído y aislado 13,5 mL de AE que representó un rendimiento de 0,26%, que fue calculado tomando en cuenta el volumen del aceite y el peso del material fresco utilizado para la extracción. Este resultado fue mayor al rendimiento de 0,071% obtenido por Torres *et al* (40), quienes estudiaron la planta *H. luteynii* y aplicaron el mismo método de destilación. Además de la investigación realizada por, Collaguazo *et al* (41) que obtuvieron el 0,09% de rendimiento de la especie *Hedyosmum* sp, aplicando el mismo método; además del rendimiento de 0,26 % reportado en el estudio con la especie *H. racemosum* realizado por Correa (42). Contrario a esto, Zamora *et al* (37), registraron un rendimiento de 1,2% en el estudio con *H. translucidum*, el cual supera el valor encontrado en esta investigación, sin embargo, estos autores usaron el método asistido por microondas. Es importante recalcar que existen factores que influyen en el rendimiento de los AEs, entre ellos los factores climáticos y las condiciones en las que se realizó el procedimiento como temperatura, presión y la cantidad (39).

Actividad antibacteriana del AE

El efecto inhibitor del AE sobre el crecimiento de cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas ATCC de interés clínico evaluado mediante el método de difusión en disco o Kirby Bauer fue utilizado en el procedimiento de la investigación.

La tabla 3 y 4 muestran los valores resultantes de la actividad antimicrobiana del aceite esencial en todas las concentraciones utilizadas del aceite obtenido de las partes aéreas *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni frente a las cepas de interés clínico. También se puede destacar los controles utilizados en cada una de las cepas bacterianas estudiadas, como en el control positivo que se utilizó diferentes antibióticos aplicados para cada bacteria (disco de antibiótico comercial) y como control negativo el Dimetil Sulfoxido (DMSO).

El aceite esencial fue activo frente a las dos bacterias Gram positivas estudiadas (tabla 3) mostrando mayor sensibilidad al aceite esencial *Staphylococcus aureus*.

Tabla 3. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni expresado por los halos de inhibición (mm), frente a bacterias Gram positivas

| Aceite esencial de <i>Hedyosmum cuatrecazanum</i> O cchioni | | | | | | | | | |
|---|--|--|-------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------------|---------------------|
| Bacterias Gram positivas | Halos de inhibición(mm) $\bar{x} \pm SD$ | | | | | | | Control Positivo | Control Negativo |
| | Aceite esencial | Concentración del aceite $\mu\text{g}/\text{mL}$ | | | | | | Ciprofloxacina 5 μg | DMSO |
| | | 1x 10 ⁶ | 0,5x 10 ⁶ | 0,25x 10 ⁶ | 0,125x 10 ⁶ | 0,062x 10 ⁶ | 0.031x 10 ⁶ | | |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 | 10 \pm 0,9 | 9 \pm 0,9 | 8 \pm 0,8 | 7 \pm 0,8 | 6 \pm 0,8 | 0 \pm 0 | 0 \pm 0 | 19 \pm 1 | 0 \pm 0 |
| | | 1x 10 ⁶ | 0,5x 10 ⁶ | 0,25x 10 ⁶ | 0,125x 10 ⁶ | 0,062x 10 ⁶ | 0.031x 10 ⁶ | Oxacilina 2 μg | DMSO |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 20 \pm 0,5 | 19 \pm 0,5 | 17 \pm 1,1 | 15 \pm 1,5 | 11 \pm 1 | 10 \pm 0,5 | 0 \pm 0 | 30 \pm 0,7 | 0 \pm 0 |

Fuente: Resultados de la Prueba de susceptibilidad o Kirby Bauer

Por otra parte, los resultados muestran que el aceite esencial de *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni también resultó ser activo frente a las bacterias Gram negativas estudiadas, siendo *Proteus mirabilis* la cepa que presentó menor sensibilidad al aceite.

