

ARTICLE / INVESTIGACIÓN

Actividad antimicrobiana de extractos de ramas de *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni (Chloranthaceae)**Antimicrobial activity of extracts of branches of *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni (Chloranthaceae)**María E. Lucena-de Ustariz^{1*}, Francisco J. Ustáriz-Fajardo², Verónica P. Cáceres-Manzano¹, José Prato³

DOI. 10.21931/RB/2023.08.03.44

¹ Carrera de Laboratorio Clínico, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Chimborazo (UNACH), 0601003, Riobamba, Ecuador.² Carrera de Fisioterapia, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Chimborazo (UNACH), 0601003, Riobamba, Ecuador.³ Carrera de Ingeniería Ambiental, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Chimborazo (UNACH), 0601003, Riobamba, Ecuador.Corresponding author: mlucena@unach.edu.ec

Resumen: El género *Hedyosmum* (Chloranthaceae) consta de 45 especies. En el Ecuador este género presenta 16 especies endémicas del bosque nublado alto y subpáramos del sur del país. El objetivo fue determinar la actividad antimicrobiana de extractos hexánicos y etanólicos de ramas de *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni, de los Andes Ecuatorianos, frente a microorganismos de importancia clínica. Las ramas frescas de *H. cuatrecazanum* Occhioni., obtenidas del bosque natural de Jacarón, provincia de Chimborazo – Ecuador; se secaron (es38°C x 3 días), posteriormente se trituraron. El material vegetal (200 gr) se colocó en matraces Erlenmeyer con 500 mL de Hexano o Etanol 72h (19oC+/-2). Seguidamente, se filtró cada extracto y se sometieron a evaporación rotatoria (55°C), se conservaron a (4°C) en oscuridad. Las actividades antimicrobianas de los extractos fueron estudiadas mediante difusión en agar y concentración mínima inhibitoria, partiendo de diluciones con dimetil sulfóxido. Ambos extractos mostraron actividad frente a la mayoría de las bacterias Gram-negativas, y únicamente frente a la bacteria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*. Las cepas de *Candida* mostraron susceptibilidad variable frente a los extractos hexánicos pero no frente a los etanólicos. Los extractos estudiados de *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni., muestran potencial antimicrobiano variable y por tanto, alternativas para el desarrollo tramientos de origen natural frente a microorganismos de importancia clínica.

Palabras clave: *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni, antibacterianos, antifúngicos, extractos, concentración mínima inhibitoria.

Abstract: The genus *Hedyosmum* (Chloranthaceae) consists of 45 species. In Ecuador, this genus presents 16 endemic species of the high cloud forest and subpáramos of the country's south. The objective was to determine the antimicrobial activity of hexanic and ethanolic extracts from branches of *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni., from the Ecuadorian Andes against microorganisms of clinical importance. The fresh branches of *H. cuatrecazanum* Occhioni. They were obtained from the natural forest of Jacarón, province of Chimborazo - Ecuador; they were dried (in an oven at 38°C x 3 days) and then crushed. Plant material (200 gr) was placed in Erlenmeyer flasks (1000 mL with 500 mL) of Hexane or Ethanol, 72h (19oC+/-2). Subsequently, each extract was filtered and subjected to rotary evaporation (55°C), and stored at (4°C) in the dark. The antimicrobial activities of the extracts were studied by diffusion in agar and minimum inhibitory concentration, starting from dilutions with dimethyl sulfoxide. Both extracts showed activity against most Gram-negative bacteria, but only against the Gram-positive *Staphylococcus aureus*. *Candida* strains showed variable susceptibility to hexanic extracts but not to ethanolic ones. The studied extracts of *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni., show variable antimicrobial potential against microorganisms of clinical importance.

Key words: *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni, antibacterials, antifungals, extracts, minimum inhibitory concentration.

Introducción

La resistencia a los antibióticos es un tema de creciente preocupación mundial. Una estrategia clave para minimizar aún más el desarrollo de resistencia es el uso racional de los antibióticos, tanto por parte de los proveedores como de los pacientes. Con un número limitado de antibióticos disponibles y la resistencia a los tratamientos de primera línea cada vez más común, la resistencia da como resultado mayores costos de atención médica, ya que los pacientes requieren más largos y costosos tratamientos, y un mayor riesgo de mortalidad por enfermedades que antes eran cu-

rables¹. En la práctica clínica humana se ha demostrado un uso exagerado de antibióticos, así como la prescripción inadecuada, al administrarse sin necesidad o en dosis y tiempo inapropiados. Diferentes estudios han demostrado cómo, en instituciones hospitalarias, la indicación del tratamiento antibiótico puede ser incorrecta en el 30 al 50 % de los casos. De igual forma, en unidades de cuidado intensivo, entre el 30 y el 60 % de los antibióticos prescritos son innecesarios, inapropiados o subóptimos².

Citation: Lucena-de Ustariz M E, Ustáriz-Fajardo F J, Cáceres-Manzano V P, , Prato J.. Actividad antimicrobiana de extractos de ramas de *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni (Chloranthaceae). *Revis Bionatura* 2023;8 (3) 44. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.03.44>

Received: 20 June 2023 / **Accepted:** 25 August 2023 / **Published:** 15 September 2023

Publisher's Note: Bionatura stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



El informe del Sistema Mundial de Vigilancia Antimicrobiana (GLASS), revela la presencia de multiresistencia a los antibióticos en 22 países y se presume estaría afectando a unas 500.000 personas. Entre las bacterias que fueron notificadas con mayor frecuencia se encuentran: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Salmonella sp.*³. Para las infecciones bacterianas comunes como las infecciones urinarias, la septicemia, las infecciones de transmisión sexual y algunas formas de diarrea se han observado en todo el mundo tasas elevadas de resistencia a los antibióticos utilizados habitualmente en los tratamientos, lo que indica que se están agotando los antibióticos eficaces. La línea de desarrollo clínico de nuevos antimicrobianos está agotada. En 2019 la OMS identificó 32 antibióticos en fase de desarrollo clínico contra la lista OMS de patógenos prioritarios, de los que solo seis se clasificaron como innovadores. La escasez de antibióticos afecta a países de todos los niveles de desarrollo y especialmente a sus sistemas de atención de salud⁴. Igualmente, la prevalencia de las infecciones fúngicas farmacorresistentes va en aumento y empeora una situación terapéutica ya difícil. Muchas infecciones fúngicas actuales presentan problemas de tratamiento, como la toxicidad, especialmente en pacientes con otras infecciones subyacentes, por ejemplo, el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)⁴.

