



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

Estudio antibacteriano del extracto de las hojas de *Hedyosmum* sp. del bosque natural Jacarón, Chimborazo. Octubre 2018 – febrero 2019

Autora: María Corina Pazmiño Navarrete

Tutora: Dra. Ana Carolina González Ph.D

Tutora Científica: Dra. María Eugenia Lucena Ph.D

Riobamba – Ecuador

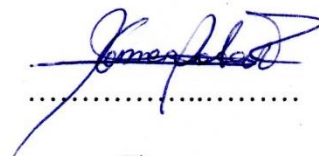
2019

REVISIÓN DEL TRIBUNAL

Los miembros del tribunal de graduación del proyecto de investigación de título: “Estudio antibacteriano del extracto de las hojas de *Hedyosmum* sp. del bosque natural Jacarón, Chimborazo. Octubre 2018 – febrero 2019”, presentado por María Corina Pazmiño Navarrete, dirigido por: Dra. Ana Carolina González PhD. Una vez escuchada la defensa oral y recibido el informe final del proyecto de investigación con fines de graduación escrito en el cual se ha constatado el cumplimiento de las observaciones realizadas, remite la presente para uso y custodia en la biblioteca de la Facultad de Ciencias de la Salud de la UNACH. Para constancia de lo expuesto firma:

Mgs. Ximena Robalino

Presidenta del tribunal



Firma

Mgs. Yisela Ramos

Miembro del tribunal



Firma

Dra. Liliana Araujo

Miembro del tribunal



Firma

DECLARACIÓN DEL TUTOR

Yo, Ana Carolina González docente de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico en calidad de Tutora del proyecto de investigación con el tema “Estudio antibacteriano del extracto de las hojas de *Hedyosmum* sp. del bosque natural Jacarón, Chimborazo. Octubre 2018 – febrero 2019”, propuesto por la Srta. María Corina Pazmiño Navarrete, egresada de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico de la Facultad de Ciencias de la Salud, luego de haber realizado las debidas correcciones, certifico que se encuentra apta para la defensa pública del proyecto. Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad facultando a la interesada hacer el uso del presente para los trámites correspondientes

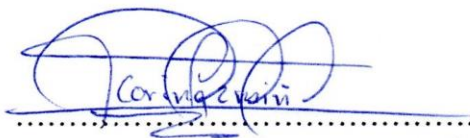


Dra. Ana Carolina González Ph.D

Docente de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico

AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN

“La responsabilidad del contenido de este Proyecto de Graduación, corresponde exclusivamente al autor María Corina Pazmiño Navarrete con cédula de identidad número 171852399-4 y el patrimonio intelectual de la misma a la Universidad Nacional de Chimborazo”



María Corina Pazmiño Navarrete

C.I. 1718523994

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por darme la fortaleza de superar los obstáculos y dificultades durante estos cinco años de mi carrera. A mi familia por su apoyo incondicional, su confianza y motivación durante mi formación académica. Agradezco a mis tutoras Dra. Ana Carolina González y a la Dra. María Eugenia Lucena por el apoyo y recomendaciones dadas durante la realización de este proyecto de investigación a la Dra. Liliana Araujo por su guía y sugerencias durante la realización del mismo. A la Universidad Nacional de Chimborazo especialmente a la carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico por haberme abierto las puertas y acogido durante todos estos años de mi carrera a la vez a todos mis profesores que con esmero compartieron día a día todas sus enseñanzas gracias infinitas a todos.

Corina Pazmiño

DEDICATORIA

A mi padre Patricio que con su perseverancia y apoyo incondicional me dio las fuerzas para la culminación de la carrera. A mi madre Hilda por su gran ejemplo de lucha constante que me enseñó a ser una guerrera y salir vencedora de todas las dificultades que se me han puesto en mi camino. A mis hermanos Patricio y Nicol que son mi motor para salir adelante y un incentivo para mi vida.

A mi padrino Saul que siempre me apoyó y confió en mí gracias por esas palabras de apoyo y consejos los cuales me sirvieron mucho en mi vida personal.

A mis abuelitos, tíos y primos que de una u otra manera han compartido mis momentos tristes y alegres gracias por su apoyo durante el tiempo de mi carrera.

Corina Pazmiño

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	5
Objetivo general	5
Objetivos específicos	5
CAPÍTULO I	6
MARCO TEÓRICO	6
Plantas del Ecuador	6
Taxonomía del género <i>Hedyosmum</i>	7
Características botánicas del género <i>Hedyosmum</i>	7
Extractos vegetales	8
Estructura Bacteriana	8
Bacterias Gram positivas	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	9
<i>Enterococcus faecalis</i>	10
Bacterias Gram negativas	11
<i>Escherichia coli</i>	11
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12
Bacterias Gram negativas no fermentadores	13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
Mecanismos de acción de los antimicrobianos	14
Mecanismos de resistencia de las bacterias a los antibióticos	15
Métodos de determinación de actividad antibacteriana	16
Método de difusión en disco (Kirby- Bauer)	17
Bacteriostático	17
Bactericida	18
Concentración Mínima Bactericida (CMB)	18
Concentración Mínima Inhibidora (CMI)	18
CAPÍTULO II	19
METODOLOGÍA	19
Investigación descriptiva	19
Diseño cuasiexperimental	19
Corte transversal	19
Enfoque mixto	19
Determinación de la población y muestra	19
Variables de estudio	20

Materiales	20
Equipos	20
Medios de cultivo	20
Cepas Bacterianas.....	20
Antibióticos	21
Procedimientos	21
Procedimiento para obtener el extracto	21
Procedimiento para realizar solución madre o Stock del extracto.....	21
Procedimiento para la preparación del preinóculo bacteriano.....	21
Procedimiento para la preparación del inóculo bacteriano y prueba antibacteriana mediante el método Kirby Bauer	22
CAPÍTULO III	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
Rendimiento del extracto hexánico de <i>Hedyosmum</i> sp.	23
CONCLUSIONES	26
RECOMENDACIONES	27
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Biodiversidad de plantas en el Ecuador	6
Figura 2. Planta y taxonomía del género <i>Hedyosmum</i>	7
Figura 3. Obtención de extractos vegetales	8
Figura 4. Infecciones por <i>Staphylococcus aureus</i>	9
Figura 5. Bacteria <i>Enterococcus faecalis</i>	10
Figura 6. Bacteria <i>Escherichia coli</i>	11
Figura 7. Bacteria <i>Klebsiella pneumoniae</i>	12
Figura 8. Bacteria <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
Figura 9. Método de difusión en disco (Kirby- Bauer)	17

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividad antibacteriana del extracto hexánico de las hojas de <i>Hedyosmum</i> sp. expresado por los halos de inhibición frente a las bacterias Gram negativas.....	23
Tabla 2. Actividad antibacteriana del extracto hexánico de las hojas de <i>Hedyosmum</i> sp. frente a las bacterias Gram positivas.	25
Tabla 3. Concentración Mínima Inhibitoria del extracto hexánico de las hojas de <i>Hedyosmum</i> sp. de las bacterias Gram negativas.	24
Tabla 4. Concentración Mínima Inhibitoria del extracto hexánico de las hojas de <i>Hedyosmum</i> sp. de las bacterias Gram positivas.	25

RESUMEN


En las dos últimas décadas ha aumentado en el mundo el uso de medicamentos tradicionales, particularmente de herbarios para cuidar y prevenir enfermedades, con el fin de disminuir el costo de los tratamientos. El objetivo de este proyecto es determinar la actividad antibacteriana del extracto hexánico obtenido de las hojas de la planta *Hedyosmum* sp. frente a bacterias ATCC de interés clínico como: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*. Para la obtención del extracto se utilizó las hojas las cuales fueron trituradas y procesadas por el método de maceración y se dejaron reposar en hexano por un periodo de 2–14 días posteriormente fue filtrado y rotaevaporado hasta la sequedad. La actividad antimicrobiana fue determinada mediante el método de Kirby- Bauer el cual fue ensayado a concentraciones de: 500.000, 250.000, 125.000, 62.500 y 31.250 $\mu\text{g/mL}$ partiendo de la solución stock preparada con dimetilsulfóxido, se usaron controles positivos y negativos. Se obtuvo un rendimiento del extracto de las hojas de un 5,42%. Los resultados obtenidos en este proyecto con las bacterias Gram negativas mostraron que *E. coli* fue la más sensible frente al extracto hexánico de las hojas, con un CMI de 31.250 $\mu\text{g/mL}$ a diferencia de las bacterias Gram positivas en las que solo hubo actividad antibacteriana para *S. aureus*, con un CMI de 250.000 ($\mu\text{g/mL}$). Este extracto puede ayudar frente a otras cepas bacterianas como un antimicrobiano natural.

Palabras claves: *Hedyosmum* sp., actividad antibacteriana, extracto vegetal, antibiograma.

Abstract

In the last two decades, the use of traditional medicines has increased worldwide, particularly herbal medicines to care for and prevent diseases, in order to reduce the cost of treatments. The objective of this project is to determine the antibacterial activity of the hexane extract obtained from the leaves of the plant *Hedyosmum* sp. against ATCC bacteria of clinical interest such as: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. Leaves were used to obtain the extract, which were crushed and processed by the maceration method and allowed to stand in hexane for a period of 2-14 days, after it was filtered and rotaevaporated until dry. The antimicrobial activity was determined by the Kirby-Bauer method which was tested at concentrations of: 500,000, 250,000, 125,000, 62,500 and 31,250 $\mu\text{g} / \text{mL}$ starting from the stock solution prepared with dimethyl sulfoxide, positive and negative controls were used. A yield of extract of the leaves of 5.42% was obtained. The results obtained in this project with the Gram negative bacteria showed that *E. coli* was the most sensitive against the hexane extract of the leaves, with a MIC of 31.250 $\mu\text{g} / \text{mL}$, unlike the Gram-positive bacteria in which there was only activity antibacterial for *S. aureus*, with a MIC of 250,000 ($\mu\text{g} / \text{mL}$). This extract can help against other bacterial strains as a natural antimicrobial.

