

## **Actividad antimicrobiana de extractos de *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni. (Chloranthaceae) de los Andes ecuatorianos**

Antimicrobial activity of extracts of *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni. (Chloranthaceae) from the ecuadorian Andes

María Eugenia Lucena-de Ustáriz<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0001-9120-345X>

Francisco Javier Ustáriz-Fajardo<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-6423-9067>

Rosa Elisa Cruz-Tenempaguay<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-3347-3651>

Verónica Paulina. Cáceres-Manzano<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-9560-9625>

Marco Vinicio Rodríguez Llerena<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0003-2492-2969>

Pablo Djabayan- Djibeyan<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-3342-5980>

Adriana Carolina Rincón Alarcón<sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0002-6019-333X>

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Chimborazo (UNACH), Facultad de Ciencias de la Salud. Riobamba, Ecuador.

<sup>2</sup>Universidad Nacional de Chimborazo (UNACH), Dirección de Investigación. Riobamba, Ecuador.

<sup>3</sup>Universidad Técnica de Manabí. Facultad de Ciencias de la Salud. Carrera de Bioquímica y Farmacia. Portoviejo, Ecuador.

\*Autor para la correspondencia: [mlucena@unach.edu.ec](mailto:mlucena@unach.edu.ec);

[maru\\_lu@yahoo.com](mailto:maru_lu@yahoo.com)

### **RESUMEN**

**Introducción:** El género *Hedyosmum* forma parte de la familia Chloranthaceae y consta de 45 especies, de las cuales 44 se distribuyen en el neotrópico de montaña y una en el sudeste asiático. En Ecuador el género *Hedyosmum* presenta 16 especies endémicas del bosque nublado andino alto y subpáramos del sur del país.

**Objetivo:** Determinar la actividad antimicrobiana de extractos hexánicos y etanólicos de hojas de *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni., (Tarqui), sobre bacterias gramnegativas y grampositivas y levaduras de interés clínico para contribuir en la búsqueda de sustancias alternativas de origen natural en el desarrollo de nuevas opciones de tratamiento de enfermedades infecciosas microbianas.

**Métodos:** Las hojas de *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni. fueron recolectadas manualmente entre abril-agosto de 2019, en el bosque natural de Jacarón, provincia Chimborazo, Ecuador. Las hojas frescas se secaron a 38 °C por tres días y luego se trituraron mediante molienda. El material vegetal (200 g) se colocó en matraces de Erlenmeyer (1000 mL), con 500 mL de hexano o etanol y macerado 72 h a temperatura ambiente (19 °C ± 2). Seguidamente, cada extracto inicial fue filtrado y sometido a evaporación rotatoria a 55 °C. Los extractos hexánicos y etanólicos se conservaron en refrigeración (4 °C) y oscuridad hasta su uso en ensayos biológicos. Las actividades antibacteriana y antifúngica se estudiaron por el método de difusión en agar y concentración mínima inhibitoria, partiendo de extractos diluidos con dimetil sulfóxido.

**Resultados:** Los extractos hexánicos y etanólicos resultaron activos sobre la mayoría de las bacterias gramnegativas, pero solo sobre la bacteria grampositiva *Staphylococcus aureus*. Todas las cepas de *Candida* estudiadas presentaron susceptibilidad variable frente a los extractos hexánicos, pero no frente a los extractos etanólicos.

**Conclusiones:** Los extractos hexánicos y etanólicos de *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni. presentaron un efecto antimicrobiano variable sobre las cepas de importancia clínica estudiadas.

**Palabras clave:** *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni.; antimicrobianos; concentración mínima inhibitoria.

## ABSTRACT

**Introduction:** The genus *Hedyosmum* is part of the family Chloranthaceae and consists of 45 species, of which 44 are distributed in the montane neotropics and one

in Southeast Asia. In Ecuador, the genus *Hedyosmum* has 16 species endemics to the high Andean cloud forest and subparamos of the south of the country.

**Objective:** To determine the antimicrobial activity of hexanoic and ethanolic extracts of *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni (Tarqui) leaves on gram-negative and gram-positive bacteria and yeasts of clinical interest in order to contribute to the search for alternative substances of natural origin in the development of new treatment options for microbial infectious diseases.

**Methods:** The leaves of *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni. were collected manually between April-August 2019, in the natural forest of Jacarón, Chimborazo province, Ecuador. Fresh leaves were dried at 38 °C for three days and then crushed by grinding. The plant material (200 g) was placed in Erlenmeyer flasks (1000 mL), with 500 mL of hexane or ethanol and macerated for 72 h at room temperature (19 °C + 2). Then, each initial extract was filtered and subjected to rotary evaporation at 55 °C. Hexanolic and ethanolic extracts were kept refrigerated (4 °C) and dark until use in biological assays. The antibacterial and antifungal activities were studied by the agar diffusion method and minimum inhibitory concentration, starting from extracts diluted with dimethyl sulfoxide.

**Results:** Hexanic and ethanolic extracts were active on most gram-negative bacteria, but only on the gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus*. All *Candida* strains studied showed variable susceptibility to hexanic extracts, but not to ethanolic extracts.