Las infecciones por levaduras del género *Candida sp.*, son cada vez más prevalentes en pacientes hospitalizados, especialmente en grupos de mayor riesgo como pueden ser pacientes con neoplasia hematológica bajo tratamiento de quimioterapia y en cuidados intensivos. De todas las infecciones micóticas sistémicas, es la candidiasis la que cobra mayor importancia por su frecuencia y hacia la cual se dirigen grandes esfuerzos en los programas de vigilancia⁵. La candidiasis invasiva afecta a más de 250.000 personas por año en todo el mundo y provoca más de 50.000 muertes y es la micosis más común entre los pacientes hospitalizados en los países desarrollados. Comprende la candidemia y la candidiasis de los tejidos profundos y la mortalidad entre los pacientes con candidiasis invasiva es de hasta el 40%, incluso en los pacientes que reciben tratamiento⁶. La candidemia y la candidiasis invasiva son las principales causas de morbilidad y mortalidad, y su incidencia está aumentando debido a la creciente complejidad de los pacientes. Cinco especies de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei*) representan más del 90% de todos los casos diagnosticados, pero su frecuencia relativa varía según la población involucrada, la región geográfica, la exposición antifúngica previa y edad del paciente⁷. *Candida albicans* es la especie predominante de candidiasis sistémica además de su alta frecuencia, en los últimos años se ha detectado un incremento en la aparición de cepas resistentes a los tratamientos antifúngicos habituales⁸.

La resistencia a los antimicrobianos deben ser la prioridad en los esfuerzos de investigación y desarrollo de nuevos fármacos alternativos a los existentes y las plantas medicinales que corresponden a especies vegetales con principios activos que tienen propiedades terapéuticas comprobadas empírica o científicamente constituyen una alternativa. Éstas producen metabolitos secundarios útiles para la solución de problemas específicos en el campo de la salud, además por su diversidad se constituyen en una de las principales fuentes viables para la investigación y desarrollo de nuevos fármacos incluyendo nuevos antibió-

ticos. Como parte de biodiversidad mundial de plantas se encuentra la familia *Chloranthaceae* constituida por hierbas, arbustos y árboles; nativa de los trópicos y el sur de las regiones templada. El género *Hedyosmum* forma parte de esta familia y consta de 45 especies, de las cuales 44 se distribuyen en el Neotrópico de montaña y una (*H. orientale* Merr. & Chun) en el Sudeste Asiático⁹. En el Ecuador el género *Hedyosmum* presenta 16 especies endémicas del bosque nublado andino alto y subpáramos (entre 600 y 3000 msnm) del sur del país; mientras que el centro de Los Andes se constituye como eje de diversificación y es allí donde se encuentra alrededor del 50% de sus especies¹⁰. Las especies del género *Hedyosmum* (conocida como Tarqui) tienen una larga historia de uso en la medicina tradicional del Ecuador, con una variedad de propiedades biológicas/farmacológicas interesantes que han sido científicamente confirmadas, en particular en el tratamiento y alivio de infecciones respiratorias agudas y enfermedades diarreicas, que son las enfermedades con mayor tasa de morbilidad¹¹, tratamiento de enfermedades renales (Radice 2019)¹². No obstante, existen muy pocas referencias publicadas sobre actividad antimicrobiana del género *Hedyosmum* y ninguna específicamente de *H. cuatrecazanum* Occhioni., de los Andes Ecuatorianos.

Con base en este contexto, en el presente trabajo se estableció como objetivo determinar la actividad antimicrobiana de extractos hexánicos y etanólicos de ramas de *H. cuatrecazanum* Occhioni., (Tarqui) recolectadas en el bosque natural Jacarón de Ecuador, frente a bacterias y levaduras de interés clínico, mediante el método de difusión en agar y a la vez contribuir en la búsqueda de sustancias alternativas de origen natural para el tratamiento de las enfermedades infecciosas.

Materiales y métodos

Especie vegetal seleccionada

Para la recolección del material vegetal se cuenta con la autorización del Ministerio del Ambiente, Agua y transición Ecológica de Ecuador., bajo el código MAAE-ARS-FC-2021-1378. Las partes aéreas de *H. cuatrecazanum* Occhioni., fueron recolectadas de forma manual entre abril y agosto de 2019, en el bosque natural de Jacarón, ubicado en la parroquia Juan de Velasco, cantón Colta, provincia de Chimborazo, Ecuador (1°55'16.36158333"S, 78°53'14.99493303"W; coordenadas UTM: x = 735000. y = 9787500, zona 17S) (Figura 1) . El bosque cubre una superficie de 106 ha, con un rango altitudinal de 3200-3480 m de altitud, con temperaturas que oscilan entre 9 a 12oC y una precipitación anual de 1200 mm. Los suelos están formados por cenizas volcánicas, con altos contenidos de materia orgánica, valores de pH entre 5,5 y 6,5; clasificados a nivel de gran grupo como Dystrandpeats en el orden de inceptisoles, correspondiendo a suelos jóvenes de poco desarrollo que presentan gran acumulación de materia orgánica y saturación de bases menor al 50%¹³. Una muestra del espécimen fue depositada en el Herbario Politécnica Chimborazo (CHEP), (con el código de identificación 2021-04-22) tras la identificación botánica realizada por el Ing. Jorge Caranqui A. de la Escuela Superior Politécnica del Chimborazo, Ecuador.