Key words: *Hedyosmum* sp., Antibacterial activity, plant extract, antibiogram.



Revised by: Caisaguano Janneth

English Language Teacher



INTRODUCCIÓN

En las dos últimas décadas ha aumentado en todo el mundo el uso de medicamentos tradicionales, particularmente herbarios. En la resolución de la Asamblea Mundial de la Salud WHA56.31 sobre medicina tradicional, los miembros solicitaron a la Organización Mundial de la Salud (OMS) «que preste apoyo técnico, incluso con el fin de elaborar metodología para vigilar o garantizar la calidad, eficacia y seguridad de los productos, preparar directrices y promover el intercambio de información»¹.

Se recomendó que la OMS diera una prioridad alta a la elaboración de directrices aplicables en todo el mundo para fomentar la inocuidad y la calidad de las materias vegetales medicinales mediante la formulación de códigos de buenas prácticas agrícolas y buenas prácticas de recolección aplicables a las plantas medicinales¹.

Desde su origen, el hombre se sirvió de las plantas para cuidarse y prevenir enfermedades. En el curso de los siglos este saber, que es la medicina tradicional, se desarrolló y se transmitió verbalmente de generación en generación. En efecto, la medicina tradicional es muy desarrollada y utilizada por las poblaciones de la subregión andina y puede ser una solución a problemas de acceso a los centros de salud, o de costo de los tratamientos. En la actualidad, una de las preocupaciones de los países de la subregión andina es conservar este saber y, por otra parte, intentar de integrar esta medicina tradicional en los sistemas de salud “occidentales” o “clásicos”².

Ecuador se encuentra entre los 17 países con mayor diversidad a nivel mundial, alberga dos de los 24 hotspots o puntos calientes de biodiversidad, como son los Andes tropicales y el Chocó Darién ecuatoriano. Existen varios factores que determinan la alta biodiversidad del Ecuador, entre ellos se mencionan: la confluencia de varias regiones biogeográficas como el Chocó, Tumbes, los Andes y la Amazonía que atraviesan el país de norte a sur; y la variabilidad ambiental en cada una de estas zonas; así como la circulación de la corriente fría de Humboldt y la cálida del Niño³.

En Riobamba, un grupo de agricultores se ha dedicado a la siembra de especies que sirven para preparar remedios naturales. Las mujeres indígenas están dedicadas a este tipo de

actividades que incluyen limpias. Achira, ajeno, manzanilla, mucuna y llantén son algunas de las plantas medicinales que se encuentra en la parroquia Cebadas en el cantón Guamote, Chimborazo. Sus plantas han aliviado a cientos de personas de su comunidad convirtiéndola en una de las mujeres de sabiduría en la zona (yachac), reconocida por su pueblo y por el Ministerio de Salud Pública (MSP)⁴.

El género *Hedyosmum* forma parte de la familia Chloranthaceae, la cual está integrada por cuatro géneros y los grupos *Sarcandra* y *Chloranthus* (se encuentran en el este de Asia, Indonesia), *Ascaria* (Malasia, Polinesia y Nueva Zelandia) y el género *Hedyosmum* es el único presente en América, es el de mayor abundancia en la región andina de Sur América, donde se encuentran más de dos tercios de sus especies, esta crece en altitudes aproximadamente de 500 a 2.800 m.s.n.m., su hábitat es en las montañas encontrándose en regiones que están bajo la influencia frecuente de las nieblas o, en zonas más secas⁵.

Algunos géneros, especialmente *Chloranthus* y *Hedyosmum*, se utilizan como plantas ornamentales o medicinales: tonificante, estimulante, antifúngicas, vermífugas y antidiarreicas, y para fines alimentarios: bebidas tonificantes y saborizante de licores. Además, se referencian las investigaciones fitoquímicas en este género y se destacan los estudios realizados en aislamiento de lactonas⁶.

Hedyosmum es fácilmente reconocido por sus hojas opuestas y dentadas con la base de sus peciolo revestida, inflorescencia en espiga, ebracteada; estambres solitarios; flores con pistilos simples, con una sola bráctea floral, además de un agradable aroma a acre que emanan las zonas expuestas de la planta. El nombre *Hedyosmum* deriva del griego hedy (placentero) y osmum (olor) el cual es asociado con el de la pimienta, el limón y el anís⁵.

Las plantas han sido utilizadas durante muchos años por sus actividades biológicas para prevención y tratamiento de enfermedades, ya que se ha comprobado que tienen propiedades antimicrobianas. Los antimicrobianos son medicamentos esenciales para la salud humana y animal, y su aplicación ha permitido salvar millones de vidas. Sin embargo, su uso masivo e inapropiado, ha generado la aparición y el veloz desarrollo del fenómeno de la resistencia antimicrobiana (RAM). La RAM es uno de los mecanismos que tienen los microorganismos para defenderse en un medio desfavorable, como lo es la presencia de los antibióticos⁷.

La resistencia a los fármacos antibacterianos tiene particular importancia en América Latina. Las bacterias Gram positivas que producen infecciones humanas frecuentes son, en su mayoría, cocos: *Staphylococcus*, *Streptococcus* (incluidos *Neumococos*) y *Enterococcus*, tanto en el medio comunitario como en el nosocomial. Esta situación no es diferente en la Región de las Américas. Entre las bacterias Gram positivas, las que causan bacteriemia con mayor frecuencia corresponden a cepas de *Staphylococcus* coagulasa negativos, seguidas de las de *Enterococcus*⁸.

Las cepas del género *Streptococcus* aisladas de infecciones respiratorias aún son sensibles a penicilina. Por otra parte, la resistencia de las enterobacterias es de gran importancia en la Región, particularmente por la gran difusión de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) de tipo CTX-M, algunas de las cuales se originaron en América Latina⁸.

En lo referente a los antibióticos, existen varias opciones para tratar infecciones por bacterias Gram positivas. La situación terapéutica no es igual para las infecciones por enterobacterias y por bacilos Gram negativos no fermentadores, donde las opciones resultan aún insuficientes para el tratamiento adecuado de los pacientes⁸.

Los antibióticos han salvado millones de vidas, y además han supuesto una revolución en la medicina. Sin embargo, una amenaza creciente deteriora la eficacia de estos fármacos: la resistencia bacteriana a los antibióticos, que se define en este trabajo como la capacidad de una bacteria para sobrevivir en concentraciones de antibiótico que inhiben/matan a otras de la misma especie⁹.

La resistencia a los antibióticos en patógenos bacterianos humanos existía antes del uso de estos fármacos por el hombre y su prevalencia era baja. Los estudios realizados con bacterias obtenidas en los años previos al descubrimiento de los antibióticos o con bacterias de poblaciones humanas que no habían tenido acceso a ellos lo demuestran. Desde el uso masivo de los antibióticos se ha constatado a nivel mundial un aumento muy importante de la prevalencia de la resistencia⁹.

La resistencia a los antibióticos está aumentando en todo el mundo a niveles peligrosos. 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. Un creciente número de infecciones, como la neumonía, la tuberculosis, la septicemia, la gonorrea o las enfermedades de transmisión alimentaria, son cada vez más difíciles y a veces imposibles de tratar, a medida que los antibióticos van perdiendo eficacia. Allí donde los antibióticos se pueden adquirir sin receta médica para uso humano o veterinario, la aparición y propagación de la farmacorresistencia empeora. En los países que carecen de directrices terapéuticas normalizadas, el personal sanitario y veterinario tiene tendencia a prescribirlos y la población general a consumirlos en exceso¹⁰.

Debido a que no se han realizado muchos trabajos de investigación sobre la actividad antibacteriana de especies del género *Hedyosmum* que crecen en Ecuador, se considera importante investigar sobre este tema, con el propósito de determinar las propiedades del extracto hexánico de las hojas de esta planta, las cuales podrían ser útiles a futuro en la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos.

Esta investigación va ayudar a conocer los principios activos que se encontró en las hojas de *Hedyosmum* sp. los cuales ayudaran al desarrollo de nuevos medicamentos para el tratamiento de infecciones causadas por las bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*) o Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*).

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la actividad antibacteriana del extracto hexánico de las hojas de *Hedyosmum* sp. del bosque natural Jacarón Chimborazo en el periodo octubre 2018 – febrero 2019.

Objetivos específicos

1. Obtener el extracto hexánico de las hojas mediante la maceración de *Hedyosmum* sp del bosque natural Jacarón, Chimborazo.
2. Identificar el efecto antibacteriano del extracto hexánico de hojas de *Hedyosmum* sp. frente a bacterias Gram positivas y negativas ATCC mediante pruebas de susceptibilidad.
3. Determinar la concentración mínima inhibitoria del extracto hexánico de las hojas de *Hedyosmum* sp. por el método de Kirby- Bauer frente a las bacterias Gram negativas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 y bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

Plantas del Ecuador

La gran diversidad de la flora ecuatoriana ha sido reconocida y estudiada desde hace mucho tiempo, hace ocho años que se documentó la presencia de más de 16.000 especies de plantas (figura 1), la parte más importante la constituye una lista de 5.172 especies para las que se han reportado usos en el Ecuador, tanto a partir de especímenes de herbario como de diversas publicaciones¹¹.