**Conclusions:** The hexanic and ethanolic extracts of *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni. showed a variable antimicrobial effect on the strains of clinical importance studied.

**Keywords:** *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni; antimicrobial; minimum inhibitory concentration.

Recibido: 25/04/2023

Aprobado: 22/05/2024

## Introducción

El advenimiento de la resistencia a múltiples fármacos entre las bacterias patógenas ha puesto en peligro el valor de los antibióticos y transformado las ciencias médicas. Se necesitan esfuerzos integrales para minimizar el ritmo de su resistencia mediante el estudio de microorganismos emergentes, mecanismos de resistencia y agentes antimicrobianos.<sup>(1)</sup>

En la práctica clínica humana está demostrado el uso exagerado de antibióticos y de su prescripción inadecuada, al ser estos administrados sin necesidad o en dosis y tiempo inapropiados.<sup>(2)</sup>

Estudios<sup>(2)</sup> realizados en instituciones hospitalarias han demostrado cómo la indicación de tratamientos antibióticos puede ser incorrecta entre 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 subóptimos.

Informes del sistema mundial de vigilancia antimicrobiana (GLASS)<sup>(3)</sup> revelan la presencia de multiresistencia a los antibióticos en 22 países y presume que esto estaría afectando a unas 500 000 personas. Entre las bacterias notificadas con mayor frecuencia se encuentran *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Salmonella sp.*<sup>(3)</sup>

En el año 2019, la Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>(4)</sup> identificó 32 antibióticos en fase de desarrollo clínico contra su lista de patógenos prioritarios, de los cuales solo seis fueron clasificados como innovadores. La escasez de antibióticos afecta a países de todos los niveles de desarrollo y en especial a sus sistemas de atención de salud.

La prevalencia de las infecciones fúngicas farmacorresistentes va en aumento y empeora la situación terapéutica actual, que ya es difícil, debido a problemas en su tratamiento, como su toxicidad, especialmente en pacientes con otras infecciones subyacentes, como, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).<sup>(4)</sup>

La candidiasis invasiva y la candidemia son importantes infecciones fúngicas asociadas a la atención de la salud, al ser una de las principales causas de morbilidad y mortalidad. Su incidencia está aumentando debido a la creciente complejidad de los pacientes, en los que cinco especies de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C.*

*parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei*) representan más del 90 % de todos los casos diagnosticados y en los cuales su prevalencia varía considerablemente según la población involucrada, región geográfica, exposición antifúngica previa y edad del paciente.<sup>(5,6)</sup>

El espectro de la enfermedad de la candidiasis invasiva va desde la candidemia mínimamente sintomática hasta la sepsis fulminante con una mortalidad asociada superior al 70 %. La candidiasis invasiva es la enfermedad fúngica humana más común entre los pacientes hospitalizados, y la *Candida albicans* el patógeno predominante.

Teniendo en cuenta la gran cantidad de casos infectados y las terapias alternativas limitadas, la resistencia a los azoles de *Candida albicans* representa una gran amenaza clínica.<sup>(7)</sup> Aun, cuando los medicamentos de primera línea, incluidas las equinocandinas y los azoles, son efectivos en muchos casos, la aparición de resistencia a los antimicóticos, especialmente entre *Candida glabrata*, es motivo de preocupación y subraya la necesidad de administrar los medicamentos antimicóticos de manera juiciosa, evitando su uso excesivo cuando sea posible.<sup>(5)</sup>

Las infecciones fúngicas sistémicas plantean un grave problema clínico. Las opciones de tratamiento son limitadas y la resistencia a los medicamentos antimicóticos está aumentando.

Además, una proporción sustancial de pacientes no responde a la terapia a pesar de estar infectados con hongos que son sensibles al fármaco. La discordancia entre el resultado general del tratamiento y los bajos niveles de resistencia clínica puede atribuirse a la tolerancia a los fármacos antimicóticos.<sup>(8)</sup>

La resistencia a los antimicrobianos requiere de esfuerzos de investigación y desarrollo de nuevos fármacos y las especies botánicas con propiedades terapéuticas comprobadas empírica o científicamente constituyen una alternativa. Muchos de sus metabolitos secundarios han demostrado ser útiles para la solución de problemas en el campo de la salud; además de que su diversidad las hace fuentes viables en la búsqueda de nuevos principios activos para el desarrollo de nuevos fármacos incluyendo antibióticos.

Como parte de la biodiversidad mundial de plantas se encuentra la familia Chloranthaceae constituida por hierbas, arbustos y árboles; nativa de los trópicos y del sur de las regiones templadas.

