



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“Validación de la técnica de dilución en agar modificada por Katherine A. Hammer, Christine F. Carson, Thomas V. Riley; para la estimación “*in vitro*” de la actividad antimicrobiana frente a una cepa ATCC de *Escherichia coli* 25922; y su aplicación a tres aceites esenciales”

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

AUTORES

JAIME MARCELO SARMIENTO ORTEGA
C.I. 0105549216
SILVIA LORENA ROMERO CHIMBO
C.I. 0302790803

DIRECTORA

DRA. MARÍA DE LOURDES JERVES ANDRADE
C.I. 0101660579

ASESOR

DR. FABIAN LEÓN TAMARIZ
C.I. 0102311610

CUENCA-ECUADOR

2017



RESUMEN

La actividad antibacteriana de los aceites esenciales (AE), ha sido objeto de gran interés desde sus inicios, debido a la existencia de diversos problemas de salud de etiología bacteriana que afectan a la población mundial, es *Escherichia coli* (*E. coli*) patógena, uno de los microorganismos más relevantes debido a diversos mecanismos de resistencia desarrollados como respuesta de adaptación a nuevos entornos adversos y a su vez por un uso indiscriminado de antibióticos.

El objetivo del presente trabajo fue validar la técnica de dilución en agar modificada por Katherine A. Hammer, Christine F. Carson, Thomas V. Riley, frente a una cepa American Type Culture Collection (ATCC) de *E. coli* 25922 usando como controles dos AE, uno con actividad positiva, otro que no presentó actividad frente a este microorganismo y determinar la posible bioactividad de tres AE escogidos mediante revisiones bibliográficas.

Para su desarrollo se llevó a cabo un estudio de tipo experimental, cuantitativo/cualitativo, en el cual se probó la actividad antibacteriana de los siguientes AE: Orégano, Jengibre, Ruda, Lavanda, Hierba luisa; a los cuales se les aplicó la técnica de dilución en agar modificada por Katherine A. Hammer, Christine F. Carson, Thomas V. Riley.

La dilución en agar es un método que ha sido validado, aprobado por Clinical and Laboratory Standards Institute (**CLSI**) y que permite comprobar si un AE presenta o no actividad frente a microorganismos como bacterias Gram Positivas (+) o Gram Negativas (-), esto se logra gracias a pequeñas modificaciones como la adición de Tween 20, el cual permite vencer la tensión superficial, facilitando la formación de una emulsión entre el medio y el AE.

Finalmente se logró la validación de la técnica de dilución en agar modificada por Katherine A. Hammer, Christine F. Carson, Thomas V. Riley, obteniéndose como resultados los siguientes puntos de corte: Orégano y Jengibre el 0.12% v/v Aceite esencial (AE) / Agar Mueller Hinton (MHA), Lavanda 0.48% v/v AE/MHA, Ruda >0.48% v/v AE/MHA y de la Hierba luisa 0.06% v/v AE/MHA.



Este resultado preliminar podrá servir como base para estudios posteriores, debido al enorme potencial de los AE y la gran biodiversidad en nuestra región; con el fin de su probable utilización como productos naturales.

Palabras claves: actividad antibacteriana, Colección de Cepas de Tipo americano (ATCC) de *Escherichia coli* 25922, aceites esenciales.



ABSTRACT

The antibacterial activity of essential oils (EO) has been the subject of great interest since its beginnings, due to the existence of diverse health problems of bacterial etiology that affect the world population, such as the *Escherichia coli* (*E. coli*) pathogen which is one of the most prominent microorganisms in terms of its resistance, developed in response to the need to adapt to new adverse environments and in addition by an indiscriminate use of antibiotics.

The objective of this study was to validate the dilution technique in agar modified by Katherine A. Hammer, Christine F. Carson, Thomas v. Riley, with an American Type Culture Collection (ATCC) strain of *E. coli* 25922, and to determine the possible bioactivity of three EO chosen through bibliographic reviews. This was accomplished by using two EO as controls. The first control EO reacts when introduced to the microorganism, while the second does not.

For the development of the study, an experimental design was followed based on a, quantitative/ qualitative approach, in which the following EO were tested: Oregano, Ginger, Rue, Lavender and Lemongrass, using the dilution in agar technique modified by Katherine A. Hammer, Christine F. Carson and Thomas V. Riley.

Dilution in agar is a method that has been validated and approved by the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) and that allows one to prove whether or not an EO reacts when introduced to microorganisms such as Gram (+) or Gram (-). This is possible thanks to small modifications such as the addition of Tween 20, which allows one to overcome surface tension, facilitating the formation of an emulsion between the environment and the EO.

Finally, it was possible to validate the technique of dilution in agar modified by Katherine A. Hammer, Christine F. Carson, Thomas V. Riley. The results were: Oregano and Ginger in 0.12% v/v Essential Oil (EO) / Agar Mueller Hinton (MHA), Lavendar 0.48% v/v (EO/MHA), Rue >0.48% v/v (EO/MHA) and Lemongrass 0.06% v/v (EO/MHA).

The preliminary result can serve as the basis of future studies, due to the enormous potential of EO and the great biodiversity of our region, in order to use them as natural products.



Keywords: Antibacterial activity, American Type Culture Collection (ATCC) de *E. coli* 25922, essential oils.



Tabla de contenido

RESUMEN 2

ABSTRACT 4

CLÁUSULA DE DERECHOS DEL AUTOR10

CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL.....12

AGRADECIMIENTOS14

DEDICATORIAS16

INTRODUCCIÓN17

IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA18

JUSTIFICACIÓN19

HIPÓTESIS.....20

OBJETIVOS GENERALES20

OBJETIVOS ESPECÍFICOS20

CAPÍTULO 121

MARCO TEÓRICO21

1.1 Definición de los aceites esenciales.....21

1.1.1 Aceites esenciales como antimicrobianos21

1.1.2 Características generales22

1.1.3 Rendimiento.....23

1.1.4 Clasificación de los aceites esenciales24

 Por su consistencia24

 Por su origen.....25

 Por la naturaleza química.....25

1.2 Métodos de extracción de los aceites esenciales.....25

1.2.1 Métodos directos26

1.2.2 Destilación directa o general27

 Destilación con arrastre de vapor de agua27

 Destilación con agua o hidrodestilación.....28

 Destilación agua-vapor o vapor húmedo29



Destilación previa maceración.....	29
Destilación al vacío	29
Destilación molecular	29
1.2.3 Extracción con solventes	30
Con disolventes volátiles	30
Maceración en grasa.....	30
Por fluidos supercríticos	31
1.3 Actividad antimicrobiana de aceites esenciales	31
1.3.1 Factores que afectan la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales	
32	
1.4 Enterobacterias.....	32
1.4.1 Definición	32
1.4.2 Características generales.....	33
1.4.3 Estructura.....	34
1.4.4 Patogenia	36
1.4.5 Epidemiología.....	36
1.5 <i>Escherichia coli</i>	38
1.5.1 Definición	38
1.5.2 Estructura antigénica.....	38
1.5.3 Virulencia	39
1.5.4 Patogenia y patología.....	39
1.5.5 Epidemiología.....	41
1.5.6 Descripción de la cepa ATCC <i>E. coli</i> 25922	42
1.6 Uso indiscriminado de los antimicrobianos	42
1.7 Opciones para mejorar el uso de los antimicrobianos	43
1.8 El papel de la vigilancia	43
1.9 Plantas estudiadas.....	43
1.9.1 Jengibre	43
1.9.2 Lavanda	45
1.9.3 Orégano	46
1.9.4 Ruda.....	47
1.9.5 Hierba luisa	48
CAPITULO 2.....	49



METODOLOGÍA	49
2.1 Tipo de investigación	49
2.2 Variables.....	49
2.2.1 Variable Independiente.....	49
2.2.2 Variable Dependiente	50
2.3 Metodica de trabajo	51
2.3.1 Recolección de las plantas de estudio.....	51
2.3.2 Selección y lavado.....	51
2.3.3 Secado y troceado.....	50
2.3.4 Obtención del aceite esencial	50
2.4 Método de dilución en agar.....	52
2.4.1 Modificaciones para el método de dilución en agar mueller hinton	53
2.5 Determinación de la concentración mínima inhibitoria	54
2.5.1 Preparación del medio de agar mueller hinton.....	54
2.6 Volumen de aceite esencial probado	55
2.6.1 Concentración de aceite esencial	55
2.7 Concentración de la suspensión bacteriana de la cepa ATCC de <i>E. coli</i> 25922 56	
2.8 Preparación del stock de antibiótico.....	57
2.8.1 Concentración del antibiótico requerido a partir del stock elaborado	56
2.8.2 Controles de antibiótico	57
CAPÍTULO 3	60
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
DISCUSIÓN.....	61
CONCLUSIONES	63
RECOMENDACIONES	64
BIBLIOGRAFÍA	64
ANEXOS	71
ANEXO 1.- RESULTADOS OBTENIDOS DURANTE LAS 72 HORAS DE REVISIÓN DE LOS CULTIVOS	71
ANEXO 2.-RENDIMIENTO DE LOS ACEITES ESENCIALES	73



ANEXO 3.- ILUSTRACIONES.....	74
ILUSTRACIONES DE PLANTAS USADAS.....	74
ILUSTRACIONES DEL PROCESAMIENTO DE LA PLANTA ESCOGIDA	77
ILUSTRACIONES DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN	79
ILUSTRACIONES DE RESULTADOS	83
ANEXOS 4.- EQUIPOS USADOS DURANTE LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO DE TESIS.....	87



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

JAIME MARCELO SARMIENTO ORTEGA en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación **“Validación de la técnica de dilución en agar modificada por Katherine A. Hammer, Christine F. Carson, Thomas V. Riley; para la estimación *“in vitro”* de la actividad antimicrobiana frente a una cepa ATCC de *Escherichia coli* 25922; y su aplicación a tres aceites esenciales”**, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 13 de Diciembre del 2017

Jaime Marcelo Sarmiento Ortega

C.I: 0105549216



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

SILVIA LORENA ROMERO CHIMBO en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación **“Validación de la técnica de dilución en agar modificada por Katherine A. Hammer, Christine F. Carson, Thomas V. Riley; para la estimación *“in vitro”* de la actividad antimicrobiana frente a una cepa ATCC de *Escherichia coli* 25922; y su aplicación a tres aceites esenciales”**, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 13 de Diciembre del 2017

Silvia Lorena Romero Chimbo

C.I: 0302790803



CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

JAIME MARCELO SARMIENTO ORTEGA, autor del trabajo de titulación “Validación de la técnica de dilución en agar modificada por Katherine A. Hammer, Christine F. Carson, Thomas V. Riley, para la estimación “*in vitro*” de la actividad antimicrobiana frente a una cepa ATCC de *Escherichia coli* 25922; y su aplicación a tres aceites esenciales”, certifico que todas las ideas opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 13 de Diciembre del 2017

Jaime Marcelo Sarmiento Ortega

C.I. 0105549216



CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

SILVIA LORENA ROMERO CHIMBO, autora del trabajo de titulación “Validación de la técnica de dilución en agar modificada por Katherine A. Hammer, Christine F. Carson, Thomas V. Riley, para la estimación “*in vitro*” de la actividad antimicrobiana frente a una cepa ATCC de *Escherichia coli* 25922; y su aplicación a tres aceites esenciales”, certifico que todas las ideas opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 13 de Diciembre del 2017

Silvia Lorena Romero Chimbo

C.I. 0302790803



AGRADECIMIENTOS

Si bien en esta vida existen muchos momentos, los mismos que van de la mano de personas que de una u otra forma van aportando en nuestro largo camino llamada vida, que sin duda dejan su huella y que valen la pena recordar; para mí más que una formalidad, es momento de decir sinceramente Dios les pague a todos aquellos que de una u otra forma nos ayudaron a llevar a cabo este modesto trabajo de tesis.

En especial un sincero agradecimiento y mi admiración eterna para la Doctora Lourdes Jerves, la misma que nos guio desde que empezó esta larga travesía; así también una gratitud eterna con todos los miembros que conforman el proyecto VLIR de la Universidad de Cuenca, entre ellos al Doctor Fabián León, en verdad muchísimas gracias a todos.

Así también quisiera dar le las Gracias a mi Dios ya que sin él no estaríamos en estas instancias de la vida, como también a mis papis y hermanos ya que sin su apoyo esto no hubiese sido posible; si bien ya ha pasado algún tiempo creo que vale la pena agradecer a una persona que me acompañó por más de dos años mientras estudiaba, la misma que a más de ser mi compañera, mi amiga y su momento mi novia me ayudo a crecer como persona, a entender que en la vida hay que tener metas y sueños; por ende mi más sincero agradecimiento y admiración para ti Nohelita Arévalo en verdad un sincero Dios le pague por todo.

Finalmente agradecer a mi compañera de tesis Lorena Romero ya que más que una colega un gran ser humano por lo que vale la pena darle las gracias por embarcarse en esta aventura que fue realizar la tesis, sinceramente Dios le pague Lore.

Marcelo Sarmiento



AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer a Dios y a mi madre, quienes son mi apoyo, guía, compañía y fortaleza en mi camino diario, que me han impulsado cada día hasta completar mi meta.

Así, quiero mostrar mi gratitud a mi segundo hogar la Universidad de Cuenca y a sus docentes, que siempre desde un inicio me han enseñado todo lo mejor para mi educación, conocimiento y a su vez con estas pautas poder desenvolverme con mi carrera.

A su vez, agradezco a nuestra Directora de tesis Dra. Lourdes Jerves Mgt., por ser una excelente docente en nuestros años de estudio en la Universidad, por brindarnos una oportunidad, guía, paciencia, amistad, capacidad y conocimiento científico; ya que es una gran satisfacción haber contribuido y desarrollado nuestra tesis.

A nuestro asesor de tesis Dr. Fabián León por su apoyo, conocimiento y guía para la realización de ésta tesis.

Al personal del Programa VLIR-IUC/Universidad de Cuenca, quienes son excelentes personas, con conocimientos en el área de Fotoquímica y Microbiología, gracias por su ayuda, guía y sobre todo por su paciencia, ya que desde un principio con respeto se tuvo siempre una amistad mutua.

A mi compañero de tesis y amigo Marcelo Sarmiento, muchas gracias por su paciencia, comprensión, confianza y por convivir todo este tiempo conmigo como una pieza clave para que pudiéramos desarrollar cada etapa de nuestra tesis con satisfacción y alegría.

Finalmente, a todos mis amigos y amigas que siempre han estado presentes, me han acompañado, brindado su amistad todos estos años de estudio en mi Universidad hasta culminar mi gran meta, gracias.

Lorena Romero



DEDICATORIAS

Este trabajo va dedicado para toda mi familia que de una u otra forma me apoyaron en especial para la mejor administradora de dinero del mundo a mi parecer, para mi mami Odalia Ortega, gracias por todo señor, creo que nunca llegaré a pagarle lo mucho que me ha dado, pero créame que lo intentaré.

