

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

“INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES”

TEMA:

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL
ACEITE ESENCIAL DE SUNFO (*CLINOPODIUM NUBIGENUM* (*KUNTH*)
KUNTZE) FRENTE A PATÓGENOS DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
(*STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ATCC: 25923, *STREPTOCOCCUS PYOGENES*
ATCC: 19615, *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* ATCC: 49619 Y
STREPTOCOCCUS MUTANS ATCC: 25175).**

AUTOR:

EVELYN ANDREA FONSECA CHASIPANTA

TUTOR:

TATIANA DE LOS ÁNGELES MOSQUERA TAYUPANTA

Quito, Julio del 2016

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, Evelyn Andrea Fonseca Chasipanta con documento de identificación N° 1724219777, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo de titulación intitulado: **“EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE SUNFO (*CLINOPODIUM NUBIGENUM (KUNTH) KUNTZE*) FRENTE A PATÓGENOS DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS (*STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ATCC: 25923, *STREPTOCOCCUS PYOGENES* ATCC: 19615, *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* ATCC: 49619 Y *STREPTOCOCCUS MUTANS* ATCC: 25175.”**, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



Evelyn Andrea Fonseca Chasipanta

1724219777

Quito, 08 de Julio del 2016

DECLARATORIA DE COAUTORÍA DE LA DOCENTE TUTORA

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, **EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE SUNFO (*CLINOPODIUM NUBIGENUM (KUNTH) KUNTZE*) FRENTE A PATÓGENOS DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS (*STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ATCC: 25923, *STREPTOCOCCUS PYOGENES* ATCC: 19615, *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* ATCC: 49619 Y *STREPTOCOCCUS MUTANS* ATCC: 25175** realizado por Evelyn Andrea Fonseca Chasipanta, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, Julio del 2016



Tatiana de los Ángeles Mosquera Tayupanta

C.I: 1711668010

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1	4
MARCO CONCEPTUAL.....	4
1.1 Descripción Botánica	4
1.2 Taxonomía de <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze).....	4
1.3 Principios activos de <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze.	5
1.4 Propiedades farmacológicas	6
1.5 Aceite esencial.....	6
1.6 Composición química de los aceites esenciales	7
1.7 Métodos de extracción de aceites esenciales.....	9
1.7.1 Destilación por arrastre de vapor	9
1.7.2 Extracción con disolventes volátiles.....	9
1.7.3 Extracción con fluidos supercríticos.....	10
1.7.4 Extracción por prensado	10
1.7.5 Extracción por enflorado o enfleurage.....	10
1.8 Microorganismos patógenos que afectan a las vías respiratorias	11
1.8.1 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC: 25723	11
1.8.2 <i>Streptococcus mutans</i> ATCC: 25175.....	13

1.8.3 <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC: 19615	14
1.8.4 <i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC: 49619.....	15
1.9 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.....	16
1.9.1 Técnica de difusión en agar empleando discos.....	17
1.9.2 Técnica de difusión en pozos.....	18
1.9.3 Técnica de dilución.....	18
CAPÍTULO 2	19
MARCO METODOLÓGICO.....	19
2.1 Localización de recolección	19
2.2 Identificación y recolección del material vegetal	19
2.3 Secado y desinfección del material vegetal.....	20
2.4 Aceite esencial de <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze	20
2.4.1 Proceso de obtención del aceite esencial	20
2.4.2 Control de calidad del aceite esencial de <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) <i>Kuntze</i>	20
2.4.2.1 Análisis organoléptico	21
2.4.2.2 Análisis físicos.....	22
2.4.2.3 Análisis químicos.....	23
2.5 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana	24
2.5.1 Activación de las cepas bacterianas.....	24

2.5.2 Preparación del inóculo	25
2.5.3 Preparación de la sustancia control.....	26
2.5.4 Preparación de las 6 concentraciones del aceite esencial de sunfo.....	26
2.5.5 Antibiograma mediante difusión en pozos	27
2.5.6 Interpretación de resultados	28
2.6 Método estadístico.....	29
2.6.1 Análisis de varianza	29
2.6.2 Análisis estadístico	30
CAPÍTULO 3.....	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
3.1 Control de calidad del aceite esencial de <i>Clinopodium nubigenum (Kunth) Kuntze</i>	32
3.1.1 Análisis Organoléptico	32
3.1.2 Análisis físicos.....	33
3.1.3 Análisis químicos.....	33
3.2 Sustancia control	34
3.3 Actividad antimicrobiana del aceite de Sunfo <i>Clinopodium nubigenum (Kunth)</i> <i>Kuntze</i>	35
3.4 Análisis estadístico	37
CONCLUSIONES	40

RECOMENDACIONES	42
BILBIOGRAFÍA	43
ANEXOS	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición química de <i>Clinopodium nubigenum</i>	8
Tabla 2: Análisis y control de calidad de los aceites esenciales	21
Tabla 3: Tratamientos para el análisis de actividad inhibitoria del aceite de Sunfo <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze frente a cuatro microorganismos <i>S. aureus</i> , <i>S.</i> <i>mutans</i> , <i>S. pyogenes</i> y <i>S. pneumoniae</i>	30
Tabla 4: Análisis organoléptico	32
Tabla 5: Valor de pH del aceite esencial.....	33
Tabla 6: Valores de la sustancia control Penicilina Clemizol.....	34
Tabla 7 : Promedios en mm de los halos de inhibición de aceite de Sunfo <i>Clinopodium</i> <i>nubigenum</i> (Kunth) Kuntze frente a cuatro bacterias causantes de enfermedades respiratorias.	35
Tabla 8: ANOVA de la actividad antimicrobiana del aceite de Sunfo <i>Clinopodium</i> <i>nubigenum</i> (Kunth) Kuntze frente a cuatro bacterias causantes de enfermedades respiratorias	38
Tabla 9: Rangos formados mediante el método comparativo de Tuckey al 5%	39

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1: Dilución de la sustancia control	26
--	----

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexos 1: ANOVA de la actividad inhibitoria del aceite de <i>Sunfo Clinopodium nubigenum (Kunth) Kuntze</i> frente a <i>S. aureus</i> ATCC: 25923 mediante el método comparativo de Tuckey al 5%	48
Anexos 2: ANOVA de la actividad inhibitoria del aceite de <i>Sunfo Clinopodium nubigenum (Kunth) Kuntze</i> frente a <i>S. mutans</i> ATCC: 25175 mediante el método comparativo de Tuckey al 5%	48
Anexos 3: ANOVA de la actividad inhibitoria del aceite de <i>Sunfo Clinopodium nubigenum (Kunth) Kuntze</i> frente a <i>S. pyogenes</i> ATCC: 19615 mediante el método comparativo de Tuckey al 5%	49
Anexos 4: ANOVA de la actividad inhibitoria del aceite de <i>Sunfo Clinopodium nubigenum (Kunth) Kuntze</i> frente a <i>S. pneumoniae</i> ATCC: 49619 mediante el método comparativo de Tuckey al 5%	49
Anexos 5: Ficha técnica <i>S. aureus</i> ATCC: 25923	50
Anexos 6: Ficha técnica <i>S. pyogenes</i> ATCC: 19615	51
Anexos 7: Ficha técnica <i>S. pneumoniae</i> ATCC: 49619	52
Anexos 8: Ficha técnica <i>S. mutans</i> ATCC: 25175	53

RESUMEN

El Ecuador cuenta con una amplia biodiversidad de plantas medicinales procedentes de las diferentes regiones del país, la mayoría de plantas medicinales se utilizan como tal basándose en conocimientos ancestrales más no por tener conocimientos científicos de sus propiedades medicinales aunque existen pocos estudios sobre las plantas andinas del Ecuador, no se encuentra información científica sobre la actividad antibacteriana del sunfo (*Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze). En el presente trabajo experimental se determinó la actividad antimicrobiana del aceite esencial de sunfo frente a cuatro bacterias causantes de enfermedades respiratorias, el sunfo fue recolectada en los páramos de la parroquia de Pintag, en el Herbario Nacional se certificó que se trataba de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntz., para la extracción del aceite esencial se utilizó la técnica de destilación por arrastre de vapor. La determinación de la actividad antimicrobiana del aceite se comprobó mediante pruebas *in vitro* de antibiogramas por difusión en pozos utilizando 6 concentraciones al 5%, 2.5%, 1.25%, 0.6%, 0.3% y 0.15% del aceite esencial, como control positivo Penicilina Clemizol de 1'000.000 U.I. y con control negativo DMSO, mediante el programa estadístico Infostat se estableció la significancia estadística de los resultados obtenidos, aunque si existió una formación de halo de inhibición para *S. aureus* ATCC: 25923 a concentraciones 5% y 2.5% de aceite esencial, para *S. mutans* ATCC: 25175 al 0.15%, para *S. pyogenes* ATCC: 19615 al 2.5% y 0.3% y para *S. pneumoniae* ATCC: 49619 al 2.5% y 0.3% estadísticamente su efectividad es menor comparado con el control positivo.

Palabras clave: *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze, antibiogramas, actividad antimicrobiana, patógenos respiratorios, aceite esencial.

ABSTRACT

Ecuador has a wide biodiversity of medicinal plants from different regions of the country, most of medicinal plants are used as such based on ancestral knowledge rather than have scientific knowledge of their medicinal properties although there are few studies on the Andean plants Ecuador, is not scientific information on the antibacterial activity of sunfo (*Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze.). In this experimental work the antimicrobial activity of essential oil sunfo. Was determined against four bacteria causing respiratory diseases, sunfo was collected in the moors of the parish of Pintag in the National Herbarium it was certified that it was *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntz., for the extraction of essential oil distillation technique was used by steam. Determining the antimicrobial activity of the oil it was tested by in vitro susceptibility tests diffusion wells using six concentrations of 5%, 2.5%, 1.25%, 0.6%, 0.3% and 0.15% essential oil, as a positive control Penicillin clemizol of 1,000,000 U.I. and DMSO negative control, using the statistical program Infostat the statistical significance of the results is established, even if there was a halation inhibition for *S. aureus* ATCC 25923 at concentrations 2.5% and 5% oil essential for *S. mutans* ATCC 25175 0.15% for *S. pyogenes* ATCC 19615 2.5% and 0.3% and for *S. pneumoniae* ATCC 49619 2.5% and 0.3% effectiveness is statistically lower compared to the positive control .

Keywords: *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze, susceptibility testing, antimicrobial activity, respiratory pathogens, essential oil.

INTRODUCCIÓN

Ecuador se destaca como uno de los países con mayor biodiversidad por metro cuadrado del mundo tanto en flora como en fauna esto se debe a la diversidad climática de sus zonas debido a la ubicación del país en la línea ecuatorial (Notuslink, 2015).

