

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO

CARRERA:
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: INGENIERA E
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:
EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE ACEITES
ESENCIALES Y SUS MEZCLAS (*Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Ocotea*
quixos, *Melaleuca armillaris* *Zingiber officinale*) EN *Aeromona hydrophila*,
Aeromona salmonicida Y *Pseudomonas fluorescens*.

AUTORES:
CRISTHIAN ALEXANDER ORTEGA MAYORGA
PAMELA DE LOS ÁNGELES USCA NARVÁEZ

TUTOR:
CHRISTIAN FABRICIO LARENAS URÍA

Quito, julio del 2018

Cesión de derechos de Autor

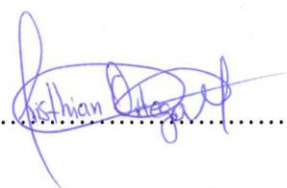
Nosotros, Pamela de los Ángeles Usca Narváez con documento de identificación N° 1723401996 y Cristhian Alexander Ortega Mayorga con documento de identificación N° 1718123514 manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo de titulación intitulado: “Evaluación *in vitro* de la actividad inhibitoria de aceites esenciales y sus mezclas (*Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Ocotea quixos*, *Melaleuca armillaris*, *Zingiber officinale*) en *Aeromona hydrophila*, *Aeromona salmonicida* y *Pseudomona fluorescens*”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero 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 nuestra condición de autores me reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribimos este documento en el momento que hacemos entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana



.....
Pamela de los Ángeles Usca Narváez

C.I: 1723401996



.....
Cristhian Alexander Ortega Mayorga

C.I: 1718123514

Quito, Julio del 2018

Declaratoria de coautoría del docente tutor

Yo, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación:
“Evaluación *in vitro* de la actividad inhibitoria de aceites esenciales y sus mezclas
(*Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Ocotea quixos*, *Melaleuca armillaris*, *Zingiber
officinale*) en *Aeromona hydrophila*, *Aeromona salmonicida* y *Pseudomona fluorescens*”
realizado por Usca Narváez Pamela de los Ángeles y Ortega Mayorga Crithian
Alexander, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por
la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final de
titulación.



.....
Christian Fabricio Larenas Uría

C.I: 1705586046

Dedicatoria

A Dios por guiarme y bendecirme cada día.

A mis padres Edgar y Rosario que siempre estuvieron brindándome apoyo, guía y cariño durante todo este camino estudiantil.

A mi hermano Stalin por su confianza, por alentarme cada día a ser mejor y brindarme su apoyo incondicional.

A mis abuelitos por estar a mi lado en cada paso de mi vida.

Pamela Usca

Este trabajo se lo dedico a Dios por haber bendecido mi camino todo este tiempo de estudios, a mis padres Luis y Laura por ser un ejemplo de perseverancia y haberme

Brindado toda su confianza y los mejores consejos en los momentos difíciles, a mi abuelita Mercedes por todo el cariño que me ha brindado, y a mis hermanos Pablo y

Luis.

Cristhian Ortega.

Agradecimientos

A la Universidad Politécnica Salesiana que nos abrió sus puertas y nos brindó una educación de excelencia.

A nuestro tutor de tesis Quim. Christian Fabricio Larenas Uría por permitirnos trabajar en este proyecto de investigación y por confiar en nosotros para el desarrollo del mismo.

Al Ing. Marco Ibarra por su apoyo y comprensión y a la Ing. Gabriela Méndez por brindarnos su apoyo y compartirnos sus conocimientos.

Al Centro de Investigación y Valoración de Biodiversidad y sus ayudantes que nos supieron brindar su apoyo dentro del laboratorio.

Índice

Introducción	1
Capítulo 1.....	4
1. Marco Teórico.....	4
1.1 Aceites esenciales.....	4
1.2 Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales.....	4
1.3 Quimiotipos de aceites esenciales	5
1.4 Descripción botánica de aceites usados.....	6
1.5 Cúrcuma (<i>Curcuma longa</i>).....	6
1.5.1 Aceite esencial de cúrcuma (<i>Curcuma longa</i>).....	6
1.5.2 Principales componentes químicos del aceite esencial de cúrcuma (<i>Curcuma longa</i>).....	7
1.6 Hierba Luisa (<i>Cymbopogon citratus</i>).....	7
1.6.1 Aceite esencial de hierba luisa (<i>Cymbopogon citratus</i>).....	8
1.7 Jengibre (<i>Zingiber officinale</i>).....	9
1.7.1 Aceite esencial de Jengibre (<i>Zingiber officinale</i>).....	9
1.7.2 Componentes del aceite esencial de Jengibre (<i>Zingiber officinale</i>).....	10
1.8 Ishpink (<i>Ocotea quixos</i>).....	11
1.8.1 Aceite esencial de Ishpink (<i>Ocotea quixos</i>).....	11
1.9 Melaleuca (<i>Melaleuca armillaris</i>).....	12
1.9.1 Aceite esencial de <i>Melaleuca armillaris</i>	13
1.10 Acuicultura.....	15
1.11 Enfermedades infecciosas en los peces de acuicultura.....	16
1.11.1 Causadas por virus	17
1.11.2 Causadas por bacterias	17
1.12 <i>Aeromonas</i>	17
1.12.1 <i>Aeromona salmonicida</i>	18
1.12.2 <i>Aeromona hydrophila</i>	19
1.12.3 <i>Pseudomona fluorescens</i>	20
1.13 Resistencia a los antimicrobianos.....	21
1.14 Concentración Mínima Inhibitoria	22
1.14.1 Microdilución.....	22
1.14.2 Sales de Tetrazolio	23

1.15	Cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS)	23
1.16	Sinergismo de aceites esenciales	23
1.17	Controles positivos	24
1.17.1	Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>).....	24
1.17.2	Cloranfenicol.....	24
1.17.3	Enrofloxacin.....	24
Capítulo 2.....		26
2.	Metodología	26
2.1	Aceites esenciales.....	26
2.2	Control de calidad	27
2.2.1	Densidad.....	27
2.2.2	Índice de Refracción	28
2.3	Cromatografía GC-MS	28
2.4	Activación de cepas ATCC <i>American Type Culture Collection</i>	29
2.5	Controles para las pruebas.....	29
2.6	Microdilución	29
2.6.1	Preparación del inóculo.....	29
2.6.2	Preparación del medio de cultivo.....	30
2.6.3	Aceites esenciales.....	31
2.6.4	Preparación de incubación de placas.....	31
2.6.5	Preparación del colorante de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC).....	32
2.6.6	Adición del colorante de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC).....	32
2.6.7	Lectura de placas.....	32
2.7	Interpretación de resultados.....	33
Capítulo 3.....		35
3.	Resultados y Discusión	35
3.1	Composición química y calidad de los aceites esenciales.....	35
3.2	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM)	40
3.3	Sinergismo y Antagonismo de los aceites esenciales.....	46
3.4	Análisis estadístico de los aceites puros y mezclas en cada bacteria	48
Conclusiones		52
Recomendaciones		54

Referencias.....	55
Anexos	55

Índices de Tablas

Tabla 1. Principales componentes del aceite esencial de <i>Curcuma longa</i>	7
Tabla 2. Componentes químicos de la Hierba luisa.....	8
Tabla 3. Principales componentes del aceite esencial de <i>Zingiber officinale</i>	10
Tabla 4. Compuestos químicos de <i>Melaleuca armillaris</i>	14
Tabla 5. Combinaciones planteadas para los aceites esenciales binarios.	26
Tabla 6. Combinaciones planteadas para los aceites esenciales ternarios	27
Tabla 7. Densidades obtenidas de los aceites esenciales puros y mezclas.....	35
Tabla 8. Índices de refracción obtenidos de los aceites esenciales puros y mezclas .	37
Tabla 9. Compuestos identificados en el aceite esencial de <i>Curcuma longa</i>	38
Tabla 10. Compuestos identificados en el aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i> ..	38
Tabla 11. Compuestos identificados en el aceite esencial de <i>Zingiber officinale</i>	39
Tabla 12. Compuestos identificados en el aceite esencial de <i>Ocotea quixos</i>	39
Tabla 13. Componentes identificados en el aceite esencial de <i>Melaleuca armillaris</i>	39
Tabla 14. Componentes identificados en el aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i>	39
Tabla 15. MIC de las bacterias en estudio para cada aceite esencial y mezcla.....	41
Tabla 16. FIC de las mezclas de aceites esenciales	47