Marcelo Sarmiento

Mi tesis se la dedico a mi Dios, a mis padres, quienes siempre estuvieron presentes a mi lado, a pesar de yo encontrarme lejos de mi hogar, siempre fueron y son incondicionales en mi vida. Así también, por su apoyo, consejos, amor y con los recursos necesarios para cumplir mi carrera. Todo lo que soy ahora, es por ellos con su guía en mi camino.

A mi hermano mayor, a mis abuelitos, aunque estén lejos o no estén a mi lado ahora, siempre me han impulsado a ser fuerte, perseverante para seguir, luchar, continuar hacia adelante.

A mis amigos, amigas y familiares que de verdad han estado conmigo siempre, contados con los dedos, pero es suficiente y lo mejor que tenga en mi vida.

Todo esfuerzo, sacrificio, dedicación, perseverancia y amor a lo que se hace, es una dedicatoria para uno mismo, porque con ellos se abre las alas, se superan miedos y se siente una satisfacción haber cumplido una gran meta que alimenta el alma con mucha felicidad.

Lorena Romero



INTRODUCCIÓN

La madre naturaleza autora del gran libro de la vida nos enseña que cada molécula, cada sustancia por pequeña o insignificante que sea cumple una función esencial, así pues, Carril establece que las plantas contienen dentro de su majestuosa composición innumerables sustancias, entre las que se podría destacar dos tipos de metabolitos; primarios y secundarios (Carril, 2011).

Los metabolitos primarios son vitales para el desarrollo de las plantas, dentro de este grupo están los carbohidratos, proteínas y lípidos. Mientras que, los metabolitos secundarios son sustancias de bajo y mediano peso molecular entre las cuales podemos destacar: alcoholes, ácidos, fenoles, terpenos, ésteres, etc, elaboradas por las plantas por medio de distintas vías metabólicas para poder subsistir al repeler a los predadores, atraer a insectos polinizadores, etc. Estableciéndose así lazos entre las distintas plantas que habitan una misma zona (Carril, 2011).

También, Montoya Cadavid menciona que dentro de estos metabolitos secundarios se encuentran los aceites esenciales (AE), que desde su aparición e implementación en la medicina han traído grandes beneficios para la salud humana, debido al afán por encontrar nuevas sustancias que ayuden a combatir los problemas de salud que aquejan a la población mundial (Montoya Cadavid, 2010).

Esto sumado al hecho de que cada día se observa resistencia a los tratamientos antimicrobianos, llevó a varios investigadores como Reyes Jurado, entre otros a probar nuevas sustancias con posible actividad antimicrobiana y sobretodo con la visión de encontrar metabolitos menos nocivos en lo posible de origen natural para el organismo humano (Reyes Jurado, Palou, & Malo López, 2009) (Montoya Cadavid, 2010).

La técnica de dilución en agar modificada por Katherine A. Hammer, et al. sirve para determinar una bioactividad de un AE contra microorganismos aerobios o microaerófilos con velocidad variable de crecimiento, por lo que, esta técnica se valida mediante ser aplicada para determinar actividad antimicrobiana como la antibacteriana.

IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA



E. coli es uno de los microorganismos que presenta mayor patogenicidad, debido a que, tiene la capacidad de provocar enfermedades en los seres humanos mediante mecanismos genéticamente controlados, de los cuales se pueden destacar: la producción de toxinas, la adhesión e invasión de células huésped, la interferencia con el metabolismo celular y la destrucción de tejidos. Por lo tanto, estos elementos genéticos contribuyen a la aparición de agentes con mayor virulencia, patogenicidad y supervivencia.

E. coli puede causar infecciones intestinales y extraintestinales la mayoría graves, como infecciones del aparato excretor, peritonitis, cistitis, septicemia, meningitis, mastitis y neumonía (Flores Palacios & Puente Puente, UPLA, 2016).

En relación a los procesos gastrointestinales *E. coli* presenta seis serotipos caracterizados por tener su propio mecanismo de patogenicidad, se mencionan: *E. coli shigatoxigénica* (STEC), enteropatógena (ECEP), enterotóxica (ECET), enteroinvasiva (ECEI), enterohemorrágica (ECEH) y enteroagregativa (ECEA); de ellas los tres primeros son los más importantes. Esto se da por la presencia de diversos determinantes de virulencia como ciertos antígenos O (somáticos) que actúan como factores de adhesión/colonización necesarios para que se dé la infección (Maza Marcatoma & Clavijo Paltin, 2017).

Por otra lado, otros grupos de *E. coli* portan antígenos K (capsulares) con su variante capsular K1 asociado con el desarrollo de meningitis neonatal, bacteriemia e infección urinaria principalmente (Maza Marcatoma & Clavijo Paltin, 2017).

Según Vidal, las bacteriemias por *E. coli*, de las cuales la gran mayoría (50-70%) se deben a procesos de infección primarios de las vías urinarias por vía ascendente, como por ejemplo, el caso de pielonefritis, obstrucción de vías urinarias o exploración instrumental de las mismas en presencia de orina infectada. Otras patologías graves las constituyen las perforaciones intestinales que causan la mayoría de los casos de problemas intraabdominales en las cuales *E. coli* puede ser el agente vinculado (Vidal Marín, Vicario Bermúdez, & Lerín, 2013)

Cabe resaltar también que la resistencia a los antimicrobianos, es un problema que afecta a la población mundial, debido a un incremento en los costos de salud, lo cual ha generado que se prolonguen las estancias hospitalarias y mayores índices de mortalidad



en los últimos años. Además, microorganismos como las bacterias sufren cambios o mutaciones al transferir genes de resistencia, en respuesta al uso continuo de antibióticos utilizados para curar las infecciones causadas por los mismos, resultando en ineficacias terapéuticas (Vidal Marín, Vicario Bermúdez, & Lerín, 2013) .

JUSTIFICACIÓN

La determinación de la actividad antimicrobiana de productos naturales en el campo de la salud y de la investigación, es muy importante como una alternativa a los mecanismos de resistencia antimicrobiana desarrollados. De este modo, mediante esta investigación se pretendió validar una técnica de dilución en agar modificada para microorganismos Gram (-) e identificar nuevos AE con actividad antibacteriana que contribuyan a eliminar al microorganismo patógeno mencionado.

Báez expresa que en los últimos años se ha observado un auge en la obtención y utilización de AE, ya que su uso va desde tratamientos de belleza para mantener el cuidado y salud de la piel, hasta su implementación para tratar infecciones gastrointestinales, gripes, etc. Es meritorio indicar que el uso de AE se remonta a épocas de antaño, usados para tratar diversos males; si bien sus propiedades se han venido reportando a través de los años, gracias a los avances de la ciencia y tecnología, se evidencian científicamente sus bondades (Báez, 2014).

La bioactividad de los AE se conoce desde hace mucho tiempo atrás ya durante la Primera Guerra Mundial, el médico y cirujano Jean Valnet empezó a usarlos ampliamente para tratar infecciones en heridas y quemaduras de guerra, observando notables propiedades antibacterianas, cicatrizantes, así como también obteniendo un alivio tanto de los problemas físicos como mentales en sus pacientes. Por lo tanto, estos estudios sirvieron de base para nuevas investigaciones, permitiendo evaluar la posible actividad de nuevos AE provenientes de plantas con posibles usos en materia de salud, belleza, entre otros campos potenciales (Báez, 2014).



HIPÓTESIS

Es posible obtener una técnica para bacterias Gram (-) y habría la posibilidad que en nuestro país existan aceites esenciales con actividad frente a las bacterias mencionadas.

OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS

OBJETIVOS GENERALES

1. Validar la técnica de dilución en agar modificada por Katherine A. Hammer, Christine F. Carson, Thomas V. Riley, para determinar la actividad antibacteriana de aceites esenciales.
2. Determinar la actividad antibacteriana de tres aceites esenciales seleccionados en base a referencias bibliográficas, mediante la aplicación del método de dilución en agar frente a la cepa ATCC *E. coli* 25922.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar una revisión bibliográfica previa sobre los posibles aceites esenciales con mayor efecto antibacteriano.
- Utilizar procesos de extracción de aceites esenciales mediante destilación por arrastre de vapor.
- Aplicar la técnica de dilución en agar modificada para la evaluación de la actividad antibacteriana de aceites esenciales.
- Establecer la concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales frente a la cepa ATCC de *E. coli* 25922.



CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1 Definición de los aceites esenciales

Los aceites esenciales (AE) son compuestos naturales, líquidos volátiles, productos del metabolismo secundario de las plantas y de composición compleja, que aportan con aromas particulares debido a que pueden tener una mezcla de hidrocarburos, terpenos, alcoholes, compuestos carbonílicos, aldehídos aromáticos y fenoles de peso molecular bajo, los cuales están almacenados en glándulas, conductos, sacos o simplemente acumulados dentro del vegetal, por lo que, es conveniente desmenuzar ya sean hojas, flores, cáscaras, semillas, frutos, pelos glandulares, rizomas, etc, para ser extraídos mediante múltiples técnicas de las cuales la más común es la destilación por arrastre de vapor (Flores Palacios & Puente Puente, UPLA, 2016).

Estos AE son productos naturales que tienen aplicación en diferentes industrias, como la farmacéutica, la alimentaria, en perfumería; entre otros usos.

Flores Palacios indica que la definición de AE también se aplica a las sustancias sintéticas obtenidas a partir del alquitrán de hulla y a las sustancias semi-sintéticas preparadas a partir de los AE naturales. Además, los AE se diferencian por ser volátiles y no dejar manchas como los aceites comunes (Flores Palacios & Puente Puente, UPLA, 2016) (SENA, 2010).

1.1.1 Aceites esenciales como antimicrobianos

Los AE en la actualidad, se ha encontrado que son efectivos tanto en su fase de vapor como por contacto directo contra numerosas bacterias patógenas, tanto Gram (-) y Gram (+), así como también en contra de mohos, levaduras e incluso contra algunos mohos productores de micotoxinas. Olivares Cruz descubrió, experimentalmente que estas propiedades se deben principalmente a los compuestos químicos presentes siendo estos: monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos con propiedades aromáticas,



antioxidantes y antimicrobianas (Olivares Cruz & López Malo, 2013).

En cuanto a la actividad antimicrobiana de los AE, esta depende principalmente de tres características: carácter hidrófobo del AE, componentes químicos y del tipo de microorganismo que debe atacar (Flores Gutiérrez, 2010).

La actividad antimicrobiana de los AE depende también de la capacidad de alterar y penetrar en la estructura lipídica de la membrana del microorganismo, lo que conduce a la desnaturalización de las proteínas y a la destrucción, haciéndola más permeable, terminando con ruptura, lisis celular y por ende la muerte del patógeno (Reyes Jurado, Palou, & Malo López, 2009).

Según lo afirma Vega Portocarrero, los mecanismos de acción de los distintos AE son muy variados en cuanto a afectar las funciones microbianas. Una característica importante es la hidrofobicidad, la cual permite la separación de los lípidos de la membrana celular y de la mitocondria, desordenando la estructura de éstos, haciéndola más permeable, lo que permite la filtración de iones y otros contenidos celulares (Vega Portocarrero & López Malo, 2009).

Además, dentro de los componentes de los AE encontramos a los compuestos fenólicos, los cuales presentan funciones como inactivar enzimas, reaccionar con la membrana celular o alterar la función del material genético, modificando la producción de energía y en la síntesis de componentes estructurales principalmente (Vega Portocarrero & López Malo, 2009).

1.1.2 Características generales

Los AE o esencias volátiles poseen un intenso olor debido a que se extraen de plantas por lo general aromáticas. Su uso es muy amplio en el campo de la industria alimenticia y cosmética; además de poseer propiedades antimicrobianas como la antiviral y antibacteriana, gracias a la acción de sustancias en su mayor parte hidrocarburos de la serie polimetilénica del grupo de los terpenos que se encuentran con otros compuestos, casi siempre oxigenados presentes en la fracción AE extraído (Flores Palacios & Puente Puente, UPLA, 2016).



A condiciones ambientales los AE son líquidos menos densos, pero más viscosos que el agua. Poseen un amplio color en la gama del amarillo, hasta en algunos casos transparentes, en cuanto a sus sabores, a veces resultan ser dulces o amargos (Vega Portocarrero & López Malo, 2009).

Los AE son inflamables, no tóxicos mientras la dosis suministrada por vía oral no supere los límites de toxicidad, de los cuales la gran mayoría presentan una toxicidad débil o muy débil, como en el caso de los AE de Eucalipto, Lavanda y Orégano con una dosis letal (DL50) de 2 y 5 gramos/Kilogramo (g/Kg), superior a 5g/Kg y 1.37g/Kg respectivamente (Flores Gutiérrez, 2010).

Sufren degradación química en presencia de la luz solar, el aire, el calor, los ácidos y álcalis fuertes. Son solubles en los disolventes orgánicos comunes como alcoholes, éter de petróleo, tetracloruro de carbono; etc, y casi inmiscibles en disolventes polares asociados (agua, amoníaco). Además, estas son aceptados como sustancias seguras GRAS (Generally Recognized as Safe) por la FDA (Vega Portocarrero & López Malo, 2009).

Son obtenidos del material vegetal que los contiene, utilizando principalmente el procedimiento básico de destilación por arrastre de vapor. A su vez, se les atribuyen variadas funciones en las plantas como la protección frente a insectos, herbívoros, adaptación frente al estrés hídrico y son de gran importancia en la polinización (Flores Palacios & Puente Puente, UPLA, 2016).

1.1.3 Rendimiento

La mayoría de plantas contienen del 0.01% al 10% de contenido de AE, siendo la cantidad media en la mayor parte de las plantas aromáticas de alrededor del 1% a 2% de manera que, este contenido aumenta alrededor del mediodía, cuando se ha eliminado el agua de rocío depositada sobre la planta y ha comenzado una deshidratación; una excepción a este comportamiento se presenta en la manzanilla, la misma que alcanza mayor concentración de AE durante en la noche (SENA, 2010).



Cuando el almacenamiento de los AE es el ideal, la mayoría se pueden preservar de 2 a 5 años, sin embargo los AE de las frutas cítricas son muy susceptibles a la oxidación (SENA, 2010) (Paredes Punina & Quinatoa Chicaiza, 2010).

Fórmula para el cálculo del rendimiento de aceites esenciales:

$$P = \frac{M1}{M2} X 100$$

Dónde:

P: rendimiento

M1: masa final del aceite esencial

M2: masa inicial de la droga empleada

100: factor matemático (Quert Alvarez & Gelabert Ayón, 2001).

1.1.4 Clasificación de los aceites esenciales

Su clasificación es en base a diferentes criterios entre los principales se indican: la consistencia, origen o naturaleza química de los componentes mayoritarios.

Por su consistencia

Las esencias fluidas, son líquidos muy volátiles a temperatura ambiente, como ejemplos de este tipo de esencias se indican: las de albahaca y caléndula. Dentro de esta clasificación se encuentran dos más, que son los bálsamos y las oleorresinas; los primeros son de consistencia más espesa, poco volátiles, contienen principalmente sesquiterpenos y son propensos a polimerizarse, y los segundos tienen un aroma más concentrado por los aceites fijos que resultan ser líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas (caucho, oleorresinas de páprika).

