



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

**“DISEÑO DE MEZCLAS DE ACEITES ESENCIALES COMO ESTRATEGIA PARA
EL DESARROLLO DE ANTIAMEBIANOS”**

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

AUTORES

ESTEBAN FELIPE BUSTILLOS HERNÁNDEZ
C.I. 0104796008

GABRIELA ISABEL CABRERA NARVÁEZ
C.I. 0105532493

DIRECTORA

DRA. MARÍA ELENA CAZAR RAMÍREZ, Ph.D
C.I. 0602243800

ASESORA

DRA. SONIA AMAYRA GOERCKE TORRES
C.I. 0102155280

CUENCA-ECUADOR

Abril, 2018



RESUMEN

El uso de preparados de plantas medicinales para combatir diversos problemas de salud ha despertado el interés de especificar que compuesto o grupo de compuestos son los responsables de ejercer su acción frente a diversos microorganismos que son capaces de producir enfermedad en los seres vivos. *Entamoeba histolytica* es una especie parásita que se transmite de manera fecal – oral y puede llegar a generar complicaciones y comprometer la salud de las personas que los portan si no reciben un tratamiento adecuado.

El objetivo de este trabajo fue el de demostrar que los aceites esenciales (AE) de especies de plantas que han sido usadas desde la antigüedad como antiparasitarios, tienen acción frente a quistes y pre quistes amebianos obtenidos de muestras fecales y mantenidos viables en un cultivo específico para esta especie como es el caldo de Diamond.

Se realizó un estudio experimental cualitativo/cuantitativo, en el cual se probó la acción del AE de *Chenopodium ambrosioides* (paico), *Artemisia absinthium* (ajenjo), *Ocimum basilicum* (albahaca) y *Peperomia inaequalifolia* (congona) y sus combinaciones a diversas concentraciones mediante un diseño de mezclas trabajando conjuntamente con un control positivo que contenía únicamente el medio con amebas viables y un control negativo en el que se inhibió el crecimiento amebiano con un testigo farmacológico.

Como resultado se demostró que los AE de paico, ajenjo y congona son capaces de inhibir el crecimiento de amebas en un lapso máximo de 48 horas y el efecto sinérgico de sus combinaciones tuvo un efecto antiamebiano a partir de las 24 horas.

Palabras claves: actividad antiamebiana; aceites esenciales; diseño de mezclas.



ABSTRACT

The use of prepared of medicinal plants to combat diverse problems of health aroused the interest of specify that compound or compound's group are the responsible to pursue action front diverse microorganism that are able to produce diseases in living beings. *Entamoeba histolytica* is a parasitic specie that transmit of fecal – oral way and can to generate complications and compromise the health of the people that carry if don't receive an appropriate treatment.

The objective of this assignment was demonstrate that essentials oils (EO) of species of plants that was use in the od as antiparasitic, has action against cysts and amebian pre cysts obtained of fecal samples and maintained viable in a specific cultivation to this specie as Diamond broth.

It has been made and qualitative/quantitative experimental research. In which test the action of the *Chenopodium ambrosioides* (paico), *Artemisia absinthium* (ajenjo), *Ocimum basilicum* (albahaca) and *Peperomia inaequalifolia* (congona) and their combinations to various concentrations through an mixture designs jointly a positive control that only contain with viable amoebas and negative control that it was inhibited the amoebas growth with an pharmacological witness.

As result it was demonstrated that the EO of paico, ajenjo and congona are able to inhibit the growth of amoebas in a maximum period of 48 hours and the synergistic effect of their combinations had an anti-amoebic effect after 24 hours.

Keywords: anti-amoebic activity; essentials oils; mixture designs.



CONTENIDO

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
CLÁUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	6
CLÁUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	7
CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL	8
CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL	9
AGRADECIMIENTOS	10
DEDICATORIAS	11
INTRODUCCIÓN	12
IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	12
JUSTIFICACIÓN	13
HIPÓTESIS	13
OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS	13
OBJETIVO GENERAL	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
CAPÍTULO 1	15
MARCO TEÓRICO	15
1.1 Parasitosis	15
1.2 Aceites esenciales	20
1.3 Plantas sujeto de estudio	25
CAPITULO 2	29
METODOLOGÍA	29
2.1 Tipo de investigación	29
2.2 Variables	29
2.3 Trabajo Experimental	30
CAPÍTULO 3	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35



3.1 Rendimiento de obtención de aceites esenciales	35
3.2 Aceites esenciales con actividad antiamebiana	35
3.3 Potencial de mezclas de aceites esenciales como inhibidores del crecimiento	36
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES	41
RECOMENDACIONES	42
BIBLIOGRAFÍA	43
ANEXOS	49
ANEXO 1: RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES	49
ANEXO 2: CÁLCULOS DE CONCENTRACIONES DEL TESTIGO FARMACOLÓGICO (Metronidazol)	50
ANEXO 3: ILUSTRACIONES DEL PROCEDIMIENTO	51
ANEXO 4: ILUSTRACIONES DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS	58



CLÁUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio
Institucional

ESTEBAN FELIPE BUSTILLOS HERNÁNDEZ en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "**DISEÑO DE MEZCLAS DE ACEITES ESENCIALES COMO ESTRATEGIA PARA EL DESARROLLO DE ANTIAMEBIANOS**", 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, Abril de 2018

ESTEBAN FELIPE BUSTILLOS HERNÁNDEZ

CI: 0104796008



CLÁUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

GABRIELA ISABEL CABRERA NARVÁEZ en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación **“DISEÑO DE MEZCLAS DE ACEITES ESENCIALES COMO ESTRATEGIA PARA EL DESARROLLO DE ANTIAMEBIANOS”**, 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, Abril de 2018

GABRIELA ISABEL CABRERA NARVÁEZ

C.I. 0105532493



CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Cláusula de Propiedad Intelectual

ESTEBAN FELIPE BUSTILLOS HERNÁNDEZ, autor del trabajo de titulación “DISEÑO DE MEZCLAS DE ACEITES ESENCIALES COMO ESTRATEGIA PARA EL DESARROLLO DE ANTIAMEBIANOS”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, Abril de 2018

ESTEBAN FELIPE BUSTILLOS HERNÁNDEZ

CI: 0104796008



CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Cláusula de Propiedad Intelectual

GABRIELA ISABEL CABRERA NARVÁEZ, autora del trabajo de titulación “DISEÑO DE MEZCLAS DE ACEITES ESENCIALES COMO ESTRATEGIA PARA EL DESARROLLO DE ANTIAMEBIANOS”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, Abril de 2018

GABRIELA ISABEL CABRERA NARVÁEZ

C.I. 0105532493



AGRADECIMIENTOS

Agradecemos en primer lugar a Dios por la salud y por guiarnos durante este largo recorrido y a pesar de que, en el camino de nuestras vidas nos rodeamos de un sin número de personas, solo pocas son quienes nos dejaron sus enseñanzas o nos ayudaron a formarnos como personas; por esto, queremos agradecer a la prestigiosa Universidad de Cuenca que nos abrió sus puertas y en la que tuvimos la oportunidad de compartir durante nuestros años de estudio con docentes y maestros que aportaron sus conocimientos para que este trabajo sea posible realizarlo.

Un agradecimiento muy especial a la Doctora María Elena Cazar y a la Doctora Sonia Goercke quienes además de sus enseñanzas nos brindaron una amistad sincera y nos otorgaron su confianza, gracias a ustedes esta meta pudo cumplirse ganándose nuestro cariño, respeto y admiración.

Agradecemos de igual forma a nuestras familias y amistades por el apoyo que hemos recibido a lo largo de nuestra formación Universitaria. A todos muchas gracias.

Felipe Bustillos H
Gabriela Cabrera N



DEDICATORIAS

Esta tesis se la dedico a mi familia quienes me apoyaron en cada decisión que he tomado en mi vida, sobre todo a mis padres, ya que gracias a su sacrificio me han permitido cumplir muchas metas y me han ayudado a levantarme en mis tropiezos y caídas.

También se lo dedico a mi compañera de tesis Gabby, mi gran amor que además de ser mi amiga incondicional, estuvo conmigo todos estos años de estudio, con quien cada día nos proyectamos nuevas cosas juntos y hemos alcanzamos todos los objetivos que nos hemos planteado; esta tesis es un claro ejemplo de aquello.

Felipe Bustillos H

Este trabajo quiero dedicarlo en primer lugar a mis padres quienes han sido mi apoyo incondicional y mi guía en cada paso que doy, por enseñarme a luchar por lo que quiero y sembrar en mi deseos de superación y responsabilidad, sin ustedes no hubiese podido alcanzar un sueño más en mi vida, gracias por los esfuerzos que han hecho por vernos surgir a mis hermanos y a mi persona.

A mi enamorado y mejor amigo Feli quien ha sido incondicional desde el primer día de clases y quien me ha motivado a ser mejor, y nunca me dejo vencer por los obstáculos estando siempre a mi lado, ahora culminamos un sueño más en nuestras vidas juntos mi amor venciendo toda barrera que se nos puso en el camino, gracias por brindarme tu amistad sincera y ahora tu amor que es incondicional. Te amo

Gabriela Cabrera N



INTRODUCCIÓN

La extensa biodiversidad que nuestro país posee ha sido aprovechada para un sin número de propósitos, entre estos el aliviar o curar diversos padecimientos que han comprometido la salud de las personas a lo largo del tiempo, ya sea ingiriendo frutos o partes de plantas o a su vez bebiendo infusiones, decocciones, etc. (de la Torre, Navarrete, Muriel, Macía, & Balslev, 2008)

Como lo han mencionado Lucía de la Torre y Montserrat Ríos el uso que se les da a las plantas en el Ecuador, ya sean endémicas o foráneas, es muy variado y no se sabe con certeza cuáles metabolitos de estas son los que ejercen el efecto terapéutico que se les ha otorgado. (de la Torre et al., 2008; Ríos, Koziol, Borgtoft, & Granda, 2007)

IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

La amebiasis conjuntamente con otros padecimientos gastrointestinales, son un problema de salud que ocupa el tercer lugar de la lista de las principales morbilidades en el Ecuador. (INEC, 2014)

Este problema surge por la inaccesibilidad a servicios básicos sanitarios y la falta de educación por parte de la población acerca de higiene y cuidados personales debido a que las amebas son organismos microscópicos que pasan desapercibidos y por lo tanto se pueden transmitir mediante la ingestión de quistes viables que pueden encontrarse en agua, alimentos o incluso las manos contaminadas con heces fecales que presenten estos parásitos.

En poblaciones rurales e incluso urbanas, es común el empleo de drogas a partir de plantas para satisfacer dolencias o combatir ciertos problemas de origen infeccioso, esto es debido a que en el Ecuador el 86% de los medicamentos en el mercado son importados según cifras de la Asociación de Laboratorios Farmacéuticos del Ecuador (ALFE) (Ortiz, Galarza, Cornejo, & Ponce, 2014), por tanto la accesibilidad a los mismos por parte de toda la población no se ve garantizada quizá por escasos recursos por lo que se ven obligados a recurrir a la medicina ancestral, a esto se suma las reacciones adversas a la medicación que presenta el fármaco de primera elección para combatir la amebiasis (Metronidazol) y su potencial efecto teratogénico,



embriotóxico y la posibilidad de ser carcinógeno en humanos.(Behnia, Haghghi, Komeylizadeh, Javad, & Abadi, 2008)

JUSTIFICACIÓN

La alta prevalencia de parasitosis desatendidas en el Ecuador, según datos del Ministerio de Salud Pública (MSP), obligan a buscar alternativas farmacológicas que sean de fácil accesibilidad a la población, por lo que es importante impulsar el desarrollo de nuevas fórmulas farmacéuticas con principios activos que pueden ser extraídos de plantas ecuatorianas, es así que, este proyecto busca impulsar el desarrollo de los mismos a partir de aceites esenciales y mezclas de ellos; para lo cual empleamos especies de plantas que tradicionalmente evidencia acción antiparasitaria.

En este estudio se investigó si el poder antiparasitario fue a causa de la acción de los aceites esenciales que presentan las plantas seleccionadas y los efectos sinérgicos de sus mezclas, formuladas de acuerdo a un diseño experimental.

HIPÓTESIS

Los aceites esenciales de *Chenopodium ambrosioides* (paico), *Artemisia absinthium* (ajenjo), *Ocimum basilicum* (albahaca), *Peperomia inaequalifolia* (congona) y sus mezclas poseen acción antiparasitaria frente a *Entamoeba histolytica*.

OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS

OBJETIVO GENERAL

Valorar la acción antiparasitaria de aceites esenciales de *Chenopodium ambrosioides* (paico), *Artemisia absinthium* (ajenjo), *Ocimum basilicum* (albahaca) y *Peperomia inaequalifolia* (congona) frente a *Entamoeba histolytica*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la actividad antiamebiana de los aceites esenciales de las plantas en estudio, en un ensayo “*in vitro*”.



- Establecer, mediante un diseño de mezclas, el efecto sinérgico de mezclas de los aceites esenciales que presenten mejor actividad antiamebiana, de acuerdo al ensayo “*in vitro*”.
- Identificar las mezclas de aceites esenciales más promisorias por su acción antiparasitaria frente a *E. histolytica*.



CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1 Parasitosis

Según Botero y Restrepo, la parasitosis es el estado de asociación en el cual un organismo vivo (parásito) se aloja en otro de diferente especie (huésped u hospedero) del cual se alimenta y según el grado de adaptación que existe entre ambos puede o no producir enfermedad o la muerte de este último, aunque también depende de otros factores tales como la dosis infecciosa, la cifra de organismos adquiridos y la respuesta inmunitaria del huésped, la parasitosis se diferencia de las infecciones bacterianas y víricas en que esta es crónica y las exposiciones repetidas conllevan a una carga mayor de parásitos. (Botero & Restrepo, 2012; Murray, Rosenthal, & Michael, 2014)

1.1.1 Clasificación de los Parásitos

Los parásitos que afectan al hombre se pueden clasificar de diversas maneras ya sea según el lugar de localización respecto al huésped (endo y ectoparásitos), según el nombre de la infección que estos producen como en el caso de la malaria, o de acuerdo al tiempo de permanencia en el huésped (temporales y permanentes), también, según la capacidad de producir enfermedad en el hombre (patógenos y no patógenos). Aunque desde el punto de vista taxonómico se pueden clasificar en cuatro reinos (Protozoa, Animalia, Fungi y Stramenopila). (Botero & Restrepo, 2012; Murray et al., 2014)

1.1.2 Amebas Intestinales

Las amebas son un género de parásitos pertenecientes al reino Protozoa (también llamados protozoos o protozoarios), estas son células eucariotas unicelulares primitivas que carecen de pared celular y pueden localizarse en diferentes tejidos, aunque no todas son patógenas para el hombre. (Botero & Restrepo, 2012)

Su ciclo vital se divide en dos fases, la fase de crecimiento que posee una movilidad activa en forma de trofozoíto y la fase resistente e infecciosa en forma de quiste.



Las mayoría de amebas pueden habitar en el hombre como microorganismos comensales sin embargo, *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba polecki* son patógenas para el ser humano al igual que diferentes amebas de vida libre pueden actuar como oportunistas.(Murray et al., 2014)

1.1.2.1 Amebas Patógenas

La principal ameba patógena para el ser humano es *Entamoeba histolytica* que puede vivir como comensal en el intestino grueso, para luego invadir la mucosa intestinal y provocar enfermedades como la disentería amebiana, la colitis amebiana y abscesos hepáticos. (Botero & Restrepo, 2012; Henry et al., 2005)

Las características nucleares de este parásito son las de presentar un cariosoma compacto central y la cromatina distribuida en forma de gránulos de tamaño uniforme. (Botero & Restrepo, 2012)

- **Ciclo de vida**

La infección y propagación de la *Entamoeba histolytica* se da por la ingestión de quistes del parásito viables en el agua, alimentos o manos contaminadas con materia fecal; en esta forma son resistentes a las condiciones ambientales e incluso a la acción de los jugos gástricos, el quiste presenta un tamaño aproximado de 10 a 20 μm de diámetro y poseen una envoltura externa gruesa, son redondeados y al microscopio se puede observar en su interior cuatro núcleos característicos de su especie.(Botero & Restrepo, 2012; Kasper et al., 2016)

Una vez ingeridos los quistes, los jugos gástricos debilitan su membrada y al llegar al intestino delgado se transforman en trofozoítos que son la forma invasiva, móvil y que causa daño al huésped, para lo cual los quistes se dividen por fusión binaria dando trofozoítos con ocho núcleos, estos a su vez se rodean de una porción de citoplasma para posteriormente ser liberados y continuar su división hasta llegar a obtener un tamaño aproximado de 20 a 40 μm de diámetro.(Becerril, 2014; Botero & Restrepo, 2012; Brooks, Carroll, Butel, Morse, & Mietzner, 2011)

En este estado se pueden distinguir dos capas: el ectoplasma que es hialino y el endoplasma que contiene los organelos del parásito, generalmente los trofozoítos presentan eritrocitos fagocitados en su interior y el movimiento se debe a las proteínas



de actina y miosina que se encuentran en su ectoplasma, las cuáles se contraen en el extremo contrario a la dirección de su desplazamiento es decir medianteseudópodo. (Becerril, 2014; Botero & Restrepo, 2012)

Los trofozoítos se sitúan en la luz del intestino e invaden la mucosa, pero en condiciones externas desfavorables para este microorganismo, entra en una fase de transición para posteriormente enquistarse nuevamente y así poder propagarse e infectar a nuevos huéspedes continuando su ciclo. (Botero & Restrepo, 2012)

- **Patogenia**

No todas las personas portadoras de *Entamoeba histolytica* llegan a padecer algún tipo de síntoma o de enfermedad, esto debido a diversas causas tales como la virulencia del parásito y las defensas del huésped; sin embargo, cuando producen enfermedad se da por los siguientes mecanismos:(Becerril, 2014; Botero & Restrepo, 2012)

- **Adhesión:**

Se da por el contacto físico entre los trofozoítos y las células de la mucosa del colon mediante la unión de lectinas de adherencia o llamadas también adhesinas presentes en el parásito con los receptores celulares, regulando la lisis de estas últimas.

- **Citólisis dependiente de contacto:**

El hospedero promueve la formación de células blancas de defensa, estas son lisadas por proteínas y enzimas de membrana de los trofozoítos amebianos cuando entran en contacto.

- **Fagocitosis**

La emplean con dos fines principalmente, uno para cubrir sus requerimientos nutricionales mediante la ingesta de almidón, hierro, etc. Y otro para el englobamiento de las células blanco por medio de las adhesinas.(Becerril, 2014)

Otras amebas patógenas para el ser humano son:

- ***Dientamoeba fragilis***



El cual generalmente tiene dos núcleos y no presenta formas quísticas, su trofozoíto mide alrededor de 6 a 12 μm de diámetro, no presentan movimiento activo y su cariosoma está formado de cuatro a ocho granos de cromatina, en el Ecuador presentan una prevalencia de 2,7% y pueden llegar a producir diarrea en el hospedero. (Botero & Restrepo, 2012)

- ***Entamoeba mosbkovskii***

Esta ameba presenta características muy similares a *E. histolytica* la cual debe ser diferenciada por estudios moleculares. (Botero & Restrepo, 2012)

- ***Entamoeba polecki***

Presenta una morfología similar a *E. histolytica* la cual puede reconocerse por tinción con hematoxilina férrica o coloración tricrómica presentando quistes uninucleados con inclusiones densas.(Botero & Restrepo, 2012)

1.1.2.2 Amebas no patógenas

Entre estas se encuentra la *Entamoeba dispar* que es morfológicamente similar a *Entamoeba histolytica* y su diferenciación se consigue por métodos inmunológicos, moleculares y bioquímicos.

- ***Entamoeba coli***

Es parásito del colon cuyo trofozoíto mide alrededor de 20 a 30 μm , su endoplasma contiene gránulos gruesos, vacuolas y bacterias pero estas no presentan eritrocitos en su interior a diferencia de *E. histolytica*, se moviliza mediante pseudópodos de forma lenta, la forma de quiste es ovoide o ligeramente redondeado y presenta más de cuatro núcleos en su forma maduro.(Botero & Restrepo, 2012)

- ***Endolimax nana***

La forma de trofozoíto es mucho más pequeña que las anteriores, mide entre 6 y 15 μm , su movimiento es muy limitado ya que presenta pseudópodos pequeños; presenta un cariosoma grande, y su forma quística es redonda u ovalada presentando hasta 4 núcleos.(Botero & Restrepo, 2012)

- ***Iodamoeba butschlii***

La forma de trofozoíto mide entre 8 y 20 μm de diámetro, se mueven lentamente y su endoplasma contiene bacterias y vacuolas con glucógeno,



cuando presenta la forma de quiste este puede llegar a medir de 5 a 14 μm de forma irregular con un solo núcleo grande con cariosoma excéntrico y gránulos en un solo lado. (Botero & Restrepo, 2012)

- ***Entamoeba gingivalis***

No se han encontrado evidencia de que presente formas quísticas por lo que su transmisión se realiza mediante el paso de los trofozoítos por la saliva ya que su hábitat es las encías y espacios interdentes. Los trofozoítos miden de 10 a 20 μm y poseen pseudópodos grandes que les permiten una gran motilidad.(Botero & Restrepo, 2012)

1.1.3 Tratamiento farmacológico

El objetivo terapéutico principal que cumplen los fármacos antiamebianos es la de actuar frente a los trofozoítos evitando la producción de quistes en la luz intestinal ya que, no se han descrito fármacos que puedan penetrar en la membrana de estos quistes. (Botero & Restrepo, 2012)

Existen diversos fármacos que son útiles para tratar la amebiasis dependiendo del sitio de acción ya sea en la luz intestinal por contacto directo con los parásitos o una acción tisular cuando las amebas penetran en la pared intestinal, por tanto, el grupo farmacológico más empleado incluido el Ecuador, es el de los derivados del 5-nitroimidazol cuyo representante es el Metronidazol que actúa frente a los parásitos que se encuentran en la luz intestinal y además tiene la capacidad de penetrar en la pared intestinal cuando las amebas se hallan en este sitio.(Botero & Restrepo, 2012; J. Flórez, Armijo, & África, 2014; MSP, 2012)

Estos fármacos penetran por difusión pasiva al interior del trofozoíto para posteriormente desintegrar el ADN parasitario e impedir su multiplicación.(J. Flórez et al., 2014)

Sin embargo, como todos los medicamentos disponibles en el mercado estos presentan reacciones adversas sobre todo de carácter digestivo y en ocasiones no son muy bien aceptadas por las personas a más de las interacciones desfavorables con



otras sustancias y el riesgo que existe en administrar este fármaco en el embarazo.(Becerril, 2014; J. Flórez et al., 2014; iDoctus, 2016; MSP, 2012)

1.2 Aceites esenciales

Según Can Baser, los aceites esenciales (AE) son mezclas complejas producto del metabolismo secundario de ciertas plantas y que pueden ser aislados por métodos físicos.(Can Baser & Buchbauer, 2010)

Alzamora y otros además complementan este concepto en que pueden tener más de 100 componentes entre los cuales pueden estar: compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos; son fracciones líquidas volátiles y rara vez sólidos o pastosos y la mayoría de aceites poseen un olor agradable.(Alzamora, Morales, Armas, & Fernández, 2001)

Los AE tienen actividad antibacteriana, antimicótica, antiparasitaria, antiviral e insecticida y se ubican en glándulas sebáceas de diversas partes de la planta (hojas, raíces, frutos, etc.) (Alzamora et al., 2001; Can Baser & Buchbauer, 2010; Vega & López, 2009)

Los compuestos químicos de los AE son relativamente volátiles y pueden ser eliminados por destilación, razón por la cual deben presentar puntos de ebullición y pesos moleculares bajos (<300 Daltons) a más de ser hidrófobos.(Can Baser & Buchbauer, 2010)

1.2.1 Clasificación

Se los puede clasificar de acuerdo a algunas consideraciones entre las cuales están:

- **Consistencia**

A su vez estos pueden ser esencias fluidas y volátiles a temperatura ambiente o también productos amorfos sólidos o semisólidos de naturaleza química compleja.