Se recopilaron los usos de 221 especies forestales nativas en 20 comunidades de las provincias de Imbabura, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo y Cañar. Los usos más importantes fueron combustibles, materiales, medicinales y alimenticios, algunas de las especies útiles que se encontró en esta formación son: *Hypericum laricifolium* (C/A), *Vallea stipularis* (C/A), *Buddleja incana* (C/A), *Siphocampylus giganteus* (C/A), *Buddleja pichinchensis* (A), *Myrcianthes rhopaloides* (C), *Hesperomeles ferruginea* (C/A), *Cinchona officinalis* (A), *Brachyotum ledifolium* (C/A) y *Hedyosmum luteynii* (A)¹¹.



Figura 1. Biodiversidad de plantas en el Ecuador

Fuente: <http://biologiabiobiodiversida.blogspot.com/2015/03/>

En el Ecuador se dan a conocer 432 especies medicinales, 273 corresponden a aquellas que se expenden en las hierberías de los mercados y 255 silvestres, 92 se comparten entre las de mercado y silvestres. Las especies de las hierberías tratan 77 dolencias y las silvestres 74, las dolencias más comunes en los dos casos es la inflamación, limpiados, baño caliente, estomacal, circulación, nervios, resfrío, cicatrizante y aromática. Entre las especies de las

hierberías, 178 son nativas, 83 introducidas y 12 endémicas, mientras que de las silvestres 199 son nativas, 43 introducidas y 13 endémicas¹².

El uso terapéutico de plantas medicinales, como sustitutas de las medicinas farmacéuticas, se aplica desde la antigüedad para curar o aliviar las enfermedades. Sin embargo, no existe todavía la suficiente evidencia científica que consolide a la medicina herbaria dentro de los sistemas de salud¹³.

Taxonomía del género *Hedyosmum*

La familia Chloranthaceae tienen 4 géneros y 75 especies; solo el género *Hedyosmum* está presente en América el cual está constituido por unas 40 especies, la mayoría están presentes en bosques nublados y su taxonomía es (figura 2)¹⁴:



Reino	Plantae
División	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Chloranthales
Familia	Chloranthaceae
Género	<i>Hedyosmum</i>

Figura 2. Planta y taxonomía del género *Hedyosmum*.

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

Características botánicas del género *Hedyosmum*

Arbustos o árboles aromáticos, dioicos o raramente monoicos, madera blanca y suave. Hojas opuestas, simples, margen dentada, nervación pinnada, bases de los pecíolos expandidas y formando una vaina alrededor del tallo. Espigas masculinas, solitarias o reunidas en racimos o panículas de 60–200 flores; flores masculinas, consistiendo de 1 estambre solitario ditecal, cuadrangular, sin filamento. Espigas femeninas, solitarias, en cimas, tirso o panículas; brácteas florales suculentas, parcial o totalmente envolviendo a la flor; flores femeninas generalmente 2–15 reunidas en cimas, con el perianto adnato al ovario con 3 segmentos libres, parcial o totalmente fusionados en el tope del ovario; ovario 1-carpelar, 1-locular, 1 óvulo péndulo, estilo corto o ausente y estigma papiloso. Drupas embebidas en una matriz de brácteas¹⁵.

Extractos vegetales

Los extractos vegetales son compuestos producidos de la obtención de sustancias biológicamente activas presentes en los tejidos de plantas, por el uso de un solvente (alcohol, agua, mezcla de estos u otro solvente selectivo) y un proceso de extracción adecuado, dependiendo de la parte de ella utilizada, del solvente y de la técnica de extracción, se podrá obtener una diferente gama de sustancias (figura 3). Los principios activos pueden ser diferentes compuestos, con estructuras químicas casi idénticas, por lo que un extracto puede tener una actividad mayor que el principio activo aislado y purificado. Además, el extracto, como compuesto, suele presentar mayor estabilidad, actividad y tolerancia, careciendo, en la mayoría de los casos de efectos adversos o de generación de residuos¹⁶.



Figura 3. Obtención de extractos vegetales

Fuente: <https://es.slideshare.net/IgorVillalta/clase-9-extraccin-vegetal>

Estructura Bacteriana

Las diferentes estructuras bacterianas que observamos las podemos dividir, según sean constantes en las células o no, en estructuras permanentes o variables. Dentro de las primeras se destaca: la pared celular, la membrana celular, los ribosomas y el material genético. Las estructuras variables son: los flagelos, las fimbrias o pilis, la cápsula y los esporos, los cuales nos dejan distinguir de las bacterias Gram positivas y negativas¹⁷.

Bacterias Gram positivas

Las bacterias Gram positivas que producen infecciones humanas frecuentes son, en su mayoría, cocos: *Estafilococos*, *Streptococos* incluidos *Neumococos* y *Enterococos*, tanto en el medio comunitario como en el nosocomial. En los Estados Unidos de América, el proyecto de vigilancia de agentes patógenos de importancia epidemiológica (SCOPE, por su

sigla en inglés) indica que 60% de las bacteriemias nosocomiales son causadas por cocos Gram positivos aerobios o facultativos⁸.

Staphylococcus aureus

Pertenece a la familia Staphylococcaceae. Es Gram positivo, aunque las cepas viejas o los microorganismos fagocitados se tiñen como Gram negativo. Tiene forma de coco y puede aparecer en parejas, en cadenas o en racimos, su tamaño oscila entre 0,8 a 1,5 micras de diámetro, es inmóvil y algunas cepas producen una cápsula externa mucoide que aumenta su capacidad para producir infección. En relación con su metabolismo, es anaerobio facultativo, coagulasa positivo, catalasa positivo y oxidasa negativo¹⁸.

La transmisión se produce principalmente por ingesta de alimentos contaminados con la bacteria o sus toxinas. En el ámbito laboral, la transmisión se produce por contacto con personas, animales (zoonosis) o elementos contaminados, es responsable de muchos casos de enfermedad nosocomial, produciendo infecciones de la piel y las mucosas (figura 4), las infecciones internas que se complican en individuos inmunodeprimidos, pudiendo producir endocarditis, meningitis, artritis séptica, neumonía y osteomielitis, que pueden llegar a ser mortales, esta bacteria es sensible a aminoglucósidos y cefalosporinas, pero la mayoría de las cepas son multirresistentes, por lo que para cada cepa debe determinarse la sensibilidad a antimicrobianos¹⁸.

Para la prevención de infecciones por esta bacteria en hospitales o centros sanitarios se debe aislar al paciente, adoptando las precauciones estándar y las precauciones por contacto, se debe realizar buenas prácticas de higiene como: aseo personal, lavado de manos, evitar tocarse la cara o las mucosas con las manos o el guante sucio¹⁸.

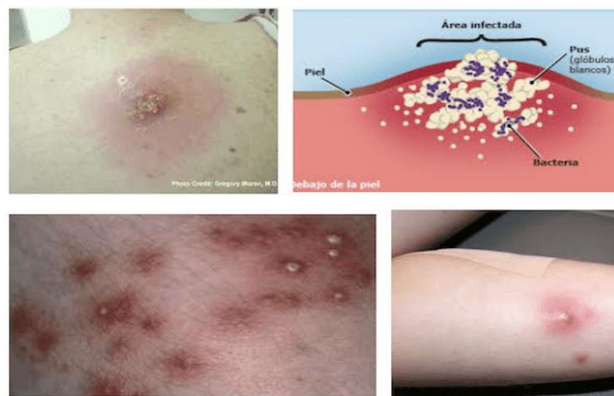


Figura 4. Infecciones por *Staphylococcus aureus*

Fuente: <https://saludalmaximo.com/enfermedades/piel/infeccion-por-sarm/>

Enterococcus faecalis

Los *enterococos* son cocos Gram positivos, que se encuentran aislados, de a pares, o formando cadenas cortas, son catalasa negativa, anaerobios facultativos, capaces de crecer en condiciones un tanto extremas (figura 5). Las características bioquímicas sobresalientes incluyen: la habilidad de crecer en presencia de NaCl al 6,5%, a temperaturas entre 10°C y 45°C, y hasta en un pH de 9,6, son parte de la flora normal endógena humana, y tienen poco potencial patogénico en el huésped normal¹⁹.

Sin embargo, en el anciano o en el paciente inmunocomprometido, estos organismos se vuelven patógenos oportunistas. Las infecciones ocurren cuando las defensas del huésped descienden por una enfermedad y por el uso de dispositivos invasivos¹⁹.

El primer paso en el proceso infeccioso parece ser la colonización del tracto gastrointestinal por parte de cepas nosocomiales, que pueden persistir durante meses o años, aunque sea documentado la inoculación directa endovenosa, a través de catéteres urinarios, dispositivos intravenosos usados en el área de anestesia o del uso compartido de termómetros²⁰.

Para estos microorganismos Gram positivos se utilizó Ciprofloxacina que es un antibiótico que combate infecciones causadas por bacterias, también combate muchas bacterias diferentes, es utilizado para combatir infecciones oportunistas en personas VIH positivas²¹.