Los concretos, se obtienen de plantas aromáticas frescas por extracción apolar con hidrocarburos, su apariencia es ser semisólidos coloreados, libres del solvente original.



Los absolutos, se obtienen por conversión de los aceites concretos por la extracción con etanol absoluto. Una vez completa la disolución, estos se refrigeran a temperaturas de -5°C. Además, el rendimiento de absolutos a partir de concretos, varía de 1% al 65% (Flores Palacios & Puente Puente, UPLA, 2016) (SENA, 2010).

Por su origen

Aceites esenciales naturales, se obtienen directamente de la planta y no se someten posteriormente a ninguna reacción, son costosos y de composición variada.

Artificiales, se obtienen por enriquecimiento o se preparan por mezclas de varias esencias naturales extraídas de distintas plantas.

Sintéticos, se obtienen por mezclas de diversos productos por procesos químicos. Se utilizan mucho en la preparación de sustancias aromatizantes y saborizantes (Flores Palacios & Puente Puente, UPLA, 2016).

Por la naturaleza química

Según la estructura química de los componentes mayoritarios que determinan el olor particular de los aceites, estos se dividen en tres grupos principales:

- Primero, los monoterpenoides: linalool, nerol, 1-8 cineol, geraniol.
- Segundo, los sesquiterpenoides: farnesol, nerolidol.
- Tercero, los compuestos oxigenados: alcoholes, aldehídos, cetonas (SENA, 2010).

1.2 Métodos de extracción de los aceites esenciales

Se define como método o técnica de extracción al procedimiento empleado para obtener o mejor dicho liberar los AE que contienen el material vegetal y que a su vez son los



responsables de determinar la calidad del AE; lo cual dependerá de la variedad del material vegetal como la parte de la misma a emplear como se puede observar en la tabla 1 y de la estabilidad del AE ya que en materia de rendimiento es importante establecer que ninguna cantidad de mejoras en los aspectos tecnológicos compensará la mala calidad del material vegetal (SENA, 2010) (Perdomo Acevedo & Palomarez, 2015).

Tabla 1. Métodos de extracción de aceites esenciales

Método	Procedimiento	Productos Obtenidos
Directos	Extracción Exudación	Aceites esenciales cítricos Gomas, resinas, bálsamos
Destilación	Directa Arrastre con vapor de agua, con agua o hidrodestilación y a vapor o vapor húmedo Destilación-maceración (liberación enzimática de agliconas en agua caliente), al vacío y molecular	Aceites esenciales y aguas aromáticas
Extracción con solventes	Solventes volátiles	Infusiones y resinoides alcohólicos Concretos y absolutos
	Solventes fijos (grasas y aceites)	Absolutos de pomadas Absolutos de enflorados
	Extracción con fluidos en estado supercríticos	

Fuente: (SENA, 2010) (Ananieva, 2017)

1.2.1 Métodos directos

Su aplicación directa es a los cítricos, debido a que los AE están presentes en su corteza y el calor de otros métodos de destilación puede alterar su composición. Según Sánchez Llambi, se presentan dos variantes que son la extracción y la exudación.

Los fenómenos que ocurren durante la extracción se desarrollan en varias etapas, como:



- Laceración de la epidermis y de las celdas que contienen su esencia.
- Se generan en la cáscara áreas que permiten que el aceite fluya al exterior.
- Troceado de la cáscara, da origen a pequeñas partículas de las cuales sale la esencia.

La exudación es un procedimiento usado básicamente para aislar las gomorresinas de árboles y arbustos (SENA, 2010) (Sánchez Llambi, 2016).

1.2.2 Destilación directa o general

Esta técnica consiste en separar por calentamiento, en alambiques u otros vasos a las sustancias volátiles llamadas esencias que son inmiscibles en el agua, enfriando luego el vapor para reducirlas nuevamente a líquidos en conjunto con la esencia; ya que, la mayoría de los AE son una mezcla de compuestos volátiles, estos van a cumplir la Ley de Raoult, es decir que en el proceso de destilación a una temperatura dada, la presión total del vapor ejercida por el AE, será la suma de las presiones de vapor de sus componentes individuales. Por lo que, durante el proceso de destilación, la vaporización del AE ocurre a una temperatura menor que la del punto de ebullición del agua (SENA, 2010) (Paredes Punina & Quinatoa Chicaiza, 2010).

Destilación con arrastre de vapor de agua

Es el proceso más común para extracción de AE, gracias a la asociación de las moléculas del agua en conjunto con las moléculas del AE presentes en la materia vegetal. Siendo así, que el proceso se efectúa cuando el vapor de agua entra en contacto con la materia vegetal y libera la esencia para luego ser condensada. Con el fin de asegurar una mayor superficie de contacto y exposición de las glándulas que contienen el AE; se requiere trocear la materia vegetal para una mayor superficie de contacto (Paredes Punina & Quinatoa Chicaiza, 2010).

Descripción del proceso, de acuerdo a Paredes Punina, el vapor de agua es el principal actor al provocar que los AE se difundan desde las membranas de la célula



hacia afuera. Los vapores de agua y AE que salen se enfrían hasta regresar a la fase líquida y se separan en un decantador.

Ventajas: energéticamente es más eficiente, se tiene control en la velocidad de destilación, se puede variar la presión de vapor y a su vez éste método satisface mejor las operaciones comerciales a escala al proveer resultados más constantes y reproducibles.

Desventajas: se pueden presentar la polimerización y resinificación de los terpenos; así como también hidrólisis de ésteres y destrucción térmica de algunos componentes en la materia vegetal (SENA, 2010) (Paredes Punina & Quinatoa Chicaiza, 2010).

Destilación con agua o hidrodestilación

En este proceso la materia vegetal debe estar siempre en contacto con el agua, para así evitar el sobrecalentamiento y la carbonización del mismo. Debe mantenerse en constante agitación para evitar que haya aglomeración o que se sedimenten en las paredes del recipiente (Paredes Punina & Quinatoa Chicaiza, 2010).

Descripción del proceso, consiste en poner a hervir agua, bien sea por fuego directo, camisa de vapor o camisa de aceite, en la cual se ha sumergido previamente la materia vegetal (preferible que esté en polvo); con el objetivo de que el vapor de agua ejerza su acción en el mayor número posible de partículas vegetales. Similar al arrastre con vapor, este ayuda en el arrastre de los AE hasta otro recipiente donde se condensan y se separan.

Ventajas: bajo costo en maquinaria.

Desventajas: la extracción del AE es incompleta y por ser un sistema particularmente empleado en zonas rurales se realiza como un arte y normalmente no se opera bajo condiciones óptimas de tiempo y temperatura.

Importancia, en general los AE producidos por destilación en agua son de menor calidad. Así:

- Sensibilidad ante la hidrólisis y la polimerización de algunos componentes.



- Solubilidad parcial de los compuestos oxigenados en el agua de destilación con lo que es imposible la remoción de los mismos.
- La calidad del producto final es baja por los tiempos requeridos que son prolongados (SENA, 2010).

Destilación agua-vapor o vapor húmedo

Este procedimiento se utiliza comúnmente en el agro con hierbas y hojas; la materia vegetal se coloca sobre una parrilla, luego entre el fondo y la parrilla se coloca agua hasta un nivel un poco inferior a la parrilla. Cuando se dispone de poca agua, esta sale con el AE en la primera extracción, se recircula al extractor para sostener el proceso.

El calentamiento se puede efectuar desde una fuente externa o dentro del propio cuerpo del extractor. Luego, el vapor de agua producido se satura, atraviesa la materia vegetal previo en la parrilla y provoca el arrastre del AE; no existe peligro del sobrecalentamiento ya que daría un olor desagradable. Sin embargo, este proceso no es conveniente para ninguna destilación comercial (SENA, 2010).

Destilación previa maceración

Proceso usado para extraer el AE de las semillas de almendras amargas, bulbos de cebolla y de ajo, semillas de mostaza; etc. En el caso de plantas aromáticas este proceso en agua caliente ayuda a la separación de su AE (SENA, 2010) (Vásquez Riberio, Alva, & Marreros Valles, 2009).

Destilación al vacío

Son nuevos diseños para aislar constituyentes del AE, basados en los diferentes puntos de ebullición. La mayor ventaja del método, es la mínima probabilidad de una descomposición y formación de compuestos no deseados, debido a las bajas temperaturas del proceso (SENA, 2010) (Paredes Punina & Quinatoa Chicaiza, 2010).



Destilación molecular

Proceso usado para obtener productos coloreados, estables y la recuperación de los compuestos más delicados que caracterizan los AE. Este proceso usa 10.3 a 10.6 libras fuerza por pulgada cuadrada (PSI), en conjunto con diversos solventes orgánicos, luego se obtiene el AE según su afinidad (SENA, 2010) (Mezza, 2015).

1.2.3 Extracción con solventes

Con disolventes volátiles

Este es un proceso que usa disolventes orgánicos como éter de petróleo, pentano, alcohol y cloroformo; utilizan diferentes puntos de ebullición, temperaturas bajas, para penetrar en la materia vegetal, lo que no provoca la termo-destrucción ni alteración química de los compuestos del AE. Siendo así, su uso solo a nivel de laboratorio, debido a que se pueden obtener esencias impurificadas con otras sustancias algunas veces tóxicas (SENA, 2010) (Paredes Punina & Quinatoa Chicaiza, 2010).

Maceración en grasa

Este proceso usa la grasa en caliente, basado en sumergir los pétalos de flores en grasa y luego extraer las AE con alcohol. Este método a sido reemplazado por la extracción con disolventes orgánicos (SENA, 2010) (Paredes Punina & Quinatoa Chicaiza, 2010).



Por fluidos supercríticos

Fluidos supercríticos (EFS) es un proceso que usa como material de arrastre sustancias químicas en condiciones especiales de temperatura y presión. La materia vegetal se corta en trozos pequeños, se licua y se empaca en una cámara de acero inoxidable por donde se hace circular un líquido supercrítico como el dióxido de carbono (CO_2). Los AE se solubilizan y el líquido supercrítico que actúa como solvente extractor se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente. Finalmente, se obtiene un AE puro (Paredes Punina & Quinatoa Chicaiza, 2010).

Ventajas: alto rendimiento, ecológicamente limpio, eliminación fácil del solvente el cual puede ser reusado y químicamente no se modifican los componentes del AE.

Desventajas: se obtienen ácidos grasos, pigmentos y ceras en conjunto con el AE. Además, que el equipo es relativamente costoso, ya que requiere bombas de alta presión y sistemas de extracción que también sean resistentes a las altas presiones (SENA, 2010).

1.3 Actividad antimicrobiana de aceites esenciales

Los mecanismos de acción de los AE han sido reportados gracias a su carácter hidrofóbico, el mismo que les permite incorporarse en los lípidos de las membranas bacterianas perturbando en su estructura y consecuentemente alterando su permeabilidad. Luego, da lugar a fugas de los iones y otros contenidos celulares vitales y conduciendo finalmente a la muerte de la célula (Ocares Cerón, 2012).

Además, los AE podrían actuar sobre las proteínas de la membrana citoplasmática ocasionando una alteración en la interacción lípido-proteína, afectando la actividad de enzimas como la ATP-asa, disminuyendo con ello la producción de energía requerida para el funcionamiento celular principalmente (Ocares Cerón, 2012).

Por lo que, la determinación de la actividad antimicrobiana de una sustancia sujeta a estudio es muy importante y representan las bases para el desarrollo de nuevos fármacos que ayudan a combatir a los microorganismos patógenos, debido al gran



beneficio que éstos traen a la salud humana; si bien en los países en vías de desarrollo la mayor parte de los medicamentos se derivan de plantas, es necesario siempre una evaluación científica que permita discernir si la planta usada es verdaderamente activa (Olivares Cruz & López Malo, 2013).

1.3.1 Factores que afectan la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

Vega Portocarrero establece que, los factores que intervienen son muy diversos, por lo que menciona entre los principales: el grado de inhibición que depende del tipo de microorganismo; de las variaciones en la composición de la planta, la especie, de la parte de la planta utilizada, de las diferencias en las zonas geográficas de cultivo; etc. Otros factores que también influyen en la actividad antimicrobiana son los intrínsecos y extrínsecos que están asociados con la actividad antimicrobiana; incluyéndose principalmente la temperatura, pH, concentración de iones en el medio de cultivo, etc (Vega Portocarrero & López Malo, 2009).

Siendo así, es necesario indicar que la temperatura durante la incubación en una prueba de actividad antibacteriana específica, debe ser la óptima para el crecimiento del microorganismo a evaluar ya que, en la mayoría de los casos, al ocurrir un incremento en la temperatura de incubación, se genera un aumento en el efecto antibacteriano del AE.

La actividad antibacteriana de los compuestos fenólicos presentes en los AE se ve favorecida por valores de pH bajos, ello se atribuye a un incremento de la solubilidad y estabilidad de estos compuestos, por ejemplo, a valores de pH bajos, ocurre una presencia de moléculas de compuestos fenólicos, como el timol que se encuentran mayormente no disociadas, presentándose regiones hidrofóbicas en las proteínas y disolviéndose mejor la fase de lípidos de la membrana (Vega Portocarrero & López Malo, 2009).



1.4 Enterobacterias

1.4.1 Definición

La familia *Enterobacteriaceae* constituye un grupo grande y heterogéneo de bacterias Gram (-). Está conformada por bacilos y cocobacilos de un tamaño de 2-3 micrómetros (um) de longitud por 0.4-0.6um de diámetro; constituyen 41 géneros y más de 100 especies. Por lo que, los representantes de este grupo son anaerobios facultativos y su crecimiento depende de que en el medio existan carbohidratos como fuente de carbono, pero en condiciones de aerobiosis la gama de sustratos apropiados para su crecimiento incluyen ácidos orgánicos, aminoácidos y carbohidratos.

Están muy diseminadas en la naturaleza, como en el agua, la tierra, en los animales; etc. Su hábitat natural en el hombre va desde el estómago al intestino grueso, la concentración va aumentando a lo largo del tubo digestivo. También, se localizan en pequeñas proporciones en las vías aéreas (Pachón Cubillos, 2009) (Merino & Losch, 2013).

1.4.2 Características generales

Según Pachón Cubillos, las Enterobacterias pueden comportarse como apatógenas, patógenas oportunistas y patógenas importantes. Siendo así, las primeras pueden encontrarse como contaminantes de muestras clínicas, al ser aisladas del ambiente o de materia fecal; mientras que las Enterobacterias patógenas oportunistas en ocasiones producen enfermedades a nivel del tracto digestivo y las patógenas pueden ocasionar daño a nivel sistémico, debido a que tienen una estructura antigénica compleja, la producción de toxinas; entre otros (Pachón Cubillos, 2009).

Además, se presentan otras características como:

- Se trata un grupo homogéneo de gamma proteobacterias, es decir una gran diversidad de formas encontradas.