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 (*Hedyosmum orientale* Merr. & Chun) en el sudeste asiático.<sup>(9)</sup>

En el Ecuador el género *Hedyosmum* presenta 16 especies endémicas del bosque nublado andino alto y subpáramos entre 600 y 3000 metros sobre el nivel del mar (m s.n.m.) 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 especies.<sup>(10)</sup>

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 y farmacológicas que han sido científicamente confirmadas, en el tratamiento y alivio de infecciones respiratorias agudas y enfermedades diarreicas, que son las enfermedades con mayor tasa de morbilidad<sup>(11)</sup> así como en el tratamiento de enfermedades renales.<sup>(12)</sup>

No obstante, existen muy pocas referencias publicadas sobre actividad antimicrobiana del género *Hedyosmum* y ninguna específicamente de *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni., de los Andes ecuatorianos.

Con base en este contexto se estableció como objetivo para este estudio, determinar la actividad antimicrobiana de extractos hexánicos y etanólicos de las hojas de *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni., (Tarqui), sobre bacterias gramnegativas, grampositivas y levaduras de interés clínico para contribuir en la búsqueda de sustancias alternativas de origen natural para el desarrollo de nuevas opciones de tratamiento de enfermedades infecciosas microbianas.

## Métodos

### Obtención de las muestras

La recolección del material vegetal (hojas) contó con la autorización del Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica de Ecuador, bajo el código MAAE-ARSFC-2021-1378.

Las hojas de *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni. fueron recolectadas de forma manual entre abril y agosto del año 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). El bosque cubre una superficie de 106 Ha, rango altitudinal de 3200-3480 m, temperaturas que oscilan entre 9–12 °C y precipitación anual de 1200 mm. Los suelos están formados por cenizas volcánicas, con altos contenidos de materia orgánica, pH entre 5,5-6,5; clasificados como dystrandeps en el orden de inceptisoles, correspondiendo a suelos jóvenes de poco desarrollo que presentan gran acumulación de materia orgánica y saturación de bases menor que 50 %.<sup>(11)</sup>

Una muestra del espécimen fue depositada en el herbario Politécnica Chimborazo (CHEP), (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.

El material vegetal se trasladó y conservó en sacos de polietileno y fue almacenado en el depósito del laboratorio hasta su procesamiento.

### **Preparación de las muestras**

Las hojas se secaron en estufa a 38 °C durante tres días. Posteriormente, las hojas libres de humedad se trituraron con un molino eléctrico.

### **Obtención de los extractos**

Se pesó 200 g del material vegetal (hojas) y se colocó en matraces de Erlenmeyer de 1000 mL (secos y estériles), los que fueron aforados con 500 mL de hexano o etanol según el caso. Las mezclas se maceraron por 72 h 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 repitió tres veces de forma sucesiva cada 72 h, 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 en 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 (ATCC). gram-negativas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 y gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

### **Cepas fúngicas**

Las cepas fúngicas 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 hojas de *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni. se evaluaron de acuerdo con el método de difusión en agar con discos de papel<sup>(13)</sup> utilizando las cepas de referencia.

A 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 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 100 000; 50 000; 25 000 y 12 500 µg/mL.

Los discos de papel de 6 milímetros 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  $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por mililitros (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  $\mu$ g) para las bacterias gramnegativas;
- ciprofloxacina® (50  $\mu$ g) para las bacterias grampositivas;
- como control negativo se utilizó DMSO.

Las placas fueron preincubadas en refrigeración a 4 °C durante 2 h y luego se incubaron a 37 °C durante 24 h. 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 *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni. se evaluaron de acuerdo al método de difusión en agar con discos,<sup>(14)</sup> se utilizaron cinco cepas del género *Candida*.

A 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) y 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 0,25 mL de azul de metileno) que fue esterilizado por 10 min. El agar fundido a 45 °C fue asépticamente mezclado con 1 mL de la suspensión fúngica con turbidez equivalente a 1 del patrón McFarland y correspondiente a  $3 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL), en placas Petri de 90 mm x 15 mm.

Los discos de papel de seis milímetros impregnados (10  $\mu$ L) con las diferentes diluciones de cada extracto (hexánicos y etanólicos) se colocaron individualmente sobre el 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  $\mu$ g® y como control negativo discos impregnados con DMSO.

Las placas fueron preincubadas en refrigeración a 4 °C durante 30 min y luego se incubaron a 37 °C durante 24 h. 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

A los datos obtenidos de las actividades antibacterianas y antifúngicas se les aplicó 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 hojas secas y trituradas de *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni., maceradas en hexano como solvente y su posterior evaporación en un rotavapor, se obtuvo 1,502 g de extracto, lo que representa un rendimiento de 1,5 %.

Los resultados para las pruebas de actividad antibacteriana a las diferentes concentraciones del extracto hexánico de las hojas de *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni., sobre las bacterias gramnegativas (tabla 1), reflejaron niveles de susceptibilidad determinados por los diferentes tamaños (mm) de los halos de inhibición obtenidos sobre las diferentes cepas bacterianas en estudio.

Los datos reflejaron la actividad inhibitoria del extracto sobre las tres cepas gramnegativas; sin embargo, la susceptibilidad al extracto hexánico varió dependiendo de cada cepa bacteriana. La mayor inhibición se determinó sobre

*Pseudomona aeruginosa*, seguida de *Escherichia coli* y finalmente sobre *Klebsiella pneumoniae*.