Índices de Figuras

Figura 1. Estructura química de los principales componentes de <i>Cymbopogon citratus</i>	9
Figura 2. Estructura química de los principales componentes <i>Zingiber officinale</i>	11
Figura 3. Estructura química de los principales componentes de <i>Ocotea quixos</i>	12
Figura 4. Estructura química de los principales componentes de <i>Melaleuca armillaris</i>	14
Figura 5. Principales productores acuícolas en el Mundo, 2015.....	16
Figura 6. Salmón con Furunculosis-Úlceras cutáneas típicas	19
Figura 7. Peces infectados con <i>A.hydrophila</i>	20
Figura 8. Pez infectado con <i>Pseudomona fluorescens</i>	21
Figura 9. Microdilución para la determinación de CIM	22
Figura 10. Prueba de Kruskal-Wallis para <i>Pseudomona fluorescens</i>	48
Figura 11. Prueba de Kruskal-Wallis para <i>Aeromona salmonicida</i>	49
Figura 12. Prueba de Kruskal-Wallis para <i>Aeromona hydrophila</i>	50

Índices de Anexos

Anexo 1. Ficha técnica del aceite esencial de <i>Curcuma longa</i>	69
Anexo 2. Ficha técnica del aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i>	70
Anexo 3. Ficha técnica del aceite esencial de <i>Zingiber officinale</i>	71
Anexo 4. Ficha técnica del aceite esencial de <i>Ocotea quixos</i>	72
Anexo 5. CIM de <i>C. longa</i> (A), <i>C. citratus</i> (B), <i>Z. officinale</i> (C), comparados con los controles positivos para <i>Aeromonas salmonicida</i>	73
Anexo 6. Codificación de aceites esenciales y sus mezclas.....	74

Resumen

El uso de antibióticos en la industria acuícola ha traído problemas de resistencia bacteriana y ambientales, hechos que ha obligado a buscar alternativas naturales para el tratamiento de enfermedades producidas por bacterias, siendo una importante opción los aceites esenciales dadas sus potenciales características antimicrobianas que ayuden a desarrollar una acuicultura sustentable.

En la investigación se determinó la Concentración mínima inhibitoria mediante la técnica de microdilución de aceites esenciales (*Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Ocotea quixos*, *Melaleuca armillaris* y *Zingiber officinale*) y sus mezclas binarias y ternarias sobre tres bacterias comunes que causan enfermedades en peces de agua dulce. El análisis de la composición de los aceites esenciales se realizó por medio de cromatografía de gases acoplado a masas (GC-MS), pudiendo determinar la composición porcentual de cada componente de los aceites analizados.

Para *Aeromona salmonicida* se obtuvo un MIC de 0.075 mg/mL que corresponde a *Cymbopogon citratus* clasificado como tratamiento de actividad fuerte. En *Aeromona hydrophila* un MIC de 1.25 mg/mL clasificada como una actividad moderada correspondiente a la mezcla de aceites: *Cymbopogon citratus* y *Ocotea quixos*. Para *Pseudomona fluorescens* se determinó un MIC de 5mg/mL correspondiendo a una actividad moderada a la mezcla de aceites *Curcuma longa*, *Ocotea quixos* y *Zingiber officinale*. Se determinó que la mayoría de aceites mezclados tuvieron un sinergismo parcial y efecto de adición, solo la mezcla *Zingiber officinale*, *Ocotea quixos* y *Melaleuca armillaris* mostro sinergismo total.

Palabras clave: aceites esenciales, microdilución, CIM, acuícola.

Abstract

The use of antibiotics in the aquaculture industry has brought problems of bacterial and environmental resistance, facts that have forced to look for natural alternatives for the treatment of diseases produced by bacteria, being an important option the essential oils given their potential antimicrobial characteristics that help to develop sustainable aquaculture.

In the research, the minimum inhibitory concentration was determined by the technique of microdilution of essential oils (*Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Ocotea quixos*, *Melaleuca armillaris* and *Zingiber officinale*) and their binary and ternary mixtures on three common bacteria that cause diseases in water fish. The analysis of the composition of the essential oils was carried out by gas chromatography coupled to masses (GC-MS), being able to determine the percentage composition of each component of the oils analyzed.

For *Aeromona salmonicida* a MIC of 0.075 mg / mL was obtained, which corresponds to *Cymbopogon citratus* classified as a strong activity treatment. In *Aeromona hydrophila* a MIC of 1.25 mg / mL classified as a moderate activity corresponding to the mixture of oils: *Cymbopogon citratus* and *Ocotea quixos*. For *Pseudomonas fluorescens*, a MIC of 5mg / mL was determined, corresponding to moderate activity in the mixture of *Curcuma longa*, *Ocotea quixos* and *Zingiber officinale* oils. It was determined that the majority of mixed oils had a partial synergism and effect of addition, only the mixture *Zingiber officinale*, *Ocotea quixos* and *Melaleuca armillaris* showed total synergism.

Key words: essential oils, microdilution, CIM, aquaculture.

Introducción

Las plantas medicinales han sido utilizadas desde tiempos ancestrales para el tratamiento de diversas enfermedades dado que utilizándolas correctamente tienen efectos terapéuticos importantes. Nazzaro et al (2013) indica que en dosis adecuadas pueden tener mejor o igual efecto que las drogas sintéticas, por esta razón alrededor del mundo se ha intensificado el desarrollo y la investigación de productos naturales.

En los últimos años los aceites esenciales se han convertido en una alternativa para el tratamiento de enfermedades producidas por bacterias y hongos. Asbahani et al (2015) indica que los aceites esenciales tienen actividades biológicas importantes, un ejemplo de ello es que son usados en el campo médico por sus características bactericidas, virucidas y fungicidas incluso contra bacterias multiresistentes a los antibióticos, además de que poseen propiedades medicinales.

Del Pozo Espinoza (2006) refiere que los aceites esenciales son de gran importancia para la industria cosmética, farmacéutica y alimenticia a nivel mundial. Dado que de estos se pueden obtener muchos beneficios tanto para el hombre como para los animales.

Actualmente los aceites esenciales están siendo utilizados para lograr una acuicultura sustentable, ya que reducen los niveles de estrés y las lesiones para disminuir los porcentajes de enfermedades y así la calidad de los cultivos (Martínez et al., 2015).

La acuicultura es considerada como una actividad de suma importancia a nivel mundial, ya que representa una opción alimenticia para el ser humano, es por ello que se investigan nuevas técnicas de producción que cumplan con ciertas características como: efectivas, accesibles y seguras.

Según el Instituto Nacional de Pesca (2016) la acuicultura en Ecuador ha sido una actividad de desarrollo y sustento para muchas poblaciones en cada una de las regiones de nuestro país, basándose en el cultivo de especies acuícolas nativas principalmente peces como: tilapia (*Oreochromis mossambicus* y *niloticus*), trucha (*Oncorhynchus mykiss*), cachama (*Colossoma macropomum*, *Piaractus brachypomus*), sábalo (*Brycon* sp.) y el Paiche (*Arapaima gigas*).

Sin embargo una de las principales dificultades que enfrenta el sector acuícola ecuatoriano para poder generar una producción inocua es la aparición de enfermedades producidas por bacterias, hongos, y virus en los peces de cultivo. Villamil Díaz & Martínez-Silva (2009) afirma:

Uno de los factores negativos para el desarrollo de la producción acuícola es la presencia de enfermedades infecciosas como resultado de incidencia de bacterias, hongos y virus frecuentemente asociadas con el aumento en las densidades de cultivo, el rápido desarrollo de la acuicultura con deficiencias en los métodos de manejo calidad de aguas, valor nutricional del alimento entre otros factores. (p.11)

El presente trabajo tiene como objetivo principal evaluar la actividad inhibitoria de los aceites esenciales y mezclas de (*Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Ocotea quixos*, *Melaleuca armillaris*, *Zingiber officinale*) sobre *Aeromona hydrophila*, *Aeromona salmonicida* y *Pseudomonas fluorescens*, mediante la técnica de microdilución. Se eligió el método porque es un ensayo que presenta una mejor precisión y eficiencia en comparación con otros métodos *in vitro*, evitando la metodología laboriosa de otras técnicas expuestas a mayor error experimental. La investigación involucra también el análisis de sinergismo y antagonismo de los aceites

en las mezclas probadas y el estudio de la composición de los quimiotipos de los aceites esenciales puros mediante cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS).