- Son bacilos Gram (-) no esporulados.
- La mayoría son móviles (gracias a los flagelos).
- Son anaerobios facultativos.
- Reducen los nitratos a nitritos.
- Son oxidasa negativo (a excepción de *Plesiomonas*) y catalasa positivo.
- Son fermentadores de azúcares, como la glucosa a ácido con formación de ácidos y con producción de gas o sin ella.
- Son productores de toxinas: exotoxinas y endotoxinas.
- No ven favorecido su crecimiento por la presencia de cloruro de sodio (NaCl).
- Son indicadores de contaminación fecal.
- Tienen importancia médica, siendo los géneros representativos como: *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Proteus*, *Serratia*, *Yersinia*, *Klebsiella* y *Enterobacter* (Puerta García & Mateos Rodríguez, 2010).

1.4.3 Estructura

Presentan membrana plasmática, membrana externa, pared celular, estructuras citoplasmáticas, cápsula, fimbrias y ausencia de envoltura nuclear (Prescott & Klein , 2013).

- **Membrana Plasmática o interna:** está formada por fosfolípidos, proteínas y enzimas. Estos participan en la producción de energía, crean el potencial de membrana y se encargan a su vez de los mecanismos de transporte (Mollinedo Patzi & Gonzáles Villalobos, 2014).
- **Pared Celular:** en las bacterias Gram (-) es compleja tanto química y estructuralmente. Sus componentes son:



- **Peptidoglucano o mureína**, es muy delgada representa un 5% al 10% del peso total de la pared celular. Está constituida por cadenas de tipo glucano de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico; proporciona rigidez y le da forma a la bacteria.

- **Espacio periplasmático**, se encuentra entre la superficie externa y la superficie interna de la membrana. Está constituida por una serie de enzimas hidrolíticas (fosfatasas, proteasas, lipasas, nucleasas y enzimas metabolizadoras de carbohidratos), las cuales son necesarias para degradar y metabolizar macromoléculas.

- **Membrana externa**, constituye una barrera de exclusión, no permite el ingreso de moléculas de gran tamaño, como proteínas, ya que su configuración es asimétrica. Debido, a que la zona interna está constituida de fosfolípidos y la zona externa por moléculas anfipáticas es decir, que poseen terminaciones hidrófilas e hidrófobas, llamadas lipopolisacáridos o endotoxinas.

- **Proteínas**, principalmente son las porinas que forman los poros y permiten la difusión de moléculas hidrófilas de un peso menor a 700 Da (Daltons), lipoproteínas que unen al peptidoglucano con la membrana externa, y proteínas de transporte.

-**Lipopolisacáridos (LPS)**, son componentes que estimulan para las respuestas inmunitarias (activación de los linfocitos B, liberación de interleucinas, factor de necrosis tumoral; etc). Además, de producir fiebre y otros efectos más graves como el shock (Mollinedo Patzi & Gonzáles Villalobos, 2014).

- **Cápsula**: son estructuras constituidas de proteínas o polisacáridos, siendo el limo que se forma cuando el grosor no es uniforme o cuando la adhesión no es muy fuerte, conociéndose como glucocálix.
- **Flagelos**: son largos apéndices extracelulares de forma helicoidal, compuestos por: filamento, gancho y corpúsculo basal; son responsables del desplazamiento de la bacteria en el medio donde se encuentre, lo cual le permite acercarse a nutrientes y evitar sustancias nocivas para las mismas.
- **Fimbrias**: son componentes filiformes, rectas, más cortas y finas que los flagelos. Pueden estar constituidos por uno, cientos o miles (Mollinedo Patzi & Gonzáles Villalobos, 2014).



1.4.4 Patogenia

Las Enterobacterias tienen gran importancia en el ámbito hospitalario donde pueden causar infecciones respiratorias, urinarias, de heridas, del Sistema Nervioso Central (SNC) y provocan problemas intestinales; al adherirse y atravesar la barrera de la mucosa gastrointestinal, manifestada por diarreas y deshidratación (Pachón Cubillos, 2009). Lo cual se debe a la presencia de factores determinantes en su estructura como:

- La **cápsula** que tiene propiedades de adhesión, es antifagocitaria y protege en contra de los antibióticos.
- Las **fimbrias** permiten la adherencia a células huéspedes, por lo que impiden el barrido por las barreras mecánicas de defensa del organismo.
- Algunas especies producen **exoenzimas** como la ureasa, gelatinasa, lipasa; etc. Las cuales permiten que la bacteria sobreviva dentro del órgano afectado.
- Todas las Enterobacterias poseen LPS de **pared**, el cual tiene acción de endotoxina, siendo esta que se libera al destruirse la bacteria (Merino & Losch, 2013).

1.4.5 Epidemiología

Las Enterobacterias representan el 80% de las bacterias Gram (-), aisladas en un laboratorio clínico que han desarrollado un fenotipo de multirresistencia complejo a los antibióticos, lo cual puede originarse por mecanismos de mutación en sus genes cromosómicos o bien por adquisición de genes localizados en sus estructuras genéticas móviles (plásmidos e integrones), este último constituye una vía eficaz para la diseminación de resistencias (Ruiz Garbajosa & Cantón, 2016).

Por lo que, el problema actual es la multirresistencia limitando las opciones terapéuticas. El *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) en su informe *Antimicrobial Resistance Threats* mencionó que las Enterobacterias son patógenos de especial interés epidemiológico, ya que con frecuencia causan infecciones en el ámbito hospitalario asociadas a una elevada morbimortalidad (Ruiz Garbajosa & Cantón, 2016).



Para combatir este problema es necesario la aplicación multidisciplinaria y medidas institucionales encaminadas a reducir la resistencia a los antibióticos. Siendo así que, a nivel del área de la salud, las medidas a tomar son la mejora en la detección oportuna de microorganismos multirresistentes, la utilización apropiada de los antibacterianos, lo cual debe ir de la mano de un manejo de las infecciones nosocomiales (Ruiz Garbajosa & Cantón, 2016).

En los individuos hospitalizados o inmunodeprimidos (incluye a los pacientes alcohólicos y diabéticos), en especial en aquellos pacientes que reciben tratamiento antibiótico, siempre van a estar presentes en forma frecuente la familia de la *Enterobacteriaceae* no solamente en el tubo digestivo, sino también en la orofaringe, el aparato genitourinario y la piel (Ruiz Garbajosa & Cantón, 2016).

En la actualidad se han aislado bacterias de esta familia a nivel nosocomial y adquiridos en la comunidad; los cuales son resistentes a múltiples antimicrobianos, como lo indica el informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) titulado *Antimicrobial resistance: global report on surveillance* (resistencia a los antimicrobianos: informe mundial sobre vigilancia), para el caso de *E. coli* desde el año 2014 se ha desarrollado resistencia a las fluoroquinolonas, este tratamiento es el más utilizado para las infecciones urinarias, por lo cual en muchos países del mundo este tratamiento es ineficaz en más de la mitad de los pacientes (Mediacentre, 2014).

Así también, se incluyen los productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) resistentes a los β -lactámicos (Mediacentre, 2014).

Por otro lado, además de la resistencia a los antimicrobianos se presentan otros factores que han contribuido al incremento de las infecciones por Enterobacterias en los hospitales como: el uso cada vez mayor de técnicas de diagnóstico y terapéuticas agresivas (catéteres intravenosos, endoscopias, intervenciones de cirugía), otros son el empleo de potentes inmunosupresores y las estancias prolongadas (Puerta García & Mateos Rodríguez, 2010).



1.5 *Escherichia coli*

1.5.1 Definición

Se define como uno de los microorganismos que se halla presente a nivel del tracto gastrointestinal y su determinación en alimentos es indicativo de contaminación al momento del procesamiento de los mismos. Además, este microorganismo presenta diversas cepas que son patógenas para el ser humano, las cuales ejercen un efecto negativo mediante diversos mecanismos, pudiéndose resaltar los siguientes: producción de toxinas, adhesión e invasión a las células del huésped, interferencia con el metabolismo celular, destrucción de tejidos; entre otros.

Debido a la existencia de cepas virulentas de *E. coli* y al ser un microorganismo Gram (-) que presenta una estructura compleja formada por una doble membrana fosfolipídica (Mediacentre, 2016).

1.5.2 Estructura antigénica

Los antígenos de esta bacteria se utilizan para la biotipificación. Se presentan los antígenos O (somático), H (flagelar) y K (capsular) y son importantes como referencia inmunológica. El **antígeno O** es un polisacárido termoestable, que forma parte del LPS localizado en la membrana externa de la bacteria. El **antígeno K** corresponde al polisacárido capsular que envuelve a la bacteria. En la actualidad se conocen un total de 185 antígenos somáticos, 56 flagelares y 60 capsulares.

Por ejemplo, en el caso de *E.coli*, en la cual la combinación de uno o más antígenos somáticos y flagelares permiten clasificarlo en serotipos; donde el antígeno O u somático define su serogrupo según las características antigénicas de su LPS. A su vez, los serogrupos se hallan integrados por distintos serotipos que permiten la diferenciación de las subespecies como el caso de los antígenos H (flagelar) (Molina López & Campos Eslava, 2015) (Custodio Marroquín, 2009).



1.5.3 Virulencia

Para *E. coli* se presentan las principales características de virulencia:

- **Fimbrias:** estas estructuras por su capacidad de adherencia en células intestinales, pueden actuar ya sea en forma localizada, agregativa o difusa.
- **Antígenos O y K:** presentan propiedades anti fagocitarias e inhibidoras de las sustancias bactericidas del suero, estas son responsables de la virulencia de las cepas invasivas.
- **Endotoxinas:** está ligada al LPS, responsable de la acción pirógena.
- **Exotoxinas:** son responsables de la producción de diarreas y su síntesis; está codificada por la presencia de plásmidos transmisibles (Ortiz & Méndez, 2013).

1.5.4 Patogenia y patología

Principalmente *E. coli* puede causar infecciones intestinales y extraintestinales la mayoría graves, como infecciones del aparato excretor, cistitis, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía, o en diversas ubicaciones (articulaciones, globos oculares, glándulas, hígado, cerebro, corazón, venas y otros). Aunque, la mayoría de las cepas de este microorganismo no son patógenas, debido a que dependen del sitio anatómico, pueden ser patógenos oportunistas causando infecciones en el hospedador inmunocomprometido (Flores Palacios & Puente Puente, UPLA, 2016).

A su vez, estos tipos comparten diversos factores de virulencia. Así, ciertos antígenos O actúan como factores de adhesión/colonización necesarios para que se dé la infección, otros actúan como toxinas. Por otro lado, los antígenos H están ligados a la producción del síndrome hemolítico urémico (SUH) y los antígenos K como su variante capsular K1 de *E. coli* se asocian al desarrollo de meningitis neonatal, bacteriemia e infección urinaria (Maza Marcatoma & Clavijo Paltin, 2017).

Se mencionan las principales enfermedades causadas por este microorganismo como:



- Infección urinaria la más común, debido al ser por lo general una infección ascendente desde el periné, a través de la uretra la más común en el caso de las mujeres.
- Infección entérica.
- Infección invasiva (es raro, excepto en los recién nacidos) (MSD, 2017).

De acuerdo a algunas de las cepas de *E. coli* han adquirido genes que les permiten causar patologías a un ser vivo, se presentan:

- ***E. coli* shigatoxigénica (STEC) o *E. coli* verotoxigénica (ECVT)**, produce citotoxinas denominadas verotoxinas (VT) o toxinas Shiga (Stx por su semejanza con la toxina producida por *Shigella dysenteriae*) provoca síntomas desde una diarrea suave hasta una diarrea grave, que en un 10% de los casos puede transformarse en una enfermedad con riesgo vital como el SUH en especial en pacientes jóvenes y ancianos.
- ***E. coli* enterohemorrágica (ECEH)**, es una variedad de la STEC la cual tiende a producir por lo general diarrea sanguinolenta y el SUH. Además, producen cambios en las células del epitelio intestinal denominados lesiones adherentes y destructoras.
- ***E. coli* enterotoxigénica (ECET)**, esta se adhiere al intestino delgado mediante antígenos del factor de colonización y producen enterotoxinas con sus respectivas variantes, las cuales provocan una alteración del balance de cloruro de sodio que da lugar a una intensa diarrea acuosa.
- ***E. coli* enteroinvasiva (ECEI)**, penetra y se difunde entre las células intestinales, destruyéndolas y provocando una diarrea sanguinolenta similar a la disentería.
- ***E. coli* enteropatogénica (ECEP)**, esta se adhiere al epitelio intestinal, donde se asocia con la producción de lesiones adherentes y destructoras semejantes a las de ECEH; dando como resultado una intensa diarrea acuosa y a veces sanguinolenta, particularmente entre niños.
- ***E. coli* enteroagregativa (ECEA)**, se adhiere en la superficie celular formando una estructura agregativa característica, gracias a una toxina enteroagregativa codificada en plásmidos (EAST1) contribuyen a los síntomas diarreicos.
- ***E. coli* de adherencia difusa (ECAD)**, tiene un perfil menos claro y provoca diarrea en niños (FAO, 2011) (MSD, 2017).



1.5.5 Epidemiología

E. coli es uno de los microorganismos más cosmopolitas, siendo uno de los principales causantes de enfermedades gastrointestinales e infección de vías urinarias (IVU).

Según Parreño y Corrales, los problemas gastrointestinales ocasionados por este microorganismo son unas de las primeras causas de consulta médica y de muerte a nivel mundial; siendo considerado un problema de Salud Pública, debido a que afecta a personas de cualquier edad y condición social. Éste representa alrededor del 4% de los casos de enfermedades diarreicas reportadas, siendo los grupos más vulnerables los niños menores de 5 años y los ancianos (Parreño Corrales & Villacres Guevara, 2012).

Según la OMS, se estima que cada año se presentan alrededor de 1.500 millones de episodios diarreicos ocasionados por *E. coli*, siendo afectados principalmente los países en vías de desarrollo, debido en la mayoría de los casos al consumo de alimentos y agua contaminados con materia fecal (Hernández Cortez, Aguilera Arreola, & Castro Escarpulli, 2011).

De acuerdo a Darquea Leoro, las IVU son una de las infecciones más comunes, al ser tanto nosocomiales como adquiridas en la comunidad, se ha observado que alrededor del 12%-50% de estas infecciones son provocadas por *E. coli*, en el caso de las mujeres, estas se generan principalmente, debido a razones anatómicas como: la uretra que es más corta y la cercanía de esta a focos de posible infección, como son el introito vaginal y el ano; pudiendo ser otra de las causas las relaciones sexuales. En el caso del género masculino, es a partir de la quinta década de su vida que se acompaña por dificultades en el tránsito de orina (Darquea Leoro, 2014).

Pilapanta indica que, alrededor de un 20% de las mujeres de entre 20 a 50 años son afectadas por IVU y sólo el 0.1% en los hombres en idéntico rango de edad (Pilapanta, 2015).



1.5.6 Descripción de la cepa ATCC *E. coli* 25922

Este microorganismo es una cepa de control de la Clinical and Laboratory Standards Institute 2017 (**CLSI 2017**) para pruebas de susceptibilidad a los antibióticos. Se utiliza para pruebas de calidad de medios de cultivo, como un control negativo para la producción de toxinas LT (Toxina Letal). Particularmente, se emplean en la prueba del disco de susceptibilidad a neomicina, colistina (colimicina), kanamicina, cefalexina, gentamicina, cefamandol, cefalotina, tetraciclina, cefaloglicina, cefaloridina (Cefalomicina), ácido nalidíxico y cloranfenicol como principales antibióticos reportados.