Así mismo, el análisis estadístico permitió establecer que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los niveles individuales de susceptibilidad obtenidos para las tres cepas gramnegativas estudiadas, frente al extracto hexánico de hojas de *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni. de mayor concentración.

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) del extracto hexánico se obtuvieron realizando ensayos a diferentes concentraciones del extracto (500 000; 250 000; 125 000; 62 500 y 31 250  $\mu\text{g/mL}$ ) frente a cada una de las bacterias gramnegativas.

Los resultados mostraron que la menor CMI del extracto hexánico (31 250  $\mu\text{g/mL}$ ) se alcanzó sobre la cepa de *Escherichia coli*, seguidas de las CMI 62 500 y 250 000  $\mu\text{g/mL}$ , determinadas sobre *Pseudomona aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, respectivamente.

Por otra parte, los resultados de las pruebas de susceptibilidad en los ensayos de actividad antibacteriana del extracto hexánico de hojas de *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni. sobre las cepas bacterianas grampositivas (tabla 1); reflejan la presencia de halos de inhibición solo sobre *Staphylococcus aureus*, el cual mostró susceptibilidad a concentraciones de 500 000 y 250 000  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

Estos resultados permitieron a su vez establecer la CMI (250 000  $\mu\text{g/mL}$ ) del extracto hexánico sobre *Staphylococcus aureus*. Mientras que, el extracto hexánico no mostró actividad antibacteriana sobre *Enterococcus faecalis* a las concentraciones estudiadas.

**Tabla 1** - Actividad antibacteriana del extracto hexánico de hojas de *Hedyosmum cuatrecasum* Occhioni. frente a bacterias gramnegativas y grampositiva, expresada mediante halos de inhibición (mm) y sus respectivos valores de CMI

Bacterias	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 gramnegativas. Halos de inhibición (mm) X ± SD								
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	12 ± 0,11	10 ± 0,04	8 ± 0,07	7 ± 0,07	6 ± 0,06	30	0	31 250
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853	16 ± 0,15	10 ± 0,09	9 ± 0,05	8 ± 0,07	0	37	0	62 500
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	10 ± 0,08	8 ± 0,06	0	0	0	28	0	250 000
Bacterias grampositivas. Halos de inhibición (mm) X ± SD								
-	-	-	-	-	-	Ciprofloxacina (5 µg)	DMSO	(µg/mL)
<i>Staphylococcus. aureus</i> ATCC 25923	10 ± 0,07	7 ± 0,09	0	0	0	35	0	250 000
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0	0	0	0	0	37	0	-

En la tabla 2 se muestra los resultados de la actividad antifúngica del extracto hexánico de hojas de *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni. en las concentraciones estudiadas sobre las diferentes especies de *Candida*.

El extracto a la máxima concentración estudiada (1 g/mL) produjo halos de inhibición de 15 mm sobre *Candida tropicalis*, de 14 mm sobre *Candida albicans* y *Candida glabrata*, y de 12 mm sobre *Candida parapsilosis* y por último de 11 mm sobre *Candida krusei*. Por tanto, el nivel de susceptibilidad frente al extracto varió en cada una de las especies de *Candida* estudiadas.

El análisis estadístico permitió establecer que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los niveles de susceptibilidad individuales alcanzados en cuatro de las cinco cepas de *Candida*, frente al extracto hexánico de *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni. de mayor concentración.

Los valores obtenidos de las CMI del extracto hexánico de hojas de *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni. mostraron que *Candida glabrata* y *Candida tropicalis* fueron las más susceptibles con CMI de 0,031 g/mL para ambas especies, seguidas por *Candida albicans* CMI de 0,062 g/mL, *Candida krusei* CMI de 0,125 g/mL y por último *Candida parapsilosis* CMI de 0,25 g/mL.

**Tabla 2** - Actividad antifúngica del extracto hexánico de hojas de *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni. frente a especies de *Candida*, expresada mediante halos de inhibición (mm) y sus respectivos valores de CMI

Bacterias	Concentración (g/mL)		Control positivo			Control negativo			CMI	
	1,0	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,0155	Fluconazol 25 µg	DMSO	(g/mL)
Especies de <i>Candida</i> . Halos de inhibición (mm) X ± SD.										
<i>Candida albicans</i>	14 ± 0,18	12 ± 0,08	13 ± 0,16	11 ± 0,14	10 ± 0,10	0 ± 0	0	16	0	0,062
<i>Candida glabrata</i>	14 ± 0,22	13 ± 0,24	12 ± 0,23	11 ± 0,21	10 ± 0,17	9 ± 0,15	0	8	0	0,031
<i>Candida tropicalis</i>	15 ± 0,13	14 ± 0,13	13 ± 0,15	12 ± 0,14	11 ± 0,06	9 ± 0,10	0	20	0	0,031
<i>Candida parapsilosis</i>	12 ± 0,18	12 ± 0,17	10 ± 0,06	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0	37	0	0,250
<i>Candida krusei</i>	11 ± 0,10	10 ± 0	10 ± 0,05	10 ± 0,07	0 ± 0	0 ± 0	0	Resistencia intrínseca al fluconazol	0	0,125

Los resultados alcanzados a partir de 200 g de hojas secas y trituradas de *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni. maceradas en etanol como solvente y su posterior evaporación en rotavapor, permitió obtener 3,144 g de extracto y un rendimiento de 1,57 %.