- **Origen**

Dependiendo de su forma de obtención en la cual, si se realiza directamente de la planta y no existe modificaciones químicas o físicas posteriores estamos



hablando de origen natural, mientras que, cuando se emplean procesos de enriquecimiento se habla de origen artificial y sintético cuando se combinan sus componentes mediante procesamientos químicos. (Martínez, 2003)

- **Naturaleza química**

Esta clasificación dependerá de los compuestos mayoritarios que se encuentren en la constitución del aceite pudiendo ser: monoterpenoides, sesquiterpenoides o fenilpropanoides. (Martínez, 2003)

1.2.2 Métodos de obtención de aceites esenciales

Los AE se pueden obtener mediante diversos métodos, entre los cuáles se mencionan:

- **Expresión:** este método es de mayor utilidad para la obtención de esencia de ciertos cítricos para lo cual la corteza de la fruta al ser sometida a presión mecánica libera el aceite que está contenido en su epicarpio y posterior a esto debe ser filtrado. (A. Flórez & Mario, 2014; Martínez, 2003)
- **Destilación por arrastre de vapor:** es utilizado por su bajo costo y por ser un método sencillo, consiste en condensar los componentes volátiles de la materia vegetal, para extraer el AE por medio de la evaporización de la mezcla a destilar; por lo que este tipo de procedimiento debe cumplir con ciertos parámetros como la temperatura de vaporización, la cual no debe ser superior a la de ebullición; así como el tamaño uniforme de la materia vegetal en estudio para de esta manera permitir el paso del vapor; también se debe trabajar a una presión más alta que la atmosférica, y los componentes volátiles deben ser insolubles en agua. (Flores & Puente, 2016; Luna, Garcia, & Malo, 2009; Stashenko, 2009)
- **Destilación con agua- vapor:** se usa para la extracción de la mayoría de plantas, en donde se emplea un vapor húmedo, el mismo que



traspasa a la materia vegetal suspendida y que a diferencia del método anterior, esta se encuentra apoyada en una malla.(Stashenko, 2009)

- **Hidrodestilación:** En donde la materia vegetal es introducida en agua previamente caliente, con la finalidad de que el vapor de agua ejerza su acción en las partículas vegetales. Sin embargo, la muestra puede sufrir notables cambios químicos a causa de la vaporización a la que es sometida.(Can Baser & Buchbauer, 2010; A. Flórez & Mario, 2014; Stashenko, 2009)
- **Extracción con disolventes:** este tipo de extracción es utilizada a escala de laboratorio y no industrialmente con el fin de reducir costos; consiste en poner en contacto la muestra seca y molida con disolventes orgánicos tales como: éter de petróleo, pentano, éter etílico, alcohol o cloroformo; obteniéndose esencias impuras ya que además se liberan otras sustancias como ácidos grasos, ceras y pigmentos los mismos que se pueden separar por destilación controlada. Los métodos comunes usados en los laboratorios son: extracción por reflujo y mediante equipo de Soxhlet; entre otros. Una de las desventajas que presenta este tipo de extracción es que el aceite esencial obtenido puede contener trazas de los solventes con lo que fue tratado.(A. Flórez & Mario, 2014; Luna et al., 2009; Martínez, 2003)
- **Extracción por fluidos supercríticos (EFS):** en donde debe cumplir con condiciones específicas de temperatura y presión, este tipo de destilación consiste en colocar la materia vegetal previamente pulverizada en una cámara de acero inoxidable haciéndola circular con un líquido supercrítico (por ejemplo: dióxido de carbono), el cual actúa como un solvente extractor, posterior a esto se obtiene un aceite puro y el solvente se elimina por descompresión progresiva. Al realizar este tipo de extracción se pueden obtener mayores rendimientos del AE en periodos cortos de tiempo, mientras que una de las desventajas de usar este tipo de extracción es el alto costo que representa. (Luna et al., 2009; Martínez, 2003)



1.2.3 Características Generales

Los AE son sustancias en su mayoría de consistencia líquida y poco solubles en agua, representan entre el 0,1 y el 1% del peso seco de la planta y pueden solubilizarse en disolventes orgánicos, su coloración puede variar desde tonos derivados del amarillo hasta incluso ser incoloros, su densidad es menor que la del agua en su gran mayoría, poseen un alto índice de refracción y desvían la luz polarizada. (López, 2004; Stashenko, 2009; Tecnova, 2013)

Químicamente, de manera general están compuestos por mezclas complejas de moléculas siendo de mayor medida pertenecientes al grupo de los terpenos y sus derivados oxigenados (alcoholes, aldehídos y cetonas) y en menor medida compuestos fenólicos, fenilpropanoides y otros derivados que en conjunto le dan el aroma y sabor característico de los aceites. (López, 2004; Stashenko, 2009)

Además, tienen la propiedad de actuar como mecanismo de defensa y protección para la planta en contra de depredadores, insectos y microorganismos como bacterias, virus, hongos, parásitos, etc. Aunque, algunos atraen a organismos polinizadores. (Stashenko, 2009)

1.2.4 Rendimiento

El rendimiento de cada aceite esencial es variado, se ha visto que los mayores rendimientos se pueden obtener de bálsamos y depende de las características que presente cada planta, así como del entorno en las que estas se desarrollan tales como el clima, tipo de suelo, estrés hídrico o incluso la presencia de microorganismos también influye el momento, el método y la hora de recolección de la droga, así como su posterior tratamiento previa extracción de su aceite. (Can Baser & Buchbauer, 2010; Stashenko, 2009)

$$\text{Rendimiento} = \frac{m_1}{m_2} \times 100$$

Donde:

m₁: masa del aceite obtenido

m₂: masa de la droga vegetal seca



100: factor de conversión a porcentaje (Navarrete, Gil, Durango, & Garcia, 2010)

1.2.5 Toxicidad

Los aceites esenciales al ser mezclas complejas en diversas concentraciones pueden llegar a ser altamente tóxicos, debido a la composición química que presenten estas sustancias, así como del uso inadecuado de los mismos, logrando desencadenar una serie de reacciones desfavorables en el organismo como por ejemplo: irritaciones en la piel, convulsiones, enfermedades hepáticas e incluso daños renales. (Velandia, Flechas, Stashenko, & Ocazonez, 2016)

Existen ciertos componentes como la tujona o el anetol que se encuentran en plantas como el ajeno, la salvia, ruda, entre otras; y estas pueden atravesar la barrera hematoencefálica afectando principalmente el sistema nervioso central, o incluso podrían llegar a ser abortivas. Se ha visto además que otros compuestos presentes en cítricos como la bergamota producen reacciones alérgicas en la piel; de igual forma la administración de aceites que han sufrido reacciones de oxidación o rancidez ocasionan problemas digestivos. (López, 2004; Velandia et al., 2016)

Debido a que no existe mucha información sobre las reacciones adversas que causan diversos aceites esenciales en el organismo, antes de hacer uso de los mismos es importante realizar estudios previos en animales para conocer su toxicidad, así como la dosis en la que se debe utilizar. (Velandia et al., 2016)

Por tales motivos, algunas recomendaciones que se debe tener en cuenta antes de utilizar un aceite esencial son:

- ✓ Considerar la dosis, tiempos de vida media, y el tiempo máximo en que puede utilizarse un aceite esencial.
- ✓ Tener precaución del uso de los mismos en niños, mujeres embarazadas, adultos mayores o personas con enfermedades crónicas.
- ✓ No se debe ingerir o aplicar directamente los aceites esenciales puros, si no deben ser diluidos previamente. (Ortuño, 2006)



1.2.6 Aceites esenciales como antiparasitarios

Varias investigaciones han correlacionado la actividad antimicrobiana de ciertos aceites esenciales frente a parásitos, hongos, bacterias e incluso algunos virus. (Brochot, Guilbot, Haddioui, & Roques, 2017; Carvajal & Quintero, 2012; Rojas, Solís, & Palacios, 2010)

Esta característica se debe a los componentes que presenta el aceite, siendo los derivados terpénicos los más representativos, un claro ejemplo de esto es lo demostrado por Clavijo y colaboradores al encontrar que el ascaridol, un monoterpene presente en el paico es un antihelmíntico natural que altera el metabolismo parasitario. En otro estudio Behnia y colaboradores, relacionaron la actividad antiamebiana del aceite esencial de *Thymus vulgaris* (tomillo) con la presencia de timol, carvacrol, borneol y linanool (Behnia et al., 2008; Clavijo et al., 2016)

Sin embargo, otras investigaciones sugieren que inclusive que otras moléculas como la emetina un alcaloide presente en algunas plantas poseen actividad antiamebiana. (Monzote, Sariago, Montalvo, Garrido, & Scull, 2004; Torres-Santos, Moreira, Kaplan, Meirelles, & Rossi-Bergmann, 1999)

1.3 Plantas sujeto de estudio

1.3.1 Paico

Nombre científico: *Chenopodium ambrosioides*

Pertenece a la familia Chenopodiaceae, comúnmente conocido como: “paico”, “paico macho”, “paico oloroso”, “yerba de Santa María”, “yerba hedionda”, “té de los jesuitas”; “pie de ganso”, entre otras denominaciones; esta planta es introducida en el Ecuador, pero sin embargo puede ser cultivada en diversas partes de las regiones Sierra y Costa debido a que crece muy bien en zonas tropicales y sub tropicales. Puede llegar a medir hasta 1m, con un tallo erguido y con numerosas hojas, sus flores son de color amarillentas o verdosas.(de la Torre et al., 2008; Monzote, 2010; Torres, Ricciardi, Agrelo de Nassiff, Ricciardi, & Bandoni, 2003)

Características del aceite esencial



Generalmente este aceite esencial está constituido por: taninos, terpenos, carveno, p-climol, linomeno, alcanfor, salicilato de metilo, ácido butírico, pectina, sales minerales y de sesquiterpenos como el ascaridol que le da el olor agradable, sabor pungente desagradable y es responsable de la toxicidad del aceite. (Gómez, 2008)

Usos medicinales

Esta planta como lo menciona de la Torre, es utilizada con diversos fines, por ejemplo: el jugo como antiespasmódico, estimulante cardíaco o laxante; se lo usa en decocción para combatir dolores de estómago y cabeza, en infusión se emplea para mejorar la memoria y para combatir la anemia, se lo emplea además como antiulceroso, antipalúdico, hipotensor, relajante muscular, cardíaco depresor, antibacteriano, antifúngico y vermífugo. (de la Torre et al., 2008)

La propiedad antiparasitaria de esta planta se debe a la presencia del ascaridol que es capaz de combatir tanto a protozoarios como helmintos.(Cafferata, Jeandupeux, & Rimada, 2005; Torres et al., 2003)

1.3.2 Ajenjo

Nombre científico: *Artemisia absinthium*

Pertenece a la familia Asteraceae, genero Artemisia, es una planta herbácea, introducida y cultivada en el Ecuador, crecen en zonas tropicales y subtropicales, sus tallos son ramosos, y pueden llegar a medir hasta 1 metro, sus hojas son pecioladas y sus flores son de color amarillo, y emanan un olor característico. (de la Torre et al., 2008; Llorens, Castell, & Pascual, 2008)

Características del aceite esencial

La composición del aceite esencial de esta planta es variable y numerosa, pero de acuerdo a investigaciones científicas se determinan como componentes predominantes a la β -tuyona en alto porcentaje superior al 70%, así como de, cis-epoxiocimeno, acetato de cis-crisantenilo, acetato de sabinilo, alcanfor y además posee santonina.(García-Rodríguez Juan et al., 2015; Llorens et al., 2008; Lopes-Lutz, Alviano, Alviano, & Kolodziejczyk, 2008)



Usos medicinales

De la Torre relata que el ajenjo se emplea para diversas afecciones de hígado, riñones y dolores estomacales, pero debido a la gran cantidad de metabolitos que constituyen su aceite esencial, investigaciones realizadas por Llorens y colaboradores establecen que la santonina presente en el aceite esencial de ajenjo posee actividad antiparasitaria frente a helmintos, sin embargo, García Rodríguez y colaboradores en una investigación realizada en 2015 sugirieron que otros constituyentes tales como el cis-epoxiocimeno y el acetato de cis-crisantenilo podrían tener efecto antiparasitario. (de la Torre et al., 2008; García-Rodríguez Juan et al., 2015; Llorens et al., 2008)

1.3.3 Congona

Nombre científico: *Peperomia inaequalifolia* Ruiz & Pav.