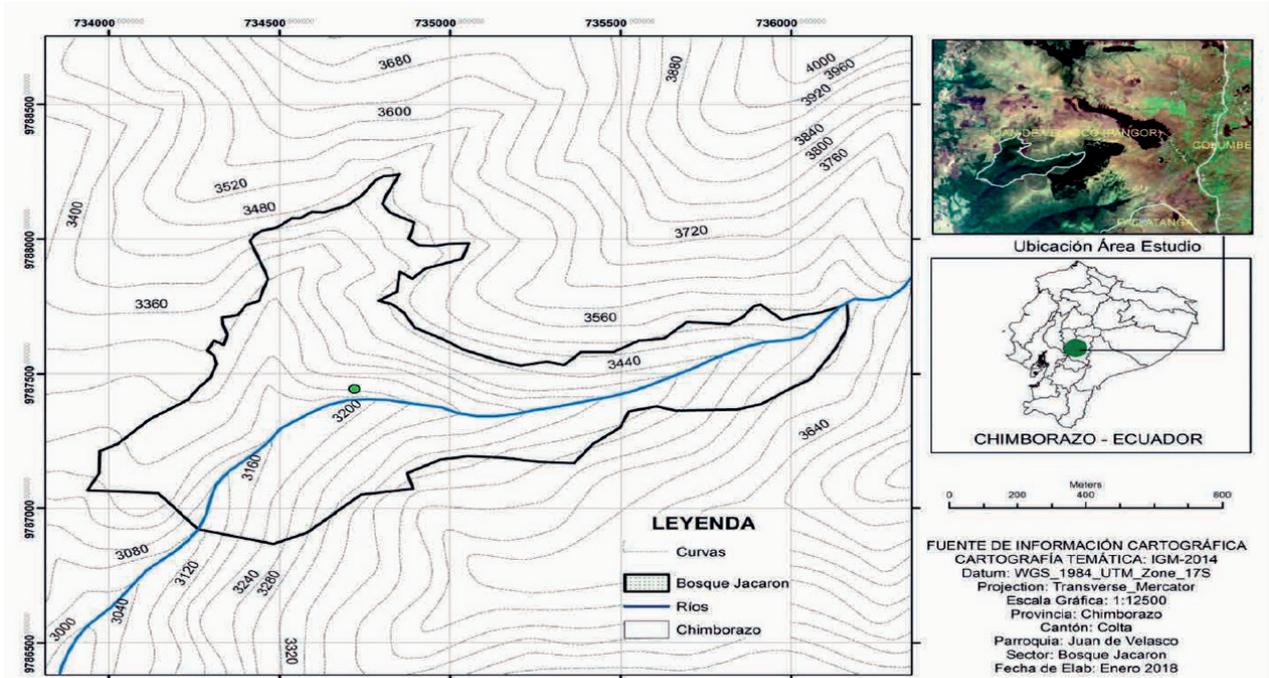


Figura 1. Bosque natural del ecosistema Jacarón ubicado en la parroquia Juan de Velasco, cantón Colta, provincia de Chimborazo, Ecuador. El bosque cubre una superficie de 106 ha, con un rango altitudinal de 3200 – 3480 msnm.

Obtención de las muestras

La recolección de ramas frescas, en perfecto estado de la planta conocida como Tarqui (*H. cuatrecazanum* Ochioni) (Figura 2), fue realizada por el Ing. Franklin Enrique Cargua Catagña del bosque natural de Jacarón en Colta provincia de Chimborazo, Ecuador. El material vegetal se trasladó y conservó en sacos de polietileno y se almacenaron en el depósito del laboratorio (limpio y libre de humedad) hasta su procesamiento.

Preparación de las Muestras

Una vez separadas las hojas de ramas se procedió a

secarlas en estufa a una temperatura de 38°C durante tres días. Posteriormente, el material vegetal (ramas) libre de humedad fue triturado utilizando un molino eléctrico.

Obtención de los extractos

Se pesaron 200 g del material vegetal en estudio y se colocaron en matraces Erlenmeyer de 1000 mL (secos y estériles), cada uno se aforó con 500 mL de Hexano o Etanol según el caso. Se dejaron macerar durante 72 horas a temperatura ambiente (19°C +/- 2). Seguidamente, se filtró cada extracto inicial y se sometieron individualmente a evaporación rotatoria (rotavapor) a 55°C. Este proceso se



Figura 2. Muestra de la planta *Hedyosmum cuatrecazanum* Ochionidel género *Hedyosmun* de la familia *Chloranthaceae*.

repitió tres (3) veces de forma sucesiva cada 72 horas, utilizando siempre el solvente recuperado de cada evaporación rotatoria; así como, el mismo material vegetal inicial. Finalizado cada proceso, los extractos hexánicos y etanólicos obtenidos se almacenaron en tubos Eppendorf estériles bajo condiciones de refrigeración (4°C) y oscuridad hasta su uso para ensayos biológicos.

Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas fueron facilitadas por el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Chimborazo y corresponden a cepas de la Colección de Cultivo Tipo Americano del inglés American Type Culture Collection y con sus siglas ATCC. El ensayo incluyó las bacterias Gram-negativas *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* ATCC 700603 y bacterias Gram-positivas *S. aureus* ATCC 25923 y *E. faecalis* ATCC 29212.

Cepas fúngicas

Las cepas del género *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, fueron proporcionadas de la Colección del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Cuenca-Ecuador.

Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana de los extractos hexánicos y etanólicos de *H. cuatrecazanum* Occhioni., se evaluaron de acuerdo al método de difusión en agar con discos de papel¹⁴, utilizando las cepas de referencia *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 23357 y *P. aeruginosa* ATCC 27853. Las cepas bacterianas que mostraron halos de inhibición frente a los extractos hexánicos y etanólicos se les determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI), a partir de una solución madre de concentración 500 000 µg/mL (0,5 g del extracto hexánico y 1 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) se prepararon diluciones a concentraciones de: 250 000, 125 000, 62 500 y 31 250 µg/mL; y a partir de una solución madre de concentración 200 000 µg/mL (0,2 g del extracto etanólico y 1 mL de DMSO) se prepararon diluciones a concentraciones de: 200 000; 100 000; 50 000; 25 000 y 12 500 µg/mL. Los discos de papel de (6mm) impregnados (10 µL) con las diferentes diluciones de cada uno de los extractos (hexánicos y etanólicos) fueron colocados individualmente sobre la superficie del agar Mueller Hinton inoculado con 1 mL de la suspensión bacteriana con turbidez equivalente a 0,5 del patrón McFarland y correspondiente a 1,5 x10⁸ Unidades Formadoras de Colonias-UFC/mL, contenido en placas Petri de 90 mm x 15 mm. El proceso se repitió para cada una de las cepas bacterianas en estudio y a su vez con cada uno de los extractos hexánicos y etanólicos. Simultáneamente, se realizaron los controles positivos empleándose los antibióticos de referencia: Amikacina® (30 µg) para las bacterias Gram-negativas y Ciprofloxacina® (50 µg) para las bacterias Gram-positivas; como control negativo se utilizó DMSO. Las placas fueron pre-incubadas en refrigeración a 4°C durante 2 horas y luego se incubaron a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, se realizó la lectura, registrando el diámetro de los halos de inhibición. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Actividad antifúngica

