



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

Actividad antimicótica del aceite esencial de *Hedyosmum* sp., frente a cepas de interés clínico

Autora: Katty Guadalupe Latorre Novillo

Tutora: PhD. María Eugenia Lucena

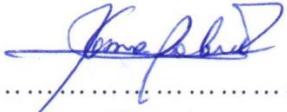
Riobamba - Ecuador

2019

REVISIÓN DEL TRIBUNAL

Los miembros del tribunal de graduación del proyecto de investigación de título: “Actividad antimicótica del aceite esencial de *Hedyosmum* sp., frente a cepas de interés clínico.” presentado por: Katty Guadalupe Latorre Novillo y dirigida por: PhD. María Eugenia Lucena, una vez escuchada la defensa oral y revisado el informe final del proyecto de investigación con fines de graduación escrito en el cual se ha constatado el cumplimiento de las observaciones realizadas, remite la presente para uso y custodia en la biblioteca de la Facultad de Ciencias de la Salud de la UNACH. Para constancia de lo expuesto firman:

Mgs. Ximena Robalino Flores
Presidente del Tribunal



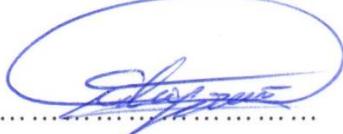
.....
Firma

Mgs. Yisela Ramos Campi
Miembro del Tribunal



.....
Firma

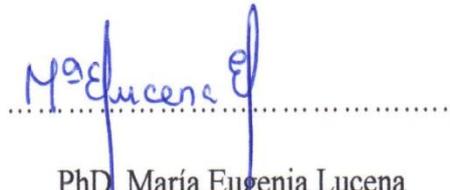
Mgs. Celio García Ramírez
Miembro del Tribunal



.....
Firma

DECLARACIÓN DEL TUTOR

Yo, María Eugenia Lucena en calidad de tutora del proyecto de investigación con el tema “Actividad antimicótica del aceite esencial de *Hedyosmum* sp., frente a cepas de interés clínico”, propuesto por la Srta. Katty Guadalupe Latorre Novillo 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 al interesado hacer uso del presente para trámites correspondientes.



PhD. María Eugenia Lucena
**DOCENTE DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO E
HISTOPATOLÓGICO**

AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN

“La responsabilidad del contenido de este Proyecto de Graduación, corresponde exclusivamente a la autora Katty Guadalupe Latorre Novillo con cédula de identidad N.060508871-5 y el patrimonio intelectual de la misma a la Universidad Nacional de Chimborazo.”



Katty Guadalupe Latorre Novillo
CI: 060508871-5

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer en primer lugar a Dios por bendecir y guiarme siempre desde mis primeros pasos, y nunca desampararme de esta gran lucha, por poner en mi camino a personas que siempre están apoyándome, llenándome de experiencias y enseñanzas para alcanzar mi gran sueño..

A mis padres, mi más profunda gratitud por ser el eje de mi vida, por su apoyo total y absoluto durante todo este proceso, por llenar mi vida de confianza y perseverancia.

A la Universidad Nacional de Chimborazo por haberme abierto las puertas y así permitirme cumplir mi anhelo de ser profesional y servir a la sociedad.

A todos mis docentes que fueron parte de este largo proceso de aprendizaje, por infundir todos sus conocimientos y por todo el tiempo brindado, en especial a PhD. María Eugenia Lucena cuyo esfuerzo ayudaron en la realización de este proyecto.

Katty Guadalupe Latorre Novillo

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a Dios por bendecirme cada día de mi vida y permitirme culminar esta gran etapa.

A mis padres Jacinto y Jinna por su amor y apoyo constante, porque han sido un ejemplo para cumplir mi meta. A mi hermano Cristian por ser mi aliento y que puedan ver en mí un ejemplo a seguir. A mi hijo Cristofer, por ser lo mejor que me ha pasado, y ha venido a este mundo a ser mi mayor motivación e inspiración para culminar mi carrera. Es sin duda mi referencia para el presente y futuro.

Katty Guadalupe Latorre Novillo

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	5
Objetivo General:	5
Objetivos Específicos:	5
CAPÍTULO I.....	6
MARCO TEÓRICO	6
Algunas Consideraciones Sobre el Surgimiento y la Evolución de la Medicina Natural y Tradicional.....	6
Plantas Medicinales en Ecuador	6
Familia Chloranthaceae	7
Género <i>Hedyosmum</i>	7
Taxonomía.....	7
Estudios Realizados a la Planta <i>Hedyosmum</i>	8
Aceites Esenciales	9
Propiedades y Beneficios del Aceite Esencial.....	9
Método de Obtención del Aceite Esencial	9
Método de Hidrodestilación	10
Cepas de Interés Clínico	11
Infecciones por Especies de <i>Cándida</i>	11
<i>Cándida albicans</i>	12
<i>Cándida glabrata</i>	12
<i>Cándida tropicalis</i>	12
<i>Cándida krusei</i>	13
<i>Cándida parapsilosis</i>	13
Tratamiento de Candidiasis	13
Resistencia a Antimicóticos.....	14
Concepto de Resistencia.....	14
Pruebas de Sensibilidad	15
Concentración Mínima Inhibidora (CMI)	15
Difusión en Agar o Método Kirby-Bauer.....	16
Resistencia a los Antimicrobianos o Antifúngicos como Amenaza Inusual para la Salud Pública	17
CAPÍTULO II.....	18

METODOLOGÍA.....	18
Tipo de Investigación	18
Determinación de la Población y Muestra.....	18
VARIABLES DE ESTUDIO.....	19
Técnicas e Instrumentos para la Recolección de Datos:.....	19
Materiales y Métodos	19
Procedimiento de la Investigación:.....	20
Extracción y Aislamiento del Aceite Esencial de <i>Hedyosmum</i> sp.	20
Solución Madre del Aceite Esencial y Diluciones.	20
Preparación de Pre-inóculo.....	20
Preparación Agar Mueller Hinton Suplementado	21
Preparación de Inóculos, Siembra, Impregnación de Discos con las Concentraciones del Aceite, Pre-incubación, Incubación de las placas y Lectura de Resultados	21
CAPÍTULO III	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
Extracción y Aislamiento del Aceite Esencial	23
Actividad Antimicótica del Aceite Esencial.....	23
CONCLUSIONES	28
RECOMENDACIONES	29
BIBLIOGRAFÍA	30
ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Especie Vegetal <i>Hedyosmum</i> sp..	8
Figura 2: Bosque Natural Jacarón Ubicado en el Cantón Colta.	9
Figura 3: Obtención de Aceites Esenciales	10
Figura 4: Protocolo de Cultivo y Antibiograma.	17

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Actividad Antimicótica del Aceite Esencial de <i>Hedyosmum</i> sp. expresado por los halos de inhibición (mm)	24
Tabla 2: Concentración Mínima Inhibitoria (g/mL) del Aceite Esencial de <i>Hedyosmum</i> sp.	26

RESUMEN

El presente proyecto de investigación tuvo como objetivo la determinación de la actividad antimicótica del aceite esencial de las partes aéreas de la especie vegetal conocida como Tarqui (*Hedyosmum* sp.) en el vocabulario local, conseguido en el bosque natural Jacarón ubicada en el Cantón Colta, Provincia de Chimborazo en Ecuador, frente a cinco especies de *Cándida* las cuales fueron *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*. Esta investigación fue descriptiva, con un diseño cuasi-experimental, de corte transversal y carácter mixto. El aceite esencial fue extraído mediante el método de hidrodestilación usando la trampa de Clevenger, el cual obtuvo un rendimiento de 0.09%. La actividad antimicótica fue detectada a través del método Kirby-Bauer y se interpretó los resultados mediante la observación y medición de halos de inhibición. Se realizó los ensayos empleando el aceite puro y diluciones con DMSO a diferentes concentraciones a partir de 2.0, 1.5, 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.062 g/mL, se utilizó controles positivos y negativos para confirmar que el ensayo es válido. Se realizaron ensayo empleando el aceite puro el cual nos indica halos de inhibición en *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, las mismas que presentan la CMI en la dilución menor 0.25 g/mL, *C. albicans* presento la CMI en la dilución de 0.5 g/mL, y *C. glabrata* no mostró sensibilidad a este ensayo. Se concluye que el aceite esencial de *Hedyosmum* sp., a las concentraciones ensayadas resultó ser activo solo frente a cuatro de las cinco especies de *Cándida* empleadas en este estudio.

Palabras clave: *Hedyosmum* sp., actividad antimicótica, aceite esencial, *Cándida*

ABSTRACT

This research project aimed at determining the antifungal activity of the essential oil of the aerial parts of the plant species known as Tarqui (*Hedyosmum* sp.) In the local vocabulary, it was obtained in the Jacarón natural forest located in the Colta Canton, Province of Chimborazo in Ecuador, among the five species of *Candida* which were *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* and *C. krusei*. This research was descriptive, with a quasi-experimental design, with a transversal model and mixed nature. The essential oil was extracted, through the hydrodistillation method using the Clevenger trap, which obtained a 0.09% performance score. The antifungal activity was detected through the Kirby-Bauer method and the results were interpreted by an observation and a halo inhibition measurement. The tests were performed using pure oil and dilutions with DMSO at different concentrations from 2.0, 1.5, 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.062 g/mL, positive and negative controls were used to confirm that the test is valid. A test was carried out using the pure oil which indicates inhibition halos in *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, which present the MIC in the lower dilution 0.25 g/mL, *C. albicans* showed the MIC in the 0.5 g/mL dilution, and *C. glabrata* showed no sensitivity in this test. It is concluded that the essential oil of *Hedyosmum* sp., in the concentrations tested, proved to be active only against four of the five *Candida* species used in this study.