Los datos obtenidos de los estudios de actividad antibacteriana del extracto etanólico a diferentes concentraciones sobre las bacterias gramnegativas: *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* se muestran en la tabla 3 en la que, además, se reflejan los niveles de susceptibilidad de las bacterias a través de los diferentes tamaños (mm) de los halos de inhibición obtenidos para cada cepa.

El extracto etanólico mostró actividad variable frente a dos de las tres cepas gramnegativas; sin embargo, la susceptibilidad al extracto etanólico varió según la cepa bacteriana en estudio. La mayor inhibición fue determinada sobre *Pseudomona aeruginosa*, seguida de *Escherichia coli*; mientras que, *Klebsiella pneumoniae* no mostró susceptibilidad frente a ninguna de las concentraciones del extracto ensayadas.

El análisis estadístico permitió establecer que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los niveles individuales de susceptibilidad obtenidos sobre *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*, frente al extracto etanólico de hojas de *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni., de mayor concentración.

La tabla 3, muestra los resultados de los ensayos de actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas de *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni., mediante los niveles de susceptibilidad obtenidos a las concentraciones estudiadas frente a las bacterias grampositivas *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*.

**Tabla 3** - Actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas de *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni. frente a bacterias gramnegativas y grampositivas, expresada mediante halos de inhibición (mm) y sus respectivos valores de CMI

Bacterias	Concentración (µg/mL)					Control positivo	Control negativo	CMI (µg/mL)
	200 000	100 000	50 000	25 000	12 500			
Bacterias gramnegativas. Halos de inhibición (mm) X ± SD								
<i>Escherichia. coli</i> ATCC 25922	15 ± 0,09	13 ± 0,06	10 ± 0,05	8 ± 0,05	0	30	0	25 000
<i>Pseudomona. aeruginosa</i> ATCC 27853	18 ± 0,14	16 ± 0,12	13 ± 0,04	10 ± 0,07	8 ± 0,03	37	0	12 500
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	0	0	0	0	0	28	0	-
Bacterias grampositivas. Halos de inhibición (mm) X ± SD								
-	-	-	-	-	-	Ciprofloxacina (5 µg)	DMSO	(µg/mL)
<i>Staphylococcus. aureus</i> ATCC 25923	18 ± 0,07	14 ± 0,09	9 ± 0,03	0	0	28	0	50 000
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0	0	0	0	0	37	0	-



El extracto etanólico mostró actividad inhibitoria solo sobre *Staphylococcus aureus*, en tres de las concentraciones (200 000, 100 000, 50 000) estudiadas. Los resultados permitieron determinar la CMI de 50 000 µg/mL para el extracto etanólico sobre *Staphylococcus aureus*; mientras que, sobre *Enterococcus faecalis* el extracto etanólico no mostró actividad antibacteriana con las concentraciones ensayadas. Los resultados de la actividad antifúngica obtenidos para los extractos etanólicos de hojas de *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni., permitieron establecer que no presentan actividad inhibitoria sobre las cepas de *Candida*: (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*) con las concentraciones ensayadas.

## Discusión

Los resultados con los extractos hexánicos de las hojas de *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni., sobre las bacterias gramnegativas: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y los extractos etanólicos sobre *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, demuestran que ambos extractos presentan actividad inhibitoria variable, según el solvente utilizado para obtener el extracto; así como, de las concentraciones del extracto y la cepa bacteriana estudiada.

Por otra parte, los resultados sobre las cepas grampositivas: *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* muestran que los extractos hexánicos y etanólicos, solo presentan actividad inhibitoria sobre a *Staphylococcus aureus*. Estos resultados difieren parcialmente de los descritos para el aceite esencial de *Hedyosmum brasiliense* Miq., el cual describió una apreciable actividad antibacteriana sobre las bacterias grampositivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC 35552), y *Bacillus subtilis* (ATCC 23858); mientras que, no mostró actividad frente a las bacterias gramnegativas *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).<sup>(15)</sup>

Estas diferencias en las actividades antibacterianas de los aceites esenciales y extractos vegetales dependen 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 origen.<sup>(16)</sup>

Estudios sobre la composición química de algunas especies del género *Hedyosmum* de Ecuador tales como *Hedyosmum sprucei* Solms,<sup>(17)</sup> *Hedyosmum luteynii* Todzia<sup>(13)</sup> y otros de países de Sudamérica como *Hedyosmum translucidum* Cuatrec,<sup>(18)</sup> *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq<sup>(19)</sup> permiten realizar comparaciones entre los diferentes compuestos mayoritarios encontrados en cada caso al determinar la presencia de compuestos comunes entre las diferentes especies independientemente de su localización geográfica de origen.