La actividad antifúngica de los extractos hexánicos y etanólicos de *H. cuatrecazanum* Occhioni., se evaluaron de

acuerdo al método de difusión en agar con discos¹⁵, utilizando cinco cepas del género *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*). Las cepas de la levadura *Candida* que mostraron halos de inhibición frente a los extractos hexánicos y etanólicos se les determinó la CMI, a partir de una solución madre de concentración (1,0 g de extracto hexánico o etanólico según el caso y 1,0 mL de DMSO), se prepararon diluciones a concentraciones de: 0,5; 0,25; 0,125; 0,062 y 0,0155 g/mL. Se utilizaron 25 mL de agar Mueller Hinton suplementado (38 g/L de agar Mueller Hinton, 20 g de glucosa y 0,25mL de azul de metileno) y se esterilizó por 10 min. El agar fundido a 45°C, fue asépticamente mezclado con 1mL de la suspensión fúngica con turbidez equivalente a 1 del patrón McFarland y correspondiente a 3x10⁸ Unidades Formadoras de Colonias por mL (UFC/mL), en placas Petri de 90 mm x 15 mm. Una vez solidificado el agar, los discos de papel de (6mm) impregnados (10 µL) con las diferentes diluciones de cada uno de los extractos (hexánicos y etanólicos) fueron colocados individualmente sobre la superficie del agar Mueller Hinton inoculado. El proceso se repitió para cada una de las cinco especies de *Candida* y a su vez con cada uno de los extractos hexánicos y etanólicos. Simultáneamente, se realizó el control de calidad positivo, para lo cual se empleó como antifúngico de referencia discos con fluconazol 25 µg® y como control negativo discos impregnados con DMSO. Las placas fueron pre-incubadas en refrigeración a 4°C durante 30 minutos y luego se incubaron a 37°C durante 24 horas, posteriormente, se realizó la lectura, registrando el diámetro (mm) de los halos de inhibición. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Recolección de la información y análisis estadístico

Los análisis se realizaron por cuadruplicado, utilizando la metodología mencionada. Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de media por el método de Tukey (p<0,05) usando el software estadístico Minitab® (MiniTab Inc. State College, PA, EEUU).

Resultados

A partir de 200 g de ramas (material seco y triturado) macerado con hexano, se obtuvo 1,8249 g de extracto, por lo que el rendimiento alcanzado fue de 0,9%. La Tabla 1, muestra la actividad antibacteriana mediante el efecto inhibitorio obtenido con los extractos hexánicos de las ramas de *H. cuatrecazanum* Occhioni., frente a todas las bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*). Resultando ser *P. aeruginosa* la bacteria más susceptible a la acción del extracto; no solo por el mayor tamaño del halo de inhibición, sino también por el valor de la CMI (31 250 µg/mL), correspondiente a la concentración más baja estudiada del extracto. Mientras que, *E. coli* y *K. pneumoniae* mostraron iguales niveles de inhibición; así como, CMIs de 62 500 µg/mL para *K. pneumoniae* y de 125 000 µg/mL para *E. coli*., lo que refleja menores niveles de susceptibilidad al extracto en estudio que *P. aeruginosa*. El análisis estadístico permitió establecer que existen diferencias significativas (p<0.05) entre los niveles de susceptibilidad alcanzados en *P. aeruginosa* en relación a los resultados obtenidos para con *E. coli* y *K. pneumoniae*.

Por otra parte, los resultados de la actividad antibacteriana del extracto hexánico de ramas de *H. cuatrecazanum* Occhioni., frente a las bacterias Gram-positivas *S. aureus*

Extracto hexánico de ramas de <i>H. cuatrecazanum</i> Occhioni.									
Concentración (g/mL)							Control Positivo	Control Negativo	CMI
	1,0	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	Fluconazol 25µg	DMSO	(µg/mL)
	Especies de <i>Candida</i> Halos de inhibición (mm) $\bar{X} \pm SD$								
<i>C. albicans</i>	12 ± 0,14	11 ± 0,56	10 ± 0,52	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	16	0	0,25
<i>C. glabrata</i>	10 ± 0,26	11 ± 0,30	10 ± 0,29	9 ± 0,06	0 ± 0	0 ± 0	8	0	0,125
<i>C. tropicalis</i>	12 ± 0,13	12 ± 0,05	10 ± 0,07	9 ± 0,07	0 ± 0	0 ± 0	20	0	0,125
<i>C. parapsilosis</i>	10 ± 0,05	10 ± 0,05	10 ± 0,07	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	37	0	0,25
<i>C. krusei</i>	10 ± 0,07	10 ± 0,07	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	Resistencia intrínseca al Fluconazol	0	0,5

Tabla 1. Actividad antibacteriana del extracto hexánico de ramas de *H. cuatrecazanum* Occhioni., frente a bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. expresada mediante halos de inhibición (mm) y sus respectivos valores CMI.

y *E. faecalis* (Tabla 1), determinaron que el extracto resultó inactivo frente a ambas cepas bacterianas a las concentraciones estudiadas (500 000; 250 000; 125 000; 62 500 y 31 250 µg/mL).