Keywords: *Hedyosmum* sp., Antifungal activity, essential oil, *Candida*

Translation reviewed by:



MsC. Edison Damian



INTRODUCCIÓN

Este proyecto de investigación tiene como objetivo principal la determinación de la actividad antimicótica del aceite esencial de las partes aéreas de *Hedyosmum* sp., conseguido en el bosque Jacarón de Ecuador frente a especies de *Cándida*.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), considera a la Medicina Natural y Tradicional, donde se incluye el tratamiento con plantas medicinales, como la medicina más natural y efectiva, además de tener un costo racional, ser accesible y aceptada por la población. La OMS, sostiene que se debe garantizar la inocuidad y la calidad de este tipo de medicamento que podría ser eficaz como tratamiento y prevención de primera línea, para afecciones tales como resfriados, diarreas, dolores de estómago provenientes de agentes bacterianos⁽¹⁾.

Encontramos que todavía más del 70% de la población mundial recurre a las plantas para la solución de problemas básicos de salud. La industria farmacéutica ha obtenido del reino vegetal la materia prima necesaria para la elaboración de casi el 30% de los productos farmacéuticos que hoy emplea la medicina moderna. La medicina moderna, pese a los enormes avances científicos y tecnológicos, reconoce sus limitaciones en la solución de muchos de los problemas de salud que todavía aquejan a la humanidad. Esto mismo percibe la población general, movida en parte por las limitaciones propias del alto costo de la atención de salud y de los medicamentos, así como por la necesidad de buscar nuevas soluciones para los viejos problemas de salud. Frente a este panorama la Organización Mundial de la Salud está promoviendo la investigación y el uso prudente de las plantas medicinales⁽²⁾.

El uso milenario de sustancias de origen vegetal con fines terapéuticos y antimicrobianos, ha llevado a investigar nuevas sustancias a partir de plantas consideradas popularmente medicinales⁽³⁾. El mundo tiene una gran biodiversidad de plantas, en donde se encuentra Chloranthaceae es una familia de hierbas, arbustos y árboles; nativa de los trópicos y el sur de las regiones templadas⁽⁴⁾. El género *Hedyosmum* pertenece a esta familia y consta de 40 especies distribuidas principalmente en las montañas desde el estado de Veracruz (México) hasta el Brasil y Paraguay; una especie se encuentra en el sureste de Asia⁽⁵⁾. En el Ecuador el género *Hedyosmun* presenta 16 especies de la cuales *Hedyosmum* es endémica del bosque andino alto del sur del país. El centro de diversificación de este género es el

centro de Los Andes, donde se encuentra alrededor del 50% de sus especies. *Hedysomun* crece principalmente en los bosques nublados entre 600 y 3000 msnm. La mayoría de sus especies habitan en sitios alterados y son polinizadas por el viento ⁽⁴⁾. En la Provincia de Chimborazo esta planta es conocida como Tarqui y la encontramos en el bosque natural Jacarón del Cantón Colta.

Se conoce como aceites esenciales a los principales productos aromáticos que existen en diversas partes de las plantas. Debido a que se evaporan por exposición al aire a temperatura ambiente, se denominan: aceites volátiles, aceites etéreos, aceites esenciales o esencias ⁽⁶⁾. Los aceites esenciales son utilizados desde el mundo antiguo, han acompañado a la humanidad en muchos aspectos de su vida cotidiana. Han formado parte de ceremonias espirituales, de rituales de belleza, como medicina y actualmente, por medio de la aromaterapia se le reconocen sus beneficios integrales para las personas, debido a que con su uso adecuado nos da bienestar físico, anímico, espiritual y mental, en donde se le da un uso de medicina complementaria y auxiliar, que complementa a la medicina alópata ⁽⁷⁾. Actualmente, en el Ecuador se comercializan 62 aceites esenciales obtenidos de plantas, hierbas y árboles a través de un proceso de destilación o prensado en frío. Sus abonos utilizados son orgánicos y específicos para cada planta ⁽⁸⁾. En la provincia de Chimborazo existe una gran variedad de plantas medicinales, últimamente las están utilizando y comprobando sus propiedades curativas.

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⁾. La candidiasis invasiva afecta a más de 250.000 personas por año en todo el mundo y provoca más de 50.000 muertes.. Aunque esta estadística corresponde a las unidades de cuidados intensivos (UCI), en la mayoría de los estudios demográficos se encuentra entre la séptima y la décima infección hemática más frecuente. Las tasas de incidencia están en aumento o estables en casi todas las regiones, aunque se han informado tasas en disminución en zonas de alta incidencia tras mejoras en la higiene ⁽¹⁰⁾.

La presencia de hongos, es un problema que los expertos ven cada vez con mayor frecuencia en nuestros hospitales, y que ha cobrado una importancia relevante dentro de las infecciones nosocomiales, es decir aquellas infecciones que los pacientes contraen en el hospital durante su ingreso. Por cada 1.100 ingresos existe un episodio de este tipo de

infecciones, según datos proporcionados en la V reunión científica del Grupo de Estudio de Micología Médica de Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), debido a la prolongación de la supervivencia entre pacientes graves, al uso de procedimientos invasivos, catéteres intravenosos, nutrición parenteral, cirugía intraabdominal y el uso de antibióticos de amplio espectro ⁽¹¹⁾.

La distribución de las especies cambió en las últimas décadas. Tras ser las especies dominantes, la *Candida albicans* hoy en día representa sólo la mitad de las cepas detectadas. La *C. glabrata* surgió como microorganismo importante en Europa del norte, los EEUU y Canadá, mientras que la *C. parapsilosis* predomina en el sur de Europa, en Asia y en América del sur. Estos cambios se deben tener en cuenta para el tratamiento, ya que cada especie tiene diferente sensibilidad. La virulencia de cada especie también es muy diferente. *C. parapsilosis* y *C. krusei* son menos virulentas que *C. albicans*, *C. tropicalis*, y *C. glabrata*. A pesar de su baja virulencia, *C. parapsilosis* puede crecer muy bien en algunos ambientes debido a su capacidad para adherirse a los dispositivos médicos y su propensión a colonizar la piel, características que facilitan los brotes intrahospitalarios. Otras especies menos frecuentes son *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr*, y *C. guilliermondii*. ⁽¹⁰⁾.

Otra causa de aumento en las infecciones es la resistencia que desarrollan los hongos a los antimicóticos. Existen algunas evidencias que indican que la resistencia a fluconazol podría haber aumentado en España, alertan los especialistas. Algunas publicaciones y datos procedentes del laboratorio de referencia de Micología Español reflejan que la incidencia de *C. glabrata* podría estar aumentando en paralelo a una disminución de la de *C. parapsilosis* debido a las medidas implantadas para controlar las infecciones nosocomiales. Además, el porcentaje de la resistencia de fluconazol de cepas aisladas en sangre de *C. albicans* y *C. tropicalis* podrían llegar al 15% ⁽¹¹⁾.

El Fondo de Acción Mundial para las Infecciones por Hongos (GAFFI por sus siglas en inglés) ha realizado un programa de estimaciones para demostrar, país por país, el número de personas afectadas por enfermedades micóticas graves a nivel mundial. En este contexto, 14 de los países más afectados en todo el mundo, incluido Ecuador, acaban de publicar sus resultados. Jeannete Zurita, médica microbióloga y miembro del GAFFI, ha liderado en Ecuador un estudio que tuvo el objetivo de estimar la carga de enfermedades micóticas a través de la utilización de datos sobre la incidencia o prevalencia local, o a su

vez, calcular su incidencias mediante la aplicación de cálculos basados en estudios de cohortes, ensayos clínicos y tasas de infecciones ya documentado en grupos similares de pacientes en otros lugares. Con este estudio lo que hemos demostrado es que el 3% (433.856) de la población ecuatoriana puede tener o puede estar afectada por una infección severa por hongos ⁽¹²⁾. Un estudio realizado en el año 2017 indica que en la provincia de Chimborazo las infecciones micóticas más frecuentes son producidas por la levadura *Cándida albicans*, y se encuentra presente en la flora normal de la cavidad bucal y de los intestino, es una infección oportunista, que ataca cuando el sistema inmunológico del paciente se ve disminuidas ⁽¹³⁾.

Tomando en cuenta las consideraciones anteriores el proyecto revelará si ¿Presenta actividad antimicótica el aceite esencial de las partes aéreas de *Hedyosmum* sp., frente a las especies de estudio de *Cándida*?, este estudio podría ayudarnos en la identificación de compuestos con actividad biológica presentes en el aceite esencial de *Hedyosmum* sp., que serían fuente de nuevos fármacos o la base estructural para el desarrollo y tratamiento de distintas enfermedades que producen las distintas especies de *Cándida*.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Determinar la actividad antimicótica del aceite esencial de *Hedyosmum* sp., del bosque natural Jacarón, Provincia de Chimborazo frente a cepas de interés clínico.