Tabla 4. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni expresado por los halos de inhibición (mm), frente a bacterias Gram negativas.

| Aceite esencial de <i>Hedyosmum cuatrecazanum</i> O cchioni | | | | | | | | |
|---|--|---|--------------|--------------|---------------|---------------|------------------------------|----------------------------|
| Bacterias Gram negativas | Halos de inhibición(mm) $\bar{x} \pm SD$ | | | | | | Control Positivo | Control Negativo |
| | Aceite esencial | Concentración del aceite $\mu\text{g/mL}$ | | | | | | |
| | | | 1x 10^6 | 0,5x 10^6 | 0,25x 10^6 | 0,125x 10^6 | 0,062x 10^6 | Amikacina 30 μg |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 70063 | 14 \pm 1,2 | 11 \pm 0,8 | 10 \pm 0,9 | 9 \pm 0,8 | 9 \pm 1 | 0 \pm 0 | 30 \pm 5,5 | 0 \pm 0 |
| | | 1x 10^6 | 0,5x 10^6 | 0,25x 10^6 | 0,125x 10^6 | 0,062x 10^6 | Clindamicina 1 μg | DMSO |
| <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933 | 14 \pm 1,4 | 12 \pm 0,5 | 10 \pm 0,5 | 9 \pm 0,5 | 0 \pm 0 | 0 \pm 0 | 12 \pm 1,0 | 0 \pm 0 |
| | | 1x 10^6 | 0,5x 10^6 | 0,25x 10^6 | 0,125x 10^6 | 0,062x 10^6 | Amikacina 30 μg | DMSO |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | 15 \pm 1,2 | 13 \pm 1,9 | 11 \pm 0,8 | 10 \pm 0,8 | 9 \pm 0,5 | 0 \pm 0 | 17 \pm 3,6 | 0 \pm 0 |

Fuente: Resultados de la Prueba de susceptibilidad o Kirby Bauer

En la tabla 5 se puede apreciar las CMI del aceite esencial de *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni, que se obtuvieron realizando ensayos en diferentes concentraciones (1x 10^6 , 0,5x 10^6 , 0,25x 10^6 , 0,125x 10^6 , 0,062x 10^6 , 0,031x 10^6 $\mu\text{g/mL}$) frente a cada una de las cepas bacterianas analizadas.

Tabla 5.: Valor de CMI del aceite esencial de *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni, de cada una de las bacterias estudiadas con su respectivo control.

| Bacterias de Interés Clínico | Aceite esencial de <i>Hedyosmum cuatrecazanum</i> O cchioni |
|---|---|
| | CMI (µg/mL) |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 0,062x 10 ⁶ |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 70063 | 0,125x 10 ⁶ |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | 0,125x 10 ⁶ |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 | 0,125x 10 ⁶ |
| <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933 | 0,25x 10 ⁶ |

Fuente: Resultados de la Prueba de susceptibilidad o Kirby Bauer

Con los resultados obtenidos en la presente investigación existió efecto del aceite esencial extraído de la planta *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni; puesto que tuvo un resultado favorable con todas las bacterias ensayadas; demostrando que su mayor efectividad fue con *Staphylococcus aureus*, que obtuvo halos de mayor dimensión lo cual conllevó a determinar que su CMI es de 0,062x 10⁶ µg/mL: las bacterias que prosiguen son *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, con una CMI de 0,125x 10⁶ µg/mL y por último la bacteria *Proteus mirabilis* con una CMI 0,25x 10⁶ µg/mL.

Cabe mencionar que se obtuvo mejores resultados en la utilización del aceite esencial, ya que mostró una mayor dimensión en el halo de inhibición; sin embargo, con las diluciones utilizadas indicó al igual un buen resultado.

En una investigación realizada por Paredes (44) indicó que el género *Hedyosmum* no cuenta con suficientes estudios. Este género posee 124 compuestos, clasificados entre terpenoides, flavonoides, cumarinas, ácidos orgánicos, amidas y esteroides. Muchas de las plantas de este género ya han mostrado su actividad antimicrobiana y antimicótica y dicho efecto es gracias a la presencia de sus bioactivos en aceites esenciales (44).

Chagnama (16), en su investigación de determinación antimicótica de extractos hexánicos de *Hedyosmum sp.*, mencionó que las especies estudiadas de *Candida* presentaron sensibilidad al extracto utilizado, obteniendo una CMI de 0.125 g/ml. Por lo tanto, coincide en los resultados que aportó el género *Hedyosmum sp.*, el cual posee una actividad antimicótica y antimicrobiana.