La Tabla 2, muestra los resultados de la actividad antifúngica del extracto hexánico de ramas de *H. cuatrecazanum* Occhioni., a todas las concentraciones estudiadas frente a las distintas cepas de la levadura *Candida*. El extracto hexánico a máxima concentración (1,0 g/mL) mostró, en mayor o menor grado, un efecto inhibitorio del crecimiento en todas las especies de *Candida* estudiadas; determinándose para *C. albicans* y *C. tropicalis* halos de inhibición de 12 mm (cada una), seguidas de *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. krusei* con halos de inhibición de 10mm (cada una). El análisis estadístico mostró que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los niveles de susceptibilidad alcanzados en *C. albicans* y *C. tropicalis*, en relación con los niveles determinados en *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*. Los valores de las CMI obtenidas muestran que *C. glabrata* y *C. tropicalis* presentan mayor susceptibilidad con una CMI de 0,125 g/mL, seguidas de *C. albicans* y *C. parapsilosis* con CMI de 0,250 g/mL y por último *C. krusei* con una CMI de 0,5 g/mL.

Partiendo de 200 g de ramas secas y trituradas de *H. cuatrecazanum* Occhioni., maceradas en etanol como solvente y su posterior evaporación en rotavapor, permitió obtener 2,557 g de extracto y alcanzar un rendimiento de 1,27%. Los resultados obtenidos para las pruebas de actividad antibacteriana a diferentes concentraciones del extracto etanólico de las ramas de *H. cuatrecazanum* Occhioni., frente a las bacterias Gram-negativas *E. coli*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*., se muestran en la Tabla 3. La susceptibilidad variable de las diferentes cepas bacterianas frente a los extractos etanólicos se manifiestan por los

diferentes tamaños de halos de inhibición (mm) obtenidos. El extracto etanólico mostró actividad variable frente a las cepas Gram-negativas; sin embargo, la susceptibilidad al extracto etanólico varió según la cepa bacteriana en estudio; determinándose mayor inhibición sobre *E. coli*, seguida de *P. aeruginosa*; mientras que, frente a *K. pneumoniae* el extracto etanólico no mostró actividad antibacteriana a las concentraciones estudiadas. El análisis estadístico permitió establecer que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los niveles individuales de susceptibilidad obtenidos en *E. coli* y *P. aeruginosa*, frente al extracto etanólico de ramas de *H. cuatrecazanum* Occhioni., de mayor concentración.

Adicionalmente, la Tabla 3, muestra los resultados los ensayos de actividad antibacteriana del extracto etanólico de ramas de *H. cuatrecazanum* Occhioni., mediante los niveles de susceptibilidad obtenidos a las concentraciones estudiadas frente a las bacterias Gram-positivas *S. aureus* y *E. faecalis*. El extracto etanólico de ramas mostró actividad inhibitoria solo frente a la cepa de *S. aureus*, en tres de las concentraciones estudiadas. Los resultados permitieron determinar una CMI de 50000 µg/mL para el extracto etanólico de ramas de *H. cuatrecazanum* Occhioni., frente a *S. aureus*; mientras que frente a *E. faecalis* el extracto etanólico de ramas no mostró actividad antibacteriana a las concentraciones estudiadas.

Los resultados de la actividad antifúngica obtenidos para los extractos etanólicos de hojas y ramas de *H. cuatrecazanum* Occhioni., permitieron establecer que ambos extractos no presentan actividad inhibitoria frente a ninguna de las cepas del complejo *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*., a ninguna de las concentraciones ensayadas en el presente estudio.

Extracto hexánico de ramas de <i>H. cuatrecazanum</i> Occhioni								
	Concentración (µg/mL)					Control Positivo	Control Negativo	CMI
	500 000	250 000	125 000	62 500	31 250	Amikacina (30 µg)	DMSO	(µg/mL)
Bacterias Gram-negativas								
Halos de inhibición (mm) $\bar{X} \pm SD$								
<i>E. coli</i> ATCC 25922	11±0,09	9±0,09	8± 0,05	0	0	30	0	125 000
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	15±0,13	12±0,11	11±0,04	10±0,14	9±0,05	37	0	31 250
<i>K. pneumonie</i> ATCC 700603	11±0,14	10±0,06	9±0,07	8± 0,03	0	28	0	62 500
Bacterias Gram-positivas								
Halos de inhibición (mm) $\bar{X} \pm SD$								
						Ciprofloxacina 5µg	DMSO	(µg/mL)
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	0	0	0	0	0	35	0	-
<i>E.faecalis</i> ATCC 29212	0	0	0	0	0	37	0	-

Tabla 2. Muestra los resultados de la actividad antifúngica del extracto hexánico de ramas de *H. cuatrecazanum* Occhioni., a todas las concentraciones estudiadas frente a las distintas cepas de la levadura *Candida*.

Discusión

Si bien es cierto que diversas especies del género *Hedyosmum* forman parte de acervo botánico de la medicina tradicional en Ecuador hasta hace algunos años se desconocía la composición química de las mismas; así como sus potenciales aplicaciones diferentes a las tradicionalmente atribuidas.

Actividad antibacteriana

Los resultados obtenidos con los extractos hexánicos de ramas de *H. cuatrecazanum* Occhioni., frente a las bacterias Gram-negativas de referencia *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y los extractos etanólicos frente a *E. coli* y *P. aeruginosa*., muestran que los extractos presentan actividad antibacteriana variable frente a estas cepas y dependen del solvente usado para obtener el extracto; así como de las concentraciones del extracto y la cepa bacteriana estudiada. No obstante, los resultados obtenidos frente a las cepas Gram-positivas de referencia *S. aureus* y *E. faecalis* muestran que el extracto hexánico de ramas de *H. cuatrecazanum* Occhioni., no resultó activo frente a las cepas bacterianas Gram-positivas estudiadas. Estos resultados difieren de los reportados para el aceite esencial de *Hedyosmum brasiliense* Miq¹⁶; donde se describió una apreciable actividad antibacteriana frente a las bacterias Gram-positivas *S. aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC 35552), y *Bacillus subtilis* (ATCC 23858); mientras que no mostró actividad frente a la bacteria Gram-negativas *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853).