Se ha encontrado que cuando se realiza un cultivo de este microorganismo en caldo de tripticasa soya, a menudo resulta en un cambio en los niveles de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Por lo tanto, lo mejor es mantenerlo en agar en donde las colonias son enteras, brillantes, circulares, lisas, translúcidas y convexas bajas (ATCC Product Sheet, 2017).

1.6 Uso indiscriminado de los antimicrobianos

Los antibióticos desde su descubrimiento en el año de 1.828 han permitido eliminar microorganismos patógenos que infectan a las personas, pero la eficacia de estos fármacos se ha reducido con el tiempo debido a la aparición de bacterias resistentes, según la OMS, el aumento de esta resistencia representa un inmenso peligro para la salud mundial. Se menciona que la resistencia se debe principalmente a dos factores fundamentales:

- **Desinformación a la población**, al usar antibióticos para tratar enfermedades que no corresponden, por ejemplo, para tratar resfriados y gripes causados por procesos virales y no bacterianos (Iberonews Limited, 2016).
- **La automedicación**, o cuando no se respeta el tratamiento impuesto por el médico; aquí se puede indicar que, en una encuesta realizada por la OMS, se observó que alrededor del 32% de los encuestados afirmaban que al sentir mejoría de sus malestares abandonaban el tratamiento con antibióticos.



La OMS, ha lamentado que los servicios de sanidad en el mundo no toman en cuenta la seriedad del mal uso de estos fármacos como un factor fundamental para la aparición de superbacterias (Iberonews Limited, 2016).

1.7 Opciones para mejorar el uso de los antimicrobianos

El uso de los antimicrobianos requiere una orientación de las decisiones terapéuticas dadas por los mismos pacientes y los prestadores de atención sanitaria; por lo que se indican los siguientes: el apropiado manejo de los medicamentos, de conformidad con las recomendaciones y las directrices terapéuticas para los pacientes que necesitan tratamiento con antimicrobianos. Además, desalentar el uso indiscriminado de los antimicrobianos en pacientes en los que es improbable que aporten cualquier beneficio (OMS, 2017).

1.8 El papel de la vigilancia

Se fundamenta en el respaldo de las decisiones clínicas, orientadas hacia la elaboración de directrices terapéuticas normalizadas, formularios nacionales que reflejen la distribución local de las infecciones y la resistencia; evaluando el impacto de las intervenciones. Siendo así, necesaria la información sobre la distribución local de enfermedades, la evolución de la resistencia a los antimicrobianos y los comportamientos relacionados con el uso de estos fármacos (OMS, 2017).



1.9 Plantas estudiadas

1.9.1 Jengibre

Nombre científico: *Zingiber spp.*

Esta es una planta que pertenece a la familia *Zingiberácea*, alcanza una altura de 60cm a 120cm; presenta un rizoma tuberoso y grueso; el cual es la parte usada, es de un sabor picante y un olor aromático, hojas lanceoladas, rara vez se observan flores verdosas y por ende da frutos de manera esporádica.

Si bien se trata de una planta de origen Asiático de clima tropical; se ha adaptado y permite ser cultivado en distintas regiones siempre y cuando se traten de suelos arenosos, fértiles y con buen drenaje (Mahabir P., 2003) (Ochoa Pumaylle, Paredes Quiroz, & Silva Paz, 2012).

Características del aceite esencial

Alrededor del 0,5% al 3% del contenido de una muestra de Jengibre se halla formada por AE; el mismo que se está compuesto por: monoterpenos, tales como el canfeno 8%, alfa pineno 2,5%, cinelol, citral bornerol, mirceno, limoneno, felandreno; entre otros componentes, cuya mezcla hace que el Jengibre tenga esa fragancia característica (Mahabir P., 2003).

Usos medicinales

Sus rizomas se hallan ampliamente utilizados para tratar diversas molestias y se han realizado estudios que han permitido valorar actividades como antieméticas, antiinflamatorias, antimicrobianas, diuréticas; entre otros usos.

La actividad antimicrobiana, se debe según diversas publicaciones a la acción de un conjunto de sesquiterpenos de la oleorresina, principalmente de β -sesquifelandreno, los cuales en estudios "*in vitro*" resultaron que inhibían el rinovirus, con extractos de raíz de Jengibre con diclorometano, metanol y etanólicos.



También, se han exhibido la actividad bactericida en estudios “*in vitro*”, frente a microorganismos tanto Gram (+) como Gram (-) debido, a que el extracto suele ser activo en concentraciones de alrededor de 500ug/disco por el método de difusión en disco (Mahabir P., 2003) (Ochoa Pumaylle, Paredes Quiroz, & Silva Paz, 2012).

1.9.2 Lavanda

Nombre científico: *Lavanda spp.*

Es una planta que pertenece a la familia de las *Lamiáceas*, presenta unas hojas lanceoladas de 2,5cm de longitud, con flores bilabiadas de color azul-grisáceo o violáceo, la floración se da entre mediados de verano hasta principios de otoño.

Su origen se remonta ha zonas mediterráneas, pero actualmente se ha extendido a casi todos los continentes, se emplean sus flores las cuales en época de verano presentan un contenido máximo de AE de olor agradable (García Suárez & Serrano, 2014) (Mahabir P., 2003).

Características del aceite esencial

Su contenido de AE se estima en alrededor de un 0,5%-3% obtenido por medio de la técnica de destilación por corriente de vapor.

En cuanto a su composición se destacan los ésteres identificados como acetato de linalilo. También, se ha observado la presencia de monoterpenos en un 5%; dentro de los cuales destacan el α -pineno, β -pineno, limoneno, alocimeno; entre otros (Mahabir P., 2003).

Usos medicinales

Se han reportado propiedades digestivas (carminativa, espasmolítica), antiséptica, analgésicas, hipotensoras y sedantes.

En cuanto a su actividad antimicrobiana podemos destacar que según algunos estudios realizados el AE de Lavanda no mostró actividad inhibitoria frente a cultivos de *E. coli*, *Bacillus subtilis*, entre otros microorganismos estudiados.



Pero, otros estudios han demostrado que el AE presenta actividad frente a *Acinetobacter calcoaeticus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*. Así también, se logró evidenciar que presenta actividad acaricida y se logró demostrar que presentaba actividad frente a hongos filamentosos (European Medicines Agency, 2012) (Mahabir P., 2003).

1.9.3 Orégano

Nombre científico: *Oreganum spp.*

Es una planta que pertenece a la familia de las *Lamiáceas*, presenta hojas ovaladas, opuestas, su color es verde, presenta flores pequeñas de color rosado que puede variar a púrpura o blanquecinas, suele producir un fruto de bordes lisos. Por lo que, se emplean sus hojas y flores.

En cuanto a su origen este se remonta ha zonas mediterráneas y otras regiones occidentales de Asia (Bastos Oyarzabal, Damé Schuch, & Braga de Mello, 2011).

Características del aceite esencial

El AE se halla en una concentración de alrededor de 0,15%-0,90% de la planta seca; se obtiene por destilación con arrastre de vapor.

El principal componente del AE son fenoles en un 90%, de los cuales podemos mencionar la presencia de timol, terpineol, carvacrol; así también, se ha observado la presencia de hidrocarburos monoterpénicos (β -cariofileno, bisaboleno), entre otros componentes (Mahabir P., 2003) (Reyes Jurado, Palou, & Malo López, 2009) (Charai & Mosaddak, 1996).

Usos medicinales

Se emplea su AE para tratar problemas digestivos, respiratorios, micóticos y como antioxidante.

En cuanto a su actividad antimicrobiana, se ha documentado tanto actividad antibacteriana, antimicótica y antiviral de su AE; estudios "*in vitro*" han demostrado la actividad antimicrobiana frente a *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, también se ha



documentado que extractos de partes aéreas de Orégano presentaron actividad frente a *Helicobacter pylori* (Bastos Oyarzabal, Damé Schuch, & Braga de Mello, 2011) (Elizari Reta, 2013) (Prudent & Baccou, 1995).

1.9.4 Ruda

Nombre Científico: *Ruta spp.*

Es una planta que pertenece a la familia *Rutáceas*, se trata de una planta subarborescente muy aromática; presenta hojas de color verde azulado, glándulas translúcidas con AE responsable de su fragancia característica, con flores terminales amarillentas y tiene frutos capsulados redondeados.

Se trata de una planta oriunda del Mediterráneo y del Asia Menor; se desarrolla con relativa facilidad en suelos rocosos, secos y cerca de huertas. Además, que su distribución es mundial.

Se emplea sus hojas antes de la floración y en ciertas ocasiones también sus flores cuando empiezan a abrirse (Pino, Sánchez , & Montes de Oca, 2014).

Características del aceite esencial

El AE se halla en una concentración de alrededor del 0,1%-0,6%; está constituido por ésteres, monoterpenos, cetonas, alcoholes, entre otros compuestos (Mahabir P., 2003) (Pino, Sánchez , & Montes de Oca, 2014).

Usos medicinales

Presenta efecto antiparasitario, espasmolíticas, fotosensibilizantes, entre otras destacadas funciones en el organismo humano.

Varios estudios han reportado que tanto su AE como extractos alcohólicos han demostrado actividad antimicrobiana frente a diversos microorganismos entre ellos, *Micrococcus*. Así también, se ha reportado que el extracto etanólico de hojas de Ruda inhibió el desarrollo de *Pseudomonas aeruginosa*, observándose resultados similares con *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* (Mahabir P., 2003) (Bretado de Santiago, Ávila Martínez, & Borjón Arroyo, 2015).



1.9.5 Hierba luisa

Nombre científico: *Cymbopogon spp.*

Se trata de una planta que pertenece a la familia de las *Poáceas*, nativa del continente Asiático, pero actualmente se halla distribuida a nivel mundial.

Se emplean sus hojas las cuales miden de 20cm a 100cm de largo por 1,5cm de ancho. Es una hierba aromática con un aroma ligero a limón; su desarrollo óptimo se da en suelos arcillosos, con un buen drenaje (Guerra Ordoñez & Llerena Rangel, 2014).

Características del aceite esencial

El contenido de AE a nivel de sus hojas oscila entre el 0,8%-1,5%, se halla compuesto en un 75%-85% por citral, geraniol, linalol, metilheptona, limoneno; entre otras sustancias (Mahabir P., 2003).

Usos medicinales

Se han reportado que sus hojas presentan propiedades antiespasmódicas, contra el vértigo, migraña, carminativas, combate la halitosis, afecciones respiratorias, presenta acción expectorante, ayuda a tratar en insomnio (Guerra Ordoñez & Llerena Rangel, 2014) (Mahabir P., 2003) (Meza Angos & Vargas Duque, 2013).



CAPITULO 2

METODOLOGÍA

2.1 Tipo de investigación

La investigación es de tipo experimental, cuantitativo/cualitativo.

2.2 Variables

2.2.1 Variable Independiente

Tabla 2. Definición de variables independientes

VARIABLES	DEFINICIÓN	DIMENSIÓN	INDICADOR
Aceites esenciales	Son compuestos aromáticos obtenidos generalmente por arrastre de vapor, que contiene sustancias responsables del aroma de las plantas y que presentan importancia a nivel de la salud (Flores Gutiérrez, 2010).	Tres niveles	Control positivo de aceite esencial con actividad positiva (+); un aceite esencial que no presente actividad, control negativo (-) y tres aceites esenciales cuya actividad ha sido probada
Concentraciones de aceites esenciales.	Cantidad de aceite esencial expresado en % v/v a emplearse en cada dilución en agar (León Méndez & Martínez Useche, 2015).	0.03% v/v AE/MHA 0.06% v/v AE/MHA 0.12% v/v AE/MHA 0.24% v/v AE/MHA 0.48% v/v AE/MHA	Si presentaron o no actividad antimicrobiana los aceites esenciales a las distintas concentraciones



Concentración de antibiótico a emplear (Ampicilina).	Ampicilina es un antibiótico semisintético, derivado de un núcleo penicilínico, empleado como control del proceso (Pediámecum, 2015).	16ug, 8ug, 4ug y 1ug	Concentraciones entre 8ug a 2ug de Ampicilina presentan actividad inhibitoria frente a la cepa ATCC <i>E. coli</i> 25922 seleccionada, según manual CLSI 2017 .
--	---	----------------------	--

Fuente: Autores

2.2.2 Variable Dependiente

Tabla 3. Definición de la variable dependiente

VARIABLES	DEFINICIÓN	DIMENSIÓN	INDICADOR
Actividad antimicrobiana	Propiedad que presentan ciertas sustancias de origen natural o sintético, sus componentes o extractos; que permiten inhibir, eliminar o controlar el desarrollo de un microorganismo o grupo de microorganismos (Ocares Cerón, 2012).	Positivo o negativo	Inhibe o no el crecimiento microbiano

Fuente: Autores



2.3 Metodica de trabajo

2.3.1 Recolección de las plantas de estudio

Algunas de las plantas estudiadas fueron recolectadas de huertas familiares y otras adquiridas en el mercado 10 de Agosto de la ciudad de Cuenca. Luego, tras el proceso de recolección se colocaron las plantas en bolsas de papel para su traslado hacia el Laboratorio de Fitoquímica del Programa VLIR-IUC/Universidad de Cuenca.

2.3.2 Selección y lavado

En el laboratorio se realizaron la selección y limpieza de las mismas; empezando primero con un lavado con agua potable y posteriormente un enjuague con agua destilada durante 5 minutos. Previamente se realizó la sanitización de las mallas de acero inoxidable con etanol al 70% y sobre ellas se colocó un papel periódico para evitar que la droga entre en contacto directo con el metal. Finalizado el proceso de lavado, se colocó la materia vegetal sobre el papel periódico que cubría las mallas de acero inoxidable.

2.3.3 Secado y troceado

El proceso de secado duró aproximadamente entre 12 a 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, la materia vegetal fue pesada una cantidad de 200g para cada ensayo y luego fue troceada hasta obtener partículas aproximadamente de 5 milímetros (mm) de longitud.

2.3.4 Obtención del aceite esencial

La obtención de los AE fue realizada mediante destilación por arrastre de vapor, los mismos que fueron recolectados de la trampa tipo Clevenger y colocados



respectivamente en tubos tapa rosca donde se adicionó una pequeña cantidad de sulfato de sodio para atrapar el agua que pudiese haber. Para luego, ser homogeneizado el AE y el sulfato de sodio en un vórtex; y posteriormente centrifugado a 3000 revoluciones por minuto (rpm) por 5 minutos.

Una vez obtenidos los AE, fueron colocados en otros tubos de tapa rosca, los cuales fueron pesados previamente en una balanza analítica, para con ello calcular sus rendimientos y finalmente emplearlos para la técnica de dilución en agar de la **CLSI 2017** modificada por Katherine A. et al; para la estimación de la actividad antimicrobiana frente a una cepa ATCC de *E. coli* 25922 (K. A. Hammer, 1999).