Para determinar el mejor tratamiento se realizará las pruebas estadísticas necesarias, en función de las características de distribución de frecuencia de los datos.

Capítulo 1

1. Marco Teórico

1.1 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son compuestos generalmente de color amarillo, solubles en lípidos y en disolventes orgánicos con una densidad generalmente más baja que la del agua; las plantas los sintetizan como metabolitos secundarios, que son mezclas de compuestos volátiles principalmente de mono y sesquiterpenoides, aromáticos, fenilpropanoides que son los responsables de la actividad biológica que ejercen en humanos, animales y plantas (Blumenthal, Goldberg, & Brinckmann, 2000).

Los aceites esenciales se han empleado en gran parte por sus propiedades ya observadas en la naturaleza, es decir, por sus actividades antibacterianas, antifúngicas e insecticidas. En la actualidad existe una gran demanda de producción de aceites esenciales especialmente para las industrias farmacéutica, agronómica, alimenticia, cosmética (Pino, 2015).

Los aceites esenciales se extraen de plantas que crecen principalmente en clima templado a cálido, las plantas los pueden sintetizar en todos sus órganos como son las hojas, ramas, raíces, corteza, frutos, flores, yemas y estos se almacenan en las células epidérmicas, células secretoras y tricomas glandulares (Başer & Buchbauer, 2015).

1.2 Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

A lo largo de los años se ha demostrado el potencial antimicrobiano que tienen los aceites esenciales contra las bacterias, debido a la gran cantidad de constituyentes; los aceites esenciales parecen no tener objetivos celulares específicos, estas propiedades

bioactivas se las debe a la unión de todos sus componentes (Gutierrez, Barry, & Bourke, 2008).

Según Bakkali (2008) los aceites esenciales al tener una conformación lipofílica atraviesan la pared celular y la membrana citoplasmática, irrumpen la estructura de sus diferentes capas de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos y los permeabilizan dañando así la membrana de las bacterias, la permeabilización de las membranas está asociada con la reducción del potencial de membrana, el colapso de la bomba de protones y el agotamiento del grupo de ATP.

Los aceites esenciales dañan lípidos y proteínas importantes del citoplasma hasta su colapso total. El daño a la pared celular y la membrana puede provocar la fuga de macromoléculas y la lisis de las células eucariotas; los aceites esenciales pueden provocar la despolarización de las membranas mitocondriales al disminuir el potencial de membrana, y el intercambio iónico (Başer & Buchbauer, 2015).

1.3 Quimiotipos de aceites esenciales

Se utiliza el término de “quimiotipo” a los miembros de una especie que se diferencian por presentar una composición química diferente a la del resto (Muñoz, Vogel, & Razmili, 2004). Los aceites esenciales pueden variar en su composición, calidad, y cantidad según el clima, el suelo, el órgano de la planta del cual fue extraído. Por lo tanto para que un aceite esencial no tenga una composición diferente debe ser extraído de una planta donde se mantengan constantes estos factores. La mayoría de los aceites esenciales comercializados son quimiotipados por cromatografía de gases y análisis de espectrometría de masas (Bakkali et al., 2008).

1.4 Descripción botánica de aceites usados

1.5 Cúrcuma (*Curcuma longa*)

Curcuma longa es una especie vegetal perteneciente a la familia de las zingiberáceas, utilizada por varios años en la medicina tradicional y como condimento en las comidas de China y de otros países. El rizoma o el tallo subterráneo es el órgano más importante de la planta ya que en este se encuentran los componentes a los cuales se les atribuye la actividad biológica, como son los curcuminoides, los pigmentos polifenólicos y los aceites esenciales (Blumenthal et al., 2000).

Se han realizados varios estudios importantes con esta planta ya que se le atribuye efectos antiinflamatorios, antivirales, anticancerígenos y antibacteriales (Nidhi Rao, 2014).

Es una planta perenne que crece en ambiente cálido húmedo con una altura máxima esta entre 1 a 1.5 m. El rizoma es el órgano más importante el cual crece de manera horizontal al suelo donde nacen las raíces y los brotes y su mayor componente es el almidón; las hojas provistas de peciolo son largas y lanceoladas (Blumenthal et al., 2000).

1.5.1 Aceite esencial de cúrcuma (*Curcuma longa*)

El aceite de cúrcuma se lo obtiene por diferentes procesos uno de ellos es mediante la destilación por arrastre de vapor por método directo (Méndez, Angulo, & Contreras, 2016). La hidrodestilación es otro método que se utiliza para obtener aceite de esta planta ya que es muy efectivo y tiene como principal ventaja que no es necesario secar la materia vegetal (Torres, Moreno, & Hermosilla, 2014).

1.5.2 Principales componentes químicos del aceite esencial de cúrcuma

(*Curcuma longa*)

Los componentes químicos del aceite esencial según Coy & Eunice (2013) se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1.

Principales componentes del aceite esencial de *Curcuma longa*

Compuestos	Porcentaje de componentes (%)
Ar – Tumerona	36.90
β - Turmenona	18.90
α – Turmenona	13.90
Isómeros del ciclopentanilo	6.10
α- Curcumeno	1.80
Bornano	0.90
Citral	0.30
Zingibereno	0.50
Cis -farnesol	0.30
Zingiberol	0.02
Oxido de cariofileno	0.01
Cariofileno	0.08

Fuente:Coy & Eunice (2013)

1.6 Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus*)

Muchos países el mundo han cultivado la hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) para fines medicinales, ya que se dice que esta planta tiene potenciales terapéuticos en numerosas enfermedades. La principal característica de esta planta es su fuerte olor a

limón, se la cultiva en trópicos y subtropicos (Antolines, de Colmenares, Linares, & Darghan, 2008).

Es una hierba aromática perenne sin ramificación sus hojas, pueden alcanzar los 90 cm de largo y 1.25 cm de ancho y tanto penduladas. La parte subterránea de *C. citratus* consiste en un bulbo de rizoma. Aunque esta planta rara vez florece, tiene un tallo floral de hasta 60 cm de largo; se reproduce a través de rizomas (Soto, Vega, & Tamajón, 2002).

1.6.1 Aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*)

El aceite esencial de *Cymbopogon citratus* ha sido muy estudiado en los últimos años porque tiene una alta actividad antimicrobiana contra una amplia variedad de organismos Gram positivos, Gram negativos, levaduras y hongos. Srivastava (2015) observó que los organismos Gram positivos eran más sensibles al aceite que los organismos Gram negativos. En la Tabla 2 se muestra los principales componentes del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* según la investigación de Shah et al. (2011).

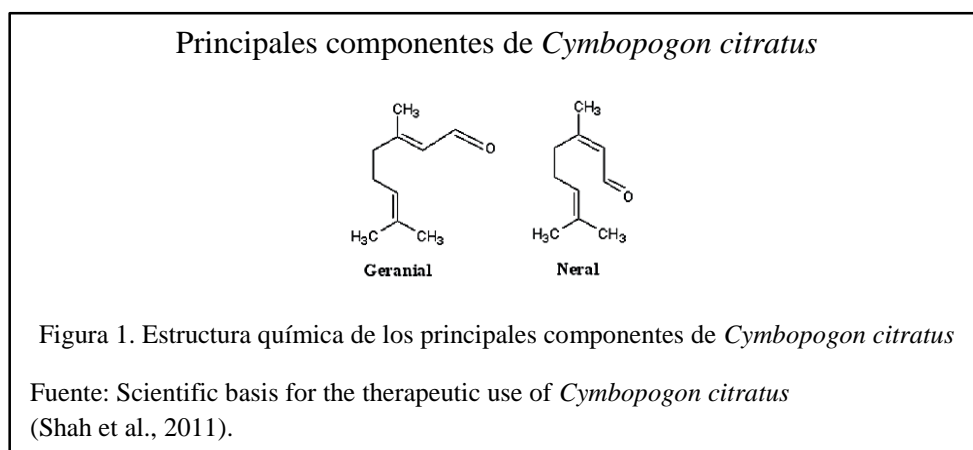
Tabla 2.