Figura 5. Bacteria *Enterococcus faecalis*

Fuente: <https://www.alamy.es/foto-enterococcus-faecalis-bacterias-ilustraciones-33304414.html>

Bacterias Gram negativas

La resistencia de las bacterias Gram negativas de importancia clínica a los antibacterianos se presenta fundamentalmente en la familia Entobacteriaceae y en bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNNF), en esta familia, las especies *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis* son las más frecuentes como causa de infecciones urinarias, tanto en la comunidad como en el hospital. Las cepas de *Klebsiella* spp. y *Enterobacter* spp. son agentes etiológicos importantes en casos de neumonía, y todas las enterobacterias están implicadas en infecciones intraabdominales y bacteriemias⁸.

Escherichia coli

Es una bacteria que habita naturalmente en el intestino de humanos y de algunos animales (figura 6), pero que en grandes cantidades puede causar problemas como gastroenteritis o infección urinaria, dependiendo si el exceso de bacterias surge a nivel intestinal o del tracto urinario. Ocurre principalmente cuando se consume agua o alimentos contaminados con la bacteria²².

Es frecuente que se transmita por el consumo de carne picada poco cocinada, pero se ha detectado en otros productos animales como salami seco, carne asada, leche y yogur no pasteurizados, también pueden estar presentes en las frutas y verduras crudas, así también como el agua no tratada o contacto directo con heces animales o humanas²³.

No existe una vacuna ni un medicamento que pueda protegerte contra la enfermedad causada por *E. coli*, pero los investigadores están estudiando posibles vacunas. Para reducir las posibilidades de estar expuesto a la misma, evita los alimentos riesgosos y ten cuidado con la contaminación cruzada²⁴.



Figura 6. Bacteria *Escherichia coli*

Fuente: <https://www.thecanadianencyclopedia.ca/en/article/hamburger-disease>

Klebsiella pneumoniae

Es un patógeno oportunista colonizador de piel y mucosas de pacientes hospitalizados que pueden presentar infecciones invasoras como bacteriemias o septicemias (figura 7). Usualmente las manos contaminadas del personal son el vehículo responsable de brotes epidémicos. Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas derivadas de las familias TEM y SHV, codificadas en plásmidos, que han substituido de 1 a 3 aminoácidos cercanos al sitio activo confiriendo resistencia a aztreonam, cefotaxima y ceftazidima²⁵.

Este género bacteriano, está implicada principalmente en infecciones nosocomiales. Es el agente causal de infecciones del tracto urinario, neumonías, sepsis, infecciones de tejidos blandos, e infecciones de herida quirúrgica. Son especialmente susceptibles los pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos, neonatos, y pacientes con EPOC, diabetes mellitus o alcohólicos²⁶.

Para la prevención de esta bacteria se debe tomar en cuenta las siguientes medidas:

- Promover la higiene de manos.
- Monitorear la adherencia a la higiene de manos y devolver la información a los involucrados, mediante tasas de cumplimiento por cargo y por turno.
- Asegurar el acceso a los elementos para la higiene de manos en los puntos de uso y salida del servicio.
- Cumplir estrictamente con las medidas de prevención de infecciones específicas (Infección urinaria, Bacteriemia relacionada a catéter, Neumonía del ventilado, Infección de sitio quirúrgico, etc.)²⁷.



Figura 7. Bacteria *Klebsiella pneumoniae*

Fuente: <https://www.elbotiquin.mx/medicina-general/que-danos-cause-la-bacteria-klebsiella-pneumoniae>.

Bacterias Gram negativas no fermentadores

En el medio hospitalario de Latinoamérica, el mayor problema de resistencia es ocasionado por las infecciones por bacilos Gram negativos no fermentadores. Si bien este grupo de bacterias es numeroso, las especies más problemáticas, por su resistencia extrema, son *Acinetobacter* spp. y *Pseudomonas aeruginosa*. Ambas son multirresistentes, aunque tienen diferencias notables en su virulencia⁸.

Pseudomonas aeruginosa

Pertenece a la familia Pseudomonaceae. Se trata de un bacilo recto o ligeramente curvado Gram negativo, con un tamaño de 2–4 x 0,5-1 micras, y móvil gracias a la presencia de un flagelo polar (figura 8). En relación con su metabolismo, es aerobio (aunque puede desarrollarse en condiciones anaerobias utilizando nitrato), catalasa positivo y oxidasa positivo²⁸.

Su transmisión se produce principalmente a través del contacto de la piel lesionada o reblandecida y de las mucosas con el agua o con los objetos contaminados. En el ámbito sanitario, constituyen una fuente de infección para los pacientes al contacto con el instrumental quirúrgico, los respiradores, los catéteres o las manos del personal sanitario contaminadas, entre otros²⁸.

La *P. aeruginosa* continúa siendo una frecuente causa de infección con una importante morbilidad y mortalidad, que oscila entre un 18% y un 61%, según las series. Esta mortalidad es superior en pacientes neutropénicos e inmunodeprimidos. En especial conviene resaltar que el Nódulo auriculoventricular (NAV) por *P. aeruginosa* tiene una mortalidad atribuible alta. En un estudio, que evaluó sólo los casos que recibieron inicialmente tratamiento empírico adecuado, la mortalidad atribuible fue del 13,5%²⁹.

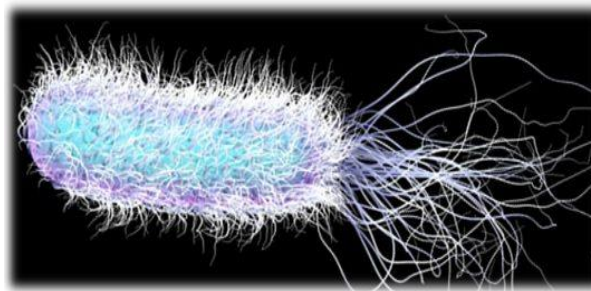


Figura 8. Bacteria *Pseudomonas aeruginosa*

Fuente: <https://wickhamlabs.co.uk/technical-resource-centre/fact-sheet-pseudomonas-aeruginosa/>

Mecanismos de acción de los antimicrobianos

Hay una amplia diversidad de familias y grupos de antimicrobianos de interés clínico. Los mecanismos por los que los compuestos con actividad antibacteriana inhiben el crecimiento o causan la muerte de las bacterias son muy variados y dependen de las dianas afectadas como la pared celular, membrana plasmática, proteínas y ácidos nucleicos³⁰.

➤ **Inhibición de la síntesis de la pared celular**

La pared celular protege la integridad anatomofisiológica de la bacteria y soporta su gran presión osmótica interna. La ausencia de esta estructura condicionaría la destrucción del microorganismo. Los antibióticos que inhiben la síntesis de la pared necesitan para ejercer su acción que la bacteria se halle en crecimiento activo, y para su acción bactericida requieren que el medio en que se encuentre la bacteria sea isotónico o hipotónico, lo que favorece el estallido celular cuando la pared celular se pierde o se desestructura³⁰.

➤ **Daño de la membrana plasmática**

La membrana citoplásmica es vital para todas las células, ya que interviene activamente en los procesos de difusión y transporte activo y de esta forma controla la composición del medio interno celular. Las sustancias que alteran esta estructura modifican la permeabilidad, y provocan la salida de iones potasio, elementos esenciales para la vida bacteriana, o la entrada de otros que a altas concentraciones alteran el metabolismo bacteriano normal³⁰.

Los antimicrobianos que actúan en esta estructura se comportan como bactericidas, incluso en bacterias en reposo, y pueden tener alta toxicidad sobre las células humanas, al compartir algunos componentes de la membrana citoplásmica³⁰.

➤ **Inhibición de la síntesis de proteínas**

La síntesis proteica es uno de los procesos más frecuentemente afectados por la acción de los antimicrobianos, y su inhibición selectiva es posible gracias a las diferencias estructurales entre los ribosomas bacterianos y eucariotas la cual puede bloquearse por una amplia variedad estructural de compuestos que afectan a algunas de las fases de este proceso: activación (mupirocina), iniciación (oxazolidinonas, aminoglucósidos), fijación del complejo aminoácido-ARNt al ribosoma (tetraciclinas, glicilciclinas) o elongación (anfenicoles, lincosamidas, macrólidos, cetólidos, estreptograminas o ácido fusídico)³⁰.

➤ **Inhibición de los ácidos nucleicos**

El genoma bacteriano contiene información para la síntesis de proteínas que se transmite a través del ARN mensajero producido a partir del molde de ADN (transcripción), y para la síntesis de ARN ribosómico que formará parte de los ribosomas bacterianos. La información del ADN debe duplicarse (replicación) cuando la bacteria se divide, para transmitir esta información a la descendencia. La replicación y la transcripción del ADN se realizan en varias fases con la participación de diferentes enzimas y sustratos, además del ADN molde, que constituyen dianas para la acción de diversos antibióticos³⁰.

➤ **Antibióticos inhibidores de β -lactamasas**

Los más importantes son los inhibidores de β -lactamasas de serina, que incluyen ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. Carecen (habitualmente) de acción antibacteriana intrínseca de verdadera importancia clínica, pero se unen irreversiblemente a algunas β -lactamasas, protegiendo de su acción a los antibióticos β -lactámicos. El sulbactam, además, es activo frente a *A. baumannii*³⁰.

Mecanismos de resistencia de las bacterias a los antibióticos

La resistencia antibiótica puede ser natural (intrínseca) o adquirida. La resistencia natural es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano. Por ejemplo, todos los microorganismos Gram negativos son resistentes a la vancomicina, y esta situación no es variable. La resistencia adquirida es variable y es adquirida por una cepa de una especie bacteriana. Así, existen cepas de *Neumococo* que han adquirido resistencia a la penicilina, cepas de *Escherichia coli* resistentes a la ampicilina, cepas de estafilococos resistentes a la metilicina. La resistencia adquirida es la que puede llevar a un fracaso terapéutico cuando se utiliza un antibiótico supuestamente activo sobre el germen que produce la infección³¹.