2.4 Método de dilución en agar

Es utilizado generalmente para determinar si el AE es letal contra microorganismos aerobios o microaerofílicos con velocidad variable de crecimiento. Para esta técnica, se prepararán diferentes concentraciones de los AE a las cuales son añadidas al agar y éste es puesto en cajas petri para su solidificación. Finalmente, los microorganismos en prueba son inoculados en los agares e incubados a temperatura (35°C-37°C) y tiempos óptimos (16-24 h).

Por definición, la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) es considerada como la menor concentración que inhibe el crecimiento visible; las principales ventajas del método son: posibilidad de evaluar muchos microorganismos a la vez, facilidad para detectar contaminación y el hecho de que el agar puede contener materiales opacos sin afectar los resultados, a diferencia de otros métodos que evalúan mediante turbidez o lectura de absorbancia (Reyes Jurado & López Malo, 2014) (Remmal, Bouchikhi, & Ettayebi, 1993).



2.4.1 Modificaciones para el método de dilución en agar mueller hinton

La modificación fue realizada, debido a la necesidad de la adición de un agente emulsificante para lograr de esta forma que se genere una disminución de la tensión superficial entre el AE y el agua del medio, con lo cual se favorece la formación de la emulsión y por ende permite generar el efecto antimicrobiano del AE al aplicar la técnica de dilución en agar (K. A. Hammer, 1999).

Para la validación de la técnica de dilución en agar modificada se empleó una escala de cinco concentraciones en serie, de manera creciente y se trabajó por triplicado, las mismas que se presentan a continuación en la tabla 4:

Tabla 4. Concentraciones de los aceites esenciales para la validación del método de dilución en agar

Concentraciones de los aceites esenciales empleados %v/v Aceite Esencial (AE) / Agar Mueller Hinton (MHA)
0,03 % v/v AE/MHA
0,06 % v/v AE/MHA
0,12% v/v AE/MHA
0,24% v/v AE/MHA
0,48% v/v AE/MHA

Fuente: (K. A. Hammer, 1999)

Se utilizó esta escala de concentraciones tanto para la validación de la técnica, como para la evaluación de la posible actividad antibacteriana de los AE a probar; ya que según los datos obtenidos tras la revisión bibliográfica se encontró que las concentraciones que mostraron actividad inhibitoria frente a microorganismos Gram (-) oscilan entre 0,03% v/v AE/MHA a una concentración del 2% v/v AE/MHA, documentándose como concentraciones activas, concentraciones inferiores al 0,24% v/v AE/MHA (K. A. Hammer, 1999) (Remmal, Bouchikhi, & Ettayebi, 1993).



2.6 Volumen de aceite esencial probado

Se trabajó con 5 concentraciones diferentes y por triplicado de acuerdo a la siguiente escala de concentraciones: **0.03% v/v AE/MHA, 0.06% v/v AE/MHA, 0.12% v/v AE/MHA, 0.24% v/v AE/MHA y 0.48% v/v AE/MHA.**

Se aplicó la ecuación porcentaje volumen para calcular los mililitros necesarios de cada AE:

$$\% \text{ v/v} = \frac{\text{ml de soluto}}{\text{ml de solución}} \times 100\%$$

2.6.1 Concentración de aceite esencial

$$\text{a) } 0.03\% \text{ v/v} = \frac{\text{ml de aceite esencial}}{20\text{ml de (MHA+Tween 20)}} \times 100\%$$

$$\text{ml de aceite esencial} = \frac{0.03\% \text{ v/v} \times 20\text{ml}}{100\%}$$

$$\text{ml de aceite esencial} = 0,006\text{ml de aceite esencial}$$

$$\text{b) } 0.06\% \text{ v/v} = \frac{\text{ml de aceite esencial}}{20\text{ml de (MHA+Tween 20)}} \times 100\%$$

$$\text{ml de aceite esencial} = \frac{0.06\% \text{ v/v} \times 20\text{ml}}{100\%}$$

$$\text{ml de aceite esencial} = 0,012\text{ml de aceite esencial}$$

$$\text{c) } 0.12\% \text{ v/v} = \frac{\text{ml de aceite esencial}}{20\text{ml de (MHA+Tween 20)}} \times 100\%$$

$$\text{ml de aceite esencial} = \frac{0.12\% \text{ v/v} \times 20\text{ml}}{100\%}$$

$$\text{ml de aceite esencial} = 0,024\text{ml de aceite esencial}$$



$$d) \ 0.24\% \ v/v = \frac{ml \ de \ aceite \ esencial}{20ml \ de \ (MHA+Tween \ 20)} \times 100\%$$

$$ml \ de \ aceite \ esencial = \frac{0.24\% \ v/v \times 20ml}{100\%}$$

ml de aceite esencial = 0,048ml de aceite esencial

$$e) \ 0.48\% \ v/v = \frac{ml \ de \ aceite \ esencial}{20ml \ de \ (MHA+Tween \ 20)} \times 100\%$$

$$ml \ de \ aceite \ esencial = \frac{0.48\% \ v/v \times 20ml}{100\%}$$

ml de aceite esencial = 0,096ml de aceite esencial

- Con una pipeta volumétrica estéril se colocó en cada caja petri 20ml de la emulsión y se homogeneizó con movimientos en sentido de las manecillas del reloj y contrarios (esto elimina las burbujas de aire atrapadas).
- Una vez solidificado el MHA más Tween 20 y el AE se procedió a inocular 2 microlitros (ul) de la suspensión 1×10^4 de la cepa ATCC de *E. coli* 25922.

2.7 Concentración de la suspensión bacteriana de la cepa ATCC de *E. coli* 25922

Se trabajó con una concentración de 1×10^4 UFC/ml de *E. coli* 25922.

Volumen de 1000ul

$4,2 \times 10^6$ UFC Stock de *E. coli* 25922

X3 = 2,38ul

1×10^4 UFC

Se debía pipetear 2,38ul de la suspensión de *E. coli* 25922 de concentración $4,2 \times 10^6$ Unidades Formadoras de Colonias (UFC) y adicionar 997,62ul de solución salina estéril. Pero, debido a que 2,38ul es un volumen muy pequeño lo cual podría generar errores al pipetear se decidió trabajar con un volumen 10 veces mayor lo cual facilitó el proceso de elaborar el stock de la suspensión bacteriana.



Se trabajó con 23,8ul de la suspensión de *E. coli* 25922 de concentración $4,2 \times 10^6$ UFC y se le adicionó 9976,2ul o 9,9762ml de solución salina estéril.

- Se determinó la CMI y se comprobó dicha actividad antimicrobiana mediante la comparación con estándares de actividad ya valorada (conocida) de acuerdo a revisiones bibliográficas previamente realizadas.

2.8 Preparación del stock de antibiótico

- Se trabajó con Ampicilina cuya presentación fue de 1g en 4ml.

A partir de esta suspensión se elaboró el stock de antibiótico empleado como control ésto se realizó para obtener una concentración final de 16ug; 8ug; 4ug y 1ug; ya que al revisar previamente el manual **CLSI 2017** se observó que los puntos de cohorte para *E. coli* estaban dentro del rango de 8ug a 2ug.

1g o (1000mg) en ml de ampicilina

250.000ug de ampicilina en 1ml de solución

2000ug **X= 0,008ml equivalente a 8ul**

Para no trabajar con un volumen tan pequeño se prefirió aumentar el volumen 10 veces. Se empleó 80ul de la solución preparada de Ampicilina y se adicionó 920ul de agua destilada estéril, para con ello obtener 1ml de suspensión de antibiótico de 2000ug de concentración.

A partir de esta solución stock de 2000ug en 1ml se realizó los cálculos para elaborar los controles de antibiótico de la siguiente manera:

2.8.1 Concentración del antibiótico requerido a partir del stock elaborado

Concentraciones: 16ug; 8ug; 4ug y 1ug.



A) 16ug (concentración final deseada) en 1ml

X1= 320ug en 20ml de MHA

2000ug de Ampicilina en 1ml de suspensión

320ug en **X= 0,16ml de suspensión**

B) 8ug (concentración final deseada) en 1ml

X2= 160ug en 20ml de MHA

2000ug de ampicilina en 1ml de suspensión

160ug en **X= 0,08ml de suspensión**

C) 4ug (concentración final deseada) en 1ml

X2= 80ug en 20ml de MHA

2000ug de Ampicilina en 1ml de suspensión

80ug en **X= 0,04ml de suspensión**

D) 1ug (concentración final deseada) en 1ml

X2= 10ug en 20ml de MHA

2000ug de Ampicilina en 1ml de suspensión

10ug en **X= 0,01 de suspensión**

2.8.2 Controles de antibiótico

Se colocó el volumen indicado de acuerdo a los cálculos realizados anteriormente, por ejemplo, se colocó 160ul de la solución stock de antibiótico de concentración conocida de 2000ug/ml en el fondo de la caja y se procedió a añadir 20ml (MHA + Tween 20); se homogeneizó con movimientos en sentido de las manecillas del reloj y contrarias.



- **Inoculación bacteriana**

Tras la elaboración de las emulsiones de AE se procedió a sembrar 26ul de la suspensión bacteriana de concentración 1×10^4 UFC de *E. coli* 25922, colocando trece gotas de suspensión bacteriana por caja, cada gota contenía un volumen de 2ul incluidos los controles de antibiótico, el control positivo y a excepción de la caja que fue designada como control negativo la cual únicamente contenía (MHA + Tween 20) y la caja del control de solución salina estéril.

- **Incubación**

Finalmente, una vez que se realizó la inoculación bacteriana se procedió a incubar las cajas en una estufa a 37°C por 24 a 72 horas.

- **Revisión y reporte de resultados**

Tras el proceso de incubación se procedió a observar las cajas para reportar los resultados obtenidos, determinándose como positivo en las cajas que presentaron crecimiento y como negativo en las cajas donde no se observó crecimiento; para lo cual se realizó una comparación con los controles de actividad positiva y negativa.



CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria de aceites esenciales utilizados como control positivo y control negativo frente a la cepa ATCC de *E. coli* 25922

Aceites esenciales usados como controles (Nombre común)	Nombre científico	Control	Concentración mínima inhibitoria % v/v Aceite Esencial (AE) / Agar Mueller Hilton (MHA)	Microorganismo estudiado
Ruda	<i>Ruta spp.</i>	Control negativo (-)	> 0,48% v/v AE/MHA	<i>E. coli</i> 25922
Orégano	<i>Origanum spp.</i>	Control positivo (+)	0,12% v/v AE/MHA	<i>E. coli</i> 25922

Fuente: Autores

Tabla 6. Concentración mínima inhibitoria de aceites esenciales cuya actividad fue valorada

Plantas estudiadas (Nombre común)	Nombre científico	Concentración mínima inhibitoria % v/v Aceite Esencial (AE) / Agar Mueller Hilton (MHA)	Microorganismo estudiado
Jengibre	<i>Zingiber spp.</i>	0,12% v/v AE/MHA	<i>E. coli</i> 25922
Hierba luisa	<i>Cymbopon spp.</i>	0,06% v/v AE/MHA	<i>E. coli</i> 25922
Lavanda	<i>Lavandula spp.</i>	0,48% v/v AE/MHA	<i>E. coli</i> 25922

Fuente: Autores



DISCUSIÓN

Mediante la realización de este trabajo de titulación se ha validado la técnica de dilución en agar modificada por Katherine A. et al., para la estimación de la actividad antimicrobiana frente a una cepa American Type Culture Collection (ATCC) de *Escherichia coli* (*E. coli*) que permite valorar el potencial antibacteriano de aceites esenciales (AE); demostrándose la hipótesis planteada ya que se obtuvieron resultados iguales a los publicados por diferentes autores, cuyo análisis se hará a continuación.

El AE de *Orégano spp.*, utilizado como control positivo presentó actividad antibacteriana frente a la cepa ATCC de *E. coli* 25922 como se indica en la tabla 5, la misma que fue inhibida a una concentración de 0,12%v/v AE/MHA; resultado que concuerda con lo expuesto en la publicación realizada por Katherine A. et al (K. A. Hammer, 1999).

Como control negativo se empleó el AE de *Ruda spp.*, ya que tras las revisiones bibliográficas realizadas preliminarmente señalaron que no presenta actividad frente a microorganismos Gram (-), específicamente frente a la cepa *E. coli* como lo indica A. Ivanova. et al., en su estudio titulado “Actividad Antimicrobiana y Citotóxica de *Ruta graveolens*” en el que trabajó con extractos polares y apolares, los mismos que no presentaron actividad frente al microorganismo estudiado (Ivanova, Mikhova, Najdenski, Tsvetkova, & Kostova, 2005).

Así también, se puede indicar que según el estudio realizado por Farah Haddouchi A. et al., titulado “Composición Química y Actividad Antimicrobiana del Aceite Esencial de Cuatro Especies de Ruda cultivadas en Algeria” en el que se trabajó con AE de Ruda, no presentaron actividad frente a la cepa de *E. coli* probada mediante la técnica de difusión en disco; lo cual sirvió de base para emplearlo como control negativo sin obtener ninguna actividad frente a la cepa estudiada como se observa en la tabla 5 (Haddouchi & Benmansour, 2013).

Tras evidenciar que la técnica funciona, en las condiciones empleadas se probó el potencial antibacteriano de tres AE más, como se indica en la tabla 6, los mismos que fueron: *Hierba luisa spp.*, *Jengibre spp.* y *Lavanda spp.*; si bien existen referencias tanto de relatos populares como de estudios científicos que demuestran el potencial antimicrobiano de los AE en mención, se puede indicar que en el caso del AE de *Hierba*



luisa spp., presentó una CMI de 0,06%v/v AE/MHA, concordando con la concentración citada en el artículo publicado por la Dra. Sara Burt, en el año 2004 y a su vez también con la publicación de Katherine A. et al. (Burt, 2004) (K. A. Hammer, 1999).

En el caso del AE de *Jengibre spp.*, de acuerdo a la tabla 6, si bien existen varios estudios en los cuales se ha evidenciado que no presenta actividad antibacteriana frente a microorganismos Gram (-) como los resultados obtenidos en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo en el año 2004; o en el reportado por Katherine A. et al., según el cual se probó la actividad antibacteriana del Jengibre y se determinó que no presentaba actividad inclusive a concentraciones del 2%v/v AE/MHA (Orozco Iguasnia & Castro Gómez, 2004) (K. A. Hammer, 1999); es interesante señalar que al probar dicho AE de *Jengibre spp.*, obtenido a partir de los rizomas del mismo, resultó activo a una concentración de 0,12%v/v AE/MHA; discrepando con las publicaciones citadas inicialmente, en las que únicamente indican que este AE resulta activo para microorganismos Gram (+). Lo que podría deberse a que la especie de Jengibre estudiada sea diferente o si las condiciones del suelo del Ecuador, climatológicas; etc, hacen que el AE de *Jengibre spp.*, presente una actividad antibacteriana que se logró evidenciar (Orozco Iguasnia & Castro Gómez, 2004) (K. A. Hammer, 1999).