Objetivos Específicos:

- Extraer el aceite esencial de las partes aéreas de *Hedyosmum* sp., mediante la técnica de hidrodestilación (trampa de Clevenger) y determinar sus características físicas.
- Evaluar la actividad antimicótica del aceite esencial de *Hedyosmum* sp., con las distintas especies de *Cándida*, mediante el método de difusión en agar Kirby Bauer.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Hedyosmum* sp., frente a cepas de *Cándida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*. mediante la determinación del efecto inhibitorio a diferentes concentraciones.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

Algunas Consideraciones Sobre el Surgimiento y la Evolución de la Medicina Natural y Tradicional

La medicina natural y tradicional forma parte del acervo cultural de la humanidad, y se ha desarrollado en muchos países con características propias, en franca tendencia a los recursos disponibles en ellos, sobre la base, además, de la idiosincrasia de sus habitantes; por tanto, es el resultado de una evolución lenta, pero avalada por la experiencia práctica. El empleo de las plantas para la alimentación del hombre y la curación de diversas enfermedades, se remonta a la creación del mundo. Esta experiencia fue transmitida de generación en generación, a tal punto, que en la actualidad, en pleno siglo XXI, son denominadas plantas de uso tradicional, lo cual continuará hasta el fin de los tiempos ⁽¹⁴⁾.

Plantas Medicinales en Ecuador

Ecuador tiene un 10% de todas las especies de plantas que hay en el planeta. De este porcentaje, la mayor cantidad crece en la cordillera de los Andes, en la zona occidental, donde se calcula que hay aproximadamente 10 mil especies. En la región amazónica existe también un alto número de especies vegetales, alrededor de 8.200 ⁽¹⁵⁾. Vacas explica que en Ecuador hay 2 900 plantas de uso medicinal y que 8 de cada 10 personas que viven en Napo utilizan alguna de estas plantas para atención de salud primaria. Tienen un vínculo muy cercano con la medicina tradicional y no tanto con la medicina occidental. Entre las plantas más utilizadas está la sangre de drago, con 17%, el barbasco con 13%, el tarqui con 12%, la canela con 12%, y el chuchuwasu (utilizada ancestralmente para los dolores de cuerpo) con 10% de utilización. Vacas no solo se ha limitado a reunir la información. También ha comprobado los beneficios de estas plantas. Cuenta que desde hace tiempo trabaja con extractos medicinales que él mismo elabora y que la uña de gato ha resultado una de las plantas más efectivas para tratar varias dolencias ⁽¹⁶⁾.

La información sobre plantas medicinales de los Andes ecuatorianos se ha difundido de diferentes maneras, desde la conquista española y su influencia en nuestras culturas, parte de la influencia de esta cultura colonizadora ha incluido también el uso de especies vegetales ampliamente cultivadas en Europa y en el resto del continente americano como es el caso de la manzanilla, el toronjil, romero, tarqui entre otras ⁽¹⁷⁾.

Familia Chloranthaceae

Orden de las plantas con flores, una rama basal del árbol angiosperma, que consiste en 1 familia, Chloranthaceae, con 4 géneros (*Ascarina*, *Chloranthu*, *Hedyosmum* y *Sarcandra*) y alrededor de 75 especies. Las clorantáceas son arbustos aromáticos de madera blanda y árboles con hojas de sierra opuestas y nódulos inflamados ⁽¹⁸⁾.

Género *Hedyosmum*

Es el más abundante de la Familia Chloranthaceae. El nombre procede de las palabras griegas *hedys* (agradable) y *osmé* (olor). 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 (Figura 1). En el Ecuador están representadas 15 especies; 12 se encuentran en los bosques andinos y subpáramos: *Hedyosmum anisodorum* Todzia, *H. cuatrecazanum* Occh., *H. cumbalense* Karsten, *H. goudotianum* Solms-Laub., *H. luteynii* Todzia, *H. purpurascens* Todzia, *H. racemosum*, *H. scabrum* Solms-Laub., *H. spectabile* Todzia, *H. sprucei* Solms-Laub., *H. strigosum* Todzia y *H. translucidum* Cuatrec ⁽⁵⁾.

Taxonomía

- **Reino:** Plantae
- **División:** Magnoliophyta
- **Clase:** Magnoliopsida
- **Orden:** Chloranthales
- **Familia:** Chloranthaceae
- **Género:** *Hedyosmum*

Aunque, las especies del género *Hedyosmum* tienen una larga historia de uso en la medicina tradicional con una variedad de propiedades biológicas/farmacológicas interesantes que han sido científicamente confirmadas, no existen reportes de la composición química del aceite esencial de la especie *H. luteynii*. A pesar de que, *H. luteynii* tiene un amplio uso en la medicina tradicional del Ecuador, en particular en el tratamiento y alivio de infecciones respiratorias agudas y enfermedades diarreicas, que son las enfermedades con mayor tasa de morbilidad cantidad de personas que se enferman en un sitio y tiempo determinado en relación con el total de la población en el Ecuador ⁽¹⁹⁾.



Figura 1. Especie Vegetal *Hedyosmum* sp.

Fuente: http://www.efloras.org/object_page.aspx?object_id=12832&flora_id=201

Estudios Realizados a la Planta *Hedyosmum*

Obtenido 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 (Figura 2), lo cual por los antecedentes que posee constituye una vía segura, rápida y adecuada para la búsqueda de nuevos compuestos que entre otras funciones mejoren la salud del hombre debido a la aparición de nuevas enfermedades y gran cantidad de patógenos resistentes a principios activos efectivamente utilizados como antibióticos. A partir de la caracterización etnobotánica se obtuvo un extracto de hojas frescas con etanol al 96°, al que se le hizo una caracterización físico-química y el mismo presentó actividad antimicrobiana frente a una batería de microorganismos seleccionados (incluye *Staphylococcus aureus* dorado y *Bacillus subtilis*, como grampositivo, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, como gramnegativo y la levadura *Cándida albicans*). Como parte del tamizaje fitoquímico fueron identificados saponinas y fenoles en mayor cantidad, y pocos flavonoides. Los subextractos de tolueno y cloroformo en la cromatografía de capa fina CCF para terpenos, saponinas y flavonoides comprobándose no extraen la mayoría de compuestos. Las saponinas y fenoles identificados pudieran ser los responsables de la actividad biológica presente en el *Hedyosmum scabrum*. Los procedimientos empleados para la obtención de extractos en esta planta y las características de los compuestos identificados, nos inclinan hacia una caracterización más detallada de los mismos y la realización de estudios de actividad biológica con la finalidad de establecer su rol en la planta y su posible mecanismo de acción en otros seres vivos⁽²⁰⁾.

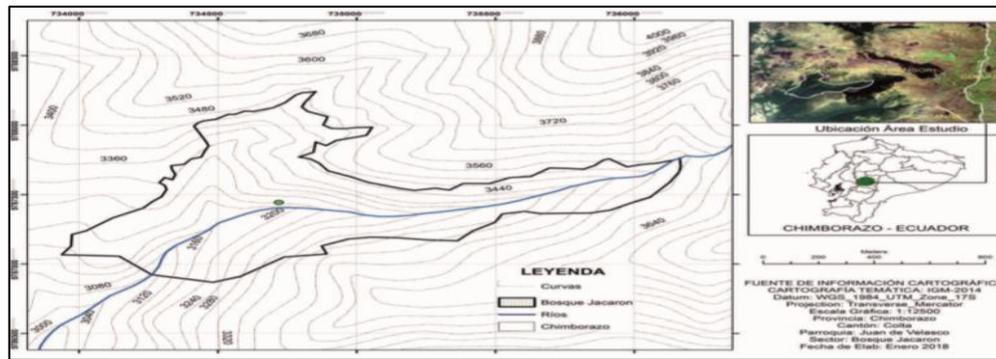


Figura 2. Bosque Natural Jacarón Ubicado en el Cantón Colta.,
Fuente: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v25n2/a12v25n2.pdf>

Aceites Esenciales

Los aceites esenciales naturales son las sustancias que se extraen de algunas plantas. Estas sustancias, llamadas metabolitos secundarios, se utilizan para crear los aceites, ya que concentran las principales propiedades medicinales de las plantas. Estos aceites se pueden utilizar en medicina natural tanto por su aroma como por su acción sobre el tejido corporal y muscular, o para limpiar o desparasitar, entre muchas otras cosas. Por lo tanto, debido a las propiedades de los aceites esenciales naturales, éstos se utilizan en diferentes ramas terapéuticas, desde la aromaterapia hasta la cosmética regenerativa, pasando por su implementación como antisépticos, antiinflamatorios y antibióticos⁽²¹⁾.

Propiedades y Beneficios del Aceite Esencial

Cada aceite esencial destaca por sus propiedades particulares, pero hay algunas que comparten la mayoría de ellos. Entre estas propiedades de los aceites esenciales puros podríamos destacar que muchos de ellos tienen principios antibióticos, como el árbol de té y la lavanda, regeneradores celulares, antivíricos y antisépticos. También contienen propiedades antimicrobianas, antifúngicas, inmuoestimuladores, son utilizados para mejorar la circulación sanguínea y el sistema linfático, e incluso para equilibrar las emociones⁽²¹⁾.

Método de Obtención del Aceite Esencial

Existen diversas técnicas que varían según la parte de la planta que se trata, su fragilidad y sus características botánicas:

La destilación por vapor de agua, o arrastre por vapor de agua (Figura 3), es la técnica más habitual para obtener aceites esenciales. Es la única técnica autorizada por la Farmacopea

Europea, junto con el prensado en frío para extraer aceites esenciales de las cáscaras de los cítricos. ⁽²²⁾

La destilación por arrastre con vapor también se emplea con frecuencia 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 simplemente reservorios dentro del vegetal, por lo que es conveniente 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 son la farmacéutica, alimenticia, en perfumería, entre otros usos. Actualmente, se constituyen en productos alternativos para la elaboración de biopesticidas o bioherbicidas. La obtención de los aceites esenciales es realizada comúnmente por la tecnología llamada de 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 el aislamiento ⁽²³⁾.