Es de gran importancia conocer las bondades de las plantas medicinales, así como las diferentes afecciones que curan, este es un tema tratado desde que la humanidad existe. Por este motivo el uso de aromas, extractos y aceites esenciales se registra por lo menos 3500 años A.C., y han sido empleados en la humanidad como sustancias curativas, cicatrizantes entre otras funciones medicinales. En las comunidades indígenas del Ecuador el uso de aceites esenciales ha llegado hasta nuestros días, como un legado de generación en generación (Bandon, 2000).

Ciertas plantas medicinales andinas se utilizan para la extracción de sus aceites esenciales los cuales son utilizados por la industria farmacéutica y cosmetológica basándose en el conocimiento tradicional de los campesinos y en publicaciones de estudios etnobotánicos, las plantas medicinales forman parte de la riqueza de la flora del país, al reconocer la importancia de la utilización de estas plantas el INIAP cuenta con un banco de germoplasma de especies medicinales representativas de la sierra ecuatoriana dentro de las cuales se encuentra el sunfo (*Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze) que es popularmente conocida por los indígenas por sus características curativas contra resfriados y dolores estomacales (INIAP, 1997).

El sunfo (*Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze), es una planta aromática perteneciente a la familia Lamiaceae, también se conoce con el sinónimo *Nubigenus timo* (Kunth), *Micromeria nubigena* (Kunth) Benth y *Satureja nubigena* (Kunth) Briq (IPNI, 2015).

Clinopodium nubigenum (Kunth) Kuntze crece en América Latina entre 3000 y 4000 (msnm), la planta es popularmente conocida por los indígenas como sunfo, en el Ecuador se utiliza como un remedio tradicional por varias comunidades, por ejemplo el pueblo Saraguro utiliza una infusión acuosa de la planta para tratar los resfriados, en la región del Azuay, esta planta se utiliza como remedio para la gripe, en pueblos quechuas en la Alta Sierra aplican una decocción de sunfo (*Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze) para curar el dolor estomacal, comunidades de Cañar utilizan la infusión de la planta para evitar la incontinencia urinaria en los niños, en Tungurahua, provincias de Chimborazo, Cañar, Azuay utilizan el sunfo en aplicaciones como digestivo, estomacal, un remedio tónico, contra la disentería y síndromes menstruales (Gilardoni, 2011).

En la actualidad la población crece aceleradamente y con ella las enfermedades infecciosas producidas por bacterias, virus y hongos. Según la Dirección Nacional de Vigilancia epidemiológica del Ministerio de salud del Ecuador, las infecciones respiratorias y gastrointestinales están entre las principales enfermedades en la sociedad ecuatoriana y al tener conocimiento por referencias etnobotánicas que atribuyen a plantas andinas, como el sunfo (*Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze) que son utilizadas para combatir estas enfermedades, se considera importante verificar la actividad *in vitro* del sunfo frente a patógenos de enfermedades respiratorias como (*S. aureus* ATCC: 25923, *S. pyogenes* ATCC: 19615, *S. pneumoniae* ATCC: 49619 y *S. mutans* ATCC: 25175), con la finalidad de aportar con información científica sobre las propiedades antibacterianas de

este aceite, que pudiesen ser utilizadas como un antibacterial natural y competir efectivamente como una opción de producto natural. La actividad antibacterial del aceite de sunfo se determinó mediante la técnica de difusión en pozos y mediante un análisis estadístico de varianza se pudo confirmar la hipótesis alternativa que dice que una o más concentraciones de aceite esencial de sunfo (*Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze) presentan actividad *in vitro* antibacterial frente a: *S. aureus* ATCC: 25923, *S. pyogenes* ATCC: 19615, *S. pneumoniae* ATCC: 49619 y *S. mutans* ATCC: 25175 y concluir que a pesar de existir una actividad antimicrobiana relativa ciertas concentraciones estos resultados no son efectivos frente a los resultados obtenidos del antibiótico comercial utilizado como referencia (Ministerio de salud pública , 2015).

CAPÍTULO 1

MARCO CONCEPTUAL

1.1 Descripción Botánica

Planta herbácea, vascular, rastrera y aromática, altura máxima de 15 cm posee raíz fibrosa y pivotante. Tallo de color café rojizo con ramificaciones verticiladas. Hojas simples opuestas de forma oval-lanceoladas con la base ligeramente truncada, miden hasta 4mm de largo. Flores zigomorfas y labiadas de 3 a 5 mm, posee 5 sépalos de color verde y 5 pétalos. Fruto seco indehiscente y tetraquenio. El sunfo (*Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze) habita en los páramos y cordilleras del Ecuador y de países como Colombia, Costa Rica, Venezuela, Panamá y Perú en un rango altitudinal de 3500 a 4500 msnm (Caicedo & Otavalo, 2007).

1.2 Taxonomía de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze)

Reino: Vegetal

División: Angiospermas

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden: Asteranae Takht.

Orden: Lamiales Bromhead

Familia: Lamiaceae Martinov

Género: *Clinopodium* L.

Nombre Científico: *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze.

Nombre Común: Sunfo (Jorgensen, 1999).

1.3 Principios activos de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze.

Los principios activos del sunfo (*Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze) se encuentran principalmente en su aceite esencial y son: borneol, acetato de borneol, ácido butírico, carvacrol, citroneol, p-cimeno, geraniol, limoneno, nerol, ácido valérico y acético, presentando cada uno diversas propiedades farmacológicas, entre las que se puede mencionar: la acción antiproliferativa del ácido butírico, es decir, podría ser utilizado en tratamientos de cáncer para evitar la multiplicación de células cancerígenas; por otra parte el olor característico de esta planta se atribuye a que contiene geraniol caracterizado por su peculiar olor (Lituma & Molina, 2008).

Encuestas realizadas en la comunidad San Cristóbal Alto (provincia del Carchi) señalan que el sunfo (*Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze) es utilizado en forma de infusiones para diversas afecciones por ejemplo para malestares generales en un 8%, para elevar el calor corporal un 42% y para combatir dolores gastrointestinales un 50% además es importante conocer que comúnmente se utiliza el follaje de esta planta en un 83% en dicha comunidad esta infusión es muy utilizada ya que no existe estudios ni testimonios de toxicidad. Existen varios estudios relacionados con técnicas de destilación del sunfo y la calidad del aceite esencial obtenido más no de las características medicinales del mismo (Caicedo & Otavalo, 2007)

1.4 Propiedades farmacológicas

El sunfo (*Clinopodium nubigenum (Kunth) Kuntze*) ha sido utilizado por la etnia Saraguro desde la antigüedad, por sus propiedades farmacológicas de importancia como: digestiva, antiinflamatorio, analgésica, antiespasmódica, antidisentérica, antivomitiva, antioxidante, antibacterial, fortificante, expectorante y calmante, además se utiliza para casos de hemorragias, reumas, control antiséptico, úlceras bucales y dolores de garganta y menstruales, el uso etnomédico atribuido en esta región es para el dolor dentario (Lituma & Molina, 2008).

1.5 Aceite esencial

Los aceites esenciales son compuestos naturales, líquidos volátiles y de agradable aroma, extraídos de las plantas mediante procesos de destilación; se registra poca información sobre el aceite esencial de sunfo (*Clinopodium nubigenum (Kunth) Kuntze*) debido a la poca investigación sobre el mismo pero se sabe de su poder antiséptico y anestésico (Salazar, 2009).

(Lituma & Molina, 2008), determinaron que la tintura de sunfo al 10% presenta actividad analgésica de tipo somático a una concentración de 50mg/kg, este experimento fue realizado mediante ensayos farmacológicos con modelos animales comparando los resultados obtenidos con la actividad analgésica del ketorolaco.

1.6 Composición química de los aceites esenciales

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, por lo general obtenidas por arrastre de vapor de agua que contienen sustancias responsables del aroma de las plantas, utilizados en la industria: cosmética, de alimentos y farmacéutica (Zabbar, 2013).

Los aceites esenciales son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden ser:

- Compuestos alifáticos de bajo peso molecular: alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos.
- Monoterpenos
- Sesquiterpenos
- Fenilpropanos (Salazar, 2009).

En la investigación sobre: “In vitro antibacterial efficacy of *Clinopodium vulgare* L. extracts and their synergistic interaction with antibiotics” realizada por (Stefanovic, Stankovic, & Comic, 2011) en Brasil, en la composición química del aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* se identificaron 70 compuestos. Los compuestos encontrados fueron: pulegona, mentofurano, isopulegona, α -copaeno, 1 - octen -3- il acetato, limoneno, p-cimeno, piperitenona, β -pineno y 1,6- octadien-3,7-dimetil 3-ol. Conjuntamente se demostró mediante cromatografía de gases acoplada a masas (GC MS) que el aceite esencial contiene un alto porcentaje de acetato de carvacrol en una especie proveniente de Loja, Ecuador, atribuyéndole así el efecto antibacterial frente a microorganismos como: *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus* (Guerra, 2015).

Tabla 1: Composición química de *Clinopodium nubigenum*

Nombre del compuesto	Ik^b	IK^a	<i>C. nubigenum</i>	Método
α -tujeno	930	922	0,83 \pm 0,19	GC MS
α -terpineno	1017	1014	0,49 \pm 0,14	GC MS
p-cimeno	1024	1022	5,2 \pm 1,12	GC MS
limoneno	1029	1025	0,91 \pm 0,19	GC MS
γ -terpineno	1059	1054	3,33 \pm 0,76	GC MS
1-octen-3-il acetato	1112	1110	4,82 \pm 0,51	GC MS
pulegona	1237	1236	6,3 \pm 0,06	GC MS
timol	1290	1298	5,54 \pm 0,42	GC MS
carvacrol	1299	1307	20,66 \pm 1,73	GC MS
δ -elemeno	1338	1333	1,01 \pm 0,02	GC MS
timol acetato	1352	1359	0,55 \pm 0,08	GC MS
acetato de citronelilo	1352	1364	3,6 \pm 0,12	GC MS
carvacrol acetato	1372	1377	42,17 \pm 1,21	GC MS
NI		1388	0,35 \pm 0,08	GC MS
cariofileno	1419	1411	0,38 \pm 0,03	GC MS
γ -muuroleno	1479	1477	0,32 \pm 0,004	GC MS
biciclogermacreno	1500	1491	1,78 \pm 0,13	GC MS
δ -cadineno	1523	1516	1,31 \pm 0,06	GC MS

espatulenol	1578	1579	0,44 ± 0,04	GC MS
-------------	------	------	-------------	-------

Nota: ^a Índice de Kovats experimental calculado en base a los tiempos de retención estándar de una serie de alcanos alcanos C8 -C30

^b Índice de Kovats teórico. NI: no identificado

Fuente: (Guerra, 2015).