Collaguazo (41), menciona que en su investigación las bacterias Gram negativas estudiadas, mostraron sensibilidad frente al aceite de *Hedyosmum sp.*, siendo *P. aeruginosa* la más sensible seguida de *E. coli* y *K. pneumoniae*, sin embargo, las bacterias Gram positivas

utilizadas en el ensayo no mostraron susceptibilidad. Resultados que no coincidieron en su totalidad con los resultados obtenidos en el presente trabajo, debido a que el aceite de *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni, mostró ser activo tanto en las bacterias Gram negativas como en las bacterias Gram positivas utilizadas, resultando *S. aureus* la más sensible.

Por último, un estudio realizado Kirchner et al (45) acerca de la actividad con el AE de *H. sprucei* frente a bacterias patógenos humanas en la que reportaron que las cepas más sensibles fueron las Gram positivas *L. grayi* y *S. aureus* con CMI de 250 y 1000 µg/mL respectivamente, lo cual evidenció que la investigación arrojó mejores resultados.

Los aceites esenciales poseen un uso particular en la prevención y tratamientos de varias patologías, son basadas en el uso de la medicina popular. Aproximadamente 300 aceites esenciales son importantes debido a su uso en la industria farmacéutica, cosmética y de perfumes (45).

CONCLUSIONES

- Se obtuvo 13,5mL de aceite esencial partir de 5,2 kg de hojas lo cual aportó con un rendimiento del 0.26% de la planta *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni.
- El aceite esencial de *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni y sus diferentes concentraciones mostró actividad antibacteriana en todas las cepas estudiadas; destacando que su mayor efectividad con *Staphylococcus aureus*.
- El aceite esencial de *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni en la investigación resultó los siguientes datos. *Staphylococcus aureus*, que obtuvo su CMI de $0,062 \times 10^6 \mu\text{g/mL}$; *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, con una CMI de $0,125 \times 10^6 \mu\text{g/mL}$ y por último la bacteria *Proteus mirabilis* con una CMI $0,25 \times 10^6 \mu\text{g/mL}$, por lo tanto, se demostró que los componentes bioactivos del aceite esencial posee un efecto inhibitor.

RECOMENDACIONES

1. Los extractos de las plantas medicinales como el *Hedyosmum*, *cuatrecazanum* deben ser extraídos con exactitud aplicando el protocolo específico para la obtención del aceite esencial que aportará con el futuro resultado en los distintos ensayos en los que sea partícipe.
2. El aceite esencial debe ser conservado en recipientes adecuados para evitar su evaporación y conservados en refrigeración, además se sugiere esterilizar el material utilizado en el análisis.
3. La investigación e interpretación de los resultados de la actividad bactericida favorece a combatir varias enfermedades especialmente las infecciosas, por lo tanto se debe aplicar el método adecuado para el análisis como lo es Kirby Bauer o Difusión en disco mediante la obtención de una cepa de calidad del microorganismo que se desea analizar (bacterias de interés clínico), realizando una adecuada preparación y esterilización de los medios, colocando e impregnado correctamente los discos, dejando reposar las placas por 20 min en refrigeración para que el aceite logre difundirse en el agar, además realizando una buena lectura e interpretación de los resultados que se obtienen con la medición exacta de los halos y CMI.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Gestal. M Villacís.J. Superbugs, Ecuador y el Futuro. revista Órgano de divulgación Académica Científica de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de guayaquil. [Internet]. 2014 abril. [citado 2021 ago. 18];Vol.17 / N.º. 2. Disponible en: http://www.admisionynivelacion.ug.edu.ec/revistas/Revista_Ciencias_Medicas/REVISTA_N2_VOL17/Revista_2-2014-Art_Invitacion.pdf
2. Quiñones Pérez Dianelys. Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque "Una salud". Rev Cubana Med Trop [Internet]. 2017 Dic [citado 2021 Ago 17]; 69(3): 1-17. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602017000300009&lng=es.
3. Orrego E. Antimycotics of plant origin and medicinal plants: the hidden potential of Chile. Medwave 2012 Ago;12(8): e5480 doi: 10.5867/medwave.2012.08.5480
4. Serra Valdés Miguel Ángel. La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. Rev haban cienc méd [Internet]. 2017 Jun [citado 2021 Dic 01]; 16(3): 402-419. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2017000300011&lng=es.
5. Fariña Norma. Resistencia bacteriana: un problema de salud pública mundial de difícil solución. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud [Internet]. Abril de 2016 [consultado el 18 de agosto de 2021]; 14 (1): 04-05. Disponible en: http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1812-95282016000100001&lng=en. [https://doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2016.014\(01\)04-005](https://doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2016.014(01)04-005).
6. Ross, J., Larco, D., Colon, O., Coalson, J., Gaus, D., Taylor, K., Lee, S. Evolución de la Resistencia a los antibióticos en una zona rural de Ecuador. Práctica Familiar Rural. Revista Practica Familiar Rural. [Internet]. 2020 marzo [citado 2021 Ago 18]; 5(1). <file:///C:/Users/WinUser/Downloads/Dialnet-EvolucionDeLaResistenciaALosAntibioticosEnUnaZonaR-7527411.pdf>
7. Torres Rodríguez Silvia Hipatia, Tovar Torres María Clarisa, García Víctor Julio, Lucena María Eugenia, Araujo Baptista Liliana. Composición química del aceite esencial de las hojas de *Hedyosmum luteynii* Todzia (Chloranthaceae). Rev. peru biol. [Internet]. 2018 Abr [citado 2021 Ago 18]; 25(2): 173-178. Disponible en:

- http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332018000200012&lng=es. <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v25i2.14289>.
8. León Yáñez, Valencia, N. Pitmam, Endara, Ulloa Ulloa y. Navarrete. Libro Rojo de Plantas Endémicas del Ecuador. Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito. (Eds). 2019[Internet]. 2019 [citado 2021 Ago 21]. <<https://bioweb.bio/floraweb/librorojo>>.
 9. Barrera, Merlin. resultados1.com. Aceites Esenciales. [En línea] 2008. [Citado el: 18 de Agosto de 2021.] http://www.med-informatica.net/TERAPEUTICA-STAR/AceitesEsencialesUdeA_esencias2001b.pdf
 10. Organización Mundial de la Salud. who.int. [En línea] 2019. [Citado el: 18 de Agosto de 2021.] https://www.who.int/topics/infectious_diseases/es/
 11. Acuña L Guillermo. Evolución de la terapia antimicrobiana: lo que era, lo que es y lo que será. Rev. chil. infectol. [Internet]. 2003 [citado 2021 Nov 07]; 20(Suppl 1): 7-10. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182003020100001&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182003020100001>.
 12. Lemonnier N, Zhou G B, Prasher B, Mukerji M, Chen Z, Brahmachari SK, Nobleg D, Auffraya C, Sagnerh M. Traditional Knowledge-based Medicine: A Review of History, Principles, and Relevance in the Present Context of P4 Systems Medicine. Progress in Preventive Medicine [Internet]. 2017 Dic [citado 10 Ene 2018]; 2(7): e0011. Disponible en: <https://scholarspace.manoa.hawaii.edu/bitstream/10125/47330/de%20la%20Torre%20et%20al.%202008%20Encyclopedia%20of%20useful%20plants%20of%20Ecuador.pdf>
 13. Jacob Paredes Daniel, Buenaño-Allauca Mónica Patricia, Mancera-Rodríguez Néstor Javier. Usos de plantas Medicinales en la Comunidad San Jacinto del Cantón Ventanas, Los Ríos - Ecuador. rev.udcaactual.divulg.cient. [Internet]. 2015 June [cited 2021 Dec 02] ; 18(1): 39-50. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262015000100006&lng=en.
 14. Lista de Plantas Medicinales del Ecuador (y para qué sirven). Ecuador [Internet]. 2017 Ago [citado 25 Nov 2017]. Disponible en: <http://www.forosecuador.ec/forum/aficiones/salud/117954-lista-de-plantas-medicinalesdel-ecuador-y-para-que-sirven>
 15. Rivas-Morales C, Oranday-Cárdenas MA, Verde-Star MJ, editoras. Investigación en plantas de importancia médica. México:OmniaScience Monographs, c2016. 437 p