Pertenece a la familia Piperaceae, se encuentra ampliamente distribuida en el Ecuador principalmente en las provincias de la Sierra, a esta planta se la conoce como “cunguna”, “congona” “cuncuna” o “tigresillo”, es una hierba terrestre nativa y cultivada, puede crecer hasta los 50cm de altura tal como lo describe Berdonces, su tallo es nudoso, cilíndrico y ramificado de igual forma, sus hojas son de color verde brillante y de forma redonda verticiladas, presenta floración verdosa y fruto pequeño; crece en bosques húmedos o montañas tropicales. (Berdonces, Serra, & Océano, 2010; de la Torre et al., 2008; Noriega et al., 2015)

Características del aceite esencial

Según Noriega, en un estudio que realizó para determinar la composición y la actividad biológica “*in vitro*” del aceite esencial de la congona, esta posee en su estructura oleosa gran cantidad de safrol, pudiendo estar presente en cantidades superiores al 30% de la composición total del AE, mientras que los miembros de los fenilpropanos, la miristicina y la elimicina representan el 20% del total de constituyentes, completan el porcentaje demás compuestos como hidrocarburos, sesquiterpenos entre otros. (Noriega et al., 2015)

Usos medicinales

En Ecuador, a las hojas trituradas y el zumo de la congona se les atribuye efectos cicatrizantes tópicos, analgésico para cefaleas, dolores reumáticos o cólicos



menstruales, también se emplea como tranquilizante natural, para el tratamiento de enfermedades de riñones, hígado y además, se emplea como dentífrico para gingivitis, para combatir la otitis e inclusive la conjuntivitis ocular y antiparasitario debido a la acción antimicrobiana del safrol y miristicina presentes en la planta. (de la Torre et al., 2008; Endara, 2015)

1.3.4 Albahaca

Nombre científico: *Ocimum basilicum*

Pertenece a la familia Lamiáceas, es una planta herbácea, aromática, introducida y cultivada en diversas provincias del Ecuador; conocida como albahaca, albahaca de comer, albahaca de sal, albahaca negra, pimpinela. (de la Torre et al., 2008). Las hojas y aromas de esta planta son variados, pueden crecer hasta 60 cm de largo y sus flores pueden ser de color morado o blanco. (Cardoso & Sosa, 2012)

Características del aceite esencial

Posee una gran variedad de compuestos entre los cuales los principales son monoterpenos y fenilpropanoides, aunque como reportaron Hussain y colaboradores en 2008 cuando evaluaron la composición química y la actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite de esta planta en diversas estaciones del año, notaron que predominaba un miembro de los terpenos, el linalool. (Hussain, Anwar, Hussain Sherazi, & Przybylski, 2008)

Usos medicinales

La infusión de hojas y flores es utilizada para tratar diversos padecimientos como afecciones nerviosas, dolores a nivel de oído o estómago, flatulencias, problemas en las vías urinarias, diarreas, la cocción de las mismas en cambio sirven para tratar tumores, fiebre, resfríos, dolor de cabeza. (Cardoso & Sosa, 2012; de la Torre et al., 2008)

Se ha estudiado y evidenciado que poseen propiedades antiespasmódicas, antivirales, antimicrobianas, antiparasitarias, antisépticas e insecticidas, dicha propiedad se le atribuye al linalool que ejerce su acción frente a los microorganismos. (de Almeida et al., 2007; Hussain et al., 2008).



CAPITULO 2

METODOLOGÍA

2.1 Tipo de investigación

Esta investigación es de tipo experimental, cuantitativo/cualitativo

2.2 Variables

2.2.1 Variable Independientes

Tabla 1: Definición de variables independientes

Variables	Definición	Dimensión	Indicador
Aceites Esenciales	Mezclas complejas producto del metabolismo secundario de ciertas plantas y que pueden ser aislados por métodos físicos.(Can Baser & Buchbauer, 2010)	Tres niveles	Control positivo de aceite esencial con actividad antiamebiana (+), control negativo para aquel que no presente esta actividad (-) y la actividad de la mezcla de estos aceites.
Concentración de aceites esenciales.	Cantidad de aceite expresado en % v/v utilizado para demostrar el efecto sinérgico de sus respectivas mezclas. (Cazar, 2013)	100 % v/v 50 % v/v + 50 % v/v 33 % v/v + 33 % v/v + 33 % v/v	En que concentración presentan mejor actividad antiamebiana.
Concentración del testigo farmacológico (metronidazol)	Es un derivado del 5-nitroimidazol, con actividad bacteriana de amplio espectro frente a bacterias anaerobias estrictas y protozoos. Empleado como control del proceso(iDoctus, 2016)	2 mg/mL 5 mg/mL 10 mg/mL	En que concentración y menor tiempo inhibe el crecimiento amebiano

Fuente: Los Autores



2.2.2 Variables Dependientes

Tabla 2: Definición de variables dependientes

Variables	Definición	Dimensión	Indicador
Actividad Antiamébia	Capacidad que poseen ciertas sustancias o metabolitos presentes en plantas con acción inhibitoria frente a parásitos.(Behnia et al., 2008; Sawangjaroen et al., 2006; Sharma & Devi, 2001)	Positivo o negativo	Capacidad de inhibir o no el crecimiento amebiano

Fuente: Los Autores

2.3 Trabajo Experimental

2.3.1 Recolección del material vegetal

Para este estudio se adquirieron y evaluaron hojas de especies vegetales procedentes del Mercado 10 de Agosto de la ciudad de Cuenca. El material vegetal fue trasladado al Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas (Campus Balzay). Se clasificó el material vegetal desechando las partes afectadas por microorganismos, así como hojas que presentaron deterioro. Las especies empleadas para la extracción de aceites esenciales fueron: *Chenopodium ambrosioides* (paico), *Artemisia absinthium* (ajenjo), *Ocimum basilicum* (albahaca), *Peperomia inaequalifolia* (congona).

2.3.2 Obtención de aceites esenciales

Se pesaron entre 200 y 300 gramos de droga fresca vegetal previamente seleccionada en una balanza BOECO (capacidad 0 – 610 g; precisión 0.01 g) y se procedió a



trocearla a temperatura ambiente y en condiciones asépticas, con el fin de aumentar la superficie de contacto y optimizar el proceso de extracción del aceite. Para la obtención de los aceites esenciales de las especies en estudio, se empleó el método de extracción por arrastre de vapor en un equipo Clevenger. La fuente de calor fue un manto calefactor, con capacidad para balones de hasta 5 litros. Los aceites obtenidos fueron almacenados hasta el bioensayo en oscuridad y temperatura próxima a -4°C ; en una refrigeradora Indurama®. Posteriormente, los aceites fueron trasladados al Laboratorio de Microscopía de la Universidad de Cuenca (Campus Central). Los AE fueron centrifugados a 5000 rpm en una microcentrífuga Hettich®, con la finalidad de separar posibles residuos acuosos y se almacenó a temperatura cercana a -4°C en una refrigeradora Indurama®.

2.3.3 Preparación del medio de cultivo (Caldo de Diamond)

Los componentes del medio Diamond fueron pesados en balanza analítica OHAUS (capacidad 120 g, precisión 0.0001 g). Previa disolución en agua destilada c.s.p y ajuste de pH a 7 con NaOH 1 N medido con tira indicadora de pH marca Merck®, el medio fue autoclavado a 121°C por 15 min en un autoclave marca Trident®. A continuación, se presenta la formulación para la preparación de 1000 mL de medio de cultivo:

Tabla 3: Constituyentes del medio de cultivo Caldo de Diamond.

Componente	Especificaciones Técnicas	Cantidad (gramos)
Caldo de Soya Tripticasa	Merck®	2
Extracto de Levadura	Difco®	1
Sacarosa	Calidad comercial	0.5
Ácido ascórbico	Merck®	0.02
Agar	Difco®	0.05

Fuente: Los Autores

Una vez que se enfrió el medio se trasvasaron 9 mL a tubos falcon de 15 mL de capacidad y se almacenó a temperatura de refrigeración ($2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$) en una refrigeradora Indurama® hasta su uso. (Diamond, 1961)



2.3.4 Aislamiento y mantenimiento de *Entamoeba histolytica*

Los microorganismos necesarios para este ensayo se obtuvieron a partir de muestras de heces humanas obtenidas de diversos laboratorios clínicos de la Ciudad de Cuenca, los que, tras el análisis macro y microscópico en el Laboratorio de Microscopia de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, presentaron por lo menos una cruz de positividad. Posteriormente las muestras fecales fueron enriquecidas con el medio de cultivo (Caldo de Diamond) tomando aproximadamente 1g de muestra y colocando en cada tubo de medio preparado previamente. A esta suspensión se añadió 1 mL de suero sanguíneo y 1 mL de penicilina benzatínica (1000 UI/mL) más 1mL de Gentamicina (1mg/mL), con la finalidad de inhibir la proliferación bacteriana, la cual agota los nutrientes del medio. Se homogenizó y se procedió a incubar los tubos por 24 horas a 37 °C en una estufa marca Memmert®. Transcurrido este tiempo y tras confirmar mediante la observación con un microscopio marca Optimus® con un aumento de 40X el crecimiento amebiano se resembró en tubos por sustitución del medio. Las siembras y resiembras se realizaron en 5 tubos falcon con medio de cultivo cada tubo.

2.3.5 Ensayo “*in vitro*” de actividad Antiamebiana

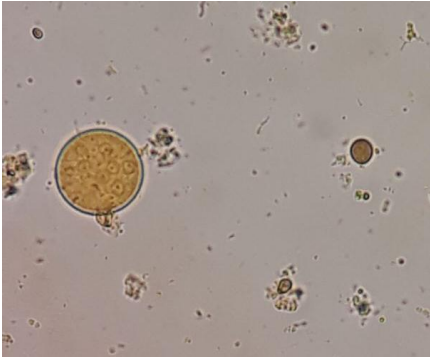
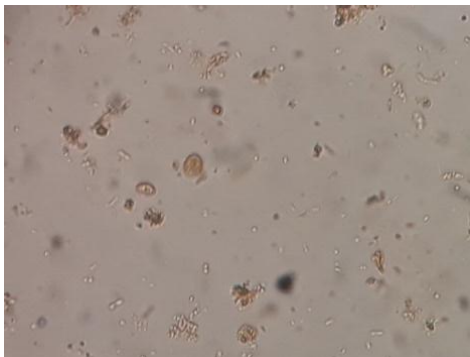
Inicialmente se evaluó la actividad antiamebiana de AE puros. Para el efecto se mezclaron 50 µL de cada aceite con 950 µL del medio de cultivo resembrado, se incubó a 37°C y se observó el crecimiento amebiano a las 24 y 48 horas posteriores. Se prepararon placas que fueron teñidas con lugol y eosina al 0,1% distinguiendo la presencia de trofozoítos, prequistes y quistes de *Entamoeba histolytica*. Se trabajó con un control positivo que estaba conformado por 1000 µL de medio resembrado y como control negativo se usó 50 µL de una solución de metronidazol con una concentración de 2 mg/mL, 5 mg/mL y 10 mg/mL, adicionando 950 µL de caldo resembrado. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Las mezclas de AE formuladas para evaluar el efecto sinérgico fueron probadas siguiendo la metodología descrita previamente.

Se realizó una evaluación microscópica de los cultivos a las 24 y 48 horas de incubación. La observación de preparaciones teñidas según lo descrito previamente permitió evidenciar la presencia de quistes y trofozoitos. Se realizó un recuento de amebas por 100 campos y se asignó un resultado positivo al evidenciar presencia de



por lo menos una célula por campo. El resultado fue negativo al evidenciarse ausencia de células en los campos investigados.

Tabla 4: Evaluación microscópica de los ensayos.

	
Evaluación microscópica de un ensayo antiamebiano positivo. Observado con un aumento de 40X.	Evaluación microscópica de un ensayo antiamebiano negativo. Observado con un aumento de 40X.

Fuente e ilustraciones: Los Autores

2.3.6 Formulación de mezclas de aceites esenciales

Se seleccionaron los tres aceites que destacaron por su acción antiamebiana y se diseñó un sistema de mezclas Simplex-Lattice entre estos, con el fin de observar si se potenciaba su actividad, trabajándose por duplicado y con las siguientes concentraciones:

Tabla 5: Proporciones aplicadas en la formulación de las mezclas de aceites esenciales

Experimento	Aceite esencial 1	Aceite esencial 2	Aceite esencial 3
1	100%	0	0
2	0	100%	0
3	0	0	100%
4	50%	50%	0
5	50%	0	50%
6	0	50%	50%
7	33%	33%	33%



Fuente: (Lundstedt et al., 1998)

2.3.7 Análisis de Datos

Se realizaron al menos cinco repeticiones de cultivos de amebas para verificar la viabilidad del medio. Se realizaron controles de crecimiento a las 24, 48 y 72 horas, para establecer el tiempo óptimo de crecimiento. Debido a que los datos son cualitativos se estableció el menor tiempo al cual se observó un buen crecimiento como el tiempo óptimo. Con este parámetro se realizó el bioensayo. Los resultados se presentan como frecuencias.



CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Rendimiento de obtención de aceites esenciales

Los rendimientos de extracción se expresan en la siguiente tabla como porcentaje peso/volumen:

Tabla 6: Rendimiento de extracción de los aceites esenciales

Espece Vegetal	Material vegetal (g)	Aceite esencial (mL)	Rendimiento (% p/v)	Número de extracciones
<i>Chenopodium ambrosioides</i> (paico)	559,91	3	0,5358	2
<i>Artemisia absinthium</i> (ajeno)	424,63	1.2	0,2825	2
<i>Ocimum basilicum</i> (albahaca)	508,99	2,5	0,4911	3
<i>Peperomia inaequalifolia</i> (congona).	242,12	1	0,4130	1

Fuente: Los Autores

3.2 Aceites esenciales con actividad antiamebiana

La efectividad de los aceites esenciales realizados en este bioensayo con poder antiamebiano, se expresan mediante la observación microscópica de presencia/ausencia de trofozoítos, quistes y prequistes de *Entamoeba histolytica*, los mismos que se exponen a continuación:

**Tabla 7:** Actividad antiamebiana de los aceites esenciales

Especie	Actividad antiamebiana*	
	24 horas	48 horas
<i>Chenopodium ambrosioides</i> (paico)	+	-
<i>Artemisia absinthium</i> (ajenjo)	-	-
<i>Ocimum basilicum</i> (albahaca)	+	+
<i>Peperomia inaequalifolia</i> (congona).	-	-
Control positivo (metronidazol 2 mg/mL, 5 mg/mL y 10 mg/mL)	-	-
Control negativo (medio Diamond)	+	+

*Frecuencia de tres repeticiones. (+): crecimiento de al menos una célula por campo, al examinar 100 campos. (-): ausencia de crecimiento de células en 100 campos. **Fuente:** Los Autores

3.3 Potencial de mezclas de aceites esenciales como inhibidores del crecimiento

Los resultados obtenidos de las mezclas de aceites para observar el efecto sinérgico fueron las siguientes:

Tabla 8: Actividad antiamebiana de mezclas de los aceites esenciales

Formulación de la mezcla	Actividad antiamebiana*	
	24 horas	48 horas
50% congona y 50% paico	-	-
50% congona y 50% ajenjo	-	-
50% paico y 50% ajenjo	-	-
33% ajenjo, 33% paico, 33% congona	-	-
Control positivo (metronidazol 2 mg/mL, 5 mg/mL y 10 mg/mL)	-	-
Control negativo (medio Diamond)	+	+

*Frecuencia de tres repeticiones. (+): crecimiento de al menos una célula por campo, al examinar 100 campos. (-): ausencia de crecimiento de células en 100 campos. **Fuente:** Los Autores



DISCUSIÓN

En este trabajo se obtuvieron aceites esenciales de cuatro especies de plantas medicinales, paico (*Chenopodium ambrosioides*), ajeno (*Artemisia absinthium*), congona (*Peperomia inaequalifolia*) y albahaca (*Ocimum basilicum*). Los rendimientos de extracción oscilaron entre 0,28% a 0,53%, siendo el aceite de paico el que demostró mejor rendimiento de extracción (0,5358%) como se observa en la Tabla 6 de este trabajo.

Para evaluar la hipótesis planteada, se probó la actividad antiparasitaria de los AE y sus combinaciones a diversas concentraciones, frente a *Entamoeba histolytica*.

Como lo mencionan J. Anthony et al., en su artículo “Plant active components – a resource for antiparasitic agents?”, los aceites esenciales de origen vegetal tienen gran potencial como antiparasitarios debido a su baja densidad (alrededor de 0.94 g/mL) y rápida difusión a través de membranas, potenciando la efectividad de sus componentes activos a parásitos específicos. (Anthony, Fyfe, & Smith, 2005)

En la obra escrita por L. de la Torre et al., “Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador”, menciona que las cuatro plantas en estudio poseen actividad antiparasitaria. Según lo expuesto en la Tabla 7, se demostró que los aceites esenciales de congona y ajeno fueron los de mejor actividad antiamebiana. (de la Torre et al., 2008)

De acuerdo al estudio realizado por J. García et al.: “Selective nematocidal effects of essential oils from two cultivated *Artemisia absinthium* populations”, se establece que el aceite esencial de ajeno presenta en su composición cis – epoxiocimeno y acetato de cis – crisantenilo, a los cuales se les atribuye poder antiparasitario. J. Llorens et al., en su artículo “Composición del aceite esencial de *Artemisia absinthium* L. procedente del término municipal de Calamocha (Teruel). Caracterización de su quimiotipo y estudio de las variaciones estacionales” indica que el aceite esencial de ajeno posee entre sus compuestos, santonina la cual presenta acción antihelmíntica. En nuestro trabajo se demostró que esta planta inhibe el crecimiento amebiano desde las 24 horas de ser incubado con el medio. (García-Rodríguez Juan et al., 2015; Llorens et al., 2008)



P. Noriega et al., al estudiar la composición química del aceite esencial de congona en su publicación titulada “Chemical Composition and *in-vitro* biological activities of the essential oil from leaves of *Peperomia inaequalifolia* Ruiz&Pav” estableció que este bioproducto presentaba en su estructura moléculas de safrol en gran cantidad. Además, S. Endara, encontró otra molécula en la composición del AE de congona: la miristicina, en su trabajo de titulación: “Evaluación del efecto acaricida del aceite esencial de congona, (*Peperomia inaequalifolia* Ruiz & Pav.) en plantas de frutilla (*Fragaria vesva* L.)”. Los autores establecieron que estas moléculas poseen actividad antiparasitaria y por lo cual en nuestro trabajo experimental no se evidenció crecimiento amebiano al igual que lo sucedido con el ajeno a las 24 horas e cocultivo. (Endara, 2015; Noriega et al., 2015)

Las estructuras amebianas al interactuar con el aceite esencial de paico, vieron inhibido su crecimiento desde las 48 horas de incubación, siendo esta acción tardía con respecto a los AE de ajeno y congona. La acción antiamebiana se debió a la presencia de ascaridol en la estructura de este aceite, demostrando así lo expuesto por A. Torres et al., en su obra “Examen del contenido en ascaridol del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L.(Paico)” y por L. Cafferata et al., en su estudio “Método simple y rápido para la determinación de ascaridol en medio acuoso utilizando CLAE (RP-HPLC)”, quienes reportaron que dicha molécula posee actividad antiparasitaria. (Cafferata et al., 2005; Torres et al., 2003)

El efecto sinérgico de mezclas de aceites esenciales se planteó como una estrategia con miras al futuro diseño de un preparado farmacéutico antiparasitario. La aplicación de un diseño de mezclas permitió, con un número mínimo de experimentos, explorar el potencial de mezclas binarias y terciarias de aceites esenciales, como potenciales agentes antiamebianos. Como se observa en la Tabla 8 de este trabajo, las mezclas binarias, obtenidas con las mezclas de aceites al 50%, y la mezcla ternaria, la cual se formuló con los tres aceites bioactivos al 33% mostraron actividad antiamebiana a las 24 horas de cultivo. No se visualizaron crecimientos ni vestigios de estructuras amebianas, esto debido a la gran cantidad de metabolitos antiparasitarios presentes, ya comentados en los párrafos anteriores.

Pese a que I. de Almeida et al., en su publicación “Antigiardial activity of *Ocimum basilicum* essential oil” y A. Hussain et al., en su obra “Chemical composition,



antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations” encontraron que el aceite esencial de albahaca presentaba en su estructura linalool al cual se le atribuye y se ha demostrado poseer propiedades anti protozoarias, en nuestro estudio, al trabajar con este aceite esencial puro no se observó dicho efecto incluso a las 48 horas posteriores a la incubación. (de Almeida et al., 2007; Hussain et al., 2008)

En este trabajo se observó el crecimiento de algunas especies del género *Entamoeba* tanto patógenas (*Entamoeba histolytica*) como no patógenas (*Entamoeba coli*), ya que no se trabajó con una cepa estandarizada de *Entamoeba histolytica*, no pudo conseguirse un cultivo axénico como el logrado por L. Diamond que al formular este medio de cultivo que lleva su nombre, incluyó antibióticos con el fin de inhibir la flora bacteriana y de esta forma garantizar el desarrollo únicamente de protozoarios. (Diamond, 1961)

Dado que los aceites esenciales están constituidos por mezclas complejas de una amplia variedad de moléculas, se requiere conocer su composición para definir con exactitud cual o cuales de estas son las que ejercen el efecto antiamebiano.

La acción antiparasitaria de los AE se debe quizá a la posibilidad que estos tienen de atravesar las membranas de estos microorganismos dada a la estructura y lipofilicidad de sus componentes; como lo detalla I. de Almeida et al., los aceites esenciales son capaces de llegar al citoplasma o incluso introducirse en el núcleo del parásito y alterar la estructura de la síntesis proteica o simplemente interactuar con proteínas integrales de membrana y afectar su permeabilidad, dando como resultado la lisis parasitaria. (de Almeida et al., 2007)

J. Anthony et al., además manifiestan que la acción antiparasitaria de los aceites esenciales puede también deberse a alteraciones moleculares que impiden la fagocitosis de estructuras por parte del parásito y de esta forma impedir su propagación. (Anthony et al., 2005).

Finalmente, las plantas productoras de aceites esenciales incluidas en este estudio han demostrado su potencial como fuente de agentes antiparasitarios. Los aceites esenciales pueden estandarizarse con mayor facilidad que un extracto vegetal, por lo que presentan un mayor potencial para el futuro desarrollo de un producto



farmacéutico. La formulación de mezclas permite optimizar el uso de estos productos bioactivos, cuyo rendimiento de extracción representa un desafío al momento de su escala preparativa. Por este motivo se recomienda establecer, mediante ensayos de microdilución, la dosis mínima inhibitoria de las mezclas para dar continuidad al proceso investigativo que conducirá a la formulación de un agente antiparasitario.(McGaw, Jäger, & van Staden, 2000)



CONCLUSIONES

El desarrollo del presente trabajo de investigación permite formular las siguientes conclusiones:

1. Se valoró la acción antiparasitaria de los aceites esenciales de paico (*Chenopodium ambrosioides*), ajeno (*Artemisia absinthium*), congona (*Peperomia inaequalifolia*) y albahaca (*Ocimum basilicum*) frente a *Entamoeba histolytica*, en donde:
 - Se observó que los AE de ajeno y congona inhiben el crecimiento de este parásito a las 24 horas de incubación.
 - El AE de paico inhibe el crecimiento a las 48 horas de incubación y el AE de albahaca no tuvo una efectividad comparable con las otras especies en estudio.
 - Las variaciones de acción antiparasitaria entre estos aceites esenciales se deben a factores ambientales que repercutieron en el desarrollo de las plantas y por esta razón no se expresaron en cantidades suficientes los metabolitos con efecto antiparasitario.
2. Se evaluó la actividad antiamebiana de los aceites esenciales de las plantas en estudio en un ensayo “*in vitro*”, mediante la combinación de cada aceite esencial en un cultivo amebiano sembrado en caldo de Diamond que es específico para protozoarios durante al menos 48 horas.
3. Se estableció el efecto sinérgico de mezclas de los aceites esenciales que presentaron una mejor actividad antiamebiana; es decir, se trabajó con mezclas binarias en concentraciones del 50% de cada aceite y mezclas ternarias en concentraciones del 33% de los AE de paico, ajeno y congona.
4. Se identificó que todas las mezclas realizadas son efectivas frente a *Entamoeba histolytica*, ya que todas estas inhibieron el crecimiento de este parásito en tiempos inferiores a las 24 horas de incubación.

Por tal motivo, esta investigación demuestra que los compuestos bioactivos presentes en las plantas tienen un gran potencial antiparasitario.



RECOMENDACIONES

Por lo anterior expuesto en el presente trabajo y por los resultados obtenidos, se recomienda lo siguiente:

- Se empleen o validen nuevas técnicas de crecimiento de otros protozoarios o helmintos con el fin de investigar la acción frente a estos de los aceites esenciales que han sido analizados en este estudio.
- Se analice la composición y variación estacional de cada aceite esencial para determinar en cuál época se da una mayor concentración de compuestos bioactivos.
- Los resultados obtenidos deben servir como fundamento para el desarrollo de nuevas investigaciones ante otros blancos farmacológicos. Adicionalmente, se deben trabajar en ensayos de microdilución para obtener dosis inhibitorias de aceites esenciales e investigar la composición de los mismos mediante estrategias cromatográficas
- Debería emplearse cepas estandarizadas de *Entamoeba histolytica*, con el fin de garantizar un cultivo axénico de las mismas.