Componentes químicos de la Hierba luisa

Composición del aceite esencial	Porcentaje de componentes (%)
Geranial	40.80
Neral	32.00
Geraniol	3.04
Citronellal	2.10
Terpinolene	1.23
Geranyl acetate	0.83
Myrecene	0.72
Terpinol	0.45
Methylheptenone	0.20
Linalyl acetate	0.10
α-Pinene	0.07
β-Pinene	0.04

Fuente: Shah et al. (2011)

Las moléculas más importantes a las cuales son las responsables de la actividad biológica: β -mirceno, limoneno, taninos, linalol, acetato de geranilo, geraniol, neral saponinas, flavonoides, compuestos fenólicos (Kouame et al., 2016).



1.7 Jengibre (*Zingiber officinale*)

El jengibre tiene una gran importancia a nivel mundial por sus características medicinales, durante muchos años ha sido utilizada como condimento. Es originaria del Sudeste de Asia donde fue domesticado y desde aquí se ha dispersado a los trópicos de todo el mundo (Kizhakkayil & Sasikumar, 2011).

El jengibre pertenece a la familia zingiberaceae, es una planta perenne que puede llegar a medir de 1 a 2 m de altura provista de una raíz tuberosa con un aroma picante que le da la característica especial, los tallos con hojas son más grandes que los tallos florales, posee inflorescencias racimosas de color amarillo con una bráctea de color verde (Kizhakkayil & Sasikumar, 2011).

1.7.1 Aceite esencial de Jengibre (*Zingiber officinale*)

El aceite esencial se caracteriza por este compuesto por un alto porcentaje de sesquiterpenos, monoterpenos, y compuestos alifáticos (Sharma, Singh, & Ali, 2016).

Múltiples estudios demuestran que el aceite esencial tiene efectos antitumorales, insecticidas antifúngicas, Y un gran potencial antibacteriano a un amplio número de bacterias gram positivas y gram negativas. Moon (2018) determino que el zingibereno, citral, curcumeno tienen una fuerte actividad antifúngicas incluso en concentración muy bajas.

1.7.2 Componentes del aceite esencial de Jengibre (*Zingiber officinale*)

Tabla 3.

Principales componentes del aceite esencial de *Zingiber officinale* según Hamad et al. (2016)

Sustancia	Porcentaje (%)
a-zingibereno	22.22
Ar-curcumeno	13.11
b-sesquifelandreno	9.44
Teraniol	3.33
b-mirceno	1.47
Citral	1.25
Geranial	1.10
No Identificados	48.08

Fuente: Hamad, Alifah, Permadi, & Hartanti (2016)

La Figura 2. Se observa la estructura química de los principales componentes del aceite esencial de jengibre

Principales componentes *Zingiber officinale*

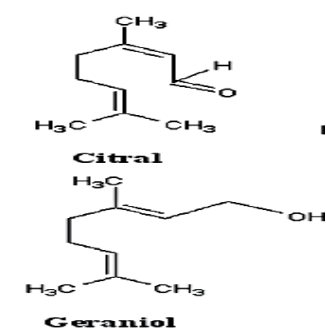


Figura 2. Estructura química de los principales componentes *Zingiber officinale*

Fuente: Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus* (Shah et al., 2011)

1.8 Ishpink (*Ocotea quixos*)

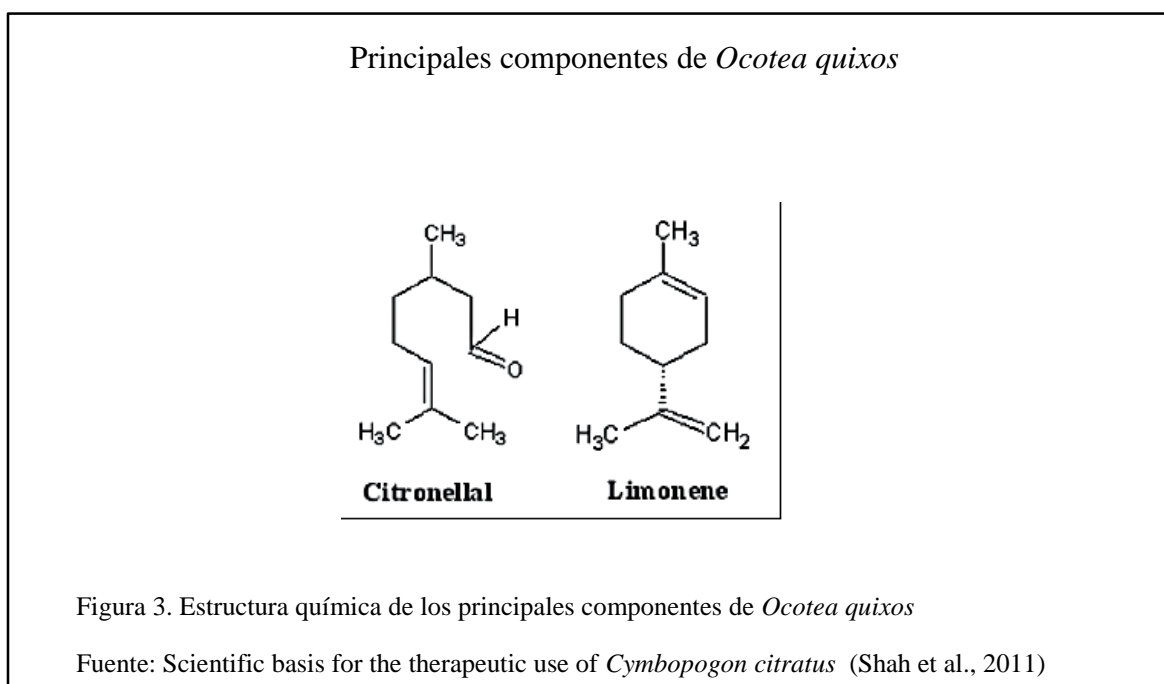
Ocotea quixos es endémico de la Amazonia del Ecuador donde es conocida como la canela de amazónica pertenece a la familia Lauracea, su habitat apropiado entre 310 y 1.250 msnm (Collahuazo, 2012).

Es un árbol pequeño (5-20 m) con capullos florales verdes, flores blancas, frutos dimórficos y hojas coriáceas, verde brillante en el has y amarillento en el envés con venas rojizas, se ha estudiado por sus propiedades aromáticas desinfectantes antibióticas y antibacteriales contra una gran variedad de organismos patógenos (Noriega & Dacarro, 2008).

1.8.1 Aceite esencial de Ishpink (*Ocotea quixos*)

Los estudios que se han realizado reportan que la mayor cantidad de aceite esencial se encuentra en las hojas y los cálices. Se ha logrado extraer aceite esencial de las hojas por arrastre de vapor obteniendo los principales componentes que fueron : β -cariofileno (15.1 %), acetato de cinnamilo (11.4 %), sabineno (7.6 %), geranial (5.6 %) y trans-cinamaldehído (5.1 %) (Sacchetti, Guerrini, Noriega, Bianchi, & Bruni, 2006).

Se ha demostrado que el aceite de las hojas es mejor frente al de los cálices ya que tiene una mejor actividad antibacteriana y antifúngica obteniendo valores similares a la actividad antibacteriana del tomillo que es aceite que se usa usualmente como estándar porque se sabe que es un antibacteriano muy efectivo (Sacchetti et al., 2006). En la Figura 3. Se observa la estructura química de los principales componentes del aceite esencial de Ishpink.



1.9 Melaleuca (*Melaleuca armillaris*)

Pertenece a la familia Myrtaceae, ocupa la mayor parte del bosque tropical, y son árboles aromáticos. Se ha encontrado que la mayoría de aceites esenciales encontrados en *Melaleuca* ssp tienen una importancia económica ya que tiene una actividad biológica alta al ser antidiarreico, antimicrobiano, antioxidante, antiinflamatorio, insecticida, nematocida, larvicida y pupicida (Bhagat et al., 2017).