16. Chagnama. N. Determinación antimicótica de extractos hexánicos de *Hedyosmum* sp., recolectadas en el bosque Jaracón - Ecuador. [Internet]. [Licenciada en Laboratorio Clínico e Histopatológico]. Riobamba: Universidad nacional de Chimborazo. Facultad de Ciencias de la Salud.;2019. Disponible en: <http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/6155>
17. Ruiz JR, Roque M. Actividad antimicrobiana de cuatro plantas del nor-oriente peruano. Ciencia e Investigación [Internet]. 2009 [citado 25 noviembre 2017]; 12(1):41-7. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/3387/450>
18. Berry, Paul E. britannica.com. [En línea] 2017. [Citado el: 18 de Agosto de 2021.] <https://www.britannica.com/plant/Chloranthales#ref1007697>.
19. 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 Técnica Particular de Loja, Bioquímica Farmacéutica; 2014. Report No.: 1. Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/paper/Determinaci%C3%B3n-fisicoqu%C3%ADmica-y-evaluaci%C3%B3n-de-la-del-Jaramillo-Alexandra./2ca3bb063bed26b564ea8f88e98a1f75344702a1>
20. Torres Rodríguez Silvia Hipatia, Tovar Torres María Clarisa, García Víctor Julio, Lucena María Eugenia, Araujo Baptista Liliana. Composición química del aceite esencial de las hojas de *Hedyosmum luteynii* Todzia (Chloranthaceae). Rev. peru biol. [Internet]. 2018 Abr [citado 2021 Dic 01]; 25(2):173-178. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332018000200012&lng=es. <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v25i2.14289>.
21. Escobar, Eduardo Orrego Antimicóticos de origen vegetal y plantas medicinales: el potencial escondido de Chile. Revista Biomédica Revisada Por Pares, Vol. 2 [Internet]. 2012 Agos [citado 2021 Ago 21]. Disponible en: <https://www.medwave.cl/medios/medwave/septiembre2012/PDF1/medwave.2012.08.5480.pdf>
22. WordPress. quimicafacil.net. Obtención de aceites esenciales por hidrodestilación. [En línea] Noviembre de 2018. [Citado el: 19 de Mayo de 2019.] <http://quimicafacil.net/manual-de-laboratorio/obtencion-de-aceites-esenciales-por-hidrodestilacion/>.
23. Sader Hélio. Resistencia antimicrobiana en Latinoamérica: ¿Cómo estamos? Rev. chil. infectol. [Internet]. 2002 [citado 2021 Ago 18]; 19(Suppl 1): S5-S13. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182002019100001&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182002019100001>.

24. Palou, N. Las 12 bacterias resistentes a los antibióticos que preocupan a la OMS. La Vanguardia. 2017 marzo [citado 2021 Dic. 03]; Disponible en: <https://www.lavanguardia.com/vivo/ecologia/20170303/42474062362/bacterias-resistentes-antibioticos-oms-salud-enfermedades.html>
25. Maguiña Vargas Ciro. Infecciones nosocomiales. Acta méd. Perú [Internet]. 2016 jul [citado 2021 Ago. 26]; 33(3): 175-177. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172016000300001&lng=es.
26. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA, editores. Microbiología Médica. 9na ed. Barcelona, España: Elsevier España, S.L.; c2021. 117-118 p.
27. Hurtado M. P., de la Parte M. A., Brito A. *Staphylococcus aureus*: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. Rev. Soc. Ven. Microbiología. [Internet]. 2002 Jul [citado 2021 Nov 18]; 22(2): 112-118. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562002000200003&lng=es.
28. Zendejas-Manzo GS, Avalos-Flores H, Soto-Padilla MY. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. Rev Biomed [Internet]. 2014 sep [citado 19 Ene 2018]; 25:129-43. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2014/bio143d.pdf>
29. Díaz Pérez Marilyn, Rodríguez Martínez Claudio, Zhurbenko Raisa. Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. Rev Cubana Hig Epidemiol [Internet]. 2010 Ago [citado 2021 Nov 18]; 48(2): 147-161. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032010000200006&lng=es.
30. Acosta-Gnass SI. Enterococcus. Grupo Asesor: Control de Infecciones y Epidemiología, CODEINEP. [Internet]. 2005 Ago [Citado 3 enero 2018]. Disponible en: <http://codeinep.org/wp-content/uploads/2017/02/Enterococcus.pdf>.
31. Varela Y, Millán B, Araque M. Diversidad genética de cepas extraintestinales de *Escherichia coli* productoras de las betalactamasas TEM, SHV y CTX-M asociadas a la atención en salud. Biomédica [Internet]. 2017 [citado 28 Ene 2018]; 37(2):209-17. doi: <http://www.redalyc.org/pdf/843/84350981011.pdf>
32. Canata María Gabriela, Navarro Rodrigo, Velázquez Gladys, Rivelli Sofía, Rodríguez Fátima, Céspedes Ana et al. Caracterización molecular de factores de virulencia de aislados *Escherichia coli* obtenidas de heces de niños con gastroenteritis del Hospital Central del