Método de Hidrodestilación

En este método, el material a extraer está completamente sumergido en agua, la cual es calentada hasta ebullición, bien sea a través de fuego directo o a través de algún método de calefacción. La característica principal de este proceso es el contacto directo entre el agua en ebullición y el material.

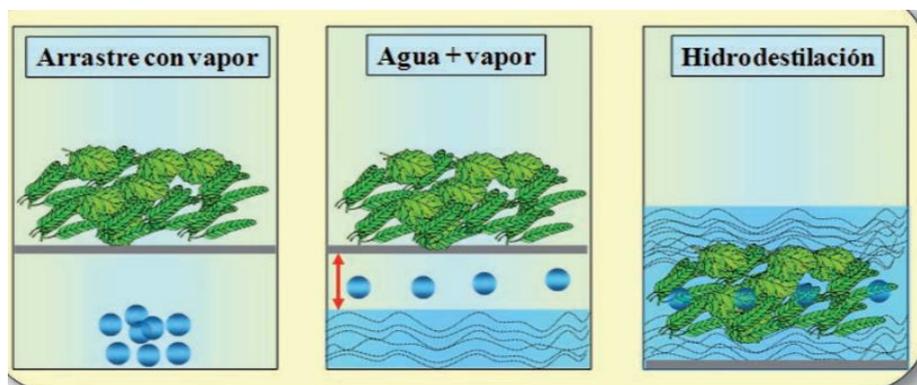


Figura 3. Obtención de Aceites Esenciales

Fuente: <http://cenivam.uis.edu.co/cenivam/documentos/libros/1.pdf>

Cepas de Interés Clínico

Infecciones por Especies de *Cándida*

Se define a la candidiasis invasiva como la penetración de especies de *Cándida* en el torrente circulatorio y posterior diseminación, que se manifiesta por fungemia, endocarditis, meningitis y/o lesiones focales en hígado, bazo, riñón, hueso, piel, tejido celular subcutáneo (TCS) y otros tejidos. Se reconocen 200 especies de *Cándidas*, pero son 10 las que fundamentalmente producen enfermedad infecciosa en el hombre. El tipo de especie predominante varía según la edad del paciente y la zona geográfica. *Cándida albicans* es la especie más frecuente en todas las regiones, en EUA y Europa le siguen en orden de frecuencia *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*, mientras que en América Latina y España, la segunda especie predominante es *C. parapsilosis*. Otras especies identificadas son *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. rugosa*, *C. pelliculosa*, *C. guiliermondii* y *C. dublinensis*⁽²⁴⁾.

Las *Cándidas* son responsables aproximadamente del 15 % de todas las infecciones nosocomiales, de más del 72 % de todas las infecciones adquiridas en los hospitales por hongos y del 8-15 % de todas las infecciones del torrente circulatorio; del 25-50 % de las candidemias nosocomiales ocurren en unidades de cuidados intensivos. Las especies de *Cándida* ocupan la cuarta causa más común (7,7 %) de infecciones nosocomiales del torrente sanguíneo en los EUA y son responsables de la mortalidad cruda más alta (40-60 %) ⁽²⁴⁾.

Epidemiología.

Las candidiasis superficiales son frecuentes, de fácil tratamiento y no atentan contra la vida del paciente, en tanto que las sistémicas de evolución aguda o crónica son generalmente graves. La mayoría de estas infecciones se originan de un foco endógeno (tracto gastrointestinal o respiratorio) aunque no se descarta la participación de fuentes externas. La distribución geográfica de esta micosis es universal y más de 70 % de ellas son producidas por *C. albicans* observándose un porcentaje mayor por el serotipo B. Los casos de candidiasis sistémica están relacionados a pacientes con severas deficiencias en su sistema inmune. *C. krusei* y *C. glabrata* son habitualmente resistentes a los compuestos azólicos y su hallazgo como agentes infecciosos involucrados en enfermedades sistémicas intrahospitalarias ha aumentado en los últimos años ⁽²⁵⁾.

Los casos registrados de candidiasis muestran que el sexo no influye en la frecuencia, a excepción de la candidiasis urogenital que tiene mayor incidencia en el sexo femenino. La edad y raza de las personas son factores que, según la clínica, no influyen en la presentación de la micosis, la cual realmente dependerá del factor de inmunocompromiso asociado; sin embargo, por lo que respecta a la ocupación aunque no es un factor de importancia, se considera que algunas actividades de las personas pueden favorecer la infección⁽²⁵⁾.

Cándida albicans

C. albicans suele presentarse como una célula oval levaduriforme de 2 a 4 micras, con paredes finas; sin embargo, en tejidos infectados también se han identificado formas filamentosas de longitud variable, con extremos redondos de 3 a 5 micras de diámetro y pseudohifas, que son células alargadas de levadura que permanecen unidas entre sí⁽²⁶⁾.

Debido al incremento de infecciones por *C. albicans*, actualmente se describe un número importante de manifestaciones clínicas, de los cuales solo se mencionaran algunos (vaginitis, candidosis del Sistema Nervioso Central, entre otras) debido a la extensa manifestación sistémica que presenta este especie⁽²⁶⁾.

Cándida glabrata

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

Cándida tropicalis

Es una célula vegetativa con una forma que va desde redonda hasta ovalada y varía de aproximadamente 2 a 10 micrómetros. Un mohó exhibe dimorfismo formando una levadura unicelular o blastoconidia llamada que se reproduce por simple brote Conidia es la unidad asexual que se produce por brote de las puntas o paredes de las hifas. Conidia es un tipo de cuerpo simple y unicelular que podría tomar la forma de una célula multicelular

con diferentes formas, tamaños y colores ⁽²⁸⁾. Esta especie es la segunda más frecuente productora de candidiasis, en algunos centros es más prevalente que *C. albicans*, sobre todo con pacientes de leucemia ⁽²⁹⁾.

Cándida krusei

Es una levadura perteneciente al género *Cándida*. Las células mayores son cilíndricas, de hasta 25 mm de largo. Las colonias separadas exceden con frecuencia los 5 mm de diámetro sobre malta-glucosa a 25 °C. Es un patógeno nosocomial que principalmente afecta a los pacientes inmunodeprimidos y aquellos con neoplasias hematológicas. Tiene una resistencia natural a fluconazol, un agente antimicótico estándar. Se encuentra con mayor frecuencia en pacientes que han tenido exposición previa al fluconazol, aunque hay pruebas contradictorias acerca de si el fluconazol debe ser utilizado con fines profilácticos. La infección por *C. krusei* es una fungemia rara ⁽³⁰⁾.

Cándida parapsilosis

Es un microorganismo diploide morfológicamente caracterizado por células redondeadas, ovals o alargadas y producción de pseudohifas.4 Estas últimas se encuentran vinculadas de manera importante a un conjunto específico de aminoácidos, particularmente citrulina, la cual origina cambios importantes en la morfología celular y colonial del microorganismo. *C. parapsilosis* es incapaz de formar hifas verdaderas. Este microorganismo se ha aislado frecuentemente de piel y uñas de las manos de enfermeras y otros profesionales del área de salud, de donde forma parte de la flora comensal humana normal. También se ha aislado de dispositivos médicos tales como catéteres intravasculares, líneas de nutrición parenteral, entre otros dispositivos prostéticos. Recientemente se le ha considerado a *C. parapsilosis* como un importante patógeno emergente, asociado de manera creciente a un amplio espectro clínico de infecciones ⁽³¹⁾.

Tratamiento de Candidiasis

Como hemos visto este tipo de enfermedad es provocada por un hongo ante lo cual para un tratamiento adecuado sería un antibiótico antifúngico dentro los que existen, los más usados habitualmente son: Voriconazol, Fluconazol. Ravuconazol.etc.

Fluconazol

El fluconazol es miembro de la familia de agentes antifúngicos triazólicos; es un inhibidor potente y específico de la síntesis de esteroides en los hongos. El fluconazol, administrado tanto por vía oral como intravenosa, es activo en una variedad de infecciones fúngicas en animales. Las propiedades fármaco-dinámicas de fluconazol son similares luego de la administración por vía oral o intravenosa. Está indicado en Candidiasis orofaríngea, esofágica, infecciones por *Candida* del tracto urinario, peritonitis, y formas sistémicas de candidiasis. Pacientes inmunocompetentes, pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), trasplante de órganos o con otras causas de inmunodepresión⁽³²⁾.

Resistencia a Antimicóticos

- La resistencia a fármacos ha sido un problema desde la década de 1990, no sólo con los hongos, sino también con las bacterias.
- Cada vez hay pacientes más graves, lo que ha determinado una mayor incidencia de infecciones fúngicas.
- En la actualidad, hay un aumento de patologías con alteración de la respuesta inmune celular, debido al SIDA, la quimioterapia y los trasplantes.
- Otros factores de riesgo son las edades extremas; por ejemplo, ha habido brotes en unidades de neonatología, donde los prematuros que antes morían ahora generalmente sobreviven.
- Otros factores de riesgo son la diabetes, el uso de terapias de amplio espectro y el uso de drogas antifúngicas en candidiasis orofaríngeas, que permiten la aparición de resistencia secundaria⁽³³⁾.