1.7 Métodos de extracción de aceites esenciales

1.7.1 Destilación por arrastre de vapor

Es el método de extracción más utilizado. Este método consiste en generar vapor que será introducido al destilador para hacerlo pasar a través del material vegetal. El principio básico de este tipo de destilación es el de dos líquidos heterogéneos en este caso el agua y el aceite esencial, cada uno ejerce su propia presión de vapor sin intervenir en el otro componente. La mezcla hierve cuando las presiones de vapor combinadas alcanzan la presión necesaria. El vapor y el aceite esencial son condensados y separados. Hay que recalcar que los aceites esenciales obtenidos mediante esta técnica suelen ser diferentes en sus características organolépticas al aceite original encontrado en el material vegetal. Ciertos compuestos no volátiles del vapor, quedan en el destilador, a estos compuestos no volátiles se les atribuye dar la característica del sabor del aceite esencial más que del olor. Algunas sustancias muy volátiles se pierden en la destilación. Aunque este proceso sea controlado en sus diferentes variables es inevitable la existencia de cambios químicos como la oxidación o hidrólisis (Ceruti & Neumayer, 2004).

1.7.2 Extracción con disolventes volátiles

En este método la muestra debe estar seca y molida, al ponerse en contacto con solventes orgánicos como alcohol y cloroformo estos solubilizan el aceite esencial, también extraen

otro tipo de sustancias como: ceras y grasas, dando como resultado un extracto impuro que deberá ser purificado según el uso que se le dará, hay que tomar en cuenta que algunos solventes utilizados en este método dejan residuos que no se los puede dejar si el aceite esencial será utilizado en la industria de alimentos o farmacéutica (Peredo, Luna, & Lopez, 2009).

1.7.3 Extracción con fluidos supercríticos

Esta técnica consiste en hacer circular a través de la muestra previamente cortada y molida un fluido en estado supercrítico por una cámara de acero inoxidable este fluido puede ser CO₂ de esta manera el aceite esencial es solubilizado mientras tanto el fluido utilizado que actúa como solvente es eliminado. La pureza del aceite esencial obtenido dependerá de las condiciones de extracción, este tipo de extracción se caracteriza por su alto rendimiento, facilidad de eliminar el solvente y poca residualidad, por otro lado las instalaciones requeridas son costosas por lo que limita la utilización de esta técnica (Rodríguez, Alcaraz, & Real, 2012).

1.7.4 Extracción por prensado

Esta técnica consiste en someter al material vegetal a una fuerza mecánica que lo exprimirá para obtener el aceite esencial el cual será previamente filtrado para su utilización, es común utilizar este método en extracción de aceites esenciales de plantas cítricas (Rodríguez, Alcaraz, & Real, 2012).

1.7.5 Extracción por enflorado o enfleurage

En este método se pone en contacto el material vegetal, que usualmente son flores, con una grasa. La grasa actúa como vehículo extractor y la esencia será solubilizada en la

misma. La mezcla obtenida será de aceite esencial y grasa la cual será purificada mediante métodos físico-químicos. La desventaja de este método es su bajo rendimiento y la dificultad y el costo de separar la grasa del aceite esencial (Rodríguez, Alcaraz, & Real, 2012).

1.8 Microorganismos patógenos que afectan a las vías respiratorias

Por lo que concierne a la etiología bacteriana, en el caso de la sinusitis maxilar aguda pediátrica los gérmenes más aislados son el *S. pneumoniae* (25-30%), la *Moraxella catharrhalis* (20%) y, en menor número, el *S. β-hemolítico* de grupo A. Con relación a la sinusitis crónica, el *Haemophilus influenzae*, el *S. aureus*, el *S. mutans*, *S. pyogenes* y los gérmenes anaerobios como *Bacteroides spp* y *Fusobacterium spp* (Díaz, 2006).

1.8.1 Staphylococcus aureus ATCC: 25723

S. aureus pertenece a la familia Staphylococcaceae. Es Una bacteria Gram positiva con metabolismo anaerobio facultativo, hay que tomar en cuenta que cepas antiguas o los microorganismos fagocitados se tiñen como Gram negativo. Presentan forma de coco y aparecen en parejas, en cadenas o en racimos. Su tamaño va de 0,8 a 1,5 micras de diámetro, es inmóvil y algunas cepas presentan una mayor capacidad de producir infección ya que producen una cápsula externa mucoide. Presenta coagulasa positivo, catalasa positiva y oxidasa negativo (Silva, 2012).

El contagio puede ser exógeno o endógeno. La transmisión exógena se lleva a cabo a través de heridas o quemaduras; a través del contacto del tejido con material médico contaminado y la ingestión de alimentos contaminados. En la infección endógena se trata de la entrada de microorganismos desde la piel, a través de fracturas, heridas o cuerpos

extraños desde un lugar en donde el microorganismo es comensal. La infección se ve favorecida cuando el paciente es inmuno deprimido, tiene diabetes, malnutrición o está expuesta a una terapia antibiótica de amplio espectro, cabe recalcar que este microorganismo ha adquirido resistencia a la Oxacilina y Meticilina (Silva, 2012).

Se utilizó la cepa ATCC: 25723 basándose en referencias bibliográficas de investigaciones similares realizadas, de las cuales se pueden mencionar: “Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de macroalgas marinas de la costa central del Perú”, en la que se evaluó la actividad antibacteriana de extractos etanólicos de 12 especies de macroalgas marinas frente a 11 cepas bacterianas probadas solamente las cepas clínicas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, entre otras. La actividad antibacteriana de los extractos etanólicos se evaluó empleando la técnica de difusión en agar (Magallanes, Cordova, & Orozco, 2003).

Se puede mencionar también el estudio realizado por (Pino, Ortega, & Pérez, 1996), “Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) n. e. Brown”, en el que se evaluó la actividad antibacteriana del aceite esencial sobre una bacteria integrada por 9 especies de bacterias en las que se incluye a *S. aureus* ATCC 25923, mediante la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias y con el empleo del método de las diluciones seriadas dobles en medio líquido. El aceite presentó actividad antibacteriana, siendo mayor en general, sobre los gérmenes Gram positivos, con valores de las concentraciones mínimas inhibitorias entre 0,3 y 0,63 mg/mL.

Véase en el anexo 5, ficha técnica de *S. aureus* ATCC: 25723.

1.8.2 Streptococcus mutans ATCC: 25175

S. mutans es una bacteria Gram positiva con metabolismo anaerobio facultativo normalmente encontrada en la cavidad bucal formando parte de la placa dental por lo que está asociada al inicio y desarrollo de las caries. Es un organismo acidófilo por que vive en medio con pH bajo, acidogénico por metabolizar los azúcares a ácidos y acidúrico por sintetizar ácidos a pesar de encontrarse en un medio de la misma composición (Porte & Braun, 2009).

S. mutans constituye la primera causa de caries dental y de infecciones graves por estreptococos del grupo viridans, tales como bacteriemia y endocarditis. Hay que tomar en cuenta que su identificación podría ser un desafío ya que posee capacidad de presentarse como un bacilo Gram positivo al aplicar diagnóstico por tinción Gram (Porte & Braun, 2009).

La cepa ATCC: 25723 fue utilizada basándose en referencias bibliográficas relacionadas a esta investigación, de las cuales se puede mencionar: “Efecto antimicrobiano In vitro de propóleos argentinos, colombianos y cubano sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175”, en el que se evaluó la actividad antimicrobiana de cuatro extractos de propóleos argentinos, cinco colombianos y uno cubano frente a *S. mutans* ATCC 25175. La actividad bactericida y bacteriostática fue medida por concentración mínima inhibitoria en un rango entre 0.02 y 15 mg/ml. La totalidad de las muestras analizadas presentaron actividad contra *S. mutans* a concentraciones de 15 a 3.75 mg/ml (Figuroa, Martínez, & Moreno, 2007).

En el estudio realizado por (Tovalino & Sacsaquishpe, 2010), “Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa-Perú sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)”, se evaluó la actividad antimicrobiana mediante el método de Kirby-Bauer, frente a dos baterías incluyendo la capa de utilizada en la presente investigación.

Véase en el anexo 6, ficha técnica de *S. mutans* ATCC: 25175.

1.8.3 Streptococcus pyogenes ATCC: 19615

S. pyogenes es una bacteria Gram positiva, se presenta en pares o en cadena de forma esférica son anaerobios facultativos, catalasa negativos, su cápsula está conformada por ácido hialurónico, en la pared celular se encuentran las siguientes proteínas: antígeno específico de gpo y peptidoglicano (Koneman, 2006, pág. 925).

S. pyogenes es el causante de faringoamigdalitis aguda bacteriana es de importancia médica ya que se caracteriza por secuelas no supurativas: fiebre reumática y glomerulonefritis. Existe un incremento en las últimas dos décadas respecto al número de casos de fiebre reumática a nivel mundial, por lo que se concluiría que existe un cambio en la epidemiología de esta bacteria, principalmente en el tema de la virulencia. El estreptococo produce varias enzimas y toxinas como las toxinas pirogénicas que contribuyen a su patogenicidad (Rivera, 2001).

La selección de la cepa ATCC: 19615 se realizó mediante revisión bibliográfica que menciona la utilización de dicha cepa en estudios relacionados a la presente investigación, se puede mencionar las siguientes investigaciones: “Actividad antimicrobiana de *Waltheria indica* y *Acacia farnesiana*”, que consistió evaluar la actividad antimicrobiana

in vitro de los extractos etanólicos y acuosos preparados con las raíces de ambas plantas. Con estos extractos, se determinó el rendimiento de sólidos solubles totales y se realizó el análisis fitoquímico general. La actividad antimicrobiana se evaluó frente a 25 cultivos bacterianos en el que se incluye a *S. pyogenes* ATCC: 19615, dos cepas de hongos filamentosos y 13 cepas de siete especies de levaduras del género *Candida* (Rojas, Avellaneda, & Cuéllar, 2008).

En la investigación realizada por (Avellaneda, Rojas, & Fonseca), “Actividad antibacteriana de *Diphysa minutifolia* Rose “, se determinó el posible efecto antibacterial del extracto, el extracto se enfrentó a 33 cepas bacterianas de la colección ATCC en la cual se incluye a *S. mutans* ATCC: 19615, se utilizó el método de difusión radial en monocapa en medio con agar y con pocillos cilíndricos.

Véase en el anexo 7, ficha técnica de *S. pyogenes* ATCC: 19615.