Los compuestos mayoritarios determinados se componen principalmente por monoterpenos hidrocarburos y en menor proporción sesquiterpenos hidrocarburos como germacreno D, determinado en: *Hedyosmum brasiliense* Miq,<sup>(15)</sup> *Hedyosmum sprucei* Solms,<sup>(17)</sup> *Hedyosmum translucidum* Cuatrec<sup>(18)</sup> componente ampliamente descrito por su actividad antibacteriana, además de su papel como precursor de algunos sesquiterpenos como cadinenos y selinenos,<sup>(20)</sup> presentes en diferentes familias botánicas caracterizadas por su amplia actividad antibacteriana.<sup>(21,22)</sup>

Otros compuestos mayoritarios curzereno,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -cariofileno, biciclogermacreno,  $\alpha$ -eudesmol y 1,8- cineol (+) presentes en diferentes especies de *Hedyosmum*, también han sido descritos como parte de aceites esenciales y extractos obtenidos de diversas especies de familias botánicas con amplia actividad biológica, fundamentalmente antimicrobiana como Asteraceae<sup>(16,23)</sup> y Piperaceae.<sup>(24,25)</sup>

El estudio realizado a partir de aceite esencial de las hojas de *Piper amalago* L. (Piperaceae), permitió identificar como parte de los principales constituyentes biciclogermacreno y  $\alpha$ -pineno,<sup>(25)</sup> compuestos descritos en diferentes especies de *Hedyosmum*.

Si bien es posible que existan componentes comunes con actividad inhibitoria entre las especies de *Hedyosmum* (Chloranthaceae) y *Piper amalago* L. (Piperaceae), estos géneros botánicos difieren parcialmente en su actividad antibacteriana al

solo coincidir específicamente en la actividad inhibitoria sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Estos resultados permiten inferir que los compuestos presentes en aceites esenciales y extractos con actividad biológica y, en específico antimicrobiana no dependen exclusivamente de un compuesto específico, sino, también de las posibles interacciones sinérgicas entre sus componentes.

Los resultados de los ensayos de actividad antifúngica de extractos hexánicos de hojas de *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni., frente a cinco especies del género *Candida* permitieron determinar la inhibición del crecimiento en todas las cepas estudiadas, demostrando así su actividad antifúngica.

Las cepas *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* y *Candida albicans* mostraron en este orden los mayores niveles de susceptibilidad frente a las diferentes concentraciones ensayadas con los extractos hexánicos, seguidas por *Candida parapsilosis* y *Candida krusei*.; mientras que, los extractos etanólicos no mostraron actividad inhibitoria sobre ninguna cepa de *Candida* estudiada.

Estos resultados son importantes, sí se tiene en consideración que en la mayor parte de América Latina las especies de *Candida* que producen candidemia son *Candida albicans* 50 %, *Candida tropicalis* 20 % y *Candida parapsilosis* 16 %.<sup>(26)</sup>

Igualmente interesante resultó la susceptibilidad observada con *Candida glabrata*, ya que mostró un halo de inhibición de 8 mm frente a fluconazol y de  $14 \pm 0,22$  mm frente al extracto hexánico; sobre todo si se considera que *Candida glabrata* es una especie difícil de tratar clínicamente, por sus características genéticas en relación con los antifúngicos azólicos y especialmente a fluconazol; además de presentar resistencia secundaria cuando es expuesta de forma continua a este fármaco.<sup>(27)</sup>

Otro resultado que presenta especial interés fue la susceptibilidad determinada en *Candida krusei* frente a los extractos hexánicos de *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni, debido a su resistencia intrínseca al fluconazol.<sup>(28)</sup>

Resultados de actividad antifúngica similar a los obtenidos con los extractos hexánicos las hojas de *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni. han sido reportados para el aceite esencial de *Hedyosmum* sp., frente a cepas de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* y *Candida parapsilosis*; pero no frente a *Candida glabrata*.<sup>(29)</sup>

Por lo que se puede inferir que los extractos hexánicos contienen compuestos con actividad antifúngica sobre *Candida glabrata*, ausentes en el aceite esencial de *Hedyosmum* sp.<sup>(29)</sup>

Estudios<sup>(15)</sup> realizados a diferentes especies de *Hedyosmum* han reportado la presencia de actividad antifúngica. El aceite esencial de *Hedyosmum brasiliense* Miq., presentó propiedades antifúngicas contra cepas de *Candida albicans* y *Candida parapsilosis* y otros hongos de importancia clínica, al determinarse entre los constituyentes de su aceite esencial,  $\alpha$ -terpineol, curzereno, pinocarvona y  $\beta$ -thujene como componentes principales.<sup>(15)</sup>

Compuestos que junto a otros están también presentes en diversas concentraciones de *Hedyosmum colombianum* Cuatrec,<sup>(30)</sup> y en otras familias vegetales ampliamente estudiadas por su importancia económica y usos medicinales entre ellas las cuales está la familia Piperaceae.<sup>(24,25)</sup>

Los resultados de susceptibilidad obtenidos con los extractos hexánicos de *Hedyosmum 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.