BIBLIOGRAFÍA

- Alzamora, L., Morales, L., Armas, L., & Fernández, G. (2001). Medicina Tradicional en el Perú: Actividad Antimicrobiana *in vitro* de los Aceites Esenciales Extraídos de Algunas Plantas Aromáticas, 156 - 161. Retrieved from <http://www.redalyc.org/html/379/37962208/>
- Anthony, J.-P., Fyfe, L., & Smith, H. (2005). Plant active components – a resource for antiparasitic agents? *Trends in Parasitology*, 21(10), 462-468.
doi:10.1016/j.pt.2005.08.004
- Becerril, M. (2014). *Parasitología Médica* (4 ed.). México D.F: McGRAW-HILL/INTERAMERICANA.
- Behnia, M., Haghighi, A., Komeylizadeh, H., Javad, S., & Abadi, A. (2008). Inhibitory Effects of Iranian *Thymus vulgaris* Extracts on in Vitro Growth of *Entamoeba histolytica*. *Korean Journal of Parasitology*, 46, 153-156.
doi:10.3347/kjp.2008.46.3.153
- Berdonces, J. L., Serra, J. L. B., & Océano. (2010). *Gran enciclopedia de las plantas medicinales: diccionario de plantas medicinales*: Océano Ambar.
- Botero, D., & Restrepo, M. (2012). *Parasitosis Humanas - incluye animales venenosos y ponsoñosos* (5 ed.). Medellín.
- Brochot, A., Guilbot, A., Haddioui, L., & Roques, C. (2017). Antibacterial, antifungal, and antiviral effects of three essential oil blends. *MicrobiologyOpen*, 6(4), e00459. doi:10.1002/mbo3.459
- Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., Morse, S., & Mietzner, T. (2011). *JAWETZ, MELNICK Y ADELBERG Microbiología médica* (25 ed.). México D.F: McGRAW-HILL INTERAMERICANA.
- Cafferata, L., Jeandupeux, R., & Rimada, R. (2005). Método Simple y Rápido para la determinación de Ascaridol en Medio Acuoso utilizando CLAE (RP-HPLC). *Acta farmacéutica Bonaerense*, 24, 567 - 571.
- Can Baser, H., & Buchbauer, G. (2010). *Handbook of ESSENTIAL OILS Science, Technology and Applications* (1 ed.). Boca Raton: CRC Press.



- Cardoso, U., & Sosa, M. (2012). Propiedades del aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) y sus aplicaciones en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6, 54 - 65.
- Carvajal, C., & Quintero, M. (2012). *Caracterización fitoquímica, actividad antimicrobiana y antimicótica del aceite esencial de congona (Peperomia inaequalifolia Ruiz&Pav.) Piperaceae*. (Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales), Universidad Politécnica Salesiana, Quito.
- Cazar, M. (2013). Formulación de mezclas de aceites esenciales como inhibidores de *Listeria monocytogenes*, 833-836. Retrieved from <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/11196/1/Formulacion%20de%20mezclas%20de%20aceites%20esenciales%20como%20inhibidores%20de%20Listeria%20monocytogenes.pdf>
- Clavijo, F., Barrera, V., Rodríguez, L., Mosquera, J., Yáñez, I., Godoy, G., & Grijalva, J. (2016). Evaluación del Paico *Chenopodium ambrosoides* y Chocho *Lupinus mutabilis* Sweet como antiparasitarios Gastrointestinales en bovinos jóvenes. *LA GRANJA Revista de ciencias de la vida*, 24, 95 - 110.
doi:10.17163/lgr.n24.2016.08
- de Almeida, I., Alviano, D. S., Vieira, D. P., Alves, P. B., Blank, A. F., Lopes, A. H. C. S., . . . Rosa, M. d. S. S. (2007). Antigiardial activity of *Ocimum basilicum* essential oil. *Parasitology Research*, 101(2), 443-452. doi:10.1007/s00436-007-0502-2
- de la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M., & Balslev, H. (2008). *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*. Quito: Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador & Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus.
- Diamond, L. S. (1961). Axenic Cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Science*, 134(3475), 336.
- Endara, S. (2015). *Evaluación del efecto acaricida del aceite esencial de congona, (Peperomia inaequalifolia Ruiz & Pav.) en plantas de frutilla (Fragaria vesva L.)*. (Magister en Agroecología Tropical Andina), Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito, Quito. Retrieved from <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/10361/1/UPS-QT08218.pdf>



- Flores, K., & Puente, M. (2016). Actividad Antibacteriana del aceite esencial de Matico sobre *Escherichia coli*, 19 - 23. Retrieved from http://repositorio.upla.edu.pe/bitstream/handle/UPLA/113/Katia_Tesis_Quimico_2016.pdf?sequence=3&isAllowed=y
- Flórez, A., & Mario, A. (2014). Introducción a la industria de los aceites esenciales extraídos de plantas medicinales y aromáticas, 7 - 16. Retrieved from http://repositorio.sena.edu.co/sitios/introduccion_industria_aceites_esenciales_plantas_medicinales_aromaticas/
- Flórez, J., Armijo, J., & África, M. (2014). *FARMACOLOGÍA HUMANA* (6 ed.). Barcelona: Elsevier Masson.
- García-Rodríguez Juan, J., Andrés, M.-F., Ibañez-Escribano, A., Julio Luis, F., Burillo, J., Bolás-Fernández, F., & González-Coloma, A. (2015). Selective nematocidal effects of essential oils from two cultivated *Artemisia absinthium* populations. In *Zeitschrift für Naturforschung C* (Vol. 70, pp. 275).
- Gómez, J. (2008). Epazote (*Chenopodium ambrosioides*). Revisión a sus características morfológicas, actividad farmacológica y biogénesis de su principal principio activo, ascaridol. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 7, 3-9.
- Henry, J., Davey, F., Herman, C., McPherson, R., Pincus, M., Threatte, G., & Woods, G. (2005). *El Laboratorio en el Diagnóstico Clínico* (20 ed. Vol. 2). Madrid: MARBÀN LIBROS, S.L.
- Hussain, A. I., Anwar, F., Hussain Sherazi, S. T., & Przybylski, R. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*, 108(3), 986-995. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.010>
- iDoctus. (2016). Metronidazol. Retrieved from <http://int.idoctus.com/consulta/medicamento/idpa/3705>
- INEC. (2014). Principales causas de morbilidad en el Ecuador. Retrieved from <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/vdatos/>
- Kasper, D., Hauser, S., Jameson, L., Fauci, A., Longo, D., & Loscalzo, J. (2016). *Harrison Principios de Medicina Interna* (19 ed.). México, D.F: McGRAW-HILL INTERAMERICANA.



- Llorens, J., Castell, V., & Pascual, R. (2008). Composición del aceite esencial de *Artemisia absinthium* L procedente del término municipal de Calamocha (Teruel). Caracterización de su quimiotipo y estudio de las variaciones estacionales. *Xiloca*, 36, 61-84.
- Lopes-Lutz, D., Alviano, D. S., Alviano, C. S., & Kolodziejczyk, P. P. (2008). Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils. *Phytochemistry*, 69(8), 1732-1738.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.02.014>
- Luna, P., Garcia, P., & Malo, L. (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción3, 24 - 30. Retrieved from
https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/39540267/Tsia-31-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1519929848&Signature=x2S1i41B45Fk%2BJV0hGuYg%2Bczyal%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DTsia_31_Peredo_Luna_et_al_2009.pdf
- Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L., Thelin, B., Nyström, Å., Pettersen, J., & Bergman, R. (1998). Experimental design and optimization. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 42(1), 3-40. doi:[https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(98\)00065-3](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(98)00065-3)
- López, T. (2004). Los aceites esenciales Aplicaciones farmacológicas, cosméticas y alimentarias. *OFFARM*, 23, 88 -90.
- Martínez, A. (2003). Aceites Esenciales, 1 -25. Retrieved from http://www.med-informatica.net/TERAPEUTICA-STAR/AceitesEsencialesUdeA_esencias2001b.pdf
- McGaw, L. J., Jäger, A. K., & van Staden, J. (2000). Antibacterial, anthelmintic and anti-amoebic activity in South African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 72(1), 247-263. doi:[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00269-5](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00269-5)
- Monzote, L. (2010). *Potencial terapéutico del aceite esencial de Chenopodium ambrosioides y algunos de sus componentes frente a Leishmania* (Doctor en Ciencias Farmacéuticas), Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", La Habana.



- Monzote, L., Sariego, I., Montalvo, A., Garrido, N., & Scull. (2004). Propiedades antiprotozoarias de aceites esenciales extraídos de plantas cubanas. *Revista Cubana de medicina*, 56, 230 -232.
- MSP. (2012). *PROTOCOLOS TERAPÉUTICOS*. Quito: Ministerio de Salud Pública Dirección de Normatización.
- Murray, P., Rosenthal, K., & Michael, P. (2014). *Microbiología médica* (7 ed.). Barcelona: ELSEVIER Inc.
- Navarrete, C., Gil, J., Durango, D., & Garcia, C. (2010). Extracción y caracterización del aceite esencial de mandarina obtenido de residuos agroindustriales77, 85 - 92. Retrieved from
- Noriega, P., Mosquera, T., Baldisserotto, A., Abad, J., Aillon, C., Cabezas, D., . . . Mandredini, S. (2015). Chemical Composition and *in-vitro* biological activities of the essential oil from leaves of *Peperomia inaequalifolia* Ruiz&Pav. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 4, 29-31.
- Ortiz, E., Galarza, C., Cornejo, F., & Ponce, J. (2014). Acceso a medicamentos y situación del mercado farmacéutico en Ecuador36, 57 -62. Retrieved from
- Ortuño, M. (2006). *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes*. España: Aiyana.
- Rojas, J., Solís, H., & Palacios, O. (2010). Evaluación in vitro de la actividad anti *Trypanosoma cruzi* de aceites esenciales de diez plantas medicinales. *Anales de la Facultad de medicina*, 71, 161 - 165.
- Ríos, M., Koziol, M., Borgtoft, H., & Granda, G. (2007). PLANTAS ÚTILES DEL ECUADOR. Aplicaciones, retos y perspectivas. In. Quito: Herbario QCA Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Sawangjaroen, N., Phongpaichit, S., Subhadhirasakul, S., Visutth, M., Srisuwan, N., & Thammanpalerd, N. (2006). The anti-amoebic activity of some medicinal plants used by AIDS patients in southern Thailand. *Springer - Verlag*, 98, 588 - 591. doi:10.1007/s00436-005-0119-2
- Sharma, P., & Devi, J. (2001). A Review of Plant Species Assessed in vitro for Antiamoebic Activity or both Antiamoebic and Antiplasmodial Properties. *PHYTOTHERAPY RESEARCH*, 15, 1-16.
- Stashenko, E. (2009). *Aceites Esenciales*. Bucaramanga - Santander: CENIVAM.



- Tecnova. (2013). Estudio sobre el uso de las plantas aromáticas y sus aceites esenciales en la industria agroalimentaria, 3-29. Retrieved from <http://www.retse.com/admin/uploads/docs/20130326142151-1.pdf>
- Torres, A., Ricciardi, G., Agrelo de Nassiff, A., Ricciardi, A., & Bandoni, A. (2003). Examen del contenido en ascaridol del aceite esencial de *Chenopodium Ambrosioides* L. (Paico). *FACENA*, 19, 27 - 32.
- Torres-Santos, E. C., Moreira, D. L., Kaplan, M. A. C., Meirelles, M. N., & Rossi-Bergmann, B. (1999). Selective Effect of 2',6'-Dihydroxy-4'-Methoxychalcone Isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(5), 1234-1241.
- Vega, P., & López, M. (2009). Agentes antimicrobianos presentes en especias y hierbas, 85 - 93. Retrieved from [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Vega-Portocarrero-et-al-2009.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Vega-Portocarrero-et-al-2009.pdf)
- Velandia, S., Flechas, M., Stashenko, E., & Ocazonez, R. (2016). Propuesta para seleccionar aceites esenciales de plantas de Colombia para investigación con base en su citotoxicidad. *Vitae Revista de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias*, 23(1), 18 - 29.
doi:<http://dx.doi.org/10.17533/udea.vitae.v23n1a03>



ANEXOS

ANEXO 1: RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

Fórmula empleada para cada cálculo:

$$\text{Rendimiento} = \frac{m_1}{m_2} \times 100$$

- **Paico:** *Chenopodium ambrosioides*

Volumen (mL) de aceite esencial obtenido $m_1 = 3$

Peso de material seco $m_2 = 559.91$

$$\text{Rendimiento} = \frac{3}{559.91} \times 100 = \mathbf{0,5358\%}$$

- **Ajenjo:** *Artemisia absinthium*

Volumen (mL) de aceite esencial obtenido $m_1 = 1.2$

Peso de material seco $m_2 = 424.63$

$$\text{Rendimiento} = \frac{1.2}{424.63} \times 100 = \mathbf{0,2825\%}$$

- **Congona:** *Peperomia inaequalifolia* Ruiz & Pav.

Volumen (mL) de aceite esencial obtenido $m_1 = 1$

Peso de material seco $m_2 = 242.12$

$$\text{Rendimiento} = \frac{1}{242.12} \times 100 = \mathbf{0,4130\%}$$

- **Albahaca:** *Ocimum basilicum*

Volumen (mL) de aceite esencial obtenido $m_1 = 2.5$

Peso de material seco $m_2 = 508.99$

$$\text{Rendimiento} = \frac{2.5}{508.99} \times 100 = \mathbf{0,4911\%}$$



ANEXO 2: CÁLCULOS DE CONCENTRACIONES DEL TESTIGO FARMACOLÓGICO (Metronidazol)

- Cantidad de principio activo en un comprimido = 1000 mg
- Peso del comprimido = 1412 mg
- **Solución madre:** La solución madre a ensayar se ajustó a una concentración de 100 mg/mL, pesando 100 mg de principio activo y disolviendo en 2ml de etanol.

$$\begin{array}{r} 1000 \text{ mg} \quad 1412 \text{ mg} \\ 100 \text{ mg} \quad \times \quad x = 141,2 \text{ mg/mL} = 282,4 \text{ mg/2mL} \end{array}$$

- **Soluciones de Trabajo:** se realizaron las siguientes diluciones de la solución madre:

$$\text{Fórmula empleada: } V_1 C_1 = V_2 C_2$$

- **10 mg:**

$$V_1 = \frac{1 \text{ mL} \times 10 \text{ mg/mL}}{100 \text{ mg/mL}} = 100 \mu\text{L} + 900 \mu\text{L de etanol al 98\%}$$

- **5mg:**

$$V_1 = \frac{1 \text{ mL} \times 5 \text{ mg/mL}}{100 \text{ mg/mL}} = 50 \mu\text{L} + 950 \mu\text{L de etanol al 98\%}$$

- **2mg:**

$$V_1 = \frac{1 \text{ mL} \times 2 \text{ mg/mL}}{100 \text{ mg/mL}} = 20 \mu\text{L} + 980 \mu\text{L de etanol al 98\%}$$



ANEXO 3: ILUSTRACIONES DEL PROCEDIMIENTO

➤ ILUSTRACIÓN DE PLANTAS EMPLEADAS

- **Paico:** *Chenopodium ambrosioides*



Fotografías: los autores

- **Ajenjo:** *Artemisia absinthium*



Fotografías: los autores

- **Congona:** *Peperomia inaequalifolia* Ruiz & Pav.



Fotografías: los autores

- **Albahaca:** *Ocimum basilicum*



Fotografías: los autores

➤ **ILUSTRACIÓN DEL PROCESO EXPERIMENTAL**

- **Extracción del Aceite esencial por método Clevenger.**



Fotografías: los autores

- **Ilustración del aceite esencial de paico**



Fotografías: los autores

- **Ilustración del aceite esencial de ajeno**



Fotografías: los autores

- **Ilustración del aceite esencial de congona**



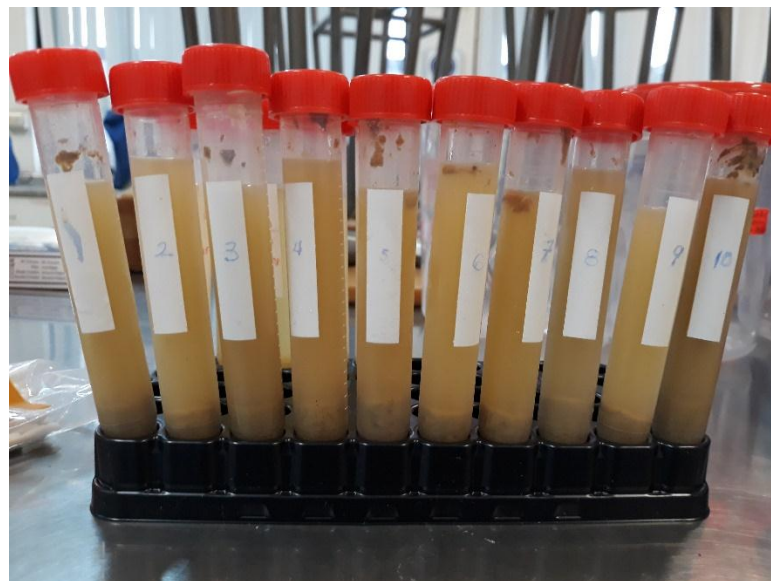
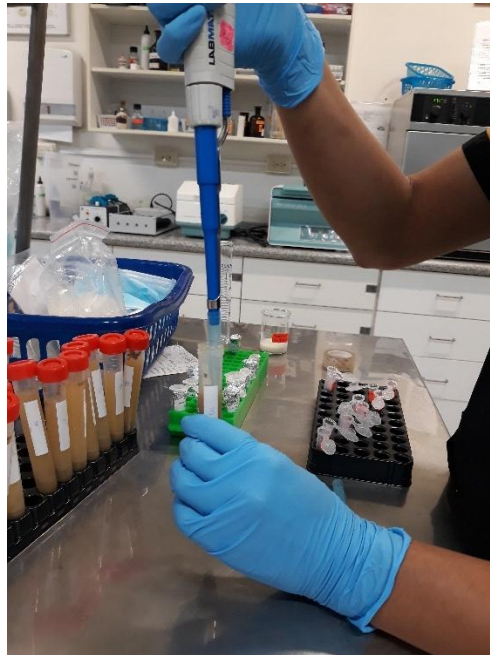
Fotografías: los autores

- Ilustración del aceite esencial de albahaca



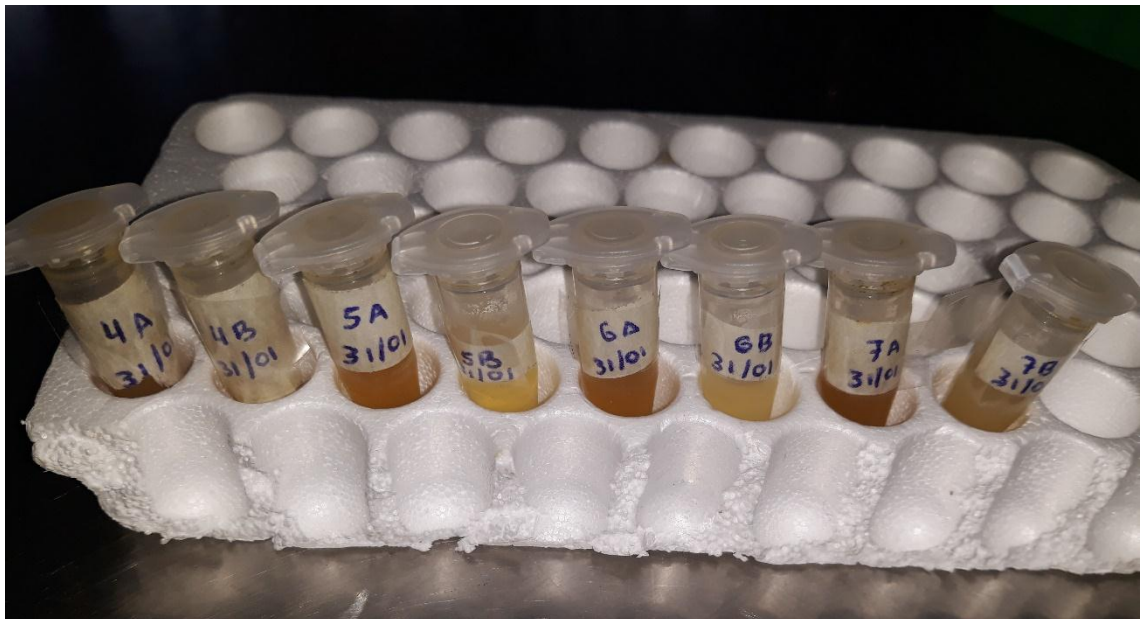
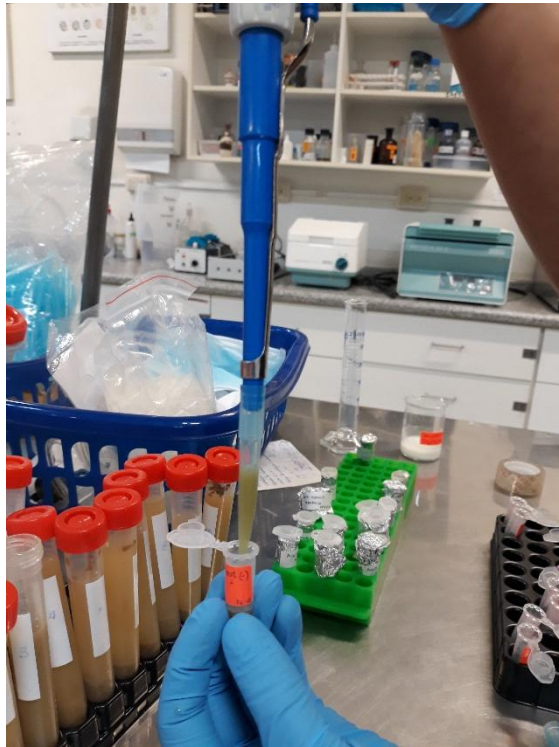
Fotografías: los autores

- Siembra de materia fecal en el medio de cultivo



Fotografías: los autores

- Siembra del medio con *Entamoeba histolytica* en cada uno de los aceites esenciales y los controles positivo y negativo.

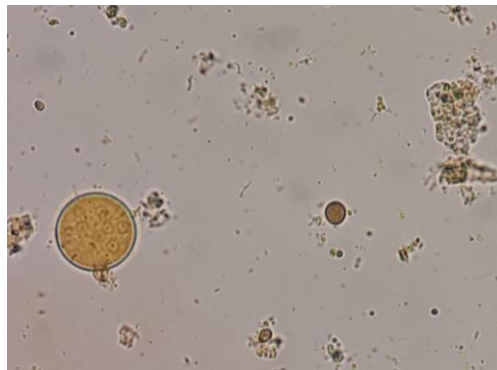


Fotografías: los autores

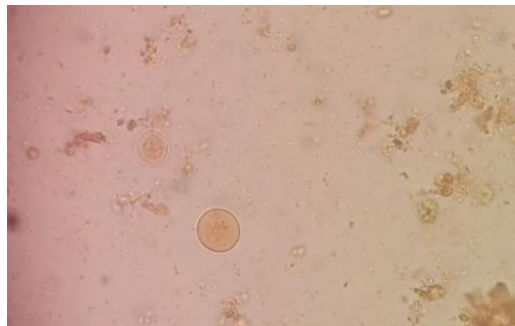


ANEXO 4: ILUSTRACIONES DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

- Observación realizada en el medio de cultivo caldo de Diamond.



Presencia de prequiste de *Entamoeba histolytica* y quiste de *Entamoeba coli* a las 24 horas de siembra. Tinción con lugol y observado a 40X. **Fotografía:** los autores

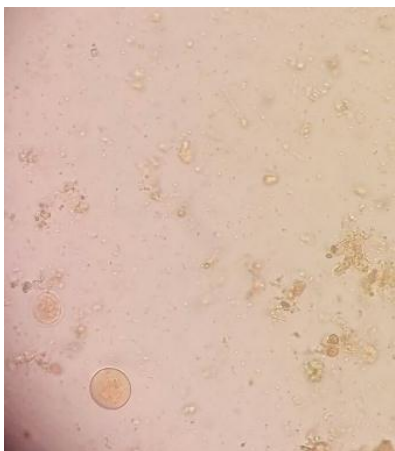
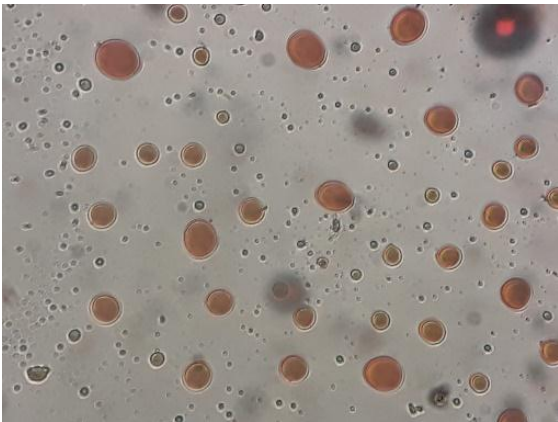
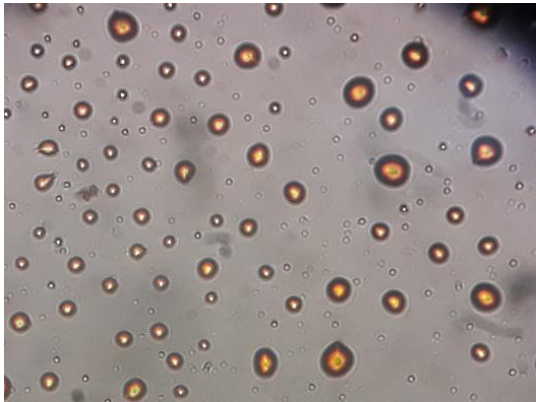
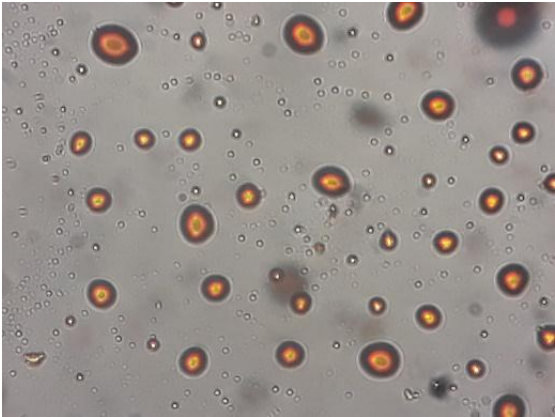