1.8.4 Streptococcus pneumoniae ATCC: 49619

S. pneumoniae es un coco Gram positivo capsulado. Sus células tienen forma lanceolada, miden 0,5 a 1,2 mm de diámetro y se encuentran en pares o diplos. Son organismo anaerobios facultativos. Tienen requerimientos propios para su crecimiento y multiplicación, su medio de cultivo debe estar enriquecido con proteínas y suplementos hematológicos. *S. pneumoniae* es causante de un porcentaje considerable respecto a los problemas de salud pública tanto en países industrializados como en países en vías de desarrollo (Preado, 2001).

En México, las infecciones de vías respiratorias siguen catalogadas como una de las 10 primeras causas de mortalidad y morbilidad en niños menores de 5 años. Los principales

agentes etiológicos en infecciones de origen comunitario son virus y bacterias. Bacterias como: *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Moraxella catharralis* son aisladas con mayor frecuencia en cultivos. *S. pneumoniae* es causante de infecciones como sinusitis o neumonía y otitis media en niños menores de 5 años (Solórzano & Ortíz, 2005).

La cepa ATCC: 49619 fue seleccionada mediante revisión bibliográfica que referencia la utilización de dicha cepa en estudios relacionados a la presente investigación, se puede mencionar: el estudio realizado por (Guzmán & Henríquez, 2007), “Determinación de la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas de la cromatografía de columna (n-hexano:acetato de etilo 70%, acetato de etilo puro y Metanol puro) procedentes del extracto diclorometánico de la goma-resina de *eucalyptus citriodora* (eucalipto)”, en la que se determinó la actividad antibacteriana de las diluciones de cada una de las fracciones, mediante el método microbiológico Kirby Bauer Modificado, utilizando 3 cepas en las que se incluye a *S. pneumoniae* ATCC: 49619.

Véase en el anexo 8, ficha técnica de *S. pneumoniae* ATCC: 49619.

1.9 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

Diversos métodos de laboratorio son usados para determinar *in vitro* la susceptibilidad de bacterias ante agentes microbianos, principalmente se utilizan técnicas de difusión o de dilución.

Respecto a las técnicas de dilución estas proporcionan resultados cuantitativos es decir la concentración mínima inhibitoria, CMI y las técnicas de difusión proporcionan resultados cualitativos que se los podría definir en términos como: sensible, intermedio y resistente.

Se recomienda trabajar con los dos métodos ya que existe una correlación directa entre la CMI y el diámetro del halo de inhibición formado (Cercenado & Saavedra, 2009).

1.9.1 Método de difusión en agar empleando discos

El método de difusión en agar, es respaldado por datos de laboratorio y clínicos, se caracteriza por que sus resultados son altamente reproducibles. Esta técnica se basa en el método originalmente descrito por Kirby-Bauer. Este método de difusión en pozo o en discos fue estandarizado y actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS, de Estados Unidos. Se fundamenta en establecer cuantitativamente el efecto de una o un conjunto de sustancias, sobre microorganismos, cepas bacterianas. Este método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria en estudio para inhibir una cepa bacteriana y la formación del halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado para cada cepa y sembrado homogéneamente con la bacteria en estudio y sobre la cual se ha colado un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro, o se ha sembrado en pozo incorporando una cantidad conocida de la sustancia (Ramírez, Castillo, & Melo, 2013).

En el método de difusión en agar empleando discos, los discos de papel contendrán la solución estandarizada y otros la sustancia que se sospecha tenga actividad antibacterial, a estos discos se los coloca sobre la superficie del medio de cultivo ya solidificado y previamente inoculado con el microorganismo a estudiar. Después de 18 h de incubación se podrá obtener resultados tomando en cuenta que el diámetro del halo formado tendrá relación con el grado de sensibilidad que presente el microorganismo (Cercenado & Saavedra, 2009).

1.9.2 Método de difusión en pozos

Este método se basa en realizar pozos en el medio solidificado que previamente fue inoculado con la suspensión bacteriana a estudiarlos pozos se realizan con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril se recomienda perforar el medio de cultivo hasta el fondo de la caja Petri para obtener un pozo de aproximadamente 5-6 mm de diámetro en los cuales se inoculará el antibiótico, la sustancia a estudiar y la sustancia utilizada como control negativo (Ramírez, Castillo, & Melo, 2013).

1.9.3 Método de dilución

A este método se la conoce también como turbidimétrico, en esta técnica se hace diluciones seriadas del antibiótico en la relación $\mu\text{g/ml}$ en el caldo de cultivo con el que se trabajará y un tubo como control de crecimiento del microorganismo, esta técnica se realiza con el objetivo de determinar la concentración mínima inhibitoria (Lizcano & Vergara, 2008).

CAPÍTULO 2

MARCO METODOLÓGICO

2.1 Localización de recolección

La recolección de sunfo (*Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze), se realizó en los páramos de la parroquia de Pintag localizada en la provincia de Pichincha, en el Distrito Metropolitano de Quito, situada al sur oriente de la Capital. La altura de la parroquia de Pintag va de 2400 a 4500 msnm. Pintag cuenta con un clima entre frío en la parte alta y templado en la parte occidental. Para la parroquia de Pintag con respecto a su temperatura se toma como referencia los datos del Ilustre Municipio del Cantón Rumiñahui Temperatura media: 13.74 °C (Gobierno Autónomo Descentralizado Parroquial de Pintag, 2012).

2.2 Identificación y recolección del material vegetal

La planta fue identificada como *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze en el Herbario Nacional del Ecuador, posteriormente se procedió a la recolección del material vegetal a estudiar de los páramos de la parroquia de Pintag.

Para la recolección se tomó la planta entera sin raíz ya que las hojas, material vegetal de interés, son muy pequeñas, para este proceso se utilizó tijeras podadoras y el material recolectado se lo almacenó en sacos de yute para su posterior tratamiento.

2.3 Secado y desinfección del material vegetal

Una vez recolectada una cantidad aproximada de 6kg de material vegetal se procedió a “desinfectarlo”, para esto se utilizó una solución de hipoclorito de Sodio al 1% en agua. Se recomienda sumergir toda la muestra de planta por 10 a 15 minutos. Posteriormente se procedió a secar el material vegetal mediante exposición al sol a una temperatura aproximada de 23°C y aire libre por 5 días ya que la muestra procedía de un lugar con alta humedad.

2.4 Aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze

2.4.1 Proceso de obtención del aceite esencial

La muestra vegetal “seca” fue destilada mediante arrastre de vapor en un destilador de acero inoxidable con capacidad de 40L. La destilación de 6kg de muestra duró aproximadamente 5 horas. El rendimiento del aceites esencial establecido en [% (p/p)] se calculó tomando en cuenta el peso del material vegetal seco. Una vez destilado el aceite esencial se utilizó sulfato de sodio para eliminar el agua presente en el aceite esencial extraído.

2.4.2 Control de calidad del aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* (Kunth)

Kuntze

Es importante tener en cuenta que, cada aceite esencial tiene valores específicos en cada parámetro de evaluación, dependiendo de: lugar de recolección, método de extracción utilizado, etc.

Tabla 2: Análisis y control de calidad de los aceites esenciales

Tipo de análisis	Métodos utilizados
Organoléptico	Olor
	Color
	Sabor
Físicos	Densidad
	Índice de refracción
Químicos	Acidez (pH)

Fuente: Andrea Fonseca

2.4.2.1 Análisis organoléptico

Se tomó una muestra de aceite esencial igual a 1 ml y se colocó sobre un vidrio reloj con el fin de facilitar los pertinentes análisis organolépticos.

La evaluación de estos parámetros debe realizarse inmediatamente extraído el aceite esencial.

Olor

Evidentemente es una de las características organolépticas más subjetivas, tanto por la agudeza de cada persona como por la identificación y denominación particular de cada olor. Para su identificación se realiza un análisis organoléptico en el cual se establecerán términos como: Desagradable, putrefacto, aromático, aliáceo, anisado, alcanforado, nulo, desagradable entre otros.

Color

Se deduce que dependiendo de la parte vegetal utilizada para la extracción tendrá relación el color del aceite pero no siempre es así por lo que si se obtiene un aceite esencial de color verde no significará que provenga de las hojas de la planta, por otro lado se atribuye el color del aceite a la composición química del mismo. Para que ciertas propiedades como el color no varíen se deberá guardar el aceite esencial en frascos color ámbar y estar protegidos de la luz.

Sabor

El sabor es también un parámetro subjetivo que será definido por comparación a sabores ya estandarizados, además variará dependiendo de la técnica de extracción utilizada y los métodos de purificación, se podría catalogar al sabor como: Dulce, amargo, salado, ácido, aromático entre otros.

2.4.2.2 Análisis físicos

Densidad

Para determinar el valor de densidad se utilizó un densitómetro Mettler Toledo DM40, para la medición se necesita aproximadamente 4 ml de aceite esencial en un vaso de precipitación, el equipo posee dos mangueras plásticas, la primera se sumergió en el vaso que contenía el aceite y mediante la pantalla digital del equipo programamos para que el aceite sea aspirado, aspirará hasta que la celda interna del equipo se llene y se pueda dar la medida, una vez establecido el valor se colocó el vaso de precipitación en la siguiente manguera para que el aceite esencial sea recuperado esto se da gracias a la fuerza de una bomba, en este proceso no se pierde aceite esencial ya que casi en su totalidad es devuelto por el equipo.

Índice de refracción

Sobre el prisma del refractómetro se colocó una gota de agua destilada para su calibración, se reguló el equipo tomando en cuenta la zona del espectro visible que aparece en la línea límite del campo visual esto se logra observando mediante el lente óptico del aparato para conseguir esta regulación se utilizó compensador cromático hasta lograr colocar la intersección del retículo sobre la línea límite de los campos claro y oscuro y se procedió a leer el valor correspondiente.

Una vez registrada la medición se limpió el prisma asegurándose quede líquido de la muestra anterior, se colocó una gota del aceite esencial teniendo precaución que el líquido no se desborde del prisma, se cerró la protección del prisma y se procedió a enfocar hasta conseguir que la línea horizontal se encuentre en el centro del círculo de medición que se observa en mediante el lente óptico y se registraron los datos.

2.4.2.3 Análisis químicos

Acidez (pH)

Para realizar medidas exactas se utilizó un pH-metro, que mide el pH por un método potenciométrico se calibró el equipo con la ayuda de soluciones estándar o amortiguadoras con los siguientes valores de pH: 4, 7, 10, ya que el principio de establecer el pH de una sustancia es que se compare el pH de una muestra con el de una disolución patrón de pH conocido, una vez establecidos estos valores se limpió el electrodo con agua destilada y se introdujo en el aceite esencial para su medición.

2.5 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana

Para la aplicación de este ensayo son importadas por Medibac a ATCC (American Type Culture Collection): *S. aureus* ATCC: 25923, *S. pyogenes* ATCC: 19615, *S. pneumoniae* ATCC: 49619 y *S. mutans* ATCC: 25175, se utilizó como control positivo para el ensayo el antibiótico comercial llamado Penicilina Clemizol de concentración 1'000.000 U.I. de laboratorios *Life*, como control negativo se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO).

2.5.1 Activación de las cepas bacterianas

El método de activación dependerá del material biológico a trabajar, para la activación de estas cepas se siguió el procedimiento establecido por la empresa que los distribuye Medibac.

Una vez extraído el hisopo del paquete se desprendió la banda señalada que detalla las características de la cepa y se pegó esta banda en la caja Petri a sembrar, las siguientes cajas a sembrar fueron etiquetadas con el nombre del microorganismo correspondiente y número de cepa. Luego se procedió a hidratar la cepa, en la parte superior del hisopo se encuentra una ampolla la cual se presionó hasta romperla interiormente con el fin de que el líquido hidratante llegue hasta la parte inferior del hisopo y lo hidrate, para conseguir mejor hidratación se presionó la parte inferior del hisopo con las yemas de los dedos posteriormente se abrió el hisopo y se procedió a la siembra en una cámara de flujo, laminar (marca: ESCO, modelo: ACB-4A2), evitando todo tipo de contaminación, la siembra se hizo en 4 placas de tripticosa soya agar (TSA) para cada bacteria a excepción de *S. pneumoniae* ATCC: 49619 que por sus requerimientos de crecimiento se sembró en agar sangre de cordero al 5% procedente de la empresa Cultiprep Cia. Ltda., finalmente

se incubó las placas en condiciones detalladas en el manual de Medibac para cada microorganismo, *S. aureus* ATCC: 25923 en condiciones aerobias (incubadora marca: Shel Lab, modelo: 1525) y anaerobias (incubadora marca: Binder, modelo: CB 53-UL) para el resto de bacterias, los parámetros de incubación para las 4 cepas fue de 24 horas a temperatura de 37 °C (Microbiologics, 2010).

2.5.2 Preparación del inóculo

De las cajas Petri anteriormente activas se realizó resiembra las cuales se utilizaron para preparar el inóculo de cada microorganismo, se trabajó en una cámara de flujo laminar (marca: ESCO, modelo: ACB-4A2), para evitar contaminación en el proceso, con la ayuda de una asa previamente esterilizada se tomó de la caja Petri una cantidad considerable de microorganismo y se transfirió a dos tubo de ensayo con medio de cultivo estéril Tryptic Soy Broth (TSB) con volumen de 4 a 5 ml. Luego los tubos se incubaron a 35°C por 18 horas. Una vez finalizado el tiempo de incubación del inóculo los tubos que lo contienen se centrifugaron a 3500rpm por 20 minutos con el fin de conseguir un pellet del microorganismo, se eliminó el sobrenadante y se añadió suero fisiológico estéril hasta la mitad del tubo de ensayo aproximadamente 5ml, con la ayuda de un vortex mediante 1 minuto se homogenizó el inóculo y finalmente se traspasó esta muestra a un tubo de ensayo más grande que contenía suero fisiológico estéril con la finalidad de facilitar el trabajo y contar con inóculo suficiente para realizar el antibiograma. Para conocer la concentración del inóculo con el que se trabajará se utilizó un espectrofotómetro (marca: Shimadzy, modelo: UV mini-1240), el cual se lo programó con una longitud de onda de 625nm y un rango de absorbancia de 0.08 a 0.11 para todas las bacterias a trabajar, para encerrar el equipo se utilizó suero fisiológico estéril y celdas desechables de 1cm.

2.5.3 Preparación de la sustancia control

Como sustancia control se utilizó el antibiótico comercial Penicilina Clemizol de 1'000.000 U.I. es decir 600.000 $\mu\text{g/ml}$, para el trabajo a realizar se requiere este antibiótico en concentración de 80 $\mu\text{g/ml}$ en un volumen de 10 ml, para llegar a esta concentración se aplicó la siguiente fórmula:

Ecuación 1: Dilución de la sustancia control

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Como se necesita conocer el volumen de antibiótico que será aforado a 10ml se despeja V_1 correspondiente al antibiótico, la ecuación quedaría de la siguiente manera:

$$V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1}$$

Correspondencia:

C_1 = Concentración inicial

V_1 = Volumen inicial

C_2 = Concentración final

V_2 = Volumen final

2.5.4 Preparación de las 6 concentraciones del aceite esencial de sunfo (*Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze)

Para la dilución al 5% del aceite esencial se colocó con la ayuda de una micropipeta automática 500 μl del mismo en un balón ámbar volumétrico de 10ml, se aforo con DMSO con la ayuda de una pipeta y se agitó para conseguir que se homogenice, para la

concentración de 2,5% se extrajo 5ml con la ayuda de una pipeta del primer balón ámbar que contiene aceite al 5% y se aforo hasta 10ml con DMSO, para la concentración de 1,25% se siguió el mismo proceso tomando en cuenta que la extracción de los 5ml debe ser del balón ámbar de concentración anterior. Para esto se tomó la siguiente referencia:

10ml 100% de concentración X= 0,5ml igual a 500 μ l

X 5% de concentración

2.5.5 Antibiograma mediante difusión en pozos

Para *S. aureus* ATCC: 25923 según sus requerimientos se preparó agar TSA para el antibiograma y agar BHI para las tres bacterias restantes (*S. pyogenes* ATCC: 19615, *S. pneumoniae* ATCC: 49619 y *S. mutans* ATCC: 25175), una vez calculada la cantidad de medio de cultivo necesario para el volumen establecido, se mezcló el medio de cultivo con agua destilada en frascos de vidrio de borosilicato “boecos” de 250ml, se colocó en el frasco boeco un agitador magnético para conseguir una rápida y homogénea disolución del medio y posteriormente en una estufa hasta su ebullición, el medio disuelto fue autoclavado a 121 °C por 15 minutos (marca del autoclave: Tuttnaver, modelo: 3870M), para dispensar el medio de cultivo este debe estar a una temperatura de 45°C a 50°C para esto se colocó el frasco ya autoclavado en baño maría a temperatura de 45°C a 50°C por 30 minutos, la temperatura fue controlada con un termómetro.

Una vez listo el medio de cultivo y preparado el inóculo del microorganismo se trabajó en una cámara de flujo laminar, se utilizó cajas Petri desechables, en cada caja Petri se colocó 24 ml de medio de cultivo y 1 ml de inóculo para esta mezcla se midió el medio de cultivo en una probeta volumétrica y el 1 ml con una micropipeta automática, la mezcla se la

realizó en un vaso de precipitación de 50ml y con una espátula metálica se homogenizó y se colocó en cada caja Petri, todos los materiales utilizados fueron previamente autoclavados para evitar cualquier tipo de contaminación, para que el medio de cultivo se gelifique se esperó aproximadamente 3 minutos, en cada caja Petri se realizaron 4 pozos de aproximadamente 5-6 mm con la ayuda de una pipeta Pasteur, los pozos fueron realizados a 1cm aproximadamente del borde de la caja Petri para que si hubiese formación de halo este pueda ser medido correctamente, se trabajó con 6 concentraciones de aceite esencial al 5%, 2,5%, 1,25%, 0,6%, 0,3% y 0,15%, como control negativo DMSO y como control positivo Penicilina Clemizol de 1'000.000 U.I., en cada caja Petri se colocaron 0,8µl de 2 concentraciones consecutivas 5% y 2,5%, 1,25% y 0,6% y 0,3% con 0,15% una en cada pozo, en otro pozo se colocó 0,8 µl de control positivo y en el último pozo se colocó 0.8µl de control negativo, se realizó 5 repeticiones de cada tratamiento, se rotuló cada caja Petri con el nombre de la cepa, nombre del investigador, tipo de medio de cultivo y fecha, finalmente se incubo a 37°C por 24 horas y según los requerimientos en condiciones aerobias para *S. aureus* ATCC: 25923 y anaerobias para las 3 bacterias restantes, está técnica fue adaptada de (Ramírez, Castillo, & Melo, 2013).

2.5.6 Interpretación de resultados

Concluidas las 24 horas de incubación se observaron las cajas petri y se registraron los resultados de cada caja tomando en cuenta que en el medio de cultivo el microorganismo haya crecido uniformemente y que no existe rastros de crecimiento de otro microorganismo, si no se cumpliera estas condiciones se deberá repetir el ensayo ya que los resultados no serán confiables, se observó las características que presentaba cada uno de los 4 pozos, se utilizó una cartulina negra como fondo para una mejor observación del

halo, el diámetro de los halos formados alrededor de cada pozo se midieron con la ayuda de un calibrador digital.

2.6 Método estadístico

2.6.1 Análisis de varianza

Se utilizó este método estadístico que se basa en los conceptos de regresión lineal. El análisis de varianza permite determinar si diferentes tratamientos muestran diferencias significativas o por el contrario que sus medias poblacionales no difieren. Mediante este modelo se pudo establecer si existía diferencias importantes entre varias poblaciones en este caso bacterias o diferencias de grupos es decir las concentraciones utilizadas mediante una variable cuantitativa que es los mm de diámetro del halo de inhibición. Se establece que cuando el valor de la significancia es baja es decir menor a 0,05 rechazamos la hipótesis nula que establece que en todos los grupos las medias son iguales y por consiguiente se acepta la hipótesis alternativa la cual establece que el aceite esencial de sunfo (*Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze) presenta actividad antimicrobiana frente a las bacterias causantes de afecciones respiratorias por lo que al menos una de las concentraciones establecidas presenta actividad antimicrobiana difiriendo una de otra.

Mediante el Test HSD de Tukey 0,05 se encontró diferencias estadísticas significativas para las combinaciones establecidas en la investigación, cada microorganismo frente a cada concentración de aceite esencial, al obtener conglomerados o grupos categorizados se estableció que concentración de aceite esencial tuvo actividad frente a qué microorganismo.

2.6.2 Análisis estadístico

Para el Análisis de Varianza de actividad inhibitoria del aceite de Sunfo (*Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze) frente a cuatro microorganismos (*S. aureus* ATCC: 25923, *S. pyogenes* ATCC: 19615, *S. pneumoniae* ATCC: 49619 y *S. mutans* ATCC: 25175), se utilizó el programa estadístico Infostat Versión Libre 2008, el método comparativo empleado fue Tuckey al 5%.

Se utilizó un Diseño de Bloques Completamente al Azar DCA en el cual se aplicaron 8 tratamientos de la forma indicada a continuación:

Tabla 3: Tratamientos para el análisis de actividad inhibitoria del aceite de Sunfo *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze frente a cuatro microorganismos *S. aureus*, *S. mutans*, *S. pyogenes* y *S. pneumoniae*

Tratamiento	Descripción
T1	Aceite de sunfo al 5%
T2	Aceite de sunfo al 2.5%
T3	Aceite de sunfo al 1.25%
T4	Aceite de sunfo al 0.6%
T5	Aceite de sunfo al 0.30%
T6	Aceite de sunfo al 0.15%
T7 (Control positivo)	Penicilina

T8 (Control negativo)	DMSO
-----------------------	------

Elaborado por: Andrea Fonseca

Las mediciones se realizaron a las 24 horas de realizado el antibiograma.

La interacción de los tratamientos fue:

En cada caja petri se realizaron 4 pozos en los cuales se colocó en el pozo superior el T1, en el pozo inferior el T2, en el pozo de la derecha el T7 y en el pozo de la izquierda de la caja petri el T8. En otra caja petri se colocó en el pozo superior el T3 y en el inferior el T4 los pozos de la derecha e izquierda se mantienen con el T7 y T8 respectivamente y finalmente en la última caja petri se colocó en el pozo superior el T5 y en el pozo inferior el T6 manteniendo constantes los pozos de la derecha e izquierda con los tratamientos T7 y T8 respectivamente. Cada caja petri se repitió 5 veces.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Control de calidad del aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* (Kunth)

Kuntze

3.1.1 Análisis Organoléptico

Tabla 4: Análisis organoléptico

Parámetros	Determinación
Olor	Cítrico penetrante
Color	Ambar
Sabor	Poco amargo

Elaborado por: Andrea Fonseca

El olor, color y sabor del aceite se atribuye a los compuestos químicos, por ejemplo se sabe que el Limoneno le da el olor característico de los cítricos por este motivo el aceite de sunfo (*Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze) posee un olor penetrante relacionado a este compuesto.

3.1.2 Análisis físicos

Densidad

El densitómetro toma automáticamente 3 mediciones reflejando en la pantalla la media de estos valores.

Densidad = 0,9133 g/cm³ a una temperatura de 20,03°C

Índice de refracción

El valor observado en el refractómetro fue de 1,479 a temperatura 20,5°C.

3.1.3 Análisis químicos

Acidez pH

Tabla 5: Valor de pH del aceite esencial

Repetición	Medición
1	5,98
2	6,01
3	5,96
Promedio	5,98

Elaborado por: Andrea Fonseca

El aceite esencial de sunfo (*Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze) es de alta calidad ya que los aceites esenciales de alta calidad presentan pH de 5 a 6 clasificándolos como soluciones ácidas, el pH se determina mediante una escala que va de 0 a 14 que representa la concentración de iones H.

3.2 Sustancia control

Se calculó mediante la ecuación 1, ecuación de dilución.

Tabla 6: Valores de la sustancia control Penicilina Clemizol

Parámetro	Valor
Concentración inicial ($\mu\text{g/ml}$)	600.000
Volumen inicial (ml)*	0,001
Concentración final ($\mu\text{g/ml}$)	80
Volumen final (ml)	10

* Valor del resultado calculado

Elaborado por: Andrea Fonseca

Se estableció trabajar con concentración de 80 $\mu\text{g/ml}$ por que la concentración a la que viene originalmente la penicilina 600.000 $\mu\text{g/ml}$ es muy alta y en la experimentación del antibiograma con pozos los diámetros formados ocupaban en su totalidad el área de la caja Petri interviniendo en la posible actividad antimicrobiana de los tratamientos o concentraciones de aceite esencial de sunfo (*Clinopodium nubigenum (Kunth) Kuntze*).

3.3 Actividad antimicrobiana del aceite de sunfo *Clinopodium nubigenum* (Kunth)

Kuntze

Tabla 7 : Promedios en mm de los halos de inhibición de aceite de sunfo *Clinopodium nubigenum* (Kunth) *Kuntze* frente a cuatro bacterias causantes de enfermedades respiratorias.

Bacterias	Concentración del aceite de sunfo	Diámetro del halo (mm)	C. positivo (mm) Penicilina Clemizol 1'000.000	C. Negativo (mm) DMSO
<i>S. aureus</i>	5%	9,98	36,64	6
	2,50%	12,68	36,57	6
	1,25%	6*	42,28	6
	0,60%	6	42,28	6
	0,30%	6	41,14	6
	0,15%	6	41,14	6
<i>S. mutans</i>	5%	6	40,59	6
	2,50%	6	40,59	6
	1,25%	6	44,15	6
	0,60%	6	44,15	6
	0,30%	8,8	46	6
	0,15%	6	46	6
<i>S. pyogenes</i>	5%	6	41,4	6

	2,50%	13,34	41,4	6
	1,25%	6	41,4	6
	0,60%	6	41,4	6
	0,30%	8,48	41,8	6
	0,15%	6	41,8	6
<i>S. pneumoniae</i>	5%	6	41,02	6
	2,50%	14,6	40,58	6
	1,25%	6	41,08	6
	0,60%	6	40,36	6
	0,30%	8,44	40	6
	0,15%	6	40,02	6

Elaborado por: Andrea Fonseca

*6 este valor representa al valor en mm del diámetro del pozo realizado en el medio de cultivo, más no la formación de un halo de inhibición.

En la tabla 7 se presentan los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de sunfo (*Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze) frente a cuatro bacterias causantes de enfermedades respiratorias, se evaluó 6 concentraciones de aceite de sunfo para cada bacteria. Según los datos obtenidos se puede decir que no existe relación entre la concentración del aceite de sunfo y la formación del halo de inhibición evidenciando así la complejidad de la acción antimicrobiana del aceite de sunfo, en la literatura consultada no se encontraron trabajos experimentales sobre las propiedades

antimicrobianas del aceite esencial de sunfo (*Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze) pero sí de algunas especies de este género, siendo las más estudiadas en este sentido algunas variedades de *Clinopodium vulgare* presentando baja potencia en la inhibición antimicrobiana frente a los mismos patógenos estudiados en esta investigación (Zaruma & Illescas, 2014).

3.4 Análisis estadístico

Para la interpretación del análisis estadístico se debe considerar el diseño experimental y los tratamientos efectuados, los cuales se encuentran detallados en la tabla 3. A continuación se muestran los resultados del Análisis de Varianza de la actividad inhibitoria del aceite de Sunfo (*Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze) frente a cuatro microorganismos (*S. aureus* ATCC: 25923, *S. pyogenes* ATCC: 19615, *S. pneumoniae* ATCC: 49619 y *S. mutans* ATCC: 25175).

3.4.1 Análisis de varianza de la actividad antimicrobiana del aceite de sunfo *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze frente a cuatro bacterias causantes de enfermedades respiratorias mediante el método comparativo de Tuckey al 5%

Tabla 8: ANOVA de la actividad antimicrobiana del aceite de sunfo *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze frente a cuatro bacterias causantes de enfermedades respiratorias

Variable: Halo de inhibición (mm)		
Bacteria	Valor CV	Valor p
<i>S. aureus</i>	18,46	>0,0001
<i>S. mutans</i>	28,83	>0,0001
<i>S. pyogenes</i>	40,47	>0,0001
<i>S. pneumoniae</i>	36,47	>0,0001

Elaborado por: Andrea Fonseca

En el análisis estadístico de la actividad antimicrobiana del aceite de sunfo (*Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze) frente a cuatro bacterias causantes de enfermedades respiratorias se obtuvo para cada bacteria un “valor p” menor a 0,05 por lo tanto se acepta la Hipótesis alternativa, es decir que uno o más de los tratamientos propuestos presenta actividad antimicrobiana, para estudios experimentales en el campo microbiológico el “valor p” que se admite y que indica que los resultados son estadísticamente significativos es de 0,05, dicho en otros términos, esto representa una seguridad del 95%, si se quisiera trabajar con un margen de seguridad mayor el “valor p” debería ser menor a 0,01 (Manterola & Pineda, 2008).

El análisis estadístico presenta Coeficientes de Variación (CV) altos, este coeficiente indica la variación de las unidades experimentales frente a la aplicación de un determinado tratamiento, es decir determina la variación de los datos, mientras el valor de CV se acerque a 100 la varianza de los datos es mayor. Los valores de CV resultantes en esta investigación, son elevados debido a la diversidad de valores resultantes de la variable halo de inhibición.

Véase los Anexo del 1 al 4, que corresponden a los cuadros resultantes del programa estadístico Infostat.

Tabla 9: Rangos formados mediante el método comparativo de Tuckey al 5%

Rangos formados según el Test: Tukey Alfa= 0,05				
Tratamientos	<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. pneumoniae</i>
<i>T1</i>	B	C	C	D
<i>T2</i>	B	C	B	B
<i>T3</i>	C	C	C	D
<i>T4</i>	C	C	C	D
<i>T5</i>	C	C	B	C
<i>T6</i>	C	B	C	D
<i>T7</i>	A	A	A	A
<i>T8</i>	C	C	C	D

Elaborado por: Andrea Fonseca

De acuerdo al Test de Tuckey al 5% se observa que existen 4 rangos con diferencias significativas estadísticamente, A, B, C y D. En el rango A se encuentra siempre el tratamiento 7 (control positivo) ya que los valores obtenidos de la variable halo de inhibición son notoriamente más grandes frente a los otros tratamientos, en el rango B se encuentran respectivamente los tratamientos que presentaron valores menores respecto a la variable medida y posteriormente en los rangos siguientes se encontraran los tratamientos cuyo valor de la variable a medir es menor a las anteriores o no formaron halo de inhibición, esto nos ayuda a categorizar en grupos a los tratamientos pudiendo llegar a una conclusión de existencia o no de actividad antimicrobiana.

CONCLUSIONES

La revisión bibliográfica sobre el sunfo en investigaciones realizadas en la misma institución Universidad Politécnica Salesiana, demuestra un potencial antioxidante del aceite esencial de sunfo (*Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze), y el estudio de composición química realizado indica compuestos tales como el timol que podrían ser los responsables de la actividad antibacterial de este recurso.

El aceite esencial de sunfo (*Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze), presenta actividad antibacterial para todas las bacterias patógenas utilizadas en el estudio relacionadas con infecciones respiratorias, esta acción se basa en la concentración del aceite es mayor para *S. pyogenes* ATCC: 19615 y menor para *S. mutans* ATCC: 25175.

El análisis estadístico de los resultados acepta hipótesis alternativa que indica que uno o más tratamientos correspondientes a las diferentes concentraciones de aceite de sunfo sí presentaron inhibición antibacterial frente a los patógenos en estudio.

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar estudios de toxicidad del aceite esencial de sunfo (*Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze), sobre todo si se utilizan concentraciones superiores al 5%.

Continuar con los estudios de la actividad antibacteriana del aceite esencial de sunfo (*Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze), utilizando bacterias relacionadas a enfermedades digestivas de origen microbiano, pues uno de los usos etnobotánicos del sunfo es en afecciones digestivas.

Experimentar con una mezcla de aceites esenciales con características antibacterianas, para comprobar si existe una potencialización en la inhibición frente a un grupo específico de microorganismos patógenos.

BILBIOGRAFÍA

- ATCC. (2014). *www.att.org*. Obtenido de <http://www.atcc.org/products/all/25923.aspx#documentation>
- Avellaneda, S., Rojas, N., & Fonseca, R. (s.f.). *Actividad antibacteriana de Diphysa minutifolia Rose*. La Habana: 2005.
- Bandon, A. (2000). *Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica*. Buenos Aires : Editorial de la universidad de la Plata.
- Caicedo, E., & Otavalo, S. (2007). *www.utn.edu.ec*. Obtenido de <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/242/1/03%20AGI%20197%20TESIS.pdf>
- Cercenado, E., & Saavedra, L. (01 de Julio de 2009). *Programa de formación continua en pediatría*. Obtenido de <http://www.apcontinuada.com/es/el-antibiograma-interpretacion-del-antibiograma/articulo/80000504/>
- Ceruti, M., & Neumayer, F. (2004). *INTRODUCCIÓN A LA OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES*. Los Ángeles.
- Díaz, J. (2006). *Streptococcus constellatus: agente etiológico asociado en empiema pleural*. Chile: Revista medica de Chile.
- Figueroa, J., Martínez, P., & Moreno, Z. (2007). *Efecto antimicrobiano In vitro de propóleos argentinos, colombianos y cubano sobre Streptococcus mutans ATCC 25175*. Colombia.

- Gilardoni, G. M. (2011). Phytochemical researches and antimicrobial activity of *Clinopodium nubigenum* Kunth (Kuntze) raw extracts. *SCIELO*.
- Gobierno Autónomo Descentralizado Parroquial de Pintag. (2012). *PLAN DE DESARROLLO Y ORDENAMIENTO TERRITORIAL*. Quito.
- Guerra, P. (2015). *Evaluación de la actividad antioxidante bioautográfica de dos variedades de aceites esenciales andinos Clinopodium nubigenum y Baccharis latifolia*. Quito.
- Guzmán, I., & Henríquez, J. (2007). *DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE LA CROMATOGRAFÍA DE COLUMNA (n-HEXANO:ACETATO DE ETILO 70%, ACETATO DE ETILO PURO Y METANOL PURO) PROCEDENTES DEL EXTRACTO DICLOROMETÁNICO DE LA GOMA-RESINA DE Eucalyptus citriodor*. El Salvador.
- INIAP. (1997). *Las plantas medicinales de la sierra ecuatoriana: biodiversidad y usos*. Quito.
- IPNI. (09 de 10 de 2015). *The international plant names index*. Obtenido de <http://www.ipni.org/>
- Jorgensen, P. (1999). *www.tropicos.org*. Obtenido de <http://www.tropicos.org/Name/17605046?langid=66>
- Koneman, E. (2006). Diagnóstico Microbiológico 6ta Edición. En E. Koneman, *Diagnóstico Microbiológico 6ta Edición* (pág. 925). Buenos Aires: Médica Panamericana.

- Lituma, L., & Molina, V. (2008). “*DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANALGÉSICO DEL TIPO (Clinopodium nubigenum)*”. Cuenca.
- Lizcano, A., & Vergara, J. (2008). *Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales Valeriana pilosa, Hesperomeles ferruginea, M. rhopaloides y Passiflora manicata frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos*. Bogotá.
- Magallanes, C., Cordova, C., & Orozco, R. (2003). *Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de macroalgas marinas de la costa central del Perú*. Lima.
- Manterola, C., & Pineda, V. (2008). *El valor de “p” y la “significación estadística”*. Chile.
- Microbiologics. (19 de Diciembre de 2010). *Microbiologics*. Obtenido de <http://www.microbiologics.com/s.nl/c.915960/it.A/id.5924/.f>
- Ministerio de salud pública . (01 de Diciembre de 2015). <http://www.salud.gob.ec/>. Obtenido de <http://www.salud.gob.ec/direccion-nacional-de-vigilancia-epidemiologica/>
- Notuslink. (10 de 10 de 2015). *Biocomercio Andino*. Obtenido de <http://www.biocomercioecuador.ec/biocomercio-en-el-ecuador/biodiversidad-en-el-ecuador>
- Peredo, A., Luna, E., & Lopez, A. (2009). *Aceites esenciales método de extracción*. México.
- Pino, J., Ortega, A., & Pérez, A. (1996). *Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de Lippia alba (Mill.) n. e. Brown*. Habana.

- Porte, L., & Braun, S. (2009). *Streptococcus mutans: Una bacteria que hace honor a su nombre*. Chile: Revista Chilena de INFECTOLOGÍA.
- Preado, V. (2001). Conceptos microbiológicos de Streptococcus pneumoniae. *SCIELO*.
- Ramirez, L., & Castaño, D. (2009). *METODOLOGIAS PARA EVALUAR IN VITRO LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE COMPUESTOS DE ORIGEN VEGETAL*.
Pereira.
- Ramírez, L., Castillo, A., & Melo, A. (16 de Mayo de 2013). *NOVA*. Obtenido de
<http://unicolmayor.edu.co/publicaciones/index.php/nova/article/view/224/448>
- Rivera, M. (2001). *Estreptococo Beta Hemolítico grupo A*. Honduras.
- Rodríguez, M., Alcaraz, L., & Real, s. (2012). *PROCEDIMIENTOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES EN PLANTAS AROMÁTICAS*.
México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Rojas, N., Avellaneda, S., & Cuéllar, A. (2008). *Actividad antimicrobiana de Waltheria indica*. La Habana.
- Salazar, A. (2009). *Obtención de aceite esencial de cedrón, sunfo, yerba luisa en un alambique tipo cachimbo po cohobación*. Ibarra.
- Silva, M. (23 de 09 de 2012). *Agentes Vivos de Enfermedad más Prevalentes en Chile*.
Obtenido de
<http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Bacterias/Staphylococcus%20aureus.pdf>
- Solórzano, F., & Ortíz, I. (2005). Serotipos prevalentes de Streptococcus pneumoniae colonizadores de nasofaringe, en niños del Distrito Federal. *SCIELO*.

Stefanovic, O., Stankovic, M., & Comic, L. (2011). *n vitro antibacterial efficacy of Clinopodium vulgare L. extracts and their synergistic interaction with antibiotics*. Serbia: Academic Journals.

Tovalino, M., & Sacsaquishpe, S. (2010). *Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa - Perú sobre cultivos de Streptococcus mutans (ATCC 25175) y Staphylococcus aureus (ATCC 25923)*. Perú.

Zaruma, M., & Illescas, J. (2014). “*DETERMINACION DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE ACEITES ESENCIALES OBTENIDOS DE LA FAMILIA Myracaceae y Lamiceae*”. Cuenca.

ANEXOS

Anexos 1: ANOVA de la actividad inhibitoria del aceite de *Sunfo Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze frente a *S. aureus* ATCC: 25923 mediante el método comparativo de Tuckey al 5%

```

D:\DEBERES\SALE\Tesises\Sunfo Andy\Tabla S. aureus.IDB2: 16/03/2016 - 23:27:28

Análisis de la varianza

Variable      N  R²  R² Aj  CV
Diámetro Halo (mm) 40 0,99  0,99 18,46

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)
F.V.      SC      gl      CM      F      p-valor
Modelo    6480,74  7  925,82  459,69 <0,0001
Tratamiento 6480,74  7  925,82  459,69 <0,0001
Error      64,45  32    2,01
Total      6545,18 39

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,91057
Error: 2,0140 gl: 32
Tratamiento Medias n
7      38,84  5  A
2      12,68  5   B
1      9,98  5   B
8      0,00  5   C
6      0,00  5   C
3      0,00  5   C
4      0,00  5   C
5      0,00  5   C
Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)
    
```

Anexos 2: ANOVA de la actividad inhibitoria del aceite de *Sunfo Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze frente a *S. mutans* ATCC: 25175 mediante el método comparativo de Tuckey al 5%

```

D:\DEBERES\SALE\Tesises\Sunfo Andy\Tabla S. mutans.IDB2: 16/03/2016 - 23:18:30

Análisis de la varianza

Variable      N  R²  R² Aj  CV
Halo Inhibición (mm) 40 0,99  0,98 28,83

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)
F.V.      SC      gl      CM      F      p-valor
Modelo    7096,89  7  1013,84  320,18 <0,0001
Tratamiento 7096,89  7  1013,84  320,18 <0,0001
Error      101,33  32    3,17
Total      7198,22 39

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,64955
Error: 3,1665 gl: 32
Tratamiento Medias n
7      40,58  5  A
6      8,80  5   B
8      0,00  5   C
5      0,00  5   C
1      0,00  5   C
2      0,00  5   C
3      0,00  5   C
4      0,00  5   C
Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)
    
```

Anexos 3: ANOVA de la actividad inhibitoria del aceite de *Sunfo Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze frente a *S. pyogenes* ATCC: 19615 mediante el método comparativo de Tuckey al 5%

```
D:\DEBERES\SALE\Tesises\Sunfo Andy\Tabla S. pyogenes.IDB2: 16/03/2016 - 23:07:39
```

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Halo Inhibición (mm)	40	0,96	0,95	40,47

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	7321,15	7	1045,88	102,25	<0,0001
Tratamiento	7321,15	7	1045,88	102,25	<0,0001
Error	327,32	32	10,23		
Total	7648,47	39			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=6,55934
Error: 10,2288 gl: 32

Tratamiento Medias n

Tratamiento	Medias	n	Letras
7	41,40	5	A
2	13,34	5	B
5	8,48	5	B
8	0,00	5	C
6	0,00	5	C
3	0,00	5	C
4	0,00	5	C
1	0,00	5	C

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Anexos 4: ANOVA de la actividad inhibitoria del aceite de *Sunfo Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze frente a *S. pneumoniae* ATCC: 49619 mediante el método comparativo de Tuckey al 5%

```
D:\DEBERES\SALE\Tesises\Sunfo Andy\Tabla S. pneumoniae.IDB2: 16/03/2016 - 23:23:19
```

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Halo Inhibición (mm)	40	0,96	0,96	36,47

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	7125,96	7	1017,99	121,01	<0,0001
Tratamiento	7125,96	7	1017,99	121,01	<0,0001
Error	269,20	32	8,41		
Total	7395,16	39			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,94856
Error: 8,4125 gl: 32

Tratamiento Medias n

Tratamiento	Medias	n	Letras
7	40,58	5	A
2	14,60	5	B
5	8,44	5	C
8	0,00	5	D
3	0,00	5	D
6	0,00	5	D
4	0,00	5	D
1	0,00	5	D

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Anexos 5: Ficha técnica *S. aureus* ATCC: 25923

 ATCC Product Sheet <i>Staphylococcus aureus</i> <i>subsp. aureus</i> (ATCC® 25923™)	 Description
<p>Please read this FIRST</p> <div data-bbox="284 724 641 1113" style="background-color: black; color: white; padding: 10px;"><p>Storage Temp. Frozen: -80°C or colder Freeze-Dried: 2°C to 8°C Live Culture: See Propagation Section</p><hr/><p>Biosafety Level 2</p></div>	<p>Designation: Seattle 1945 Deposited Name: <i>Staphylococcus aureus</i> Rosenbach Product Description: Quality control strain for the CAMP test, assay of wood smoke concentrate, evaluation of Mueller-Hinton agar, examination of dairy products, media testing, CLSI disk diffusion, and for Abbott, API, and Autobac products.</p>
Intended Use <p>This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.</p>	 Propagation
Citation of Strain <p>If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: <i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> (ATCC® 25923™)</p>	<p>Medium ATCC® Medium 18: Trypticase Soy Agar/Broth</p> <p>Growth Conditions Temperature: 37°C Atmosphere: Aerobic</p> <p>Propagation Procedure</p> <ol style="list-style-type: none">1. Open vial according to enclosed instructions.2. Using a single tube of #18 broth (5 to 6 mL), withdraw approximately 0.5 to 1.0 mL with a Pasteur or 1.0 mL pipette. Rehydrate the entire pellet.3. Aseptically transfer this aliquot back into the broth tube. Mix well.4. Use several drops of the suspension to inoculate a #18 agar slant and/or plate.5. Incubate the tubes and plate at 37°C for 24 hours.
References <p>References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.</p>	 Notes
Biosafety Level: 2 <p>Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the <i>Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories</i> from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.</p>	<p>It is advisable to transfer from agar to agar to maintain MIC values.</p> <p>Several GenBank accessions are available for this item:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Nucleotide (GenBank) : AF063668 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 heat shock protein 60 gene, partial cds.2. Nucleotide (GenBank) : AX110511 Sequence 1244 from Patent WO0123604.3. Nucleotide (GenBank) : AX110995 Sequence 1728 from Patent WO0123604.4. Nucleotide (GenBank) : U02910 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 16S rRNA gene, partial sequence.5. Nucleotide (GenBank) : U39769 <i>Staphylococcus aureus</i> 16S-23S ribosomal RNA spacer region.6. Nucleotide (GenBank) : Z16422 <i>S. aureus</i> <i>dfrB</i> gene for dihydrofolate reductase.7. Nucleotide (GenBank) : AB047239 <i>Staphylococcus aureus</i> DNA, complete structure of cassette chromosome(SCC)-like element, strain:ATCC 25923.

Fuente: (ATCC, 2014).

Anexos 6: Ficha técnica *S. pyogenes* ATCC: 19615

 ATCC Product Sheet <i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC® 19615-MINI-PACK™)	 Description
Please read this FIRST	<p>Designation: Bruno [CIP 104226] Deposited Name: <i>Streptococcus pyogenes</i> Rosenbach Antigenic Properties: Lancefield's group A Product Description: ATCC® 19615-MINI-PACK™ consists of 6 ready-to-use vials of ATCC® 19615™ frozen in 200 µL of glycerol stock, eliminating the need to rehydrate and culture the strain prior to use. Each vial is provided with a 2-D barcode for easy storage and tracking, as well as peel-off labels for fast and reliable recordkeeping.</p>
 <p>Storage Temp. -70°C or colder, store upright. Storage at -20°C is acceptable for up to 1 year.</p> <hr/>  <p>Biosafety Level 2</p>	 Propagation
Intended Use	<p>Medium ATCC® Medium 44: Brain Heart Infusion Agar/Broth ATCC® Medium 260: Trypticase soy agar/broth with defibrinated sheep blood</p> <p>Growth Conditions Temperature: 37°C Atmosphere: 5% CO₂</p> <p>Propagation Procedure Frozen mini-cryovials packed in dry ice should either be thawed immediately for use or stored at or below -70°C until the expiration date printed on the label. Storage at -20°C is acceptable for up to 1 year.</p> <ol style="list-style-type: none">1. Thaw the bacterial strain upright using gentle agitation in a 25°C to 30°C water bath. Thawing will be rapid; approximately 2-3 minutes or until all ice crystals have melted.2. Immediately after thawing, wipe down the ampoule with 70% ethanol and aseptically transfer the entire contents to a 5-6 mL tube of #44 broth or directly inoculate a #260 plate and/or #260 agar slant.3. Discard the empty vial. Do not refreeze any unused portion as it will result in a loss of viability.4. Incubate at 37°C for 24 hours in an atmosphere of 5% CO₂.
This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.	 Notes
Citation of Strain	Additional information on this culture is available on the ATCC® web site at www.atcc.org .
<p>If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: <i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC® 19615-MINI-PACK™)</p>	 References
	References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org .
	 Biosafety Level: 2
	<p>Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the <i>Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories</i> from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.</p>
	ATCC Warranty
	<p>The viability of ATCC® products is warranted for 30 days from the date of shipment, and is valid only if the product is stored and cultured according to the information included on this product information sheet. ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this strain. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this strain. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.</p>

Fuente: (ATCC, 2014)

Anexos 7: Ficha técnica *S. pneumoniae* ATCC: 49619

 ATCC Product Sheet <i>Streptococcus pneumoniae</i> (ATCC® 49619-MINI- PACK™)	 Description
<p>Please read this FIRST</p>  <p>Storage Temp. -70°C or colder, store upright. Storage at -20°C is acceptable for up to 1 year.</p>  <p>Biosafety Level 2</p>	<p>Designation: 262 [CIP 104340] Deposited Name: <i>Streptococcus pneumoniae</i> (Klein) Chester Antigenic Properties: Serotype 19F (Danish), type 19 (U.S.) Product Description: ATCC® 49619-MINI-PACK™ consists of 6 ready-to-use vials of ATCC® 49619™ frozen in 200 µL of glycerol stock, eliminating the need to rehydrate and culture the strain prior to use. Each vial is provided with a 2-D barcode for easy storage and tracking, as well as peel-off labels for fast and reliable recordkeeping.</p>
<p>Intended Use</p> <p>This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.</p> <p>Citation of Strain</p> <p>If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: <i>Streptococcus pneumoniae</i> (ATCC® 49619-MINI-PACK™)</p>	 Propagation Medium ATCC® Medium 44: Brain Heart Infusion Agar/Broth ATCC® Medium 260: Trypticase soy agar/broth with defibrinated sheep blood Growth Conditions Temperature: 37°C Atmosphere: 5% CO ₂ Propagation Procedure Frozen mini-cryovials packed in dry ice should either be thawed immediately for use or stored at or below -70°C until the expiration date printed on the label. Storage at -20°C is acceptable for up to 1 year. <ol style="list-style-type: none">1. Thaw the bacterial strain upright using gentle agitation in a 25°C to 30°C water bath. Thawing will be rapid; approximately 2-3 minutes or until all ice crystals have melted.2. Immediately after thawing, wipe down the ampoule with 70% ethanol and aseptically transfer the entire contents to a 5-6 mL tube of #44 broth or directly inoculate a #260 plate and/or #260 agar slant.3. Discard the empty vial. Do not refreeze any unused portion as it will result in a loss of viability.4. Incubate at 37°C for 24 hours in an atmosphere of 5% CO₂. Screw caps should be loose.
<p>American Type Culture Collection PO Box 1549 Manassas, VA 20108 USA www.atcc.org</p>	 Notes <p>This strain will lyse if incubated for 48 hours or longer. An additional transfer may be required after initial 24 hours of growth in order to fully remove cytoprotectant and achieve acceptable growth. Depositor-provided information: serotype 19F (Danish), type 19 (U.S.). Additional information on this culture is available on the ATCC® web site at www.atcc.org.</p>  References <p>References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.</p>  Biosafety Level: 2 <p>Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the <i>Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories</i> from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.</p> ATCC Warranty <p>The viability of ATCC® products is warranted for 30 days from the date of shipment, and is valid only if the product is stored and cultured according to the information included on this product information sheet. ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this strain. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this strain. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.</p>

Fuente: (ATCC, 2014).

Anexos 8: Ficha técnica *S. mutans* ATCC: 25175

 ATCC Product Sheet <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC® 25175™)	 Description <hr/> Designation: NCTC 10449 [IFO 13955] Deposited Name: <i>Streptococcus mutans</i> Clarke Product Description: Type strain
<p>Please read this FIRST</p>  <p>Storage Temp. Frozen: -80°C or colder Freeze-Dried: 2°C to 8°C Live Culture: See Propagation Section</p> <hr/>  <p>Biosafety Level 1</p>	 Propagation <hr/> Medium ATCC® Medium 44: Brain Heart Infusion Agar/Broth Growth Conditions Temperature: 37°C Atmosphere: Aerobic Propagation Procedure <ol style="list-style-type: none">1. Open vial according to enclosed instructions or visit www.atcc.org for instructions.2. Rehydrate the entire pellet with approximately 0.5 mL of #44 broth. Aseptically transfer the entire contents to a 5-6 mL tube of #44 broth. Additional test tubes can be inoculated by transferring 0.5 mL of the primary broth tube to these secondary tubes.3. Use several drops of the primary broth tube to inoculate a #44 plate and/or #44 agar slant.4. Incubate at 37°C for 24 to 48 hours.
Intended Use <hr/> <p>This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.</p>	 Notes <hr/> <p>Colonies on #44 agar appear punctiform, white, dry, flat, and entire. Additional information on this culture is available on the ATCC web site at www.atcc.org.</p>
Citation of Strain <hr/> <p>If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC® 25175™)</p>	 References <hr/> <p>References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.</p> <hr/>  Biosafety Level: 1
	<hr/> ATCC Warranty <hr/> <p>The viability of ATCC® products is warranted for 30 days from the date of shipment, and is valid only if the product is stored and cultured according to the information included on this product information sheet. ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this strain. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this strain. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.</p>

Fuente: (ATCC, 2014).