La actividad antibacteriana determinada en aceites esenciales y extractos vegetales depende esencialmente de los compuestos constitutivos de cada familia, género, especie e incluso de cada variedad de la especie; así como también de las condiciones climáticas, altura, intensidad de luz y estación del lugar de origen¹⁷. Estudios recientes sobre la composición química de algunas especies del género *Hedyosmum* de Ecuador tales como: *Hedyosmum sprucei* Solms¹⁸, *Hedyosmum luteynii* Todzia¹³; y otros países de Sudamérica *Hedyosmum translucidum* Cuatrec¹⁹, *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq²⁰, permiten realizar comparaciones entre los diferentes compuestos mayoritarios encontrados en cada caso; determinándose, la presencia de compuestos comunes entre las diferentes especies analizadas independientemente de su localización geográfica de origen. En gran proporción los compuestos mayoritarios determinados se componen por monoterpenos hidrocarburos y en menor proporción sesquiterpenos hidrocarburos como: germacreno D, determinado en *Hedyosmum brasiliense* Miq¹⁶, *Hedyosmum sprucei* Solms¹⁸, *Hedyosmum translucidum* Cuatrec¹⁹, componente que se ha descrito por su actividad antibacteriana, además del papel que juega como precursor de algunos sesquiterpenos como cadinenos y selinenos²¹; descritos en diferentes familias botánicas por su amplia actividad antibacterial²². Asimismo, otros compuestos mayoritarios como: curzereño, α-pineno, β-pineno, β-cariofileno, biciclogermacreno, α-eudesmol y 1.8- cineol (+) presentes en diferentes especies de *Hedyosmum*, también se han descrito, como parte de compuestos presentes en aceites esenciales y extractos obtenidos de diversas especies de familias con amplia actividad biológica, fundamentalmente antimicrobiana como:

Extracto etanólico de ramas de <i>H. cuatrecazanum</i> Occhioni								
	Concentración (µg/mL)					Control Positivo	Control Negativo	CMI
	200.000	100.000	50.000	25.000	12.500	Amikacina (30 µg)	DMSO	(µg/mL)
Bacterias Gram-negativas								
Halos de inhibición (mm) $\bar{X} \pm SD$								
<i>E. coli</i> ATCC 25922	18± 0,11	15± 0,04	12± 0,07	10± 0,07	8± 0,06	30	0	12 500
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	14± 0,15	12± 0,09	10± 0,05	8± 0,07	0	37	0	25 000
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	0	0	0	0	0	28	0	-
Bacterias Gram-positivas								
Halos de inhibición (mm) $\bar{X} \pm SD$								
						Ciprofloxacina 5µg	DMSO	(µg/mL)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	16± 0,07	12± 0,09	8± 0,04	0	0	28	0	50 000
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0	0	0	0	0	37	0	-

Tabla 3. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de ramas de *H. cuatrecazanum* Occhioni., frente a bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, expresada mediante halos de inhibición (mm) y sus respectivos valores de CMI.

Asteraceae^{23,24}, *Piperaceae*²⁵; y antifúngica *Piperaceae*²⁶. Los resultados obtenidos con los extractos hexánicos de ramas de *H. cuatrecazanum* Occhioni., mostraron actividad inhibitoria frente a las Gram-negativas *E. coli*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*; mientras que el extracto etanólico de ramas solo presentó actividad frente a *E. coli*, *P. aeruginosa*, pero también sobre la bacteria gran positiva *S. aureus*. Por tanto, lo más probable que la actividad antibacteriana observada con los extractos hexánicos de ramas de *H. cuatrecazanum* Occhioni., provengan de algunos de los componentes comunes descritos en las especies del género *Hedyosmum* (Chloranthaceae).

Actividad Antifúngica

Los resultados de los ensayos de actividad antifúngica de extractos hexánicos de ramas de *H. cuatrecazanum* Occhioni., frente a cinco especies del género *Candida*; permitieron determinar inhibición del crecimiento en todas las cepas de *Candida* estudiadas, demostrando su actividad antifúngica. Las cepas *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. albicans* mostraron en este orden los mayores niveles de susceptibilidad frente a las diferentes concentraciones ensayadas con ambos extractos hexánicos, seguidas por *C. parapsilosis* y *C. krusei*.; mientras que, los extractos etanólicos no mostraron actividad inhibitoria frente a ninguna especie de *Candida* estudiada. Resultados interesantes, si tenemos en cuenta que en la mayor parte de América Latina las especies de *Candida* que producen candidemia se distribuyen de la siguiente manera: *C. albicans* 50%, *C. tropicalis* 20% y *C. parapsilosis* 16%²⁷. Igualmente interesante, resulta la susceptibilidad observada con *C. glabrata*, ya que mostró

un de halo de inhibición de 8 mm frente a Fluconazol y de 14 ± 0,22 mm frente al extracto hexánico de hojas de *H. cuatrecazanum* Occhioni; tomando en consideración que *C. glabrata* es una especie difícil de tratar clínicamente, por sus características genéticas en relación a los antifúngicos azólicos y especialmente a fluconazol, además de presentar resistencia secundaria cuando es expuesta en forma continua a este mismo fármaco⁵. Otro resultado que presenta especial interés fue la susceptibilidad determinada en *C. krusei* frente a los extractos hexánicos de *H. cuatrecazanum* Occhioni., si consideramos su resistencia intrínseca a fluconazol²⁸; además del cambio constante y continuo del panorama epidemiológico en la susceptibilidad de las levaduras del género *Candida* a los antifúngicos, relacionada con el tipo de huésped, la etiología de la enfermedad, el microorganismo involucrado y sus mecanismos de resistencia²⁹. Resultados de actividad antifúngica similares a los obtenidos con los extractos hexánicos las partes aéreas de *H. cuatrecazanum* Occhioni., han sido reportados para el aceite esencial de *Hedyosmum* sp., frente a cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*; pero no frente a *C. glabrata*²⁴. Por tanto, se puede inferir que en los extractos hexánicos contienen compuestos con actividad antifúngica frente a *C. glabrata* ausentes en el aceite esencial de *Hedyosmum* sp. Estudios realizados a diferentes especies de *Hedyosmum* han reportado la presencia de actividad antifúngica. El aceite esencial de *H. brasiliense* Miq., presentó propiedades antifúngicas contra un panel de hongos patógenos oportunistas humanos, y los resultados mostraron actividad significativa contra los dermatofitos fúngicos (*Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton*