Presencia de trofozoito de *Entamoeba histolytica* y quiste de *Entamoeba coli* a las 48 horas de siembra. Tinción con eosina al 0,1% y observado a 40X. **Fotografía:** los autores



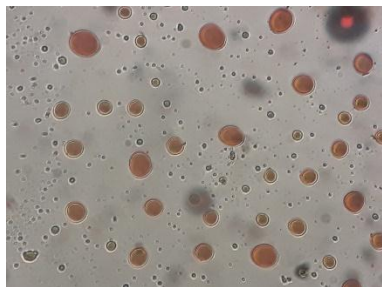
➤ Observación realizada en el bioensayo

Tabla 9: Ilustraciones de los resultados de aceites esenciales como antiamebianos

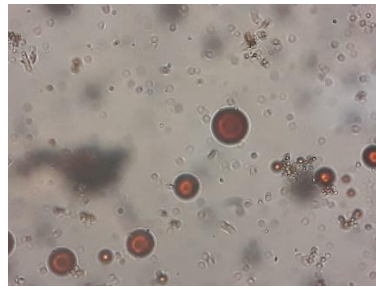
Paico (<i>Chenopodium ambrosioides</i>), AE 100% puro.	
 <p>Presencia de trofozoítos, prequistes y quistes de <i>Entamoeba histolytica</i> y quistes de <i>Entamoeba coli</i> a las 24 horas de siembra. Tinción con lugol y observado a 40X.</p>	 <p>Ausencia de estructuras parásitas celulares a las 48 horas de siembra. Tinción con lugol y observado a 40X.</p>
Ajenjo (<i>Artemisia absinthium</i>), AE 100% puro	
 <p>Ausencia de estructuras parásitas celulares a las 24 horas de siembra. Tinción con lugol y observado a 40X.</p>	 <p>Ausencia de estructuras parásitas celulares a las 48 horas de siembra. Tinción con lugol y observado a 40X.</p>



Congona (*Peperomia inaequalifolia*) Ruiz & Pav, AE 100% puro

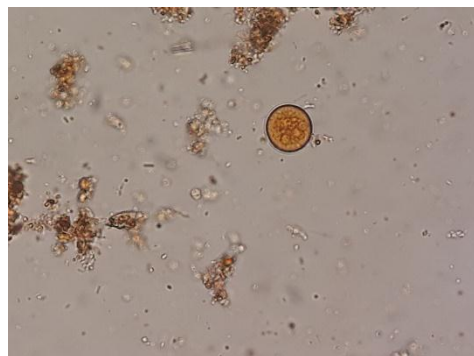


Ausencia de estructuras parásitas celulares a las 24 horas de siembra. Tinción con lugol y observado a 40X.

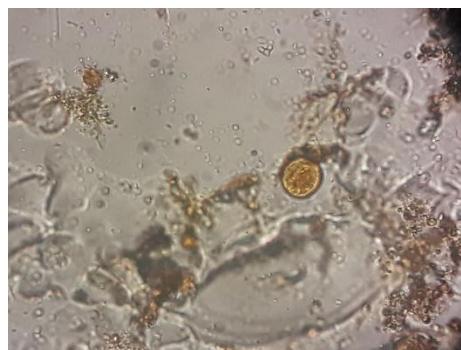


Ausencia de estructuras parásitas celulares a las 48 horas de siembra. Tinción con lugol y observado a 40X.

Albahaca (*Ocimum basilicum*), AE 100% puro



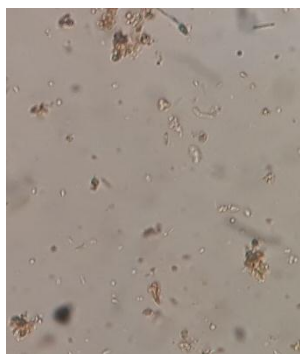
Presencia de trofozoítos, prequistes y quistes de *Entamoeba histolytica* y quistes de *Entamoeba coli* a las 24 horas de siembra. Tinción con lugol y observado a 40X.



Presencia de trofozoítos, prequistes y quistes de *Entamoeba histolytica* y quistes de *Entamoeba coli* a las 48 horas de siembra. Tinción con lugol y observado a 40X.



Control positivo (metronidazol 2 mg/mL, 5 mg/mL y 10 mg/mL)

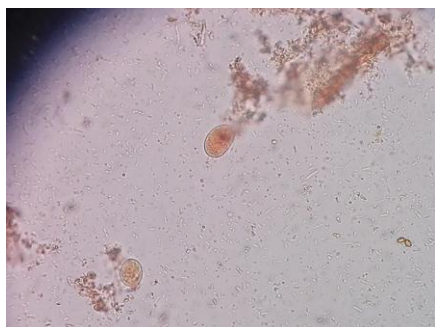


Ausencia de estructuras parásitas celulares a las 24 horas de siembra. Tinción con lugol y observado a 40X.

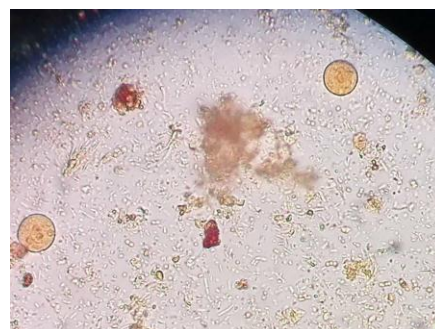


Ausencia de estructuras parásitas celulares a las 48 horas de siembra. Tinción con lugol y observado a 40X.

Control negativo (medio Diamond)



Presencia de trofozoítos, prequistes y quistes de *Entamoeba histolytica* y quistes de *Entamoeba coli* a las 24 horas de siembra. Tinción con lugol y observado a 40X.



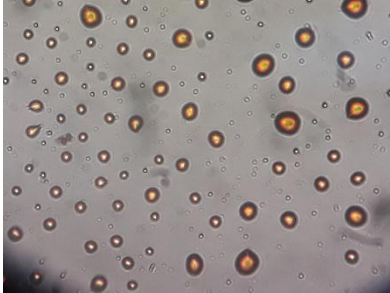
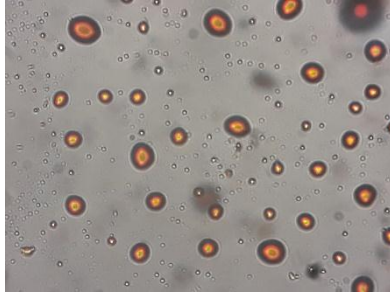

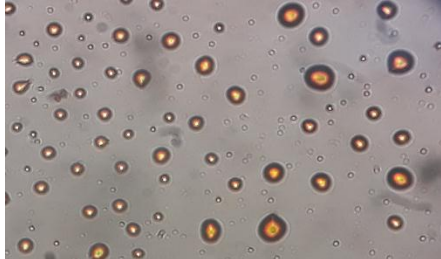
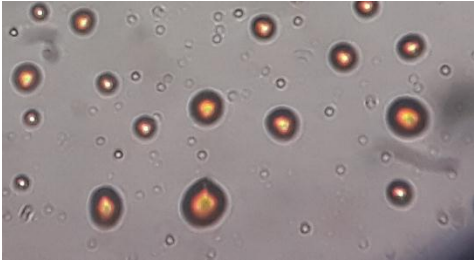
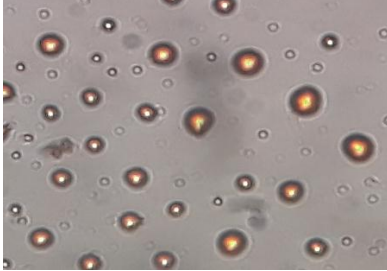
Presencia de trofozoítos, prequistes y quistes de *Entamoeba histolytica* y quistes de *Entamoeba coli* a las 24 horas de siembra. Tinción con lugol y observado a 40X.

Fuente e ilustraciones: los autores



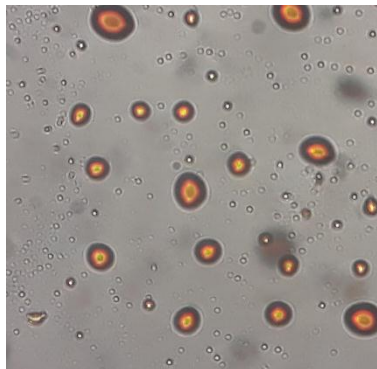
➤ **Observación realizada de la actividad antiamebiana en el diseño de mezclas de aceites esenciales**

Tabla 10: Ilustraciones de la actividad antiamebiana del diseño de mezclas

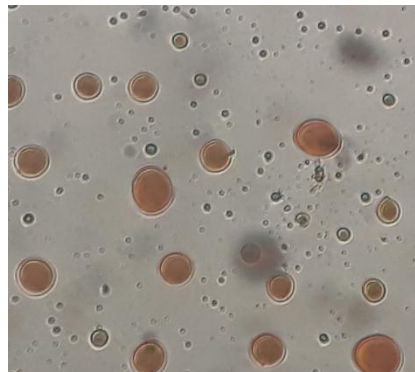
Formulación de la mezcla	
50% congona y 50% paico	
	
Ausencia de estructuras parásitas celulares a las 24 horas de siembra. Tinción con lugol y observado a 40X.	Ausencia de estructuras parásitas celulares a las 48 horas de siembra. Tinción con lugol y observado a 40X.
50% congona y 50% ajeno	
	
Ausencia de estructuras parásitas celulares a las 24 horas de siembra. Tinción con lugol y observado a 40X.	Ausencia de estructuras parásitas celulares a las 48 horas de siembra. Tinción con lugol y observado a 40X.
50% paico y 50% ajeno	
	
Ausencia de estructuras parásitas celulares a las 24 horas de siembra. Tinción con lugol y observado a 40X.	Ausencia de estructuras parásitas celulares a las 48 horas de siembra. Tinción con lugol y observado a 40X.



33% ajeno, 33% paico, 33% congona

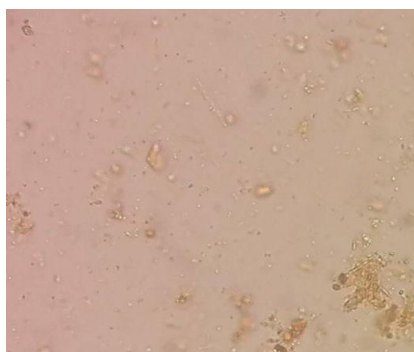


Ausencia de estructuras parásitas celulares a las 24 horas de siembra. Tinción con lugol y observado a 40X.



Ausencia de estructuras parásitas celulares a las 48 horas de siembra. Tinción con lugol y observado a 40X.

Control positivo (metronidazol 2 mg/mL, 5 mg/mL y 10 mg/mL)

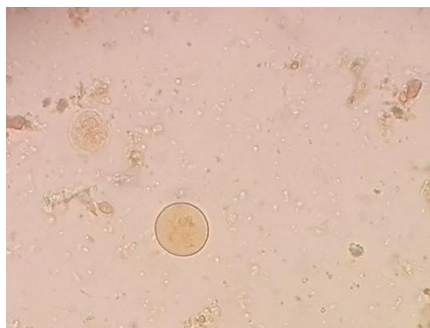


Ausencia de estructuras parásitas celulares a las 24 horas de siembra. Tinción con lugol y observado a 40X.



Ausencia de estructuras parásitas celulares a las 48 horas de siembra. Tinción con lugol y observado a 40X.

Control negativo (medio Diamond)



Presencia de trofozoítos, prequistes y quistes de *Entamoeba histolytica* y quistes de *Entamoeba coli* a las 24 horas de siembra. Tinción con lugol y observado a 40X.



Presencia de trofozoítos, prequistes y quistes de *Entamoeba histolytica* y quistes de *Entamoeba coli* a las 48 horas de siembra. Tinción con lugol y observado a 40X.

Fuente e ilustraciones: los autores