Finalmente, el AE de *Lavanda spp.*, de acuerdo a la tabla 6, resultó activo a una concentración de 0,48% v/v AE/MHA, si bien existen publicaciones en las que se menciona el potencial antimicrobiano de este AE, las concentraciones reportados por dichos investigadores oscilan entre 0,25% v/v AE/MHA y 0,50% v/v AE/MHA, por lo que, al no haberse realizado una caracterización etnobotánica de las plantas estudiadas no podemos tener la certeza de conocer si se trata de la misma especie; por lo que la discrepancia en los resultados podrían deberse a eso (K. A. Hammer, 1999) (Dadalioglu & Akdemir Evrendilek, 2004).



CONCLUSIONES

Luego de finalizado el presente trabajo de titulación se puede concluir lo siguiente:

1º Se validó la técnica de dilución en agar modificada por Katherine A. Hammer, Christine F. Carson, Thomas V. Riley; para la estimación de la actividad antimicrobiana de AE frente a microorganismos Gram (-) en este caso la cepa ATCC *E. coli* 25922, cumpliéndose con la hipótesis planteada.

2º Se verificó la actividad antibacteriana de tres AE de: *Hierba luisa spp.*, *Lavanda spp.*, y *Jengibre spp.*, conforme lo referencian la literatura revisada y determinándose la concentración mínima Inhibitoria de los mismos.

3º Se evidenció que el AE de *Jengibre spp.*, que fue obtenido a partir de los rizomas de Jengibre de procedencia de Santo Domingo de los Tsáchilas presenta actividad antibacteriana frente a la cepa ATCC de *E. coli*.

4º No se evidenció la actividad antibacteriana del AE de la *Ruta spp.*, por lo que, dicho AE sirvió como control negativo.



RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados anteriormente expuestos que se obtuvieron según los procesos realizados y con la elaboración de este documento, se recomienda lo siguiente:

- Se podría probar la técnica de dilución en agar modificada frente a otras bacterias Gram (-) e inclusive frente a cepas que presenten genes de resistencia a los antimicrobianos.
- Se utilicen otras técnicas para extracción de los AE como por ejemplo, la técnica de fluidos supercríticos ya que posee las siguientes ventajas como: alto rendimiento, ecológicamente limpio, eliminación fácil del solvente el cual puede ser reusado y químicamente no se modifican los componentes de los AE.



BIBLIOGRAFÍA

Ananieva, L. (2017). *Aceites Esenciales*. España: Tektime.

ATCC Product Sheet. (2017). Obtenido de <https://www.atcc.org/~ps/25922.ashx>

Bastos Oyarzabal, D. E., Damé Schuch, D. F., & Braga de Mello, D. R. (2011). Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. ante bacterias aisladas en leche de bovino. *Scielo*, 4-6.

Báez, I. S. (2014). *Repositorio de la Universidad tecnologica Equinoccial*. Recuperado el 9 de 7 de 2017, de http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/8359/1/56031_1.pdf

Bretado de Santiago, B., Ávila Martínez, G. G., & Borjón Arroyo, G. A. (10 de Mayo de 2015). *Slideshare*. Obtenido de <https://es.slideshare.net/bentuu/actividad-antimicrobiana-in-vitro-del-extracto-etanlico-de-las-hojas-de-ruta-graveolens-ruda-mediante-el-mtodo-de-bauerkirby>

Burt, D. S. (3 de 3 de 2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods-a review . *ELSEVIER*, 8,9.

Carril, A. Á.-U. (2011). *Metabolismo secundario de plantas*. Recuperado el 18 de 9 de 2017, de http://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf

Charai, M., & Mosaddak, M. (1996). Chemical Composition and Antimicrobial Activities of two Aromatic Plants: *Origanum majorana* L. and *O. compactum* Benth. *Journal Essential Oil*, 140-145.

Custodio Marroquín, J. A. (9 de Noviembre de 2009). *Slideshare*. Obtenido de <https://es.slideshare.net/jcustodio91/guia-iii>

Dadalioglu, I., & Akdemir Evrendilek, G. (2004). Composiciones químicas y efectos antibacterianos de los aceites esenciales: lavanda española (*Lavanda stoechas* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1-6. doi:10. 1021/ jf049033e

Darquea Leoro, A. D. (12 de Diciembre de 2014). *Repositorio.puce.edu.ec*. Recuperado el 6 de Noviembre de 2017, de



<http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/10821/11.46.001076.pdf?sequence=4>

Elizari Reta, I. (27 de Septiembre de 2013). *Academia Unavarra*. Recuperado el 8 de Octubre de 2017, de http://academica-e.unavarra.es/bitstream/handle/2454/8746/TyCIAA_TFM%20ELIZARI%20RETA.pdf?sequence=1

European Medicines Agency. (2 de Marzo de 2012). *Ema. Europa*. Obtenido de http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/Herbal_-_Summary_of_assessment_report_for_the_public/2014/06/WC500168589.pdf

FAO. (24 de Abril de 2011). Obtenido de Codexalimentarius: <http://www.fao.org/3/a-i2530s/i2530s03.pdf>

Flores Gutiérrez, M. C. (2010). *Repositorio. uchile*. Obtenido de http://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2010/qf-flores_mc/pdfAmont/qf-flores_mc.pdf

Flores Palacios, K., & Puente Puente, M. R. (18 de Marzo de 2016). *UPLA*. Obtenido de http://repositorio.upla.edu.pe/bitstream/handle/UPLA/113/Katia_Tesis_Quimico_2016.pdf?sequence=3

García Suárez, D. D., & Serrano, D. S. (2014). Lavanda. *TecnoAgro*, 6-7. Recuperado el 15 de Octubre de 2017, de <https://tecnoagro.com.mx/revista/2014/no-94/lavanda-lavandula-angustifolia-mill-lamiaceae/>

Guerra Ordoñez, M., & Llerena Rangel, L. (2014). Actividad antimicrobiana del aceite esencial y crema de *Cymbopogon citratus* (DC). *Stapf. Scielo*, 4-6.

Haddouchi, F., & Benmansour, A. (2013). chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in algeria. *Elsevier*, 253-258. Recuperado el 1 de Octubre de 2017, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23768355>

Hernández Cortez, C., Aguilera Arreola, M. G., & Castro Escarpulli, G. (Enero de 2011). Situación de las enfermedades gastrointestinales en México y a nivel mundial. *Medigraphic*, 137-151. Recuperado el 6 de Noviembre de 2017, de



<http://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2011/ei114f.pdf>

Iberonews Limited. (2016 de Diciembre de 2016). Uso indiscriminado de antibióticos amenaza al mundo. *El Nacional*, págs. 14-16.

Ivanova, A., Mikhova, B., Najdenski, H., Tsvetkova, I., & Kostova, I. (2005). Actividad Citotóxica y Antimicrobiana de *Ruta graveolens*. *Elsevier*, 344-347. Recuperado el 1 de Octubre de 2017, de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X05000663>

K. A. Hammer, C. F. (23 de Febrero de 1999). *Antimicrobial activity of esencial oils and other plant extracts*. Recuperado el 13 de 6 de 2017, de Onlinelibrary: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x/full>

León Méndez, Q. G., & Martínez Useche, S. R. (2015). Comparación de dos métodos de extracción del aceite esencial de *Citrus sinensis* L. *Revista Cubana de Farmacia*, 743-745.

Mahabir P., P. (2003). *Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos*. Panamá: Corpus. Recuperado el 9 de Septiembre de 2017

Maza Marcatoma, C. S., & Clavijo Paltin, M. I. (25 de Enero de 2017). *Dspace Universidad de Cuenca*. Recuperado el 7 de Octubre de 2017, de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/26828/1/Tesis.pdf>

Mediacentre. (30 de Abril de 2014). OMS. Obtenido de <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/>

Mediacentre. (Octubre de 2016). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/>

Merino, L. A., & Losch, L. S. (7 de Marzo de 2013). *ECATHS. S3. AMAZONAS*. Recuperado el 28 de Octubre de 2017, de Universidad Nacional del Nordeste: <http://ecaths1.s3.amazonaws.com/catmicromed/APUNTE%20Enterobacterias.pdf>

Meza Angos, K. L., & Vargas Duque, G. G. (25 de Mayo de 2013). *Dspace UPS*. Obtenido de <https://www.dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/6005/1/UPS->



QT03735.pdf

- Mezza, I. N. (27 de Marzo de 2015). *RDU UNC*. Obtenido de <https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/4605/Tesis%20Gabriela%20Mezza.pdf?sequence=1>
- Molina López, J., & Campos Eslava, C. A. (3 de Agosto de 2015). *FACMED*. Obtenido de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/escherichia-coli.html>
- Mollinedo Patzi, M. A., & Gonzáles Villalobos, C. (2014). Bacterias Gram Negativas. *Scielo*, 5-7.
- Montoya Cadavid, G. d. (17 de Junio de 2010). Obtenido de Bdigital: <http://www.bdigital.unal.edu.co/50956/7/9588280264.pdf>
- MSD. (27 de Enero de 2017). *MSD y los Manuales MSD*. Obtenido de <http://www.msmanuals.com/es-ec/professional/enfermedades-infecciosas/bacilos-gramnegativos/infecciones-por-escherichia-coli>
- Ocares Cerón, M. A. (2012). *Cybertesis de la Universidad Austral de Chile*. Obtenido de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2012/fao.15a/doc/fao.15a.pdf>
- Ochoa Pumaylle, K., Paredes Quiroz, L. R., & Silva Paz, R. J. (2012). Extracción, caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial. *Redalyc*, 291-302. Recuperado el 8 de Octubre de 2017, de <http://www.redalyc.org/pdf/3576/357633704003.pdf>
- Olivares Cruz, M. A., & López Malo, A. (2013). Potencial antimicrobiano de mezclas que incluyen aceites esenciales o sus componentes en fase vapor. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos, I*, 78-82. Obtenido de <http://web.udlap.mx/tsia/files/2013/12/TSIA-71-Olivares-Cruz-et-al-2013.pdf>
- OMS. (31 de Enero de 2017). *Farmacorresistencia*. Obtenido de <http://www.who.int/drugresistance/use/es/>
- Orozco Iguasnia, E. R., & Castro Gómez, R. d. (2004). *Actividad Antimicrobiana In Vitro del Aceite Esencial de Jengibre*. Recuperado el 19 de 9 de 2017, de



http://bibliotecas.esPOCH.edu.ec/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=40246&shelfbrowse_itemnumber=59048#holdings

Ortiz, H., & Méndez, I. (17 de Octubre de 2013). "INVESTIGACIÓN DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS Y COLIFORMES EN LOS TECLADOS DE LAS COMPUTADORAS DEL CENTRO DE DOCUMENTACIÓN REGIONAL JUAN BAUTISTA VÁSQUEZ". Obtenido de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/4714/1/TESIS.pdf>

Pachón Cubillos, D. A. (30 de Enero de 2009). *Javeriana. Edu*. Recuperado el 28 de Octubre de 2017, de <http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis198.pdf>

Paredes Punina, D. O., & Quinatoa Chicaiza, F. D. (7 de Julio de 2010). *Dspace Epoch*. Recuperado el 7 de Octubre de 2017, de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1710/1/15T00453.pdf>

Parreño Corrales, D. E., & Villacres Guevara, D. G. (25 de Septiembre de 2012). *Repositorio.puce.edu.ec*. Recuperado el 6 de Noviembre de 2017, de <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/7333/11.27.001620.pdf?sequence=4>

Pediamécum. (Abril de 2015). *Comité de medicamentos de la asociación española de pediatría*. Obtenido de <http://pediamecum.es/wp-content/farmacos/Ampicilina.pdf>

Perdomo Acevedo, D., & Palomarez, B. (37 de Mayo de 2015). *Stadium UNAD*. Obtenido de <http://stadium.unad.edu.co/preview/UNAD.php?url=/bitstream/10596/3456/1/17685012.pdf>

Pilapanta, E. (27 de Junio-Diciembre de 2015). *Dspace.uniandes.edu.ec*. Recuperado el 6 de Noviembre de 2017, de <http://dspace.uniandes.edu.ec/bitstream/123456789/1023/1/TUAMED0722015.pdf>

Pino, O., Sánchez, Y., & Montes de Oca, R. (2014). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de Ruta chalepensis L. *SciELO*, 4-7.



- Prescott, L. M., & Klein, D. A. (2013). *Unicen-Microbiología*. Obtenido de <http://www.vet.unicen.edu.ar/ActividadesCurriculares/Microbiologia/images/Documentos/Libro%20prescott.pdf>
- Prudent, D., & Baccou, J. C. (1995). Analysis of the Essential Oil of wild Oregano from Martinique (*Coleus aromaticus* Benth.) Evaluation of its Bacteriostatic and Fungistatics properties. *Journal of Essential Oil*, 102-106.
- Puerta García, A., & Mateos Rodríguez, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*, 3426. Recuperado el 28 de Octubre de 2017, de http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Enterobacterias_Medicine2010.pdf
- Quert Alvarez, R., & Gelabert Ayón, F. (2001). Rendimiento de aceite esencial en *Pinus caribaea* Morelet. *Scielo*, 43.
- Remmal, A., Bouchikhi, T., & Ettayebi, M. (1993). Improved method for the determination of Antimicrobial Activity of Essential Oils in Agar Medium. *Journal of Essential Oil*, 46-49.
- Reyes Jurado, F., Palou, E., & Malo López, A. (2009). Vapores de aceites esenciales: alternativa de antimicrobianos naturales. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 32-37.
- Reyes Jurado, F., & López Malo, A. (2014). *Udlap*. Obtenido de <http://web.udlap.mx/tsia/files/2015/05/TSIA-81-Reyes-Jurado-et-al-2014.pdf>
- Ruiz Garbajosa, P., & Cantón, R. (2016). Epidemiología de los bacilos gramnegativos multirresistentes. *Esp. Quimioter*, 21-24. Obtenido de <http://www.seq.es/seq/0214-3429/29/sup1/5ruiz.pdf>
- Sánchez Llambi, M. (2016). *Aceites Esenciales*. Bloomingthon: Balboa Press.
- SENA. (18 de Mayo de 2010). *SENA*. Obtenido de http://repositorio.sena.edu.co/bitstream/11404/1144/1/ACEITES_ESENCIALES_EXTRAIDOS_DE_PLANTAS_MEDICINALES_Y_AROMATICAS.pdf
- Vásquez Riberio, O., Alva, A., & Marreros Valles, J. (2009). Extracción y Caracterización



del Aceite Esencial de Jengibre. *Amazónica de Investigación*, 39-40. Obtenido de <http://www.unapiquitos.edu.pe/pregrado/facultades/alimentarias/descargas/vol1/6.pdf>

Vega Portocarrero, E., & López Malo, A. (2009). Agentes antimicrobianos presentes en especias y hierbas. *Udlap*, III(1), 89-90. Obtenido de [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSA-3\(1\)-Vega-Portocarrero-et-al-2009.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSA-3(1)-Vega-Portocarrero-et-al-2009.pdf)

Vidal Marín, M., Vicario Bermúdez, J., & Lerín, F. J. (2013). Bacteriemia por E. coli: epidemiología y comorbilidad. *Revista Clínica Española*, 8-10.