Myrtaceae (121 géneros, 3.800 – 5.800 spp.) es una de las familias más grandes de las plantas del bosque tropical, se compone de árboles aromáticos o arbustos. Se han informado aceites esenciales de importancia económica de varias especies de

Melaleuca spp y se sabe que poseen potente actividad biológica con una valiosa fuente de metabolitos secundarios biológicamente activos para el tratamiento de infecciones bacterianas y fúngicas (Bhagat et al., 2017).

Ha sido utilizada desde la antigüedad en medicinas tradicionales como agentes antisépticos, las propiedades antimicrobianas de *Melaleuca* spp fueron descubiertas por los aborígenes australianos. Ellos utilizaban hojas trituradas de plantas de *Melaleuca* spp en el tratamiento de resfriado, dolor de garganta, picaduras de insectos, heridas u hongos infecciones de la piel (Barbosa, Silva, & Teixeira, 2013).

1.9.1 Aceite esencial de *Melaleuca armillaris*

Uno de los procesos más efectivos para obtener aceite esencial de *Melaleuca armillaris* es la hidrodestilación en el cual se observa la presencia de monoterpenoides (44.6 %), la fracción sesquiterpénica (51,6 %) (Amri et al., 2012). Los principales componentes se presentan en la Tabla 4 según la investigación de Farag et al. (2004).

Tabla 4.

Compuestos químicos de *Melaleuca armillaris*.

Componente	Abundancia (%)
α-Pinene	0.23
α-Thujene	2.52
β-Pinene	2.35
Sabinene	6.59
β-Myrcene	2.28
α-Terpinene	5.80
Limonene	3.23
1,8-Cineole	35.89
γ-Terpinene	10.37
ρ-Cymene	0.59
Terpinolene	3.02
Linalool	0.67
trans-pinene	0.16
Terpinen-4-ol	19.79
β-germacrene	0.29
α-Terpineol	4.49
D-Germacrene	0.24
D-Elemene	0.42
cis-Piperitol	0.14
α-Cadinene	0.5
Geraniol	0.06
Eugenol	0.37

Fuente. Farag et al. (2004)

Principales componentes de *Melaleuca armillaris*.

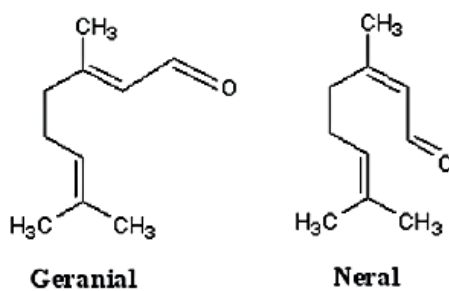


Figura 4. Estructura química de los principales componentes de *Melaleuca armillaris*.

Fuente: Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus* (Shah et al., 2011)

1.10 Acuicultura

Según de Bruijn, Liu, Wiegertjes, & Raaijmakers (2018) la acuicultura es el sector de alimentos de mayor incremento a nivel mundial y con el aumento de la población humana, se espera que siga en crecimiento. La alimentación mediante especies acuáticas a lo largo de los años ha formado parte de las tradiciones culturales de los seres humanos a nivel mundial dado que son una fuente muy importante de ácidos grasos, proteínas, minerales y vitaminas (ESPAE -ESPOL, 2018).

El Ecuador posee importantes recursos hídricos ideales para la producción acuícola y para mejorar volúmenes de producción junto con la diversificación de especies (Ortiz, 2015). Teniendo en cuenta la riqueza natural del país, la región amazónica tiene una gran diversidad de especies nativas para cultivo entre las cuales se puede mencionar al paiche (*A. gigas*), cachama (*C. macropomum*), bocachico (*P. brachypomum* y *P. nigricans*), sábalo (*B. erythropterum*) (Ortiz, 2015). Además de otras especies introducidas de gran importancia productiva en el Litoral, como tilapia (*O. niloticus*) y la trucha (*O. mykiss*) en la región Andina.

Según ESPAE -ESPOL (2018) las cifras proporcionadas por el Banco Central del Ecuador (BCE), indica que ha existido una gran variabilidad en cuanto a producción y actividades relacionadas con la industria acuícola en el Ecuador, aumentando sus niveles de producción, lo que ha llevado al país a ubicarse en el puesto quince a nivel mundial en lo referente a productores acuícolas.

Países con mayor producción acuícola en el Mundo

#	País	TM	Variación Anual	Participación
1	China	47,611,840	4.7%	62.1%
2	India	5,235,017	7.3%	6.8%
3	Indonesia	4,379,970	1.9%	5.7%
4	Viet Nam	3,438,378	2.9%	4.5%
5	Bangladesh	2,060,408	5.3%	2.7%
6	Noruega	1,380,839	3.6%	1.8%
7	Egipto	1,174,831	3.3%	1.5%
8	Chile	1,045,790	-13.9%	1.4%
9	Myanmar	998,906	3.8%	1.3%
10	Tailandia	897,096	-0.1%	1.2%
11	Filipinas	781,798	-0.8%	1.0%
12	Japón	703,935	8.6%	0.9%
13	Brasil	574,530	2.0%	0.7%
14	Corea del Sur	479,360	-0.2%	0.6%
15	Ecuador	426,410	15.8%	0.6%
16	EE.UU.	425,973	1.1%	0.6%
17	Irán	346,118	8.1%	0.5%
18	Nigeria	316,727	1.1%	0.4%
19	Taiwán	313,372	-7.9%	0.4%
20	España	289,820	2.7%	0.4%
	Top 20	72,881,118	4.1%	95.1%

Figura 5. Principales productores acuícolas en el Mundo, 2015

Fuente: *Estudios Industriales: Orientación estratégica para la toma de decisiones – Industria de Acuicultura* (ESPAE -ESPOL, 2018)

1.11 Enfermedades infecciosas en los peces de acuicultura

La acuicultura es una actividad sensible a diferentes factores ambientales y a enfermedades infecciosas producidas por la masificación de peces las cuales son transmitidas a través del agua o por rozamiento entre los mismos (Márquez, 2018). Las enfermedades infecciosas causadas por diferentes microorganismos son causa de pérdidas económicas en la acuicultura dado a los costos de los tratamientos, a la mortalidad y bajo nivel de producción de los peces (FAO, 2016).

Entre los microorganismos que causan enfermedades a los peces se puede mencionar a bacterias, hongos, virus, protozoos.

1.11.1 Causadas por virus

Estas enfermedades se presentan generalmente con la importación de huevos o de reproductores de lugares en donde la enfermedad está latente. Algunas de las enfermedades que son producidas por virus son: Septicemia Vírica Hemorrágica la cual es producida por *Rhabdovirus*, Necrosis Hematopoyética Epizoótica causada por *Iridovirus*, entre otras (Márquez, 2018).

1.11.2 Causadas por bacterias

Las enfermedades de mayor significancia para la acuicultura están dadas por etiología bacteriana, dado que se puede alterar fácilmente el balance natural de la flora bacteriana presente por un deficiente manejo del agua o por altas densidades de cultivo (Alvarez, Alvarez, Austin, & Agurto, 2000).

Existe una gran variedad de bacterias que pueden causar enfermedades en los peces entre las cuales destacan: *Aeromonas*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Flavobacterium columnare* y *Flexibacter columnaris*, *Vibriosis* entre otras.

1.12 *Aeromonas*

Janda & Abbott (2010) refiere que el género *Aeromonas* hasta mediados de 1970 se dividían en dos grupos establecidos por las características de crecimiento y características bioquímicas. El grupo mesófilo, representado por *A. hydrophila*, consistía en bacterias móviles que crecían bien a 35-37 °C y se relacionaron con enfermedades humanas, el segundo grupo, conocido como cepas psicrófilas, causaba enfermedades en los peces, no eran móviles, tenía un óptimo crecimiento a temperaturas de 22-25 °C a este grupo lo representaba *A. salmonicida*. Sin embargo en los últimos años se han clasificado por sus características de ADN dado que se han encontrado más especies.

El género *Aeromonas* está conformado por bacilos Gram negativos, con características oxidasa-positivos y anaerobios facultativos y está formado por 30 especies y 12 subespecies (Suárez & Herrera, 2012). Generalmente *Aeromonas* son patógenos oportunistas dado que consiguen propagarse en huéspedes heridos e inmunocomprometidos (Figueras, 2005).