Los resultados de este estudio demostraron que los extractos hexánicos de las hojas de *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni. tienen actividad antibacteriana sobre las cepas gramnegativas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*; mientras que, los extractos etanólicos mostraron ser activos solo sobre las cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo, ambos extractos (etanólicos y hexánicos) mostraron actividad inhibitoria solo sobre la cepa grampositiva de *Staphylococcus 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 y permite concluir que los extractos hexánicos y etanólicos de las hojas de *Hedyosmum*

*cuatrecazanum* Occhioni. presentaron efectos antimicrobianos variables frente a las diferentes cepas de importancia clínica estudiadas.

### Agradecimientos

Nuestro agradecimiento a la Universidad Nacional de Chimborazo (UNACH), al ser este estudio realizado mediante un proyecto aprobado por el vicerrectorado de investigación bajo la resolución N° 143-CIV-07-08-2020, y por el uso de sus instalaciones de laboratorios.

Agradecimiento especial a la Ing. Eliana de la Torre, al Ing. Franklin Enrique Cargua Catagña y al Ing. Jorge Caranqui, así como a los estudiantes tesistas de la carrera de Laboratorio Clínico por su colaboración durante su fase experimental.

### Referencias bibliográficas

1. Aslam B, Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Muzammil S, Rasool MH, *et al.* Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect Drug Resist.* 2018;11:1645-58. DOI: [10.2147/IDR.S173867](https://doi.org/10.2147/IDR.S173867)
2. Essack SY, Sartorius B. Global antibiotic resistance: of contagion, confounders, and the com-b model. *Lancet Planet Health.* 2018;2(9):e376-e377. DOI: [10.1016/S2542-5196\(18\)30187-6](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(18)30187-6)
3. Organización Mundial de la Salud (OMS). Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) Report early implementation 2016-17. Ginebra: Organización Mundial de la Salud. 2018 [acceso 21/05/2024]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241513449>
4. Organización Mundial de la Salud (OMS). Resistencia a los antimicrobianos. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2020 [acceso 21/05/2024]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
5. Pappas PC, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky L, Kullberg BJ. Candidiasis invasiva. *Nat Rev Dis Primers.* 2018;4:18026. DOI: [10.1038/nrdp.2018.26](https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.26)

6. Antinori S, Milazzo L, Sollima S, Galli M, Corbellino M. Candidemia and invasive Candidiasis in adults: A narrative review. *Eur J Intern Med.* 2016;34:21-8. DOI: [10.1016/j.ejim.2016.06.029](https://doi.org/10.1016/j.ejim.2016.06.029)
7. Gong J, Chen XF, Fan X, Xu J, Zhang H, Li RY, *et al.* Emergence of Antifungal Resistant Subclades in the Global Predominant Phylogenetic Population of *Candida albicans*. *Microb Spectr.* 2023;14;11(1):0380722. DOI: [10.1128/spectrum.03807-22](https://doi.org/10.1128/spectrum.03807-22)
8. Berman J, Krysan DJ. Resistencia y tolerancia a fármacos en hongos. *Nat Rev Microbiol.* 2020;18:319–31. DOI: [10.1038/s41579-019-0322-2](https://doi.org/10.1038/s41579-019-0322-2)
9. Todzia C. Flora Neotropicals. Chloranthaceae: *Hedyosmum*. New York, USA: The New York Botanical Garden Press. Monograph. 1988 [acceso 21/05/2023];48:123. Disponible <https://n9.cl/gp5ny>
10. León S, Valencia N, Pitman NC, Endara L, Ulloa C, Navarrete H. Libro rojo de plantas endémicas del Ecuador. Segunda ed. Quito, Ecuador: Publicaciones del Herbario QCA. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 2011 [acceso 21/05/2024]. Disponible en: <https://bioweb.bio/floraweb/librorojo/home>
11. Torres SH, Tovar MC, García VJ, Lucena ME, Araujo L. Composición química del aceite esencial de las hojas de *Hedyosmum luteynii* Todzia (Chloranthaceae). *Rev Peru Biol.* 2018;25(2):173-8. DOI: [10.15381/rpb.v25i2.14289](https://doi.org/10.15381/rpb.v25i2.14289)
12. Radice M, Tasambaya A, Pérez A, Diéguez K, Sacchettic G, Buso P, *et al.* Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of the genus *Hedyosmum* (Chloranthaceae): A review. *Journal of Ethnopharmacology.* 2019;244:111932 DOI: [10.1016/j.jep.2019.111932](https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111932)
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 27th ed, CLSI supplement M100. Estados Unidos de América: CLSI; 2017.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts, 3rd ed, CSLI guideline M44-A2. Estados Unidos de América: CLSI; 2018.
15. 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;20:692–9. DOI: [10.1590/S0102-695X201000500005](https://doi.org/10.1590/S0102-695X201000500005)

16. Lucena ME, Escalante M, González V, Rojas L, Cordero Y, Ustáriz FJ, et al. Composición y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Austroeupatorium inulifolium* (Kunth) King & Robinson (Asteraceae). Rev. Cuba. de Farm. 2019 [acceso 21/05/2024];52(4):1-16. Disponible en: <http://www.revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/369/272>