➤ **Inactivación del antibiótico por destrucción o modificación de la estructura química**

El fenotipo de resistencia antibiótica por destrucción o modificación de la estructura química es un proceso molecular caracterizado por la producción de enzimas que van a llevar a cabo esta función. Las enzimas que destruyen la estructura química, más conocidas, son las beta-lactamasas que se caracterizan por hidrolizar el núcleo beta-lactámico rompiendo el enlace amida, otra enzima es la eritromicina esterasa que cataliza la hidrólisis del anillo de lactona del antibiótico. Entre las enzimas que se encargan de la modificación de la estructura se

encuentran: cloranfenicol acetiltransferasa y también a las enzimas que modifican a los aminoglucósidos, lincosamidas y estreptograminas (acetilasas, adenilasas y fosfatasas)³².

➤ **Alteración del sitio blanco del antibiótico**

La resistencia bacteriana conferida por la alteración del sitio en donde actúa el antibiótico consiste en la modificación de algunos sitios específicos de la célula bacteriana como la pared celular, la membrana celular, la subunidad 50S o 30S ribosomales, entre otras. Por ejemplo, la modificación por mutación de los genes *gyrA* y *gyrB* que codifican para las topoisomerasas II y IV respectivamente, ofrecen resistencia bacteriana a *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli* frente a las quinolonas. En cuanto a las modificaciones a nivel ribosomal se mencionan los cambios que ocurren en las subunidades 30S y 50S los cuales son los sitios de acción de aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas y lincosamidas. Por ejemplo, la metilación del RNA ribosomal de la subunidad 50S confiere resistencia a *S. aureus* y *S. epidermidis* frente a tetraciclinas, cloranfenicol y macrólidos. La resistencia bacteriana contra gentamicina, tobramicina y amikacina consiste en una mutación de la subunidad ribosomal 30S³².

➤ **Alteración en las barreras de permeabilidad**

Este mecanismo se debe a los cambios que se dan en los receptores bacterianos específicos para los antimicrobianos o por alteraciones estructurales en los componentes de envoltura de la célula bacteriana (membrana o pared celular) que influyen en la permeabilidad, así como a la pérdida de la capacidad de transporte activo a través de la membrana celular o la expresión de bombas de eflujo las cuales se activan en el momento en que el antibiótico se introduce a la célula bacteriana³².

La membrana celular de las bacterias Gram negativas contiene un alto contenido de lípidos con respecto a las Gram positivas, presenta una membrana externa con un 40% de lipopolisacárido lo cual le proporciona una barrera efectiva contra la entrada de antibióticos, dependiendo de la composición química de estos³².

Métodos de determinación de actividad antibacteriana

Dentro de los principales métodos de evaluación preliminar de la actividad antimicrobiana se encuentran los métodos de difusión en disco (Kirby- Bauer) y difusión del pozo en agar, mediante los cuales se determina en forma cualitativa el efecto antimicrobiano de los

extractos de plantas sobre los microorganismos de interés, los resultados obtenidos se expresan midiendo el diámetro de los halos de inhibición producido por los extractos³³.

Método de difusión en disco (Kirby- Bauer)

La técnica de difusión en agar, es cualitativa y sus resultados se pueden interpretar únicamente como sensible, intermedio o resistente, y está diseñada específicamente para bacterias de crecimiento rápido como *Staphylococcus* sp. o los integrantes de la familia Enterobacteriaceae³⁴.

Cada plato es observado en una luz indirecta y cada halo de inhibición es medido utilizando un caliper o en su defecto una regla graduada en la forma adecuada (figura 9). En el caso de que no se presente un halo, no se debe reportar 0 mm, se debe reportar 6 mm, ya que ese es el diámetro del disco³⁴.

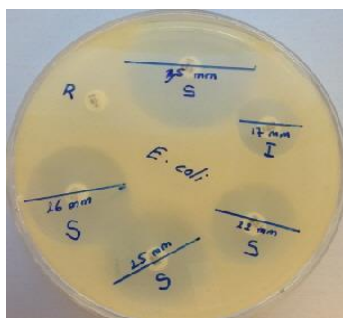


Figura 9. Método de difusión en disco (Kirby- Bauer)
Fuente. http://people.uepi.ca/jlewis/html/2b_demo.html

Bacteriostático

Por otro lado encontramos con productos bacteriostáticos, cuya denominación proviene del prefijo “bacter” y la terminación derivada del griego “stasis” que significa detención, o que no cambia porque está estático, por lo que los agentes químicos bacteriostáticos en medicina se utilizan para reducir o detener el metabolismo bacteriano, inhibiendo el crecimiento de bacterias que permanecen vivas, de tal modo que al suprimir el elemento bacteriostático por disolución o neutralización, las bacterias se seguirán desarrollando³⁵.

Bactericida

Por un lado, encontramos con los agentes físicos o químicos terminados en “cida” que proviene del término del latín clásico “caedere” que significa matar, y en este caso al llevar el prefijo “bacter” de bacteria hace referencia a las sustancias capaces de acabar con este tipo de microorganismos, por tanto, este tipo de agentes son bactericidas³⁵.

Concentración Mínima Bactericida (CMB)

La Concentración Mínima Bactericida (CMB), se define como la mínima concentración de antimicrobiano que elimina a más del 99,9% de los microorganismos viables después de un tiempo determinado de incubación (generalmente 24 horas). En ocasiones es necesario determinar la actividad bactericida de un agente antimicrobiano, como es el caso de endocarditis, osteomielitis, meningitis o infecciones en pacientes inmunosuprimidos, existe la necesidad de establecer métodos de laboratorio que definan la actividad de estos agentes³⁶.

Concentración Mínima Inhibidora (CMI)

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se define como la mínima concentración de antimicrobiano (en $\mu\text{g}/\text{mL}$) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 37°C ³⁶.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

Investigación descriptiva

La investigación es descriptiva ya que se exponen los procedimientos para la obtención de extractos y la determinación de la actividad antibacteriana.

Diseño cuasiexperimental

El estudio corresponde a un diseño cuasiexperimental debido a que existe una exposición, una respuesta y una hipótesis para contrastar, pero no hay aleatorización de la muestra de grupos de tratamiento y control, ya que consistió en elegir la especie vegetal cuyo extracto a diferentes concentraciones tendrían un efecto sobre la variable dependiente (grupo de bacterias seleccionadas para los ensayos). Se usaron antibióticos comerciales como controles positivos y DMSO como control negativo.

Corte trasversal

La presente investigación es de tipo trasversal o transaccional porque se realizó en un período de tiempo señalado entre octubre 2018 – febrero 2019, y que no se encuentra sujeto a cambios de tiempo ni lugar.

Enfoque mixto

El trabajo se hizo con características cualitativas que incluyeron la observación de la inhibición del crecimiento bacteriano mediante la formación de halos de inhibición y cuantitativas debido a que se obtuvieron valores numéricos producto de la medición de los halos y de las determinaciones de las concentraciones mínimas inhibitorias. Los datos obtenidos mediante la aplicación de técnicas y métodos facilitaron el análisis e interpretación de los resultados.

Determinación de la población y muestra

- Población: está conformada tanto por el número de especies que están incluidas dentro del género *Hedyosmum*, como por el conjunto de bacterias Gram positivas y Gram negativas de la colección ATCC.
- Muestra: incluye la planta *Hedyosmum* sp. recolectada en el bosque Jacarón de la provincia de Chimborazo de la se obtuvo el extracto hexánico de las hojas y las cepas

Staphylococcus aureus y *Enterococcus faecalis* (Gram positivas), y *Escherichia coli*,
Pseudomonas aeruginosa y *Klebsiella pneumoniae* (Gram negativas).

Variables de estudio

Variable Independiente: extracto hexánico de las hojas de *Hedyosmum* sp.

Variable dependiente: bacterias ATCC de interés clínico.

Materiales

- Matraz
- Probeta
- Espátula
- Pinzas
- Cajas Petri
- Asas
- Lámpara de alcohol
- Papel aluminio
- Agua destilada
- Suero fisiológico
- Tubos de tapa rosca
- Tubos Eppendorf
- Pipetas automáticas
- Puntas amarillas y azules

Equipos

- Autoclave (marca Tuttnauer)
- Refrigeradora (marca Mabe)
- Campana de flujo laminar (marca HFsafe 900)
- Vortex (marca BenchMixer™)
- Incubadora (marca Memmert)
- Balanza analítica (marca Adam Equipment)
- Plancha térmica

Medios de cultivo

- Caldo y agar tripticasa soya (TSB y TSB)
- Agar Müller Hinton (AMH)
- Agar infusión cerebro corazón (BHI)

Cepas Bacterianas

- *Escherichia coli* ATCC 25922

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

Antibióticos

- Amikacina para bacterias Gram negativas
- Ciprofloxacina para bacterias Gram positivas

Procedimientos

Procedimiento para obtener el extracto

1. El material (las hojas) de la planta *Hedyosmum* sp. fue recolectado por el Ing. Franklin Enrique Cargua Catagña.
2. Las hojas se limpiaron, secaron a una temperatura de 37°- 40°C y se trituró.
3. Se obtuvo 200g del material y se depositó en un matraz erlenmeyer, se adicionó el solvente hexano hasta cubrirlo completamente se agitó y tapó.
4. Se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 - 14 días, se agitó esporádicamente el contenido.
5. El producto obtenido fue filtrado con la ayuda de una malla y el extracto hexánico obtenido tras la evaporación del solvente utilizando un evaporador rotatorio se pesó y almacenó en refrigeración a 4°C (anexo 1).