1.12.1 *Aeromona salmonicida*

Aeromona salmonicida es uno de los patógenos más importantes por su grave impacto económico en la acuicultura, este agente usa el intestino anterior como ruta de infección más probable, esta bacteria puede afectar a salmónidos y no salmónidos según estudios que se han realizado (Li et al., 2016). *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida* fue aislado por Emmerich y Weibel en 1894 de una trucha Arcoíris, esta bacteria es la causante de una grave infección en peces produciendo la Furunculosis (Bartkova, Pimlampas, Aarestrup, & Dalsgaard, 2017). Esta enfermedad deriva su nombre de los forúnculos que se forman en la musculatura y en la piel de los peces afectados ya sea un contagio subagudo o crónico (Dallaire-Dufresne, Tanaka, Trudel, Lafaille, & Charette, 2014).

Los síntomas de la enfermedad aguda se caracterizan por ser fatales en dos o tres días, por una rápida septicemia como resultado de hemorragia en órganos internos y necrosis en la piel (Fig.3), además de letargo y falta de apetito. También existe una forma latente en la cual los peces son asintomáticos (Dallaire-Dufresne et al., 2014).

Salmón con Furunculosis



Figura 6. Salmón con Furunculosis-Úlceras cutáneas típicas

Fuente: Tomado de *Fish Disease: Diagnosis and Treatment, Second Edition*.(Noga, 2010)

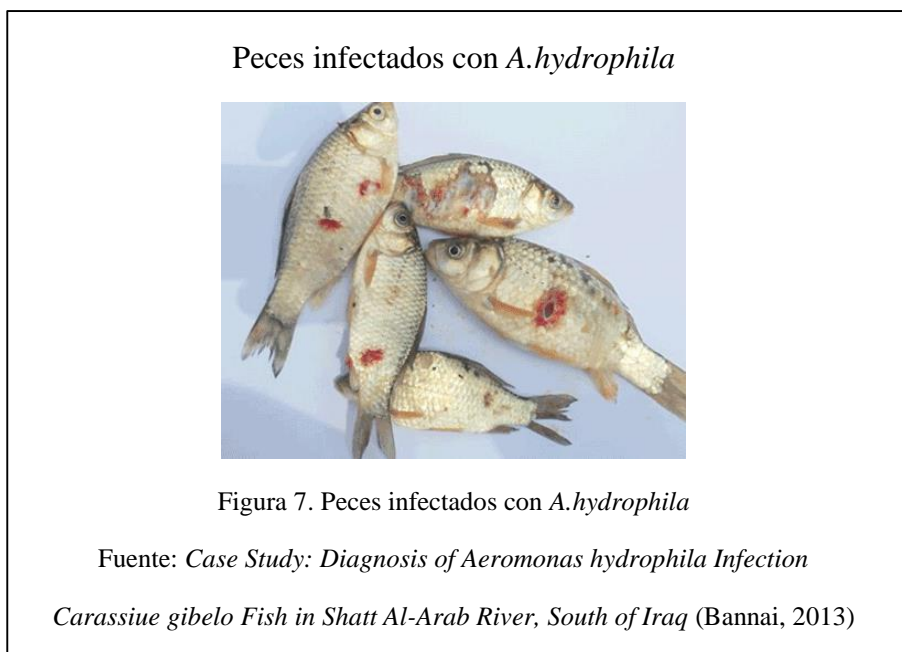
1.12.2 *Aeromona hydrophila*

Aeromona hydrophila es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa, móvil con flagelado polar, sin embargo no todas las cepas son móviles (Viswanatan, Manikandan, Haniffa, & Chairman, 2015). Afecta a una gran diversidad de peces de agua dulce y peces marinos (Abd-El-Rhman, 2009). Según Peatman et al.(2018) la incidencia de *Aeromonas hydrophila* en peces y los impactos en la salud de los mismos son habitualmente secundarios a la infección de un patógeno primario (*Flavobacterium columnareo*) o podría estar provocado por estrés ambiental.

Estas bacterias pueden aislarse de varias fuentes, como alimentos, agua potable, aguas residuales, entre otras (Viswanatan et al., 2015). Pueden crecer a temperaturas de refrigeración y se consideran importantes causantes de enfermedades transmitidas por los alimentos y el agua (Viswanatan et al., 2015).

Según Baumgartner, Ford, & Hanson (2017) la septicemia por aeromotora móvil (SAM) es producida por *A.hydrophila* generando un diverso patrón de síntomas entre los cuales se puede mencionar ulceraciones, hiperemia, pudrición de la cola o la aleta (necrosis dérmica), hemorragia y necrosis en el intestino, entre otras (Figura 4). La

presencia de dichos síntomas puede ser variable dependiendo de la especie afectada, la tensión de las bacterias y el método de infección. La septicemia tiene características usuales que perduran durante varias semanas, en este tiempo la tasa de mortalidad aumenta paulatinamente y la mortalidad acumulada puede llegar a ser alta (AlYahya et al., 2018).



1.12.3 *Pseudomonas fluorescens*

Los integrantes del género *Pseudomonas* son muy versátiles metabólicamente y fisiológica notable, características que le permiten la colonización de numerosos hábitats terrestres y acuáticos (Silby, Winstanley, Godfrey, Levy, & Jackson, 2011). Entre las *Pseudomonas* patógenas de peces se puede encontrar sea *Pseudomonas anguilliseptica*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas putida*, entre otras, estas bacterias son las causantes de la enfermedad conocida como mancha roja (Sekiten byo)(Austin & Austin, 2016).

Pseudomonas fluorescens es un bacilo Gram-negativo, crece aeróbicamente a temperatura óptima para su funcionamiento de 25 a 30 °C aproximadamente, no crece

a condiciones acidas, por lo que necesita un pH neutro para su proliferación (Portillo, 2015).

Según (Austin & Austin, 2016) la septicemia provocada por *Pseudomonas* presenta síntomas como abdomen distendido y hemorragias en la superficie del cuerpo, lesiones cutáneas y pudrición de la aletas o cola. La infección en los peces ocurre cuando sus defensas de encuentran disminuidas, la bacteria puede entrar sea por la boca o por las branquias.

P. fluorescens es parte de la flora normal de agua dulce y de los intestinos de los peces, se ha calificado invasor secundario ya que se ha encontrado en asociación con mixobacterias.



1.13 Resistencia a los antimicrobianos

(Souza et al., 2016) afirma que los tratamientos para enfermedades producidas por bacterias en peces implican una gran diversidad de productos químicos los cuales deben aplicarse continuamente, esto genera resistencia bacteriana a los antibióticos,

además de afectar el medio ambiente y dejar residuos en la carne que se va a comercializar.

En el caso de *Aeromonas* spp. estas son sensibles a varias familias de antibióticos entre los cuales se puede mencionar a las cefalosporinas, cloranfenicol, aminoglucósidos, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol, y son resistentes a las penicilinas (Stratev, Vashin, & Daskalov, 2015).

1.14 Concentración Mínima Inhibitoria

1.14.1 Microdilución

La técnica de microdilución está basada en la actividad inhibitoria, se realiza en una placa de poliestireno que contiene 96 pocillos con una capacidad de volumen hasta 300 μ L, la misma que puede contener hasta 8 diluciones de 12 diferentes agentes. La concentración mínima de la sustancia estudiada se determina por los cambios de turbidez y/o absorbancia. En la figura 5 se muestran el proceso de microdilución (Balouiri, Sadiki, & Ibsouda, 2016).