17. 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. DOI: [10.1155/2016/1638342](https://doi.org/10.1155/2016/1638342)

18. Zamora AM, Arturo DE. Composición química del aceite esencial de hojas *Hedyosmum translucidum* Cuatrec, Chloranthaceae (Granizo). Bol. Latinoam. Caribe plantas med. Aromát. 2016 [acceso 21/05/2024];15(3):192–8 Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-907535>

19. 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. DOI: [10.3390/medicines4030055](https://doi.org/10.3390/medicines4030055)

20. 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):141-68 DOI: [10.1016/S0031-9422\(00\)00266-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00266-1)

21. Ustáriz F, Lucena M, Meza K, Soto V, Rojas L, Cordero Y, et al. Composición y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ageratina neriifolia* (Asteraceae) de Mérida-Venezuela. Rev. Cuba. de Farm. 2021 [acceso 21/05/2024];54(1):e548 Disponible en: <http://www.revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/548/438>

22. Lucena M, Ustáriz F, Meza K, Soto C, Rojas L, Cordero Y, et al. Chemical composition and antibacterial activity of *Ageratina neriifolia* (B.L.Rob.)(Asteraceae) extracts from Mérida-Venezuela. Emirates. Journal of Food and Agriculture. 2021; 33(8):704-710. DOI: [10.9755/ejfa.2021.v33.i8.2739](https://doi.org/10.9755/ejfa.2021.v33.i8.2739)

- 23 Bua A, Usai D, Donadu M, Delgado J, Paparella A, Chaves C, *et al.* Antimicrobial activity of *Austroeupatorium inulaefolium* (HBK) against intracellular and extracellular organisms. *Nat Prod Res.* 2018;2(23):2869-71 DOI: [10.1080/14786419.2017.1385014](https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1385014)
24. Ustáriz FJ, Lucena ME, Urbina FG, Villamizar DM, Rojas LB, Cordero YE, *et al.* Composition and antibacterial activity of the *Piper eriopodon* (miq) c. dc. essential oil from the Venezuelan Andes. *Pharmacologyonline.* 2020 [acceso 21/05/2024];2:13-22 Disponible en: [https://pharmacologyonline.silae.it/files/archives/2020/vol2/PhOL\\_2020\\_2\\_A002\\_Ustariz.pdf](https://pharmacologyonline.silae.it/files/archives/2020/vol2/PhOL_2020_2_A002_Ustariz.pdf)
25. Araujo L, Rondón M, Cruz R, Guayanlema J, Vargas C, Morocho S, *et al.* Antimicrobial activity of the essential oil of *Piper amalago* L. (Piperaceae) collected in coastal Ecuador. *Pharmacology online.* 2019 [acceso 21/05/2024];3:15-27. Disponible en: [https://pharmacologyonline.silae.it/files/archives/2019/vol3/PhOL\\_2019\\_3\\_A002\\_AraujoBaptista.pdf](https://pharmacologyonline.silae.it/files/archives/2019/vol3/PhOL_2019_3_A002_AraujoBaptista.pdf)
26. Nucci M, Queiroz F, Tito T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, *et al.* Epidemiology of candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. *PLoS ONE.* 2013;8(3):e59373. DOI: [10.1371/journal.pone.0059373](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059373)
27. Gómez C. Resistencia de levaduras del género *Candida* al fluconazol. *Infectio.* 2010;14(Supp 2):172- 80. DOI: [10.1016/S0123-9392\(10\)70134-X](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(10)70134-X)
28. Silva V, Díaz MC, Febré N. Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. *Rev Chil Infect.* 2002;19(S2):149-56. DOI: [10.4067/S0716-10182002019200016](https://doi.org/10.4067/S0716-10182002019200016)
29. Lucena M, Latorre K, Ustáriz F, García V, Rojas L, Monge A, *et al.* Actividad antifúngica del aceite volátil de *Hedyosmum* sp., frente a especies del género *Candida*. *Kasmera.* 2020;48(2):e48231678. DOI: [10.5281/zenodo.3951044](https://doi.org/10.5281/zenodo.3951044)
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;22:234–6. DOI: [10.1080/10412905.2010.9700312](https://doi.org/10.1080/10412905.2010.9700312)



### **Conflicto de intereses**

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

### **Contribuciones de los autores**

*Conceptualización:* María Eugenia Lucena de Ustáriz.

*Curación de datos:* María Eugenia Lucena de Ustáriz, Rosa Elisa Cruz Tenempaguay, Marco Vinicio Rodríguez Llerena.

*Investigación:* Marco Vinicio Rodríguez Llerena, Pablo Djabayan Djibeyan.

*Metodología:* Rosa Elisa Cruz Tenempaguay, Adriana Carolina Rincón Alarcón

*Supervisión:* Verónica Paulina Cáceres Manzano.

*Redacción, revisión y edición:* María Eugenia Lucena de Ustáriz, Francisco J. Ustáriz Fajardo, Verónica Paulina Cáceres-Manzano.