mentagrophytes y *Trichophyton rubrum*), y también, frente a cepas de *C. albicans* y *C. parapsilosis* de interés clínico. Entre los constituyentes determinados en el aceite esencial de *H. brasiliense* Miq., se encontraron α -terpineol, curzereno, pinocarvona y β -thujene como componentes principales¹⁶; así mismo, estos y otros compuestos están presentes en diversas concentraciones en *Hedyosmum* colombiano Cuatrec³⁰; y también, en otras familias vegetales ampliamente estudiadas por su importancia económica y usos medicinales entre ellas la familia Piperaceae²⁶. Resultados de la evaluación de aceites esenciales y extractos de plantas del género *Piper*, de Colombia, señalan que el aceite *Piper hispidum* Sw., mostró actividad contra el hongo multiresistente *Fusarium oxysporum*; mientras que, otras seis especies mostraron fuerte actividad contra dermatofitos, siendo *Piper bogotense* el más activo, seguido de *Piper hispidum*. Así mismo, este estudio determinó como principales componentes: trans- β -cariofileno, óxido de cariofileno, β -pineno y α -pineno, con diferentes concentraciones en la mayoría de las muestras antifúngicas más activas³¹, compuestos también presentes en especies del género *Hedyosmum*.

Los resultados de susceptibilidad obtenidos con los extractos hexánicos de *H. cuatrecazanum* Occhioni., permiten inferir la presencia de compuestos descritos previamente en aceites esenciales y extractos de diversas especies de este y otros géneros de familias botánicas; referenciados ampliamente por sus vinculaciones directas con una variada actividad biológica y en este caso, con actividad antibacteriana y antifúngica. Sin embargo, la actividad de estos compuestos no parece depender exclusivamente de su valor porcentual en la muestra analizada, sino, también, de posibles interacciones sinérgicas entre sus componentes.

Conclusiones

Los resultados de este estudio permiten concluir que los extractos hexánicos de ramas de *H. cuatrecazanum* Occhioni., mostraron actividad antibacteriana frente a todas las cepas Gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*); mientras que, los extractos etanólicos mostraron ser activos solo frente a *E. coli*, *P. aeruginosa*. Sin embargo, los extractos etanólicos de ramas mostraron actividad inhibitoria solo frente a la cepa Gram-positiva *S. aureus*. Por otra parte, los extractos hexánicos mostraron actividad antifúngica frente a las cinco especies de *Candida* estudiadas (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*); mientras que, ninguno de los extractos etanólicos presentó actividad antifúngica bajo las condiciones experimentales ensayadas. Por tanto, los extractos hexánicos y etanólicos de ramas de *H. cuatrecazanum* Occhioni., mostraron un potencial antimicrobiano variable frente a cepas de importancia clínica.

Contribuciones de los autores

Conceptualización, MELU y FJUF.; metodología, MELU.; validación, MELU y FJUF.; análisis formal, MELU ; FJUF y VPCM.; investigación, MELU ; FJUF ; curación de datos, JP y FJUF.; redacción - preparación del borrador original, MELU.; escritura—revisión y edición, MELU; FJUF y JP X; visualización, VPCM.; supervisión, MELU.; administración de proyectos, MELU y FJUF.; adquisición de fondos, MELU. Todos los autores han leído y aceptado la versión a ser publicada del manuscrito.

Agradecimientos

Nuestro agradecimiento a la Universidad Nacional de Chimborazo (UNACH), ya que esta investigación ha sido realizada mediante el proyecto de investigación aprobado por la Dirección de Investigación del Vicerrectorado de Investigación bajo la Resolución N^o 143-CIV-07-08-2020 y por el uso de sus instalaciones de laboratorios. Un agradecimiento especial a la Ing. Eliana de la Torre y a los estudiantes tesistas de la carrera de Laboratorio Clínico por su colaboración durante la fase experimental del proyecto.

Conflictos de Interés

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Referencias bibliográficas

- Graham K, Sinyangwe Ch, Nicholas S, King R, Mukupa S, Källander K, Counihan H, Montague M, Tibenderana J, Hamade P. Rational use of antibiotics by community health workers and caregivers for children with suspected pneumonia in Zambia: across-sectional mixed methods study. BMC Public Health. 2016; 16:897. DOI 10.1186/s12889-016-3541-3548
- Essack SY, Sartorius B. Global antibiotic resistance: of contagion, confounders, and the com-b model. Lancet Planet Health. 2018; 2(9):e376-e377. Disponible en: [https://www.thelancet.com/journals/lanplh/article/PIIS2542-5196\(18\)30187-6/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanplh/article/PIIS2542-5196(18)30187-6/fulltext) DOI: [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(18\)30187-6](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(18)30187-6)
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) Report early implementation 2016-17. Organización Mundial de la Salud. 2018. Disponible en: <http://www.medicosypacientes.com>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Resistencia a los antimicrobianos. Organización Mundial de la Salud. 2020. Disponible en: <https://www.who.int/es>
- Gómez CH. (2010). Resistencia de levaduras del género *Candida* al fluconazol. Infectio. 2010;14 (Supp 2):172- 180. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(10\)70134-X](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(10)70134-X)
- Kullberg BJ, Arendrup MC. Invasive candidiasis. N Engl J Med. 2015; 373 (15):1445-1456 <https://doi.org/10.1056/NEJMra1315399>
- Antinori S, Milazzo L, Sollima S, Galli M, Corbellino M. Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. Eur J Intern Med. 2016; 34: 21- 28 <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2016.06.029>
- McCarty TP, Pappas PG. (2016). Invasive candidiasis. Infect Dis Clin North Am. 2016; 30(1):103-124. DOI: 10.1016/j.idc.2015.10.013
- Todzia C. Flora Neotropica. Chloranthaceae: *Hedyosmum*, Monograph, 48., 123. New York, USA. The New York Botanical Garden Press. 1988. ISBN-10:0893273287
- León S, Valencia N, Pitman NC, Endara L, Ulloa-Ulloa C, Navarrete H. Libro rojo de plantas endémicas del Ecuador. Segunda edición. Quito, Ecuador: Publicaciones del Herbario QCA. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 2011. ISBN: 978-9942-03-393-2
- Gupta MP. Medicinal plants originating in the andean high plateau and central valleys region of Bolivia, Ecuador and Peru, Ed. United Nations Industrial Development Organization (UNIDO). 2006. Disponible en: <https://repositorio.promperu.gob.pe/handle/123456789/1455>
- Radice M, Tasambaya A, Pérez A, Diéguez K, Sacchetti G, Buso P, Buzzi R, Vertuani S, Manfredini S, Baldisserotto A. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of the genus *Hedyosmum* (Chloranthaceae): A review. Journal of Ethnopharmacology. 2019; 244: 111932 Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111932>