- Instituto de Previsión Social en el 2012. *Pediatr.* (Asunción) [Internet]. Abril de 2016 [consultado el 18 de noviembre de 2021]; 43 (1): 13-17. Disponible en: http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1683-98032016000100002&lng=en. <https://doi.org/10.18004/ped.2016.abril.13-17> .
33. Villamil Cajoto I., Eynde Collado A. Van den, Villacián Vicedo M. J., Martínez Rey C., Rodríguez Otero L., Rodríguez Framil M. Neumonía comunitaria por *Proteus mirabilis*. *An. Med. Interna (Madrid)* [Internet]. 2006 Mar [citado 2021 Nov 18]; 23(3): 146-146. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992006000300016&lng=es.
 34. Espinosa-Antúnez VK, Castrillón-Rivera LE, Vega-Memije ME, et al. Alteraciones en el tracto urinario durante la infección con *Proteus mirabilis* que expresa la toxina codificada en plásmido (Pet). *TIP Rev Esp Cienc Quim Biol.* 2019;22(1):1-10. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revespciequibio/cqb-2019/cqb191ad.pdf>
 35. López Vargas, Jaime Alberto, Echeverri Toro, Lina María, *K. pneumoniae*: ¿la nueva "superbacteria"? Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia. *Iatreia* [Internet]. 2010;23(2):157-165. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180519015007>
 36. Vitek. IDEX-Actualización 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. Zamora A., Arturo D. Composición química del aceite esencial de hojas de *Hedyosmum translucidum* Cuatrec., Chloranthaceae (Granizo). *Boletín Latinoam y del Caribe plantas Med y aromáticas* [Internet]. 2016 [cited 2019 Feb 7]; 15:192–8. Available from: www.blacpma.usach.cl
 39. Malbrán. C, Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución, [cited 2021 Dic 07] M07-A9 Vol. 32 No. 2. 2012 [Internet] Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/04-DETERMINACION-DE-LA-SENSIBILIDAD-METODO-DE-DILUCION-2012.pdf>
 40. Torres S, Tovar M, García V, Lucena M, Araujo L. Composición química del aceite esencial de las hojas de *Hedyosmum lutey nii* Todzia (Chloranthaceae). *Rev Peru Biol la Fac Ciencias Biológicas.* 2018;25(May):173–8.
 41. Collaguazo E, Lucena M, Cáceres V, Austáriz F. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Hedyosmum* sp. Del bosque natural Jacarón, Ecuador [Internet]. [Licenciada en

Laboratorio Clínico e Histopatológico]. Riobamba: Universidad nacional de Chimborazo. Facultad de Ciencias de la Salud.;2019. Disponible en: <http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/5533>

42. Correa M. Determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de actividad biológica del aceite esencial de *Hedyosmum Racemosum* G.Don de la familia Chloranthaceae de la provincia de Loja, a partir de individuos con flores femeninas. [Internet]. Universidad Técnica Particular de Loja; 2014 [cited 2019 Feb 7]. Available from: http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/10488/1/Correa_Conza_Magdaly_Juliana.pdf
43. Bernal M. Guzman M. BIOMEDICA Vol. 4, No. 3 y 4 - 1984[cited 2019 Junio 16]. Actualizaciones el Antibiograma de discos.Tecnica De Kirby-Bauer Disponible en: <https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/viewFile/1891/1917>
44. Paredes M. Dspace. [Internet].; 2013 [citado 2019 Julio. Disponible en: <http://dspace.utpl.edu.ec/handle/123456789/7896>.
45. Kirchner K, Wisniewski A, Cruz A, Biavatti M, Netz D. Chemical composition and antimicrobial activity of *Hedyosmum brasiliense* Miq., Chloranthaceae, essential oil. Rev Bras Farmacogn [Internet]. 2010 Nov [cited 2019 Feb 12];20(5):692–9. Available from: <https://www.scielo.br/j/rbfar/a/WBJKzx7XbtHV6RYC4Q5ZrVn/?lang=en>