Concepto de Resistencia

Hay dos conceptos de resistencia, que no siempre están asociados en las infecciones micóticas; distinto es el caso de las bacterias, en las que lo que sucede *in vitro* se asocia generalmente con lo que sucede *in vivo* y por eso es tan importante conocer el antibiograma, del cual depende la decisión de los esquemas terapéuticos. En el caso de los hongos no siempre es así⁽³³⁾.

Concepto microbiológico: Establece que una cepa es resistente cuando su CMI es más elevada que la habitual para esa especie.

Concepto clínico: Un hongo es resistente a un antifúngico cuando sigue produciendo la enfermedad en el paciente, a pesar de que la concentración del agente antimicótico sea máxima en el lugar de la infección.

Lo anterior puede ocurrir porque en muchos casos de infecciones micóticas el paciente tiene un compromiso grave de la respuesta inmune; si es así, por más que se le administren fármacos, su sistema inmunitario no va a ser capaz de eliminar el agente patógeno ⁽³³⁾.

Hay tres tipos de **resistencia microbiológica**:

- **Resistencia intrínseca:** ningún miembro de la especie es sensible a la droga. Ej.: *Candida krusei* el fluconazol;
- **Resistencia primaria:** una cepa perteneciente a una especie normalmente sensible al antifúngico presenta resistencia natural a éste sin haber estado en contacto con el compuesto, por mutaciones que ocurren al azar. Ej.: *C. albicans* y 5-fluorocitosina;
- **Resistencia secundaria:** la más interesante desde el punto de vista clínico, ocurre en una cepa previamente sensible que adquiere resistencia al compuesto después de que el hongo ha estado en contacto con él. Ej: *C. albicans* y 5-fluorocitosina y fluconazol ⁽³³⁾.

Pruebas de Sensibilidad

Hay dos estándares internacionales: uno del *National Committee for Clinical Laboratory Standards*(NCCLS), de los Estados Unidos, y el estándar europeo (EUCAST), que se basa en el anterior. En levaduras es más fácil estandarizar la técnica que en hongos filamentosos; por eso no hay estándares para todos ellos ⁽³³⁾.

Las pruebas de sensibilidad bacteriana se llevan a cabo mediante el antibiograma que sirve para medir la sensibilidad de una cepa bacteriana a uno o varios antibióticos. El estudio de la sensibilidad *in vitro* es uno de los requisitos previos para la eficacia *in vivo* de un tratamiento antibiótico ⁽³⁴⁾.

Concentración Mínima Inhibidora (CMI)

La determinación de la Concentración Mínima Inhibidora (CMI) es la medida de la sensibilidad de una bacteria u hongo a un antibiótico. Es la mínima cantidad de antimicrobiano que es capaz de impedir el crecimiento de un microorganismo en unas condiciones normalizadas. Es el método habitual utilizado en los laboratorios de

Microbiología Clínica. Para llevarlo a cabo es necesario utilizar cepas control (de referencia) con el fin de que los resultados sean reproducibles y comparables. Este método nos ofrece información sobre la sensibilidad de las bacterias S (sensible), I (intermedia) y R (resistente)⁽³⁴⁾.

- Sensible, si existe una buena probabilidad de éxito terapéutico en el caso de un tratamiento a la dosis habitual.
- Resistente, si la probabilidad de éxito terapéutico es nula o muy reducida. No es de esperar ningún efecto terapéutico sea cual fuere el tipo de tratamiento.
- Intermedia, cuando el éxito terapéutico es imprevisible. Se puede conseguir efecto terapéutico en ciertas condiciones (fuertes concentraciones locales o aumento de la posología)⁽³⁴⁾.

Existen diferentes técnicas de laboratorio que permiten medir o calcular de forma rutinaria, y de manera semicuantitativa, las CIM (métodos manuales y métodos automatizados o semiautomatizados). Se puede realizar mediante:

- Difusión en agar: Disco placa y E test
- Dilución: Medio sólido y Medio líquido (micro/macrodilución)
- Mecanizados y Automatizados⁽³⁴⁾.

Difusión en Agar o Método Kirby-Bauer

Este método incorpora el antimicrobiano a discos de papel de filtro. Su introducción permitió agilizar la determinación de la sensibilidad de las cepas bacterianas frente a un número importante de antimicrobianos de forma simultánea. El empleo de los discos de papel de filtro para las pruebas de sensibilidad está estandarizado y se correlaciona con las CMIs. Durante muchos años, y a pesar de ser una técnica puramente cualitativa, el método de difusión por disco (o método Kirby-Bauer), en función sobre todo de su comodidad, economía y fiabilidad, ha sido uno de los más utilizados en los laboratorios.

El microorganismo a investigar se inocula en una o varias placas de agar y sobre su superficie se disponen los discos correspondientes a varios antibióticos. Se incuban las placas durante 16-24 horas y se estudia el crecimiento en ellas. Se valora el diámetro de la zona de inhibición que se forma alrededor de cada disco. De esta manera se sabe si el

microorganismo es Sensible, Intermedio o Resistente a cada uno de los antibióticos (Figura 4)⁽³⁴⁾.

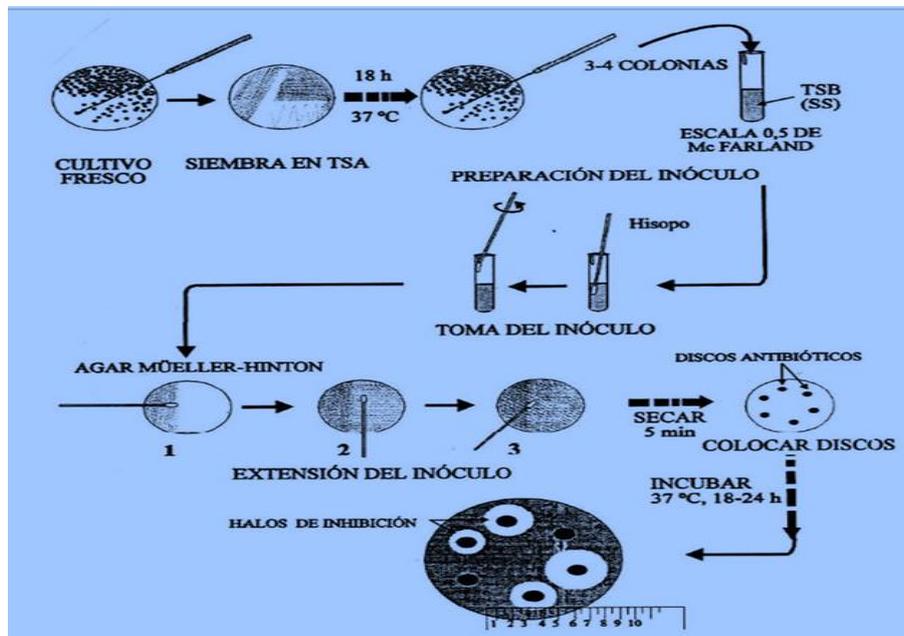


Figura 4: Protocolo de Cultivo y Antibiograma

Fuente: <http://www.telefonica.net/web2/carlosmartinezanton/pdf/8.%20Antibiograma.pdf>

Resistencia a los Antimicrobianos o Antifúngicos como Amenaza Inusual para la Salud Pública

La resistencia a los antimicrobianos no es una enfermedad. Habitualmente no hay diferencias de gravedad entre las enfermedades causadas por cepas sensibles y cepas resistentes. La resistencia no suele ser un problema de patogénesis, sino de limitación de las opciones terapéuticas. El problema básico es que dependemos de los antimicrobianos para tratar las infecciones. Si hubiera métodos alternativos para tratarlas, la resistencia a los antimicrobianos persistiría, pero dejaría de ser importante como problema de salud pública.

La resistencia a los antimicrobianos es un problema de salud pública condicionado por las prácticas asistenciales, y en particular por el uso excesivo de los antimicrobianos en trastornos en los que no aportan beneficios. La resistencia es una característica de muchos patógenos causantes de diferentes enfermedades. Por consiguiente, las estrategias de contención deben adaptarse a las necesidades de los programas de control y tratamiento de enfermedades específicas⁽³⁵⁾.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

Tipo de Investigación

- **Nivel Descriptivo:**

Se recolectó información descrita en la literatura científica acerca del uso tradicional y las propiedades biológicas como la antimicótica atribuidas de la especie vegetal *Hedyosmum* sp., para discutir los resultados a obtener en este proyecto investigación.

- **Diseño Cuasi experimental:**

Se modificó la variable independiente ya que realizamos ensayos microbiológicos utilizando distintas concentraciones del aceite esencial obtenido de las partes aéreas (tallos, hojas, flores) de *Hedyosmum* sp., para determinar la actividad antimicótica de las especies de *Cándida* a estudio.

- **Corte Transversal:**

El proyecto se elaboró con el Aceite Esencial que se obtuvo de la planta *Hedyosmum* sp., conocido como Tarqui que fue recolectada en un lugar específico (bosque natural Jacarón del Cantón Colta), en un tiempo determinado durante el periodo abril – agosto 2019.

- **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).

Determinación de la Población y Muestra

- **Población:**

Especies vegetales pertenecientes al género *Hedyosmum* y especies de *Cándida*.

- **Muestra:**

Las plantas *Hedyosmum* sp., y las especies de *Cándida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*.