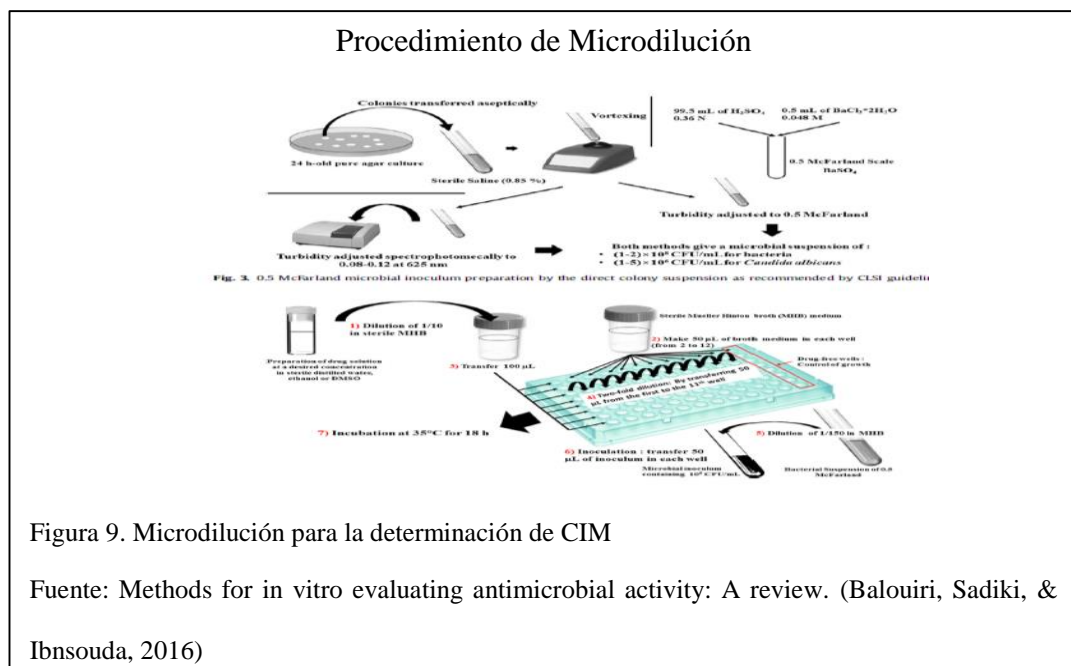


Figura 9. Microdilución para la determinación de CIM

Fuente: Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. (Balouiri, Sadiki, & Ibsouda, 2016)

1.14.2 Sales de Tetrazolio

Las sales de tetrazolio son de color amarillo pálido que en el agua no presenta color se utilizan en ensayos de actividad antimicrobiana ya que mide la actividad respiratoria de los microorganismos, este compuesto es degradado por las enzimas deshidrogenasas en muy poco tiempo ocasionando así un cambio de color, para diferenciar donde creció la bacteria y donde se inhibió (Vallejo, Habib, & Roldan, 2010).

1.15 Cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS)

Son dos técnicas instrumentales acopladas que permiten la separación e identificación de las moléculas de mezclas complejas, esta técnica es muy utilizada para el análisis de compuestos de los aceites esenciales ya que maneja un sistema muy sensible, el proceso es confiable y de relativo bajo costo (Casas, Garcia, Guayadol, & Olive, 1994). Los componentes de los aceites esenciales son comparados con bibliotecas de masas espectrales, la GC/MS un análisis cuantitativo y los resultados de los componentes están dados por los porcentajes de abundancia que se encontraron en la muestra (López & Gutiérrez, 2005).

1.16 Sinergismo de aceites esenciales

El efecto sinérgico producido por la combinación de aceites esenciales de plantas ha sido muy estudiado como una estrategia eficiente para combatir el desarrollo microbiano (de Mendonça et al., 2012)

Se debe determinar si la mezcla tiene sinergismo (el efecto de las sustancias combinadas es mayor a la suma de mezcla), antagonismo (las sustancias presentan una menor actividad antimicrobiana cuando están mezcladas), sinergismo parcial (el efecto combinado es igual a la suma de los efectos individuales), adición o indiferencia

(cuando no hay interacción entre ellos) (Nikkhah, Hashemi, Habibi, & Farhoosh, 2017).

1.17 Controles positivos

1.17.1 Tomillo (*Thymus vulgaris*)

El aceite esencial es utilizado como control positivo en varios estudios ya que su actividad antimicrobiana ya ha sido comprobada, su mayor componente es el timol que se le conoce que es un potente antibacteriano que incluso ha llegado a tener actividad en microorganismos que han logrado adquirir resistencia a la medicina tradicional, y tiene un potencial antioxidante muy fuerte (Borboa et al., 2010).

Se ha demostrado que el aceite esencial de tomillo tiene una fuerte actividad antiviral contra varios tipos de herpes (Nolkemper, Reichling, Stintzing, Carle, & Schnitzler, 2006). Un estudio de Zu (2010) revelo que el tomillo tiene una actividad citotóxica contra tres líneas celulares de cáncer humano, carcinoma de próstata, carcinoma pulmonar, carcinoma de mama.

1.17.2 Cloranfenicol

Es un antibiótico de amplio espectro contra bacterias Gram negativas y Gram positivas que es producido por el género *Streptomyces*, este antibiótico se utiliza contra infecciones que se encuentran en un sitio de difícil acceso ya que la molécula es muy pequeña (Morales, Herrera, & Muñoz, 2007)

1.17.3 Enrofloxacin

Es un antibiótico que pertenece a la clase de las fluoroquinolonas, provoca la muerte de las bacterias ya que inhibe la síntesis del ADN, sin embargo no es tan eficaz contra parásitos, hongos y virus que fue producida exclusivamente para uso veterinario para

microorganismos que han presentado resistencia a otros antibióticos (Otero, Mestorino, & Errecalde, 2001).

Capítulo 2

2. Metodología

2.1 Aceites esenciales

Para la evaluación de la actividad inhibitoria de los aceites esenciales se utilizó aceites esenciales de *Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Ocotea quixos*, *Zingiber officinale* obtenidos en la fundación CHANKUAP, y *Melaleuca armillaris* obtenido en la casa comercial AROMAVIDA, estos aceites se codificaron como: *Curcuma longa* (A), *Cymbopogon citratus* (B), *Zingiber officinale* (C), *Ocotea quixos* (D) y *Melaleuca armillaris* (E) (ver anexo 6).

Las mezclas de los aceites esenciales antes mencionados se realizaron de forma en que sean mezclas binarias y ternarias siguiendo las siguientes especificaciones dadas por el tutor de la investigación.

Tabla 5.

Combinaciones planteadas para los aceites esenciales binarios.

MEZCLAS BINARIAS					
Aceite esencial	A	B	C	D	E
A		50/50	50/50	50/50	50/50
B			50/50	50/50	50/50
C				50/50	50/50
D					50/50

Elaborado por: Los Autores, 2018

Tabla 6.

Combinaciones planteadas para los aceites esenciales ternarios

MEZCLAS TERNARIAS					
Mezcla/Aceite esencial	A	B	C	D	E
AB			50/50	50/50	50/50
AC		50/50		50/50	50/50
AD		50/50	50/50		50/50
AE		50/50	50/50	50/50	
BC	50/50			50/50	50/50
BD	50/50		50/50		50/50
BE	50/50		50/50	50/50	
CD	50/50	50/50			50/50
CE	50/50	50/50		50/50	
DE	50/50	50/50	50/50		

Elaborado por: Los Autores, 2018

Los aceites esenciales y mezclas se mantuvieron en refrigeración a $10 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta su posterior uso en envases ámbar estériles de 1.5 mL para cada aceite, las mezclas binarias y ternarias se realizaron por duplicado.

2.2 Control de calidad

2.2.1 Densidad

Este control se realizó utilizando el método del picnómetro para lo cual se utilizó picnómetros de cristal de 1 mL cada uno, en este método se utilizó una balanza analítica ML204 METTLER TOLEDO previamente calibrada. Se procedió a pesar el picnómetro vacío, seguido del picnómetro con agua destilada y finalmente el picnómetro con la muestra de los aceites esenciales. Este proceso se realizó por cuadruplicado, los datos obtenidos fueron registrados y calculados mediante la fórmula planteada por Paucar, Salvador, Guillén, Capa, & Moreno (2015) en la cual se utiliza los siguientes datos:

$$Densidad = \frac{P_{PAC} - P_p}{P_{PAG} - P_p}$$

Dónde:

P_{PAC} = Peso del picnómetro con el aceite esencial

P_{PAG} = Peso del picnómetro con agua destilada

P_p = Peso del picnómetro vacío

2.2.2 Índice de Refracción

Para determinar el índice de refracción se utilizó el refractómetro ATAGO NAR IT LIQUID siguiendo la metodología planteada por Paucar et al. (2015) para lo cual colocó 0.5 mL de los aceites esenciales en el prisma, posteriormente se observó por el ocular el campo de visión. En dicho campo se encuentra una X, girando la perilla de equilibrio de color se ajustó hasta que se identifique una línea clara que debe pasar por el centro de la misma. El índice de refracción se determina en la escala inferior. Las mediciones se realizaron por triplicado, los datos obtenidos fueron registrados para luego ser calculados por la siguiente fórmula

$$IR = (IR_{obs} + fact. correc) \times (T_{obs} - 20^{\circ}C)$$

Siendo:

IR_{obs} = Índice de refracción observado en el refractómetro

fact. correc = factor de corrección

T_{obs} = Temperatura a la cual se observó

2.3 Cromatografía GC-MS

Para la Cromatografía GC-MS se utilizó el equipo EVOQ SCION 436-GC para lo cual se necesitó diluir los aceites puros (A, B, C, D, E, F) con diclorometano en una

proporción 1:10, por lo que se tomó 100 µL del aceite y 1000 µL de diclorometano en un envase ámbar estéril de 1.5 mL para cada aceite. Una vez preparadas las diluciones se colocó los envases en el equipo para su análisis.