ANEXOS

Anexo 1: Autorización de recolección de especímenes de especies de la diversidad Biológica



Ministerio del Ambiente, Agua
y Transición Ecológica

AUTORIZACIÓN DE RECOLECCION DE ESPECIMENES DE ESPECIES DE LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA No. 1378

ESTUDIANTES E INVESTIGADORES (SIN FINES COMERCIALES)

1.- AUTORIZACIÓN DE RECOLECTA DE ESPECÍMENES DE ESPECIES LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA

2.- CÓDIGO

MAAE-ARSFC-2021-1378

3.- DURACIÓN DEL PROYECTO

| FECHA INICIO | FECHA FIN |
|--------------|------------|
| 2021-06-25 | 2022-06-25 |

4.- COMPONENTE A RECOLECTAR

| |
|---------|
| Plantae |
|---------|

El Ministerio del Ambiente y Agua, en uso de las atribuciones que le confiere la Codificación a la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre autoriza a:

5.- INVESTIGADORES /TÉCNICOS QUE INTERVENDRÁN EN LAS ACTIVIDADES DE RECOLECCION

| Nº de C./Pasaporte | Nombres y Apellidos | Nacionalidad | Nº REGISTRO SENESCYT | EXPERIENCIA | GRUPO BIOLÓGICO |
|--------------------|---------------------------------|--------------|----------------------|-----------------------------|-----------------|
| 1600441842 | RODRIGUEZ LLERENA MARCO VINICIO | Ecuatoriana | 1002-13-1230365 | Ingeniero Forestal (8 años) | Magnoliopsida |

6.- PARA QUE LLEVEN A CABO LA RECOLECCION DE ESPECIMENES DE ESPECIES LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA:

Nombre del Proyecto: Composición química evaluación antioxidante y antimicrobiana de aceites esenciales de especies del género Hedyosmun de los Andes del Ecuador.

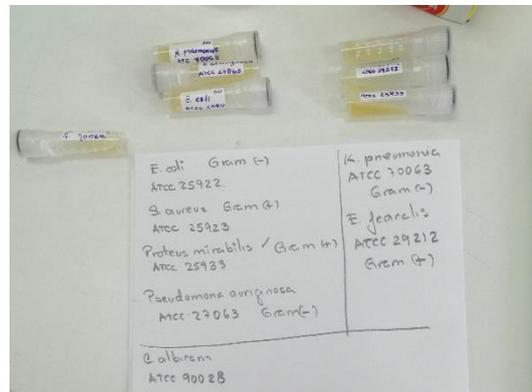
7.- SE AUTORIZA LA RECOLECCION CON EL PROPOSITO DE:

| |
|--|
| Analizar la composición química de aceites esenciales de especies del género Hedyosmun endémicas del Ecuador y determinar la |
|--|

Anexo 2: Proceso de extracción del aceite esencial de la planta *Hedyosmum cuatrecasum* O cchioni