Variables de Estudio

- **Variable Independiente:**

Diferentes concentraciones del Aceite Esencial de *Hedyosmum* sp.,

- **Variable Dependiente:**

Actividad antimicótica frente a cepas de *Cándida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*.

Técnicas e Instrumentos para la Recolección de Datos:

- **Técnicas:** observación directa.
- **Instrumentos:** guía de observación

Materiales y Métodos

- **Materiales:**

Matraz Erlenmeyer 500 y 1000 mL, probeta de 250mL, vasos de precipitación 100 y 200 mL, espátula, pinzas, cajas mono Petri de plástico estériles desechables, asas de platino, puntas azules, amarillas y blancas, tubos Eppendorf, cinta adhesiva, discos en blanco, discos de antibiótico comerciales, lápiz graso, algodón (Anexo 1).

- **Equipos:**

Cámara de Flujo Laminar (marca HFsafe900), autoclave (marca Tuttnauer), refrigeradora (marca Mabe), incubadora (marca Memmert), balanza analítica (marca Adam Equipment), vortex, plancha de calentamiento (Anexo 2).

- **Solventes:** Agua destilada, suero fisiológico estéril, dimetilsulfóxido (DMSO)(Anexo 3).
- **Medios de cultivo:** Agar Sabouraud (ASb), agar Mueller Hilton (AMH) (Anexo 3)
- **Otras sustancias utilizadas:** Glucosa en polvo, azul de metileno (Anexo 3)

- **Muestras Biológicas:**

Muestras de cinco especies de *Cándida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*) que fueron facilitadas por la carrera de Bioquímica y Farmacia de la Universidad Católica de Cuenca.

Aceite esencial obtenido de las partes aéreas de la planta *Hedyosmum* sp.

Procedimiento de la Investigación:

Extracción y Aislamiento del Aceite Esencial de *Hedyosmum* sp.

- La planta fue recolectada en el bosque natural Jacarón del Cantón Colta en la Provincia de Chimborazo.
- Se pesó 2000g de las partes aéreas de la planta (ramas, hojas, flores frescas).
- Se procedió a la extracción por el método de hidrodestilación mediante la utilización de la trampa de Clevenger, durante 4 - 5 horas a una temperatura entre 50 - 60 °C (Anexo 4).
- El aceite que se obtuvo se guardó en refrigeración a 4 °C en tubos Eppendorf estériles.

Solución Madre del Aceite Esencial y Diluciones.

- Se pesó 2 g de aceite esencial en un tubo de ensayo estéril y se añadió 1 mL de DMSO (Dimetilsulfóxido).
- Se homogenizó con la ayuda del vórtex.
- Se realizó los cálculos para las siguientes diluciones.
- A partir de la solución concentrada se realizó seis diluciones (anexo 5) en tubos Eppendorf estériles (con su respectiva rotulación) preparadas a las concentraciones de 1.5, 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.062 g/mL.

Preparación de Pre-inóculo

- Desinfectamos el asa con algodón y alcohol.
- Dentro de la cámara de flujo laminar encendemos el mechero y flameamos el asa hasta que se vea el rojo vivo para asegurar la esterilización de la misma.

- De las cepas anteriormente replicadas y conservadas se recoge una colonia de cada una de las especies de *Cándidas* para trabajar
- Se sembró por rastreo o agotamiento a las colonias de las cinco especies de *Cándida* en una placa mono Petri (cada una con su respectiva rotulación) que contenía medio sólido de Agar Sabouraud.
- Se incubó a 37°C durante un periodo de 24 a 30 horas.

Preparación Agar Mueller Hinton Suplementado

- Se pesa 38g de Agar Mueller Hinton y se coloca en un matraz Erlenmeyer con un agitador, se adiciona 1000 mL de agua destilada (preparación para 1L, si se requiere en menor cantidad se realiza los calculas correspondientes).
- Esta preparación se ubica en la plancha de calentamiento y esperamos de 10 – 15 minutos hasta que llegue a su punto de ebullición
- Dejamos reposar la preparación y que baje la temperatura y agregamos 20g de glucosa y 0.25mL de azul de metileno, homogenizamos.
- Colocamos 25 mL de la preparación en cada tubo de ensayo con tapa de rosca y esterilizamos durante 10 minutos (debido a que la preparación contiene glucosa y se puede caramelizar) (Anexo 6).

Preparación de Inóculos, Siembra, Impregnación de Discos con las Concentraciones del Aceite, Pre-incubación, Incubación de las placas y Lectura de Resultados

- Colocamos en tubos de ensayo 18 mL de solución salina al 0.89% estéril.
- Transcurrida las 18 horas de incubación del pre inóculo, con la ayuda de un asa estéril transferimos una colonia de *Cándida* al tubo que contiene solución salina.
- Homogenizamos hasta obtener la turbidez equivalente al patrón McFarland 1 que corresponde a una densidad del recuento de células aproximadamente a 3×10^9 o 30×10^8 UFC/mL (Anexo 7).
- Después de la esterilización colocamos en los tubos de la preparación del Agar suplementado 1 mL de la preparación de solución salina con la *Càndida* correspondiente. Homogenizamos y distribuimos en la caja Petri para que se solidifique. (Repetimos el proceso con los demás tubos para las cinco especies de *Cándida*).

- Con una pinza estéril se colocó los discos de antibióticos para los controles positivos (fluconazol 25µg) y negativos (DMSO).
- Con la ayuda de otra pinza estéril cogemos los discos en blanco, sumergimos en el aceite puro y en las diferentes concentraciones diluidas del aceite (2, 1.5, 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.062 g/mL) e impregnamos en el inóculo, colocamos en distancias adecuadas. Estas pruebas de susceptibilidad se realizaron por duplicado para cada ensayo. (Anexo 8).
- Estas fueron pre incubadas en refrigeración a 4°C durante 30 minutos y luego se incubaron a 37°C durante 24 horas.
- Al pasar las 24 horas de incubación se realizó la lectura de los resultados para ver si hubo presencia, cuyo diámetro fue medido (mm) o ausencia de halos de inhibición alrededor de los discos que contenían las distintas concentraciones del aceite esencial (Anexo 9).
- Las CMIs fueron determinadas mediante la evaluación de la menor concentración en la cual el aceite presentó actividad antimicótica, frente a cada una de las especies de *Cándida*. Los resultados fueron tabulados en el programa de procesamiento de datos Excel.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción y Aislamiento del Aceite Esencial

- **Análisis:**

Se obtuvo 1,8 mL de Aceite esencial a partir de 2000 g de las partes aéreas de la planta *Hedyosmum* sp., que fue sometido al método de hidrodestilación (Trampa de Clevenger), logrando un rendimiento de 0.09%, que fue calculado a partir del volumen del aceite y el peso del material utilizado para la extracción.

- **Discusión:**

Este resultado coincide con el rendimiento obtenido por Collaguazo ⁽³⁶⁾ quien estudió la misma planta *Hedyosmum* sp., aplicando el mismo método de destilación e igual peso de las partes de la planta. Este resultado fue mayor al rendimiento de 0,071% obtenido por Rodríguez *et al.* ⁽²⁰⁾ quienes estudiaron la planta *H. luteynii* y aplicando el mismo método de destilación, así como el rendimiento de Zamora *et al.* ⁽³⁷⁾ Registraron un rendimiento de 1,2% en el estudio con *H. translucidum*, este supera el valor encontrado de rendimiento en esta investigación, ya que estos autores usaron el método asistido por microondas. Los factores climáticos y las condiciones en las que se realizan los ensayos (temperatura, presión, cantidad de material vegetal) influyen mucho en el porcentaje de rendimiento de los diferentes tipos de aceites esenciales.

Actividad Antimicótica del Aceite Esencial

Esta investigación indica sobre la actividad antimicótica del aceite esencial frente a cinco especies de *Cándida*, que fue evaluado mediante el método de difusión en disco o Kirby Bauer, el procedimiento a seguir fue indicado en el apartado del procedimiento. Los resultados obtenidos se expresan en las tablas 1 y 2, los cuales fueron analizados a partir de las mediciones de los diámetros de los halos de inhibición en mm, así mismo las determinaciones de las CMIs fueron realizadas mediante los resultados que arrojaron las pruebas de susceptibilidad ejecutadas a diferentes concentraciones del aceite diluido (2, 1.5, 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.062 g/mL) y el aceite puro.

Tabla 1. Actividad Antimicótica del Aceite Esencial de *Hedyosmum* sp., Expresado por los Halos de Inhibición (mm)

<i>Cándidas</i>	Aceite Esencial <i>Hedyosmum</i> sp.								Control Positivo	Control negativo
	Halos de inhibición (mm) X ± SD									
	Concentraciones g/mL									
	Aceite puro	2	1.5	1	0.5	0.25	0.125	0.062	Fluconazol 25µg	DMSO
<i>C. albicans</i>	0	0	0	11 10.7/ 0.5	9 9.2/0.5	0	0	0	16	0
<i>C. krusei</i>	11 10.7/0.5	9 8.5/0.5	10 9.7/0.5	12 11.5/0.5	17 16.7/0.5	20 20/0.8	0	0	38	0
<i>C. glabrata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0
<i>C. tropicalis</i>	15 14.5/0.5	0	0	17 17.2/0.5	14 13.5/0.5	11 10.5/0.5	0	0	37	0
<i>C.parapsilosis</i>	13 13.2/0.9	0	0	14 13.7/0.9	12 11.7/0.5	10 9.7/0.9	0	0	18	0

Fuente: Resultados obtenidos durante el proyecto de investigación

- **Análisis:**

El aceite puro tuvo actividad en tres especies de *Cándida*, como se puede observar en la Tabla 1, *C. tropicalis* tuvo una mayor inhibición presentando un halo de 15 mm, seguido por *C. parapsilosis* con 13 mm y *C. krusei* con 11 mm de diámetro de halo de inhibición. Mientras que el aceite puro no fue activo frente a *C. albicans* y *C. glabrata*.