Procedimiento para realizar solución madre o Stock del extracto

1. Con ayuda de una balanza analítica se pesó 0,5 g del extracto hexánico de las hojas de *Hedyosmum* sp. en un eppendorf.
2. Se añadió 1000 mL de DMSO (Dimetilsulfóxido).
3. Con ayuda de un vortex se mezcló hasta que quedó homogéneo (anexo 2).

Procedimiento para la preparación del preinóculo bacteriano

1. Con ayuda de un mechero se flameó el asa hasta que se vio al rojo vivo para asegurar la esterilización.

2. De las cepas bacterianas anteriormente replicadas y conservadas se recogió una colonia de la bacteria para trabajar.
3. Se sembró en una placa de Petri con medio de TSA por rastro o agotamiento para obtener colonias aisladas para verificar la pureza del cultivo.
4. Se colocó en la estufa durante un periodo de 18 – 20 horas a 37°C (anexo 3).

Procedimiento para la preparación del inóculo bacteriano y prueba antibacteriana mediante el método Kirby Bauer

1. Con ayuda de un mechero se flameó el asa hasta que llegue al rojo vivo para esterilizarla.
2. Del preinóculo se trasladó una o más colonias de la bacteria en estudio a un tubo con solución salina al 0,89% estéril y se comparó la turbidez de este con el patrón McFarland de escala 0,5, que corresponde a un cultivo de una concentración bacteriana aproximada de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.
3. Un hisopo estéril sumergido en la solución bacteriana y presionando por las paredes del tubo para evitar el exceso, se usó para realizar una siembra sobre la superficie de placas con agar Müller Hinton distribuyendo uniformemente por agotamiento empleando la técnica de los tres giros, que consistió en pasar el hisopo por toda la superficie de dos a tres veces antes de efectuar cada giro.
4. Con una pinza estéril se colocaron los discos de antibióticos para los controles positivos y discos en blanco a distancias adecuadas para posteriormente poner el extracto hexánico a diferentes concentraciones.
5. Se dejó reposar durante 30 minutos en refrigeración a 4°C y se llevó a incubar a 37°C durante 24 horas.
6. Al cabo de las 24 horas de incubación se procedió a realizar la lectura de los resultados para ver si la bacteria presentó presencia o ausencia de halos de inhibición alrededor de los discos (sensibilidad o resistencia) a las distintas concentraciones del extracto.
7. Las CMI's fueron determinadas mediante la evaluación de la menor concentración en la cual el extracto presentó actividad antibacteriana partiendo de la concentración inicial de 500.000 µg/mL frente a cada una de las bacterias en estudio (anexo 4).

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimiento del extracto hexánico de *Hedyosmum* sp.

A partir de 200 g de hojas secas y trituradas de *Hedyosmum* sp. maceradas en el solvente hexano y su posterior evaporación en un rotavapor, se obtuvo 1,502 g de extracto, obteniéndose un rendimiento de 1,5%. Mientras que Zaruma³⁷, 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%.

En la tabla 1 y 2 se muestran los resultados obtenidos del efecto de las diferentes concentraciones del extracto hexánico de las hojas de *Hedyosmum* sp. evaluado sobre el crecimiento de las bacterias Gram negativas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*. Como se evidencia en la tabla 1 la presencia de halos de inhibición del crecimiento bacteriano indica que el extracto tuvo una acción antibacteriana frente a las tres cepas, que varió según la bacteria en estudio. Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) del extracto hexánico se obtuvieron realizando los ensayos a diferentes concentraciones (500.000, 250.000, 125.000, 62.500 y 31.250 µg/mL) frente a cada una de las bacterias, las cuales se exponen en la tabla 2. Los datos indican que la mayor actividad del extracto se observó frente a *E. coli* ya que la CMI fue de 31.250 µg/mL, seguido de la actividad encontrada frente a *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* para las cuales las CMI fueron de 62.500 y 250.000 µg/mL, respectivamente.

Tabla 1. Efecto antibacteriano del extracto hexánico de las hojas de *Hedyosmum* sp. expresado por los halos de inhibición (mm) frente a las bacterias Gram negativas.

Bacterias Gram negativas	EXTRACTO HEXÁNICO					Control positivo	Control negativo
	Halos de inhibición (mm)					Amikacina (30 µg)	DMSO
	Concentraciones (µg/mL)						
500.000	250.000	125.000	62.500	31.250			
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	12	10	8	7	6	30	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	16	10	9	8	0	37	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	10	8	0	0	0	28	0

Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria ($\mu\text{g/mL}$) del extracto hexánico de las hojas de *Hedyosmum* sp. de las bacterias Gram negativas.

Bacterias Gram negativas	EXTRACTO HEXANICOS
	CMI ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	31.250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	62.500
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	250.000

Como se pudo evidenciar el extracto hexánico de las hojas de *Hedyosmum* sp. fue más activo frente a *E. coli*. En un estudio realizado por Holetz *et al*³⁸, se reporta que los extractos de hexano, acetato de etilo y metanol de las partes aéreas de *Hedyosmum purpurascens* son inactivos frente a las bacterias Gram positivas y Gram negativas, debido a que presentaron un CMI $>1000 \mu\text{g/mL}$, sin embargo, como la especie es diferente y dicha actividad antimicrobiana fue realizada por el método de microdilución, mientras que en el presente estudio se realizó por el método de Kirby Bauer, este método es menos sensible al de microdilución.

Los resultados de actividad antibacteriana del extracto hexánico de hojas de *Hedyosmum* sp. a concentraciones seriadas a partir de $500.000 \mu\text{g/mL}$ frente a las cepas bacterianas Gram positivas *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* se muestran en las tablas 3 y 4. En la tabla 3 se reporta el efecto del extracto a las distintas concentraciones sobre el crecimiento bacteriano mediante la presencia de halos de inhibición, siendo estos solo observados frente a *S. aureus*, el cual fue susceptible a altas concentraciones de 500.000 y $250.000 \mu\text{g/mL}$, con halos de 10 y 7 mm, respectivamente, mientras que *E. faecalis* fue resistente incluso a la mayor concentración ensayada del extracto. Por tanto, el extracto hexánico de las hojas de *Hedyosmum* sp. presentó un valor de CMI de $250.000 \mu\text{g/mL}$ frente a la bacteria *S. aureus* (tabla 4), pero fue inactivo frente a *E. faecalis* al menos a las concentraciones probadas.

Tabla 3. Actividad antibacteriana del extracto hexánico de las hojas de *Hedyosmum* sp. frente a las bacterias Gram positivas expresado por los halos de inhibición (mm).

Bacterias Gram positivas	EXTRACTO HEXÁNICOS Halos de inhibición (mm)					Control positivo	Control negativo
	Concentraciones (µg/mL)					Ciprofloxacina (5 µg)	DMSO
	500.000	250.000	125.000	62.500	31.250		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	10	7	0	0	0	35	0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0	0	0	0	0	37	0

Tabla 4. Concentración Mínima Inhibitoria (µg/mL) del extracto hexánico de las hojas de *Hedyosmum* sp. frente a *Staphylococcus aureus*.

Bacterias Gram positivas	EXTRACTO HEXÁNICOS
	Concentración mínima inhibitoria (µg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	250.000
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	>500.000

En este trabajo se probó la actividad antibacteriana del extracto hexánico de las hojas de *Hedyosmum* sp. solo frente a dos cepas Gram positivas, reportándose cierta sensibilidad al extracto en el caso de *S. aureus*. Por otro lado, el extracto hexánico de las hojas de *Hedyosmum* sp, no mostro actividad frente a la cepa de *Enterococcus faecalis*. Sin embargo, Zaruma³⁷, en una investigación de la actividad antibacteriana frente a bacterias Gram positivas de los extractos de las hojas de las plantas con flores femeninas de *Hedyosmum strigosum*, en Loja, reportó que este fue activo frente a bacterias Gram positivas, obteniendo CMI de 62,5 µg/mL tanto para *S. aureus* como para *E. faecalis*. Por otro lado, Solano³⁹, realizó un estudio de los extractos de hojas con flores masculinas de *Hedyosmum strigosum*, encontrando que el extracto de hexano fue activo frente a estas dos bacterias con una CMI de 15,62 µg/mL para ambas, la diferencia radica dicho estudio fue realizado por el método de microdilución mientras que en el presente estudio se realizó por difusión en disco.

CONCLUSIONES

1. Se obtuvo el extracto hexánico de las hojas de *Hedyosmum* sp. por el método de maceración con un rendimiento de 1,5%.
2. Se identificó el efecto antibacteriano de las hojas de *Hedyosmum* sp. frente a las bacterias Gram negativas *E. coli*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*, y a las Gram positivas *S. aureus* y *E. faecalis*. El extracto mostró mayor actividad frente a las bacterias Gram negativas, siendo *E. coli* la que resultó más susceptible, ya que se observaron halos de inhibición a todas las concentraciones ensayadas del extracto, es decir, 500.000, 250.000, 125.000, 62.500 y 31.250 $\mu\text{g/mL}$ con medidas de 12, 10, 8, 7 y 6 mm, respectivamente; frente a *P. aeruginosa* el extracto mostró inhibición hasta 62.500 $\mu\text{g/mL}$ con un halo de 8 mm y frente a *K. pneumoniae* solo se observó halo de inhibición (8 mm) hasta 250.000 $\mu\text{g/mL}$. El estudio frente a las bacterias Gram positivas arrojó resultados de actividad solo frente a *S. aureus* ya que efecto del extracto se evidenció a 500.000 (halo de 10 mm) y 250.000 $\mu\text{g/mL}$ (halo de 7 mm).
3. El extracto hexánico de las hojas de *Hedyosmum* sp. presentó CMI de 250.000, 62.500 y 31.250 $\mu\text{g/mL}$ sobre el crecimiento de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*; la actividad inhibitoria del extracto frente a la bacteria Gram positiva *S. aureus* se evidenció con una CMI de 250.000 $\mu\text{g/mL}$, pero frente a *E. faecalis* la actividad resultó mayor a 500.000 $\mu\text{g/mL}$.

RECOMENDACIONES

1. Una adecuada esterilidad de los materiales que se van a utilizar durante todo el proyecto. Es importante una adecuada manipulación de las cepas bacterianas para evitar la contaminación de las mismas.
2. Seguir correctamente los protocolos de extracción para obtener extractos con resultados eficaces.
3. Se sugiere continuar con la evaluación de las plantas medicinales en busca de aquellas con actividad antibacteriana y, posteriormente, identificar y aislar los metabolitos secundarios causantes de tal efecto.

BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud. Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales [Internet]. Suiza; 2003 [citado el 2019 Feb 12]. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s5527s/s5527s.pdf>
2. Le Loc'h JP. Lista de plantas medicinales comunes en la subregión andina [Internet]. Lima; 2014 [citado el 2018 Nov 23]. Disponible en: <https://www.orasconhu.org/sites/default/files/LIBRO PLANTAS COMUNES.pdf>
3. Aguirre N, Ojeda TL, Eguiguren P AM. Cambio climático y Biodiversidad: Estudio de caso de los páramos del Parque Nacional Podocarpus, Ecuador Editores [Internet]. Aguirre N, Luna TO, Eguiguren P, Mendoza ZA, editors. Loja: EDILOJA Cía. Ltda; 2015 [citado el 2018 Nov 22]. Disponible en: https://nikolayaguirre.files.wordpress.com/2011/12/libro_biodiversidad_cambio_climatico_marzo_2016.pdf
4. Maggi E. Plantas medicinales, la "farmacia" de los pueblos ancestrales. El Telegrafo [Internet]. 2018 May 31 [citado el 2018 Dec 10]; Disponible en: <https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/sociedad/6/plantas-medicinales-riobamba>
5. Sutherland DN. Evaluación de la actividad inhibitoria del crecimiento tumoral de los extractos metonólico y de acetato de etilo de *Hedyosmum scabrum*, *H. racemosum* y *H. purpurascens*, en las líneas celulares RKO, MCF-7, D384 y PC3 mediante el ensayo MTS. [Internet]. Universidad Técnica Particular de Loja; 2014 [citado el 2018 Nov 21]. Disponible en: <https://docplayer.es/15048067-Universidad-tecnica-particular-de-loja-universidad-catolica-de-loja-area-biologica.html>
6. Zamora BAM PA. Composición química del aceite esencial de hojas de *Hedyosmum translucidum* Cuatrec., Chloranthaceae (Granizo). Boletín Latinoamericano y del Caribe Plantas Med y Aromáticas [Internet]. 2016 [citado el 2018 Nov 15];15(0717 7917). Disponible en: www.blacpma.usach.cl
7. Ministerio de salud. Uso responsable de los antibióticos [Internet]. Argentina; 2015 [citado el 2018 Nov 23]. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/comunicados/Uso_Responsable_de_los_Antibioticos.pdf
8. Casellas JM. Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. Rev Panam Salud Pública [Internet]. 2011 [citado el 2018 Nov

- 23];30:519–28. Disponible en:
https://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1020-49892011001200004
9. Alós JI. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2015 Dec 1 [citado el 2018 Nov 23];33(10):692–9. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X14003413>
 10. Organización mundial de la salud. Resistencia a los antibióticos [Internet]. 2018 [citado el 2018 Nov 23]. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibioticos>
 11. Balslev H, Navarrete H, De la Torre L MJ. Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador [Internet]. 2008 [citado el 2018 Nov 27]. Disponible en:
[https://scholarspace.manoa.hawaii.edu/bitstream/10125/47330/de la Torre *et al.* 2008 Encyclopedia of useful plants of Ecuador.pdf](https://scholarspace.manoa.hawaii.edu/bitstream/10125/47330/de%20la%20Torre%20et%20al.%202008%20Encyclopedia%20of%20useful%20plants%20of%20Ecuador.pdf)
 12. Cerón MCE. Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos [Internet]. Quito; 2006 [citado el 2018 Nov 27]. Disponible en: [http://www.beisa.dk/Publications/BEISA Book pdfer/Capitulo 18.pdf](http://www.beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdfer/Capitulo%2018.pdf)
 13. Gallegos ZM. Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador Medicinal plants: main alternative for health care, in the rural town of Babahoyo, Ecuador. *An Fac med* [Internet]. 2016 [citado el 2018 Nov 27];77(4):1. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.15381/anales.v77i4.12647>
 14. Vargas WG. Guía ilustrada de las plantas de las montañas del Quindío y los Andes centrales [Internet]. 1st ed. Luis Fernando Escobar Velásquez, editor. Manizales: Editorial Universidad de Caldas; 2002 [citado el 2019 Feb 28]. 813 p. Disponible en:
<https://es.scribd.com/document/321006132/Guia-Ilustrada-Plantas-Del-Quindio#>
 15. Ulloa UC, Moller JP. Árboles y arbustos de los Andes del Ecuador [Internet]. 2nd ed. Departamento de la Botánica Sistemática de la Universidad de Aarhus, Dinamarca, en colaboración con el Departamento de Ciencias Biológicas de la PUC del E, editor. Quito: Editorial Abya-yala; 1995 [citado el 2018 Nov 22]. Disponible en:
http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=201&taxon_id=114826
 16. Santamaría C, González MA AF. Extractos vegetales aplicación para la reducción del estrés [Internet]. Madrid; 2015 [citado el 2018 Nov 28]. Disponible en:
<https://nutricionanimal.info/download/0315-ena-WEB.pdf>

17. Pírez M MM. Morfología y estructura bacteriana. In: Universidad de la República D de B y V, editor. Temas de Bacteriología y Virología Médica [Internet]. 2nd ed. Montevideo: Oficina del libro FEFMUR; 2006 [citado el 2019 Feb 28]. p. 23–4. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiayEstructuraBacteriana.pdf>
18. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. *Staphylococcus aureus*. DDATABiO [Internet]. 2012 [citado el 2019 Feb 8]; Disponible en: [http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas de agentes biologicos/Fichas/Bacterias/Staphylococcus aureus.pdf](http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas_de_agentes_biologicos/Fichas/Bacterias/Staphylococcus_aureus.pdf)
19. Acosta G SI. Enterococcus [Internet]. 2005 [citado el 2019 Feb 8]. Disponible en: <https://codeinop.org/wp-content/uploads/2017/02/Enterococcus.pdf>
20. Conde ED. Factores de riesgo para la adquisición de Bacteriemia por *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* [Internet]. Universitat Autònoma de Barcelona. Departament de Medicina; 2014 [citado el 2019 Feb 8]. Disponible en: <https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/284486/dce1de1.pdf?sequence=1>
21. International Association of Providers of AIDS Care. Ciprofloxacina (Cipro) [Internet]. InfoRed SIDA. 2014 [citado el 2019 Feb 9]. Disponible en: http://www.aidsinfonet.org/fact_sheets/view/531?lang=spa
22. Frazão A. Síntomas de infección por *Escherichia Coli* y cómo tratar [Internet]. Tua Saúde. 2018 [citado el 2019 Feb 9]. Disponible en: <https://www.tuasaude.com/es/sintomas-escherichia-coli/>
23. Todd CDE BN. Infecciones por *E. coli* en Canadá. Encicl Can © 2019 [Internet]. 2018 [citado el 2019 Feb 9]; Disponible en: <https://www.thecanadianencyclopedia.ca/fr/article/hamburger-maladie-du>
24. Mayo Clinic. *Escherichia coli* [Internet]. Mayo Clinic. 2019 [citado el 2019 Feb 9]. Disponible en: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/e-coli/symptoms-causes/syc-20372058>
25. Andrade V, Grupo de Resistencia Bacteriana SJ. Caracterización de *Klebsiella pneumoniae* productora de la β -lactamasa SHV-5, en una unidad de cuidados intensivos. Salud Publica Mex [Internet]. 2004 [citado el 2019 Feb 9];46:524–8. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/spm/v46n6/22565.pdf>
26. Grupo asesor control de infecciones y epidemiología. *Klebsiella pneumoniae* [Internet]. Argentina; 2018 [citado el 2019 Feb 9]. Disponible en:

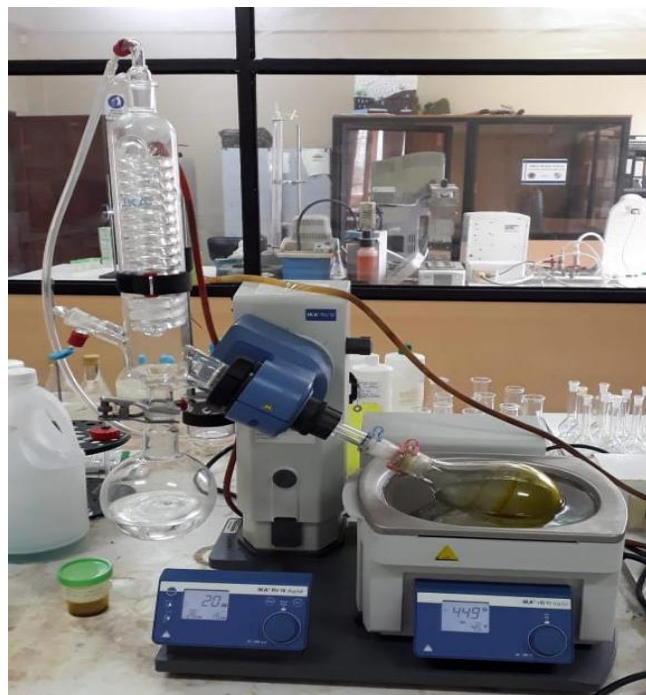
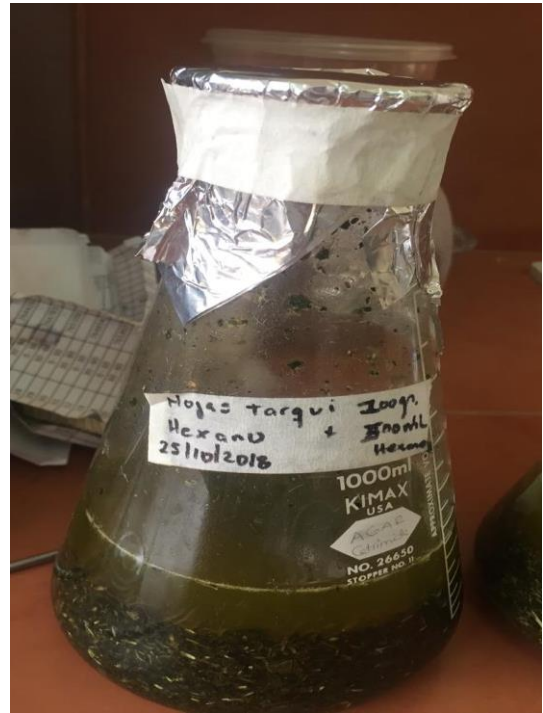
- https://codeinep.org/wp-content/uploads/2017/02/Klebsiella_pneumoniae_ii.pdf
27. Guerra S. Recomendaciones para el control de la dispersión de enterobacterias productoras de KPC1 en hospitales que no han tenido casos previos o tuvieron casos esporádicos [Internet]. Uruguay; 2012 [citado el 2019 Feb 9]. Disponible en: [https://www.cocemi.com.uy/docs/KPC_Prev y Tra MSP.pdf](https://www.cocemi.com.uy/docs/KPC_Prev_y_Tra_MSP.pdf)
 28. Instituto nacional de seguridad e higienen en el trabajo. *Pseudomonas aeruginosa* [Internet]. 2016 [citado el 2019 Feb 9]. Disponible en: [http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas de agentes biologicos/Fichas/Pseudomonas aeruginosa 2017.pdf](http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas_de_agentes_biologicos/Fichas/Pseudomonas_aeruginosa_2017.pdf)
 29. Bodí M GJ. *Pseudomonas aeruginosa*: tratamiento combinado frente a monoterapia. Med Intensiva [Internet]. 2007 [citado el 2019 Feb 9];31(2):83–7. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0210-56912007000200005
 30. Calvo J MM. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet]. 2009 Jan 1 [citado el 2019 Feb 28];27(1):44–52. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-mecanismos-accion-los-antimicrobianos-S0213005X08000177>
 31. Vignoli R, Seija V. Principales mecanismos de resistencia antibiótica [Internet]. [citado el 2019 Feb 9]. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Principalesmecanismosderesistenciaantibiotica.pdf>
 32. Pérez CJ RC. Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. Rev MÉDICA MD [Internet]. 2013 [citado el 2019 Feb 9];4:186–91. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revmed/md-2013/md133i.pdf>
 33. Sánchez GE, Castillo HSL GP. Investigación en plantas de importancia médica [Internet]. Rivas MC, Oranday CMA VS, editor. Vol. 0, OmniaScience Monographs. Barcelona: OmniaScience; 2016 [citado el 2019 Feb 12]. 77-100 p. Disponible en: <https://www.omniascience.com/monographs/index.php/monograficos/article/view/313/248>
 34. Herrera ML. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana Metodología de laboratorio. Rev Médica del Hosp Nac Niños Dr Carlos Sáenz Herrera [Internet]. 1999 [citado el 2019 Feb 9];34. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85461999000100010
 35. Serkonten. Bactericida y Bacterostático. Diferencias y usos generales de ellos

- [Internet]. phsserkonten. 2018 [citado el 2019 Mar 11]. Disponible en: <https://www.phsserkonten.com/higiene/bactericida-bacteriostatico/>
36. Horna QG, Silva DM, Vicente TW TO. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. Rev Med Hered [Internet]. 2005 Dec 19 [citado el 2019 Mar 8];16(1):39. Disponible en: <http://www.upch.edu.pe/vrinve/dugic/revistas/index.php/RMH/article/view/862/828>
 37. Zaruma GJ. Aislamiento, caracterización y actividad biológica de metabolitos secundarios a partir de hojas de plantas con flores femeninas de *Hedyosmum strigosum* en el cantón Saraguro provincia de Loja. [Internet]. Universidad Técnica Particular de Loja ; 2015 [citado el 2019 Feb 28]. Disponible en: http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/13439/1/Zaruma_Gonzalez_Jessica_Johanna- Trabajo de Titulacion.pdf
 38. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Garcia CDA, Nakaruma CV DF. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio Janeiro [Internet]. 2002 [citado el 2019 Feb 18];97(7):1027–31. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/mioc/v97n7/4476.pdf>
 39. Solano LES. Extracción, aislamiento, caracterización y actividad biológica de metabolitos secundarios de *Hedyosmum strigosum* con flores masculinas en la provincia de Loja. [Internet]. Universidad Técnica Particular de Loja; 2015 [citado el 2019 Mar 17]. Disponible en: http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/12133/1/Solano_de_la_Sala_Lozano_Estefany_Sofia.pdf?fbclid=IwAR1U-_dhpn01Bg4jR_jPDJFRfyQTuGTDEPyRBYA_jytyJkpe2lbNV_kdseF4

ANEXOS

Anexo 1

Procedimiento para obtener el extracto.



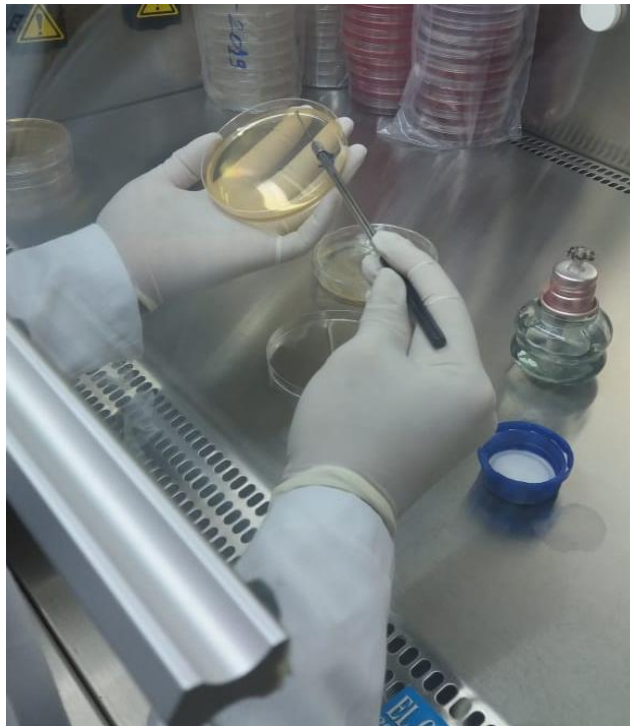
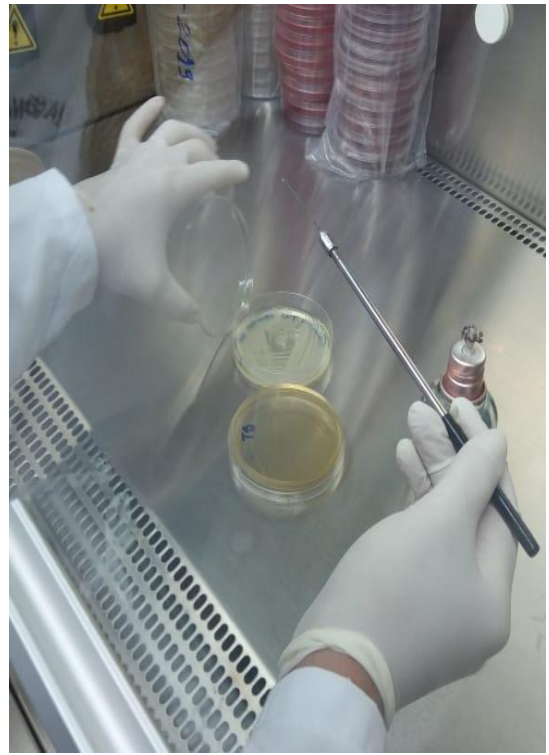
Anexo 2

Procedimiento para realizar solución madre o Stock.



Anexo 3

Procedimiento para la preparación del Preinóculo.



Anexo 4

Procedimiento para la preparación del inóculo.



Anexo 5

Bacterias en estudio