Anexo 3: Cepas Microbianas ATCC



Anexo 4: Preparación del extracto a diferentes concentraciones



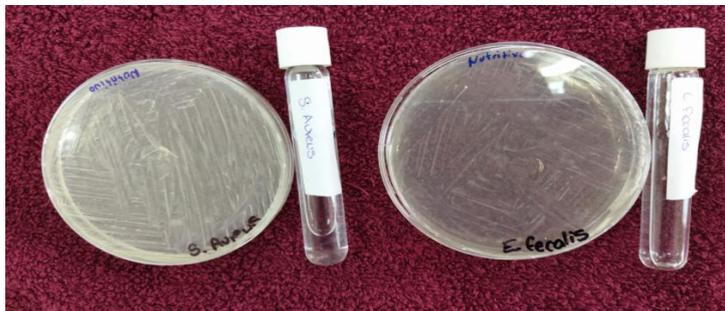
Anexo 5: Reactivación de cepas



Anexo 6: Preparación del Pre- inóculo



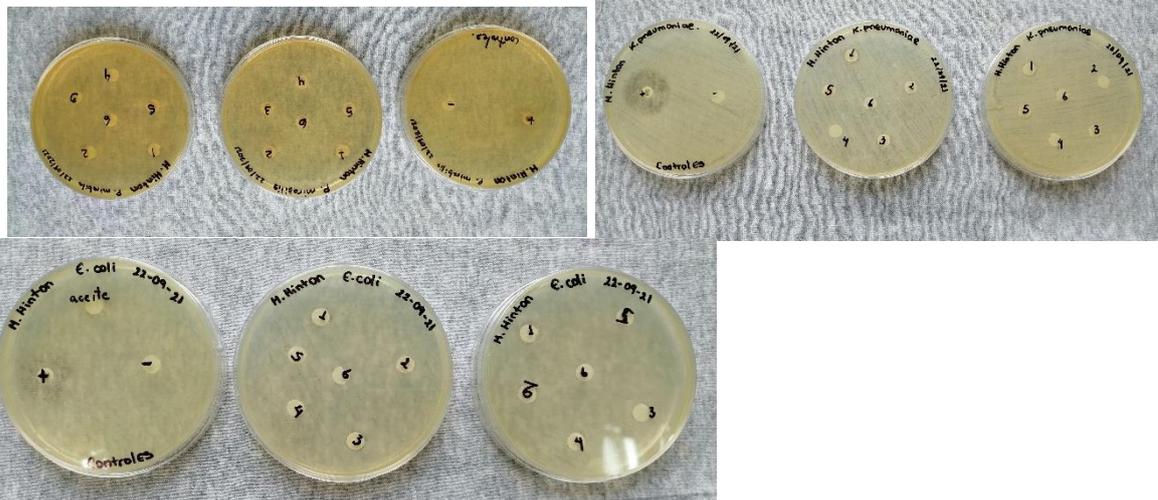
Anexo 7: Preparación del inóculo



Anexo 8: Siembra e impregnación de discos de los extractos, pre-incubación e incubación de las placas



Anexo 9: Lectura de resultados



Anexo 10: CÓDIGO MAAE-ARSFC-2021-1378



HERBARIO POLITECNICA CHIMBORAZO (CHEP)

ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL CHIMBORAZO
Panamericana sur Km 1, fono: (03) 2 998-200 ext. 700123, jcaranqui@yahoo.com
Riobamba Ecuador

Ofc.No.016.CHEP.2021

Riobamba, 3 de junio del 2021

DIRECTOR DE BIODIVERSIDAD
LAGLA CHIMBA BYRON ADRIAN
2021-04-22

De mis consideracion:

Reciba un atento y cordial saludo, por medio de la presente certifico que la señora LUCENA DE USTARIZ MARIA EUGENIA con PASAPORTE: 120617458, entregó 4 muestras botánicas fértiles, 1 infertil (listado), identificadas, comparando con muestras de la colección y verificación de nombres en el catálogo de plantas Vasculares del Ecuador; Nombre del Proyecto: Actividad biológica de productos naturales de las especies vegetales de *Hedyosmun spp.*, que crecen en el bosque natural Jacarón Cantón Colta Provincia de Chimborazo, según autorización de Investigación N°. MAAE-ARSFC-2020-0366 Las muestras fértiles se procesarán y en un tiempo no determinado ingresarán a la colección del herbario.

| FAMILIA | ESPECIE | LOCALIDAD | ESTADO |
|----------------|--|------------|----------|
| CHLORANTHACEAE | <i>Hedyosmun cumbalense</i> Karst. | Palictahua | Fertil |
| CHLORANTHACEAE | <i>Hedyosmun cumbalense</i> Karst. | Palictahua | Fertil |
| CHLORANTHACEAE | <i>Hedyosmun cuatrecazanum</i> Occhioni | Palictahua | Fertil |
| CHLORANTHACEAE | <i>Hedyosmun cuatrecazanum</i> Occhioni | Palictahua | Fertil |
| CHLORANTHACEAE | <i>Hedyosmun sp.</i> | Llucud | Infertil |

Me despido, atentamente

Ing. Jorge Caranqui A.
RESPONSABLE HERBARIO CHEP