Sin embargo cuando se realizó el estudio de la sensibilidad a diferentes concentraciones del aceite, se puede observar que el halo de inhibición en *C. krusei* aumenta a medida que se disminuye concentración de aceite esencial, obteniéndose halo de inhibición hasta una concentración de 0,25 g/mL, por debajo de esa concentración no se presentó halos de inhibición. Por otro lado *C. albicans* no presentó sensibilidad al aceite puro ni a concentraciones superiores a 1 g/mL, mientras que a concentraciones de 1 y 0,5 g/mL se pudo observar halos de inhiación.

En estos dos casos (*C. krusei* y *C. albicans*) se podría explicar problemas de difusión tanto del aceite como a las altas concentraciones del mismo en el medio Muller Hinton que no permitieron difundir sus componentes o también podría ser por antagonismo entre los compuestos mayoritarios del aceite y el compuesto que está ejerciendo la inhibición de la *Cándida* estudiada y al estar más diluido el o los componentes mayoritarios ejercen menos efecto antagónicos con el componente que ejerce la actividad antimicótica de esas dos especies de *Cándida*. Mientras que *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* tiene un halo con mayor diámetro de medida en la concentración 1g/mL, *C. albicans* fue sensible a las concentraciones de 1g/mL obteniendo un halo de 11 mm y 0,5 g/mL un diámetro de 9 mm.

- **Discusión:**

Según Zapata *et al.* ⁽³⁸⁾ evaluaron la actividad antimicótica con las cepas *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258, *Aspergillus flavus* ATCC 204304 y *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305 de acuerdo con las técnicas EUCAST y CLSI M38-A para levaduras y hongos filamentosos, respectivamente. Las analizaron con aceites de las plantas *Achyrocline alata* y *Baccharis latifolia* fueron los únicos activos contra *A. fumigatus* (media geométrica de la concentración mínima inhibitoria=78,7 y 157,4µg/mL, respectivamente). En contraste, no se evidenció actividad de los aceites contra especies de *Cándida*. Otro estudio realizado con otro tipo de aceite Moura *et al.* ⁽³⁹⁾ Indicaron que la especie *C. tropicalis* está siendo aislada frecuentemente, es el segundo microorganismo más aislado después de *C. albicans*. La aparición de cepas resistentes a los antifúngicos convencionales ha aumentado la búsqueda de nuevas alternativas provenientes de productos naturales, especialmente los aceites esenciales.

En este estudio se investigó la actividad de los aceites esenciales contra las cepas de *C. tropicalis*, utilizando el método de difusión en disco, la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración fungicida mínima (CFM). En el método de difusión en disco, con los aceites esenciales de *Cinnamomum zeylanicum*, *Eugenia caryophyllata* y *Origanum vulgare* se obtuvieron mayores valores de inhibición. La CIM y CFM del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* fueron 0.512 y 0.1024 g/mL, mientras que los de la anfotericina B fueron idénticos, 0.2 g/mL. Por lo tanto, se puede concluir que el aceite esencial de *E. caryophyllata* tiene potente actividad antifúngica y puede ser objeto de nuevos estudios sobre esta actividad.

- **Análisis:**

C. glabrata no fue sensible al aceite puro de *Hedyosmun* sp y a todas las concentraciones estudiadas, observándose también un halo de inhibición de 8 mm para el control positivo (Fluconazol).

- **Discusión**

Tapia ⁽²⁷⁾ indica que las infecciones por *C. glabrata* son difíciles de tratar; por sus características genéticas presenta resistencia a fármacos azólicos, principalmente a fluconazol. Es un patógeno emergente, que se recupera generalmente en pacientes que han recibido tratamiento anti fúngico previo, que se asocia a falla terapéutica por su mayor resistencia a fluconazol, y que posee factores de virulencia, por lo que debe ser estudiada hasta precisarse su especie en el laboratorio.

Tabla 2. Concentración Mínima Inhibitoria (g/mL) del Aceite Esencial de *Hedyosmun* sp.

<i>Cándidas</i>	Aceite Esencial <i>Hedyosmun</i> sp.
	CMI
<i>C. albicans</i>	0.5 g/mL
<i>C. krusei</i>	0.25 g/mL
<i>C. tropicalis</i>	0.25 g/mL
<i>C.parapsilosis</i>	0.25 g/mL

Fuente: Resultados obtenidos durante el proyecto de investigación

- **Análisis:**

En la tabla 2 se indica la Concentración mínima inhibitoria (CMI) de las cuatro especies de *Cándida* que resultaron ser sensibles frente al aceite esencial de *Hedyosmun* sp . *C albicans* muestra la CMI en 0,5 g/mL, mientras que *C. krusei*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* en 0,25 g/mL.

- **Discusión:**

Cabe recalcar que existen otras investigaciones de aceites esenciales en donde se analizado solo a *C. albicans*, Según Echeverría ⁽⁴⁰⁾ indica que la media del halo de inhibición sobre el hongo *C. albicans* a las concentraciones de 2,500ppm (0.025 g/mL) a 8,500ppm (0.085 g/mL) fueron de (10±1,527mm hasta 14±1,527mm), en cambio en la concentración de 12,500ppm (0.12 g/mL) el halo de inhibición fue de (17±1) y de acuerdo a la escala de actividad de los aceites esenciales según Duraffourd y Lapraz presenta una sensibilidad media (++) , en cambio a partir de 2,500ppm a 8,500ppm su efecto antifúngica fue menor presentando una sensibilidad limite (+). Otro estudio realizado por Guzmán ⁽⁴¹⁾ indica que el aceite esencial de *Moringa oleífera* a la concentración del 100% presento mayor efectividad anti fúngica frente a la *Cándida albicans* en relación a las demás concentraciones presentando como valor medio 9.58mm de diámetro del halo de inhibición siendo así Intermediamente sensible.

CONCLUSIONES

- Se concluye que la planta *Hedyosmum* sp., es de gran utilidad e importancia para la medicina tradicional, ofrece grandes propiedades curativas para aliviar infecciones. A partir de 2000 g de partes aéreas de esta especie vegetal colectada en el bosque natural Jacarón obtuvimos 1.8 mL de aceite esencial mediante el método de hidrodestilación usando la trampa de Clevenger, lo cual representó un rendimiento de 0,09%, alcanzando un porcentaje bueno que ayudó a obtener resultados confiables en cada uno de los ensayos, siendo fuente de nuevos fármacos o la base estructural para el desarrollo y tratamiento de distintas enfermedades que producen las distintas especies de *Cándida*.
- Según los ensayos microbiológicos utilizados, la actividad antimicótica frente a las cepas de interés clínico fue evaluada mediante el método de Kirby Bauer, que permitió evidenciar la actividad en cuatro especies de *Cándida* *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. albicans*, teniendo un mejor crecimiento de halo en la concentración de 1.0 g/mL.
- La determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) del aceite esencial de *Hedyosmum* sp., frente a las especies de *Cándida* en estudio y utilizando las distintas concentraciones del aceite (2, 1.5, 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.062 g/mL), indicaron que empleando el aceite puro se obtiene halos de inhibición en *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, las mismas que presentan la CMI en la concentración menor 0.25 g/mL, *C. albicans* presento la CMI en la dilución de 0.5 g/mL, *C. glabrata* no mostró susceptibilidad a este ensayo.

RECOMENDACIONES

- Los docentes de la carrera incentiven a los estudiantes a continuar investigando sobre las bondades medicinales de las plantas y el estudio de las actividades biológicas frente a otras especies bacterianas.
- A los pacientes que adolecen enfermedades bacterianas, micóticas entre otras, no auto medicarse por que los microorganismos se vuelven resistentes a ciertos medicamentos que no es el específico para el tratamiento.
- Los instrumentos a utilizar en los procedimientos deben estar estériles para evitar contaminaciones. Las cepas a utilizar deben tener una correcta manipulación. Seguir el procedimiento adecuado para obtener resultados confiables de los ensayos.