2.4 Activación de cepas ATCC *American Type Culture Collection*

En el presente trabajo se emplearon cepas ATCC las cuales fueron: *Aeromona hydrophila* ATCC 35654, *Aeromona salmonicida* ATCC 33658 y *Pseudomona fluorescens* ATCC 13525, dichas cepas fueron activadas en los medios requeridos por cada bacteria usando la técnica de estriado simple, siendo para *Pseudomona fluorescens* en TSA *Tryptic Soy Agar* y TSB *Tryptic Soy Broth*, se incubó a 27 ± 2 °C durante 48 horas.

Para *Aeromona hydrophila* y *Aeromona salmonicida* se utilizó medio Agar sangre de Cordero y TSB *Tryptic Soy Broth*, se incubó a 30 ± 2 °C durante 48 horas.

2.5 Controles para las pruebas

Para la siguiente investigación se realizaron controles positivos y negativos para efectuar comparaciones. Como controles positivos se tomó a dos antibióticos y un aceite esencial, siendo: Enrofloxacina, Cloranfenicol y *Thymus vulgaris* respectivamente a este último se le codificó como F. Para los controles negativos se sembró a las bacterias *Aeromona hydrophila* ATCC 35654, *Aeromona salmonicida* ATCC 33658 y *Pseudomona fluorescens* ATCC 13525 en medio TSB.

2.6 Microdilución

2.6.1 Preparación del inóculo

Se inoculó 1 unidad formadora de colonia (UFC) de *Aeromona hydrophila* ATCC 35654, y *Pseudomona fluorescens* ATCC 13525 en 35 mL de TSB a las condiciones

adecuadas para su crecimiento, es decir, 30 ± 2 °C y 27 ± 2 °C respectivamente por un tiempo de 24 horas.

En el caso de *Aeromona salmonicida* ATCC 33658 se siguió la metodología planteada por (Starliper et al., 2015), el inóculo se realizó colocando 1 UFC en 30 mL de TSB e incubó a 26 ± 2 °C por un tiempo de 48 horas a 70 rpm, después de transcurrido este tiempo se colocó 3 mL del cultivo en 30 mL de TSB, este se dejó incubando a 26 ± 2 °C por un tiempo de 24 horas.

Con los cultivos de 24 horas se procedió a realizar el inóculo, para lo cual se colocaron los tubos en la centrifuga HERMLE Z400 por un tiempo de 15 minutos a 3000 rpm para que la bacteria quede suspendida, se desechó el medio de cultivo y se procedió a resuspender la bacteria utilizando agua salina estéril al 0.9 %. Para determinar el rango de concentración se utilizó la escala de McFarland para *Aeromona hydrophila* ATCC 35654, y *Pseudomona fluorescens* ATCC 13525 a la escala de 0.5 y para de *Aeromona salmonicida* ATCC 33658 a una escala de 5.

Para tener una mayor constancia del inóculo se realizó espectrofotometría con lo que se utilizó el espectrofotómetro SHIMADZU UV mini-1240 a una longitud de onda de 625 nm, los valores de absorbancia para las escalas de 0.5 y 5, fueron 0.010 y 1.44 respectivamente como lo menciona (EUCAST, 2003)

2.6.2 Preparación del medio de cultivo

Para la prueba de microdilución se utilizó TSB, para *Aeromona hydrophila* ATCC 35654, y *Pseudomona fluorescens* ATCC 13525 se preparó 2000 mL con agua destilada, dicho medio debe ser estéril para lo cual se llevó al autoclave TUTTNAUER AUTOCLAVE-ATEAM STERILIZER 3870M a 121 °C por 45 minutos.

Para *Aeromona salmonicida* ATCC 33658 se preparó TSB y se adicionó 5 % de cloruro de sodio, de igual manera se llevó al mismo autoclave a 121 °C por 45 minutos.

2.6.3 Aceites esenciales

Los aceites esenciales en mezclas binarias, ternarias y puros se diluyeron con Dimetil Sulfóxido (DMSO) a una concentración 1:2 para *Aeromona hydrophila* ATCC 35654, y *Pseudomona fluorescens* ATCC 13525, para lo cual se pesó 40 mg de aceite esencial y se colocó 80 µL de DMSO. Para *Aeromona salmonicida* ATCC 33658 se realizó una dilución 1:25, se pesó 20 mg de aceite esencial y se adicionó 500 µL de DMSO

2.6.4 Preparación de incubación de placas

Para la preparación de las placas de microdilución se utilizó una micropipeta multicanal siguiendo la metodología planteada por (Balouiri, Sadiki, & Ibsouda, 2016).

Esta metodología se realiza con placas de 96 pocillos en las cuales se llevó a cabo los siguientes pasos en el caso de *Aeromona hydrophila* ATCC 35654, y *Pseudomona fluorescens* ATCC 13525: en la primera fila A se colocó 184 µL de medio TSB previamente esterilizado, en las siguientes filas de la B hasta la H se colocó 100 µL del mismo medio. Para *Aeromona salmonicida* ATCC 33658 se colocó 188 µL en la fila A de TSB estéril y 100 µL en las demás filas.

Los aceites esenciales puros, mezclas y controles positivos se colocaron en la fila A con un volumen de 16 µL para *Aeromona hydrophila* ATCC 35654, y *Pseudomona fluorescens* ATCC 13525 y 12 µL para *Aeromona salmonicida* ATCC 33658, después de esto se procede a realizar la microdilución con la micropipeta multicanal tomando 100 µL de la fila A y llevándole a la fila B, en donde se procedió a mezclar, después

se toma 100 μL de la fila B y se la llevo a la fila C, de igual manera se procedió a mezclar correctamente, este proceso se repite hasta llegara la fila H, de la cual se tomó 100 μL y esto se desechó, posteriormente se colocó las bacterias a las concentraciones establecidas con un volumen de 100 μL . Con el proceso realizado se obtuvo en cada pocillo un volumen final de 200 μL .

Las placas listas fueron llevadas a una incubadora a las condiciones óptimas para su crecimiento, *Aeromona hydrophila* a 30 ± 2 °C, *Pseudomona fluorescens* 27 ± 2 °C y *Aeromona salmonicida* 26 ± 2 °C por 22 horas.

2.6.5 Preparación del colorante de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC)

Se preparó una solución de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) al 1 %, para lo cual se esterilizó 100 mL de agua destilada. Una vez estéril se agregó 10 mg de TTC, se agitó constantemente por un tiempo de 2 minutos, para su posterior distribución en las placas de microdilución.

2.6.6 Adición del colorante de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC)

Después de 22 horas de incubación de las placas de microdilución se procedió a colocar 40 μL de TTC en cada uno de los pocillos.

2.6.7 Lectura de placas

Las placas se leyeron en el equipo MICROPLATE READER a una longitud de onda de 450 nm en 3 tiempos T0, T22, TC; siendo: tiempo cero considerado antes de someter a incubación, tiempo 22 después de 22 horas de incubación y tiempo con colorante, después de 45 minutos de colocado el colorante cloruro de trifeniltetrazolio (TTC), respectivamente.

2.7 Interpretación de resultados

Para determinar el MIC se observó las placas en cuanto a su coloración, el MIC estaba dado por el último pocillo que no pintó el TTC. Para su categorización se manejó la metodología planteada por Başer & Buchbauer (2015