ANEXOS

ANEXO 1.- RESULTADOS OBTENIDOS DURANTE LAS 72 HORAS DE REVISIÓN DE LOS CULTIVOS

Tabla 7. Seguimiento de los resultados durante las 72 horas de estudio

<i>Orégano spp.</i>	Réplicas 24H			Réplicas 48H			Réplicas 72H		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0,03	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,24									
0,48									
<i>Jengibre spp.</i>	Réplicas 24H			Réplicas 48H			Réplicas 72H		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0,03	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,06	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,48	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ruda spp.</i>	Réplicas 24H			Réplicas 48H			Réplicas 72H		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0,03	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,06	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,12	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,24	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,48	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Fuente: Autores



<i>Hierba luisa</i> <i>spp.</i>	Réplicas 24H			Réplicas 48H			Réplicas 72H		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0,03	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,48	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lavanda</i> <i>spp.</i>	Réplicas 24H			Réplicas 48H			Réplicas 72H		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0,03	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,06	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,12	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,24	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,48	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fuente: Autores

**ANEXO 2.- RENDIMIENTO DE LOS ACEITES ESENCIALES****Tabla 8.** Rendimiento de los aceites esenciales

Planta/ Nombre común	Nombre científico	Parte usada	Cantidad en gramos usada	Rendimiento de aceite en gramos	Rendimiento de aceite en %	Número de extracciones
Orégano	<i>Origanum spp.</i>	Hojas y tallos	955,3g	2,006g	0,2099%	6
Jengibre	<i>Zingiber spp.</i>	Rizomas	602,52g	1,257g	0,2086%	3
Ruda	<i>Ruta spp.</i>	Hojas y flores	509,33g	0,735g	0,1443%	3
Hierba luisa	<i>Cymbopongo spp.</i>	Hojas	401,24g	2,655g	0,6616%	2
Lavanda	<i>Lavandula spp.</i>	Flores	307,65g	2,719g	0,8837%	2

Fuente: Autores

ANEXO 3.- ILUSTRACIONES

ILUSTRACIONES DE PLANTAS USADAS

Ilustración 1: *Lavanda spp.*



Ilustración 2: *Hierba luisa spp.*



Fotografías: Autores, ubicación Santa Isabel



Ilustración 3: *Orégano spp.*



Fotografías: Autores, ubicación San Joaquín

Ilustración 4: *Ruda spp.*



Fotografías: Autores, ubicación Punta Corral

Ilustración 5: *Jengibre spp.*



Fotografías: Autores, ubicación Santo Domingo de los Tsáchilas

ILUSTRACIONES DEL PROCESAMIENTO DE LA PLANTA ESCOGIDA

Ilustración 6: Lavado



Fuente: Autores

Ilustración 7: Secado en pales a temperatura ambiente



Fuente: Autores

Ilustración 8: Pesado de la droga



Fuente: Autores

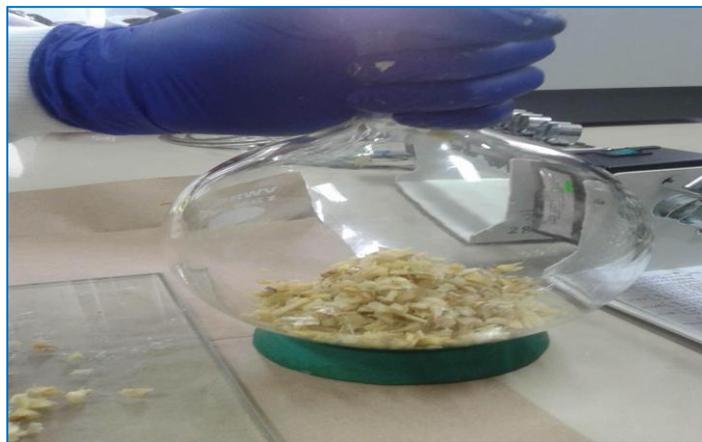
Ilustración 9: Troceado



Fuente: Autores

ILUSTRACIONES DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN

Ilustración 10: Cargar la droga en el balón



Fuente: Autores

Ilustración 11: Extracción



Fuente: Autores

Ilustración 12: Recuperación del aceite de la trampa tipo Clevenger



Fuente: Autores

Ilustración 13: Adición de Sulfato de Sodio (Na_2SO_4)



Fuente: Autores

Ilustración 14: Eliminación del agua atrapada por centrifugación



Fuente: Autores

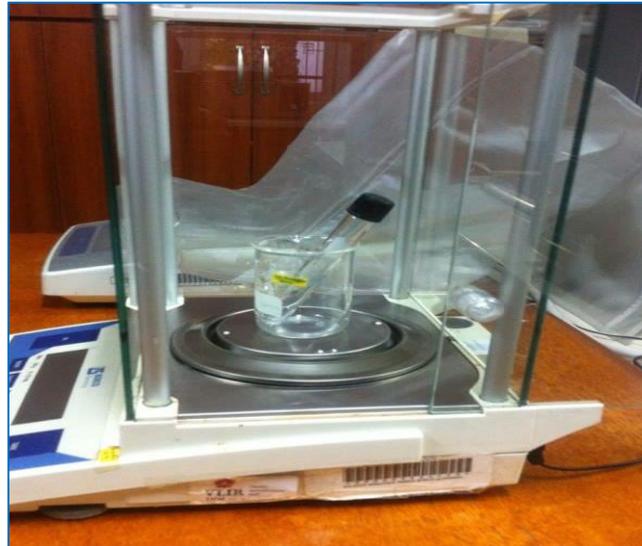
Ilustración 15: Almacenamiento del aceite esencial



Fuente: Autores



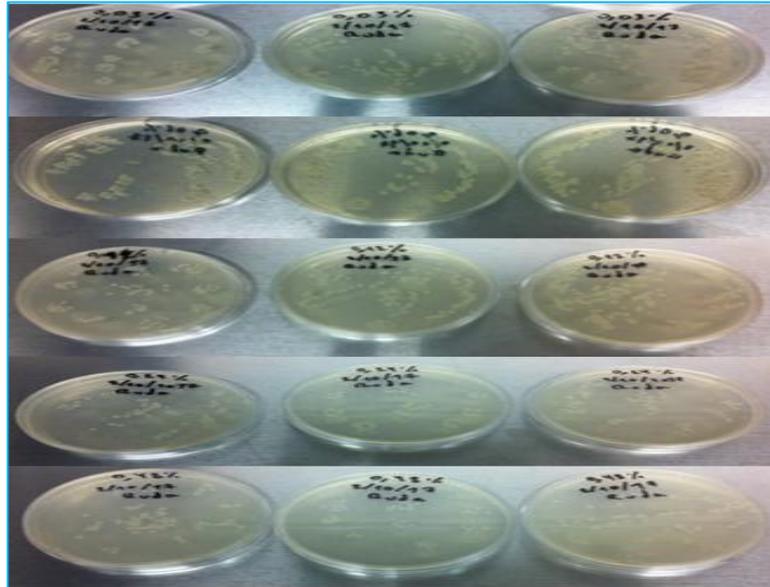
Ilustración 16: Determinación del contenido de aceite esencial obtenido (peso)



Fuente: Autores

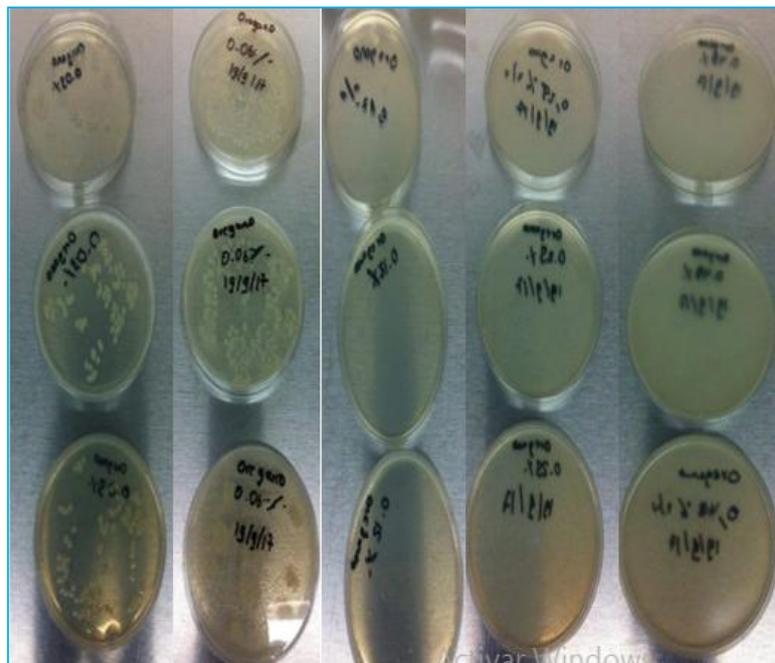
ILUSTRACIONES DE RESULTADOS

Ilustración 17: *Ruda spp.*



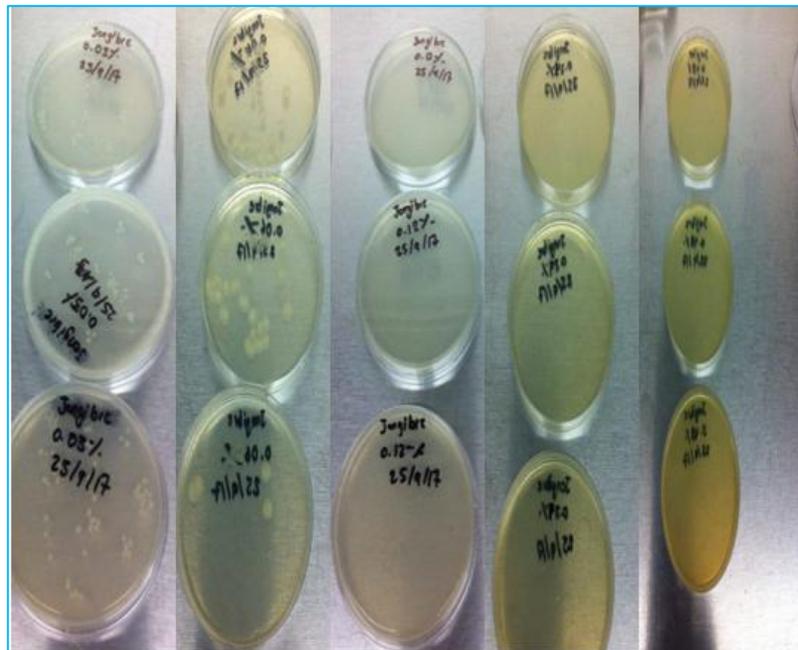
Fotografías: Autores

Ilustración 18: *Orégano spp.*



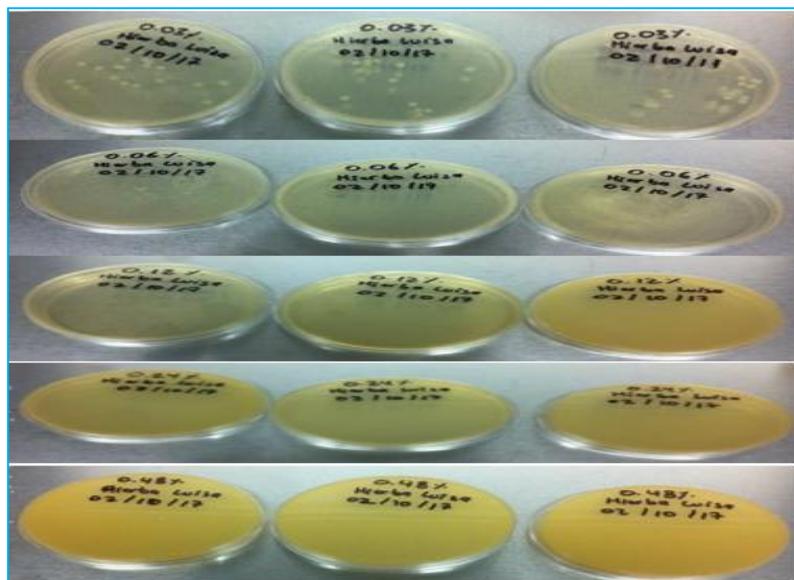
Fotografías: Autores

Ilustración 19: *Jengibre spp.*



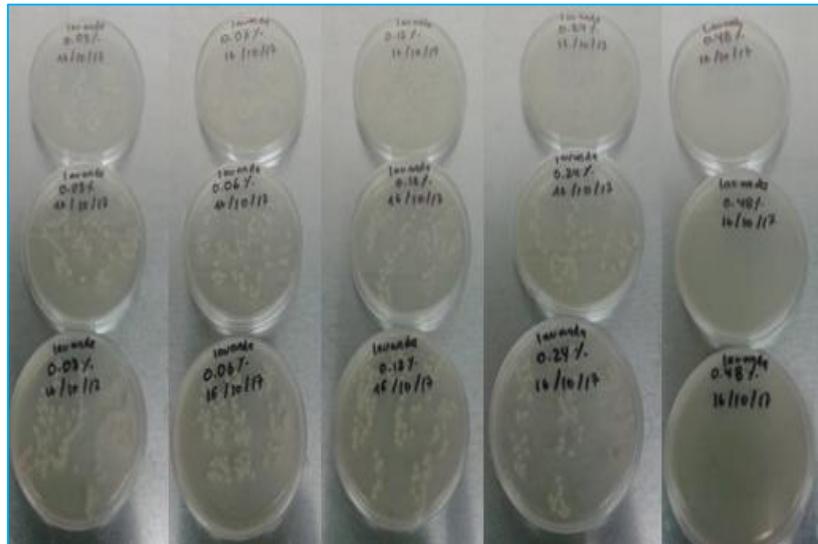
Fotografías: Autores

Ilustración 20: *Hierba luisa spp.*



Fotografías: Autores

Ilustración 21: *Lavanda* spp.



Fotografías: Autores



ANEXOS 4.- EQUIPOS USADOS DURANTE LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO DE TESIS

Tabla 9. Equipos usados

Nombre	Marca	Modelo
ROTAVAPOR LADOROTA	4000 EFFICIENT ^R	HBG3
CAMPANA DE EXTRACCIÓN DE GASES, DIMENSI	DIMENSI ^R	Q216-21
BAÑO CON ULTRASONIDO	CPN-952-318	351
BALANZA ANALÍTICA	BOECO ALEMANIA ^R	ES-220A
BALANZA DE PRECISIÓN	METTLER TOLEDO ^R	1129070512
REFRIGERADORA	INDURAMA ^R	R1-4
REFRIGERADORA	INDURAMA ^R	R1-480
HORNO UTILITY	VWR	61305
ESTUFA DE CULTIVO	MEMMERT ^R	SL20C
COCINETA ELÉCTRICA	FUSE ^R	E08
CENTRIFUGA DE ALTA CAPACIDAD	SIGMA ^R	2-6
VÓRTEX MIXER	GEMMY ^R	VM-300
AUTOCLAVE AUTOMÁTICA	TUTTNAUER ^R	2540EK

Fuente: Autores