BIBLIOGRAFIA

1. OMS. Las Plantas Medicinales y su aplicación en la Salud Pública. 2018; 8(1).
2. Zuluaga G. Plantas Medicinales En El Mundo Moderno. Wanamey. 2018; 3(1).
3. Molinares P, Castillo A. Actividad antibacteriana del extracto total de hojas. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2017; 22(1).
4. Santiana J, Romero-Saltos H. Familia: Chloranthaceae. En Ecuador PUCd, editor. Libro Rojo- Plantas del Ecuador. Quito: Herbario QCA; 2014. p. 67.
5. Ulloa C, Moler P. Arboles y Arbustos de los Andes Ecuador. Floras. 2011; 2(6).
6. Barrera M. Aceites Esenciaes. Mercado de la Unión Europea. 2018; 12(1).
7. Stasteshenko E. Aceites Esenciales. Primera ed. Isaza M, editor. Bucaramanga - Santander : CENIVAM; 2009.
8. Corral L. Exportación de aceites esenciales crece en el Ecuador. Vistazo. 2018; 1(8).
9. Organizaicón Mundial de la Salud. Enfermedades infecciosas. Las Américas. 2019; 3(2).
10. Kullberg BJ AM. Enfermedades Infecciosas. Intramed. 2015; 2(1).
11. Larrea A. Infecciones provocadas por Hongos. [Online]; 2015. Acceso 22 de Mayode 2019. Disponible en: http://www.elcorreo.com/infecciones_provocadas_por_hongos.
12. Zurita J. Estiman que el 3% de la población ecuatoriana podría tener enfermedades micóticas. Redmedic. 2017; 1(3).
13. Patricia V. Patología Oral en la Provincia de Chimborazo..
14. Pascual Casamayor , Pérez Campos YE, Morales Guerrero , Castellanos Coloma , González Heredia E. Evolución de la Medicina Natural. [Online]; 2014. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/san/v18n10/san191810.pdf>.
15. Escuela Superior Politecnica de Chimborazo. <http://estephaniforestal.blogspot.com>. [Online]; 2017. Acceso 22 de Mayode 2019. Disponible en: <http://estephaniforestal.blogspot.com/p/plantas-de-la-sierra-ecuatoriana.html>.
16. Vaca R. Plantas Medicinales en el Ecuador. [Online]; 2018. Acceso 22 de Mayode 2019. Disponible en: <https://www.elcomercio.com/tendencias/ecuador-plantas-medicinales-napo-amazonia.html>.

17. Martínez CEC. Plantas Medicinales de los Andes. [Online]; 2016. Disponible en: <http://www.beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdfer/Capitulo%2018.pdf>.
18. Berry PE. Plant Order. Britannia. 2017; 1(2).
19. Rodríguez SHT, Tovar Torres MC, García VJG, Lucena ME, Araujo L. Composición química del aceite esencial de las hojas de *Hedyosmum luteynii* Todzia. 2018; 25(2).
20. Rodríguez SHT, Barbarú Grajale AD, Torres MdJ. análisis fitoquímico de un extracto de la especie forestal nativa tarqui (*hedyosmum scabrum*), perteneciente al bosque de Jacarón, Juan de Velasco, Chimborazo, Ecuador. 2016; 3(2).
21. Mannise R. Aceites Esenciales. [Online]; 2019. Disponible en: <https://ecocosas.com/plantas-medicinales/aceites-esenciales/?cn-reloaded=1>.
22. Laboratorios HAVEA. Aceites Esenciales. [Online]; 2018. Disponible en: file:///C:/Users/admin/Documents/HE_es.pdf.
23. Xavier D. Destilación por arrastre con vapor. Química Orgánica Experimental. 2016; 8(1).
24. Álvarez T. Infecciones por especies de *Cándida*. [Online]; 2016. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75312008000300011.
25. Castañón Olivares LR. Candidiasis o Candidosis. [Online], México; 2016. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/candidosis.html>.
26. Pardi G, Cardozo EI. ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE CANDIDA ALBICANS COMO AGENTE ETIOLÓGICO DE CANDIDIASIS BUCAL. 2012; 40(3).
27. Tapia C. *Candida glabrata*. Revista Chilena de Infectología. 2008; 25(4): p. 293.
28. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance". Rev. 2013; 229(38).
29. Barrionuevo DO. Candidiasis. [Online], Granada: Editorial de la Universidad de Granada; 2015. Disponible en: <https://doi.org/10.1111%2Fj.1574-6976.2011.00278.x>.
30. A HT. Enfermedades Infecciosas Washington DF: BMC; 2007.
31. J , Treviño R, Gonzalez Gonzalez JG, Garza Gonzalez E, Gonzalez G. *Candida parapsilosis*, una amenaza desafiante. Rev Médica Universitaria. 2014; 14(56): p. 157-165.

32. Microbiología y Parasitología BIO058. Candidiasis. [Online]; 2017. Disponible en: <http://candidalbicans.blogspot.com/>.
33. Tapia C. Resistencia a antifúngicos. Rev Biomèdica. 2015; 3(10).
34. Lab Microbiologia. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD BACTERIANA. [Online]; 2017. Disponible en: http://campus.usal.es/~micromed/Practicas_odontologia/unidades/labv/LabMicro/Antibiograma.html.
35. Organizacion Mundial de la Salud (OMS). La resistencia a los antimicrobianos o antifúngicos como amenaza inusual para la salud pública. [Online]; 2016. Disponible en: https://www.who.int/drugresistance/AMR_Importance/es/?fbclid=IwAR2Q0WHew5kH329j0na505Fryih0qYbN-5__NJdbedT-ZW28iTybzhJ2sFU.
36. Collaguazo Ramirez EG. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Hedyosmum* sp. del bosque natural Jacarón. [Online], Riobamba ; 2019. Disponible en: <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/5533/1/UNACH-EC-FCS-LAB-CLIN-2019-0002.pdf>.
37. Zamora A, Arturo D. Composición química del aceite esencial de hojas de *Hedyosmum translucidum* Cuatrec. Caribe Plants Med. 2016; 192(8).
38. Zapata B, Durán C, Stashenkobn E, Betancur-Galvis L, Mesa-Arango L. Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia Asteraceae. Revista Iberoamericana de Micología. 2013; 27(2).
39. Moura , Queiroga F, Pereira J, Nogueira V. Actividad antifúngica del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* sobre cepas de *Candida tropicalis* de aislados clínicos. Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales ya romáticas. 2012; 11(3).
40. Echeverria A. Actividad anti funguica in vitro de aceite esencial y extractos alcoholicos de eucalipto sobre *Candida albicans*. [Online]; 2017. Disponible en: <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/4454/1/UNACH-EC-FCS-ODT-2017-0034.pdf>.
41. Guzmán M. Efecto anti fúngico del aceite esencial de *Moringa oleífera* Lam al 25, 50, 100 % frente a la *Cándida albicans* estudio in vitro. [Online]; 2018. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/15855/1/T-UC-0015-ODO-012.pdf>.

ANEXOS

Anexo 1: Materiales



A. Vasos de Precipitación, Tubos de ensayo

B. Matraz Erlenmeyer

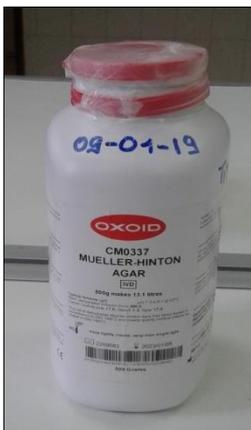
Anexo 2: Equipos



A. Cámara de flujo Laminar

B. Autoclave

Anexo 3: Agares, solventes, entre otros



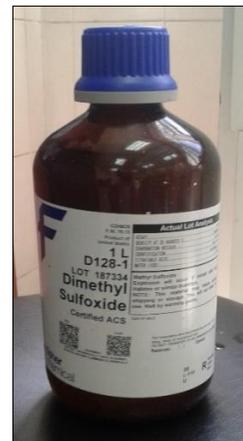
A. AMH



B. Glucosa



C. Azul de Metileno



D. DMSO

Anexo 4: Extracción del Aceite



Método de Hidrodestilación (Trampa de Clevenger)

Anexo 5: Diluciones del Aceite



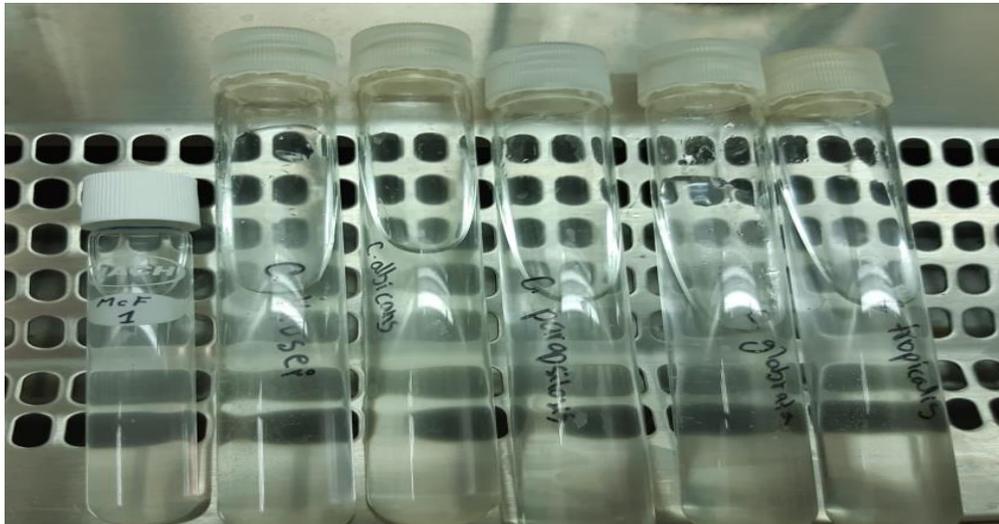
Distintas concentraciones en tubos Eppendorf

Anexo 6: Agar Mueller Hilton suplementado



Preparación del AMH, añade la glucosa y azul de metileno, se agrega los 25mL en los tubos de ensayo con tapa rosca.

Anexo 7: Patrón McFarland



McFarland 1

Anexo 8: Impregnación de discos



Anexo 9: Halos de Inhibición



A. Halos de inhibición Controles

B. Halos de inhibición de las Cándidas