13. Torres SH, Tovar MC, García VJ, Lucena ME, Araujo L. Composición química del aceite esencial de las hojas de *Hedyosmum luteyrii* Todzia (Chloranthaceae). *Rev Peru Biol.* 2018; 25(2):173-178. DOI: 10.15381/rpb.v25i2.14289
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 27th edition, CLSI supplement M100. Estados Unidos: CLSI; 2017. ISBN 1-56238-804-5
15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts, 3rd edition, CSLI guideline M44-A2. Estados Unidos: CLSI; 2018. ISSN 0273-3099
16. Kirchner K, Wisniewski A, Cruz AB, Biavatti MW, Netz DJ. Chemical composition and antimicrobial activity of *Hedyosmum brasiliense* Miq., Chloranthaceae, essential oil. *Braz. J. Pharmacog.* 2010; 20: 692– 699 Doi: 10.1590/S0102-695X201000500 0005
17. Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Scheffer JJ. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour Fragr. J.* 2008; 23(4):213–226. DOI: 10.1002/ffj.1875
18. Guerrini A, Sacchetti G, Grandini A, Spagnoletti A, Asanza M, Scalvenzi L. Cytotoxic effect and TLC bioautography-guided approach to detect health properties of amazonian *Hedyosmum sprucei* essential oil. *Evid. Based Complementary Altern. Med.* 2016; 2016:1638342. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27118979/> <https://doi.org/10.1155/2016/1638342>
19. Zamora AM, Arturo DE. Composición química del aceite esencial de hojas *Hedyosmum translucidum* Cuatrec, Chloranthaceae (Granizo). *Bol. latinoam. Caribe plantas med. Aromát.* 2016;15(3):192–198 ISSN 0717 7917. Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-907535>
20. Murakami C, Cordeiro I, Scotti MT, Moreno PR, Young MC. Chemical composition, antifungal and antioxidant activities of *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq. (Chloranthaceae) Essential Oils. *Medicines.* 2017; 4(3): 55. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28930269/> Doi: 10.3390/medicines4030055
21. Bülow N, König W.A. The role of germacrene D as a precursor in sesquiterpene biosynthesis: Investigation of acid catalyzed, photochemically and thermally induced rearrangements. *Phytochemistry.* 2000; 55(2): 141-168 [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00266-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00266-1)
22. Ustáriz FJ, Lucena ME, Meza K, Soto V, Rojas-Fermin LB, Cordero de Rojas YE, Torres S., Cáceres VP. Composición y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ageratina neriiifolia* (Asteraceae) de Mérida-Venezuela. *Rev. Cuba. de Farm.* 2021; 54(1):e548 Disponible en: <http://www.revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/548/438> ISSN 1561-2988
23. Bua A, Usai D, Donadu M, Delgado J, Paparella A, Chaves-Lopez C, Serio A, Rossi C, Zanetti S, Mollicotti P. (2018). Antimicrobial activity of *Austroepatorium inulaefolium* (H.B.K.) against intracellular and extracellular organisms. *Nat Prod Res.* 2018; 2(23): 2869-2871 DOI: 10.1080/14786419.2017.1385014
24. Lucena ME, Escalante M, González V, Rojas-Fermin L, Cordero de Rojas Y, Ustáriz FJ, Carmona J, Torres S. Composición y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Austroepatorium inulifolium* (Kunth) King & Robinson (Asteraceae). *Rev. Cuba. de Farm.* 2019; 52(4):1-16. Disponible en: <http://www.revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/369/272> ISSN 1561-2988
25. Ustáriz FJ, Lucena ME, Urbina FG, Villamizar DM, Rojas-Fermin LB, Cordero de Rojas YE, Ustáriz JE, González LC, Araujo LM. (2020). Composition and antibacterial activity of the *Piper eriopodon* (miq) c.dc. essential oil from the Venezuelan andes. *Pharmacologyonline.* 2020; 2:13-22 Disponible en: https://pharmacologyonline.silae.it/files/archives/2020/vol2/PhOL_2020_2_A002_Ustariz.pdf ISSN: 1827-8620
26. Araujo L, Rondón M, Cruz R, Guayanlema J, Vargas C, Morcho S, Cornejo X. (2019). Antimicrobial activity of the essential oil of *Piper amalago* L. (Piperaceae) collected in coastal Ecuador. *Pharmacologyonline.* 2019; 3: 15-27. Disponible en: https://pharmacologyonline.silae.it/files/archives/2019/vol3/PhOL_2019_3_A002_AraujoBaptista.pdf ISSN: 1827-8620
27. Nucci M, Queiroz F, Tito Alvarado, T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, Guzman M, Santolaya ME, Thompson L, Sifuentes J, Echevarria JI, Colombo AL. Epidemiology of candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. *PLoS ONE.* 2013; 8(3): e59373. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23527176/> <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059373>
28. Silva V, Díaz MC, Febré N. Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. *Rev Chil Infect.* 2002; 19 (S2): 149-156. Doi: 10.4067/S0716-10182002019200016
29. Quiñones D. Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque «Una salud». *Rev Cubana Med Trop.* 2017; 69(3):1-17. ISSN 1561-3054
30. Delgado PA, Quijano CE, Morales G, Pino J. Composition of the essential oil from leaves and fruits of *Hedyosmum colombianum* Cuatrec, grown in Colombia. *J. Essent. Oil Res.* 2010; 22: 234–236. <https://doi.org/10.1080/10412905.2010.9700312>
31. Tangarife V, Correa J, Roa VC, Pino N, Betancur LA, Durán DC, Stashenko EE, Mesa AC. (2014). Anti-dermatophyte, anti-Fusarium and cytotoxic activity of essential oils and plant extracts of *Piper* genus. *Journal of Essential Oil Research.* 2014; 26: 221-227. <https://doi.org/10.1080/10412905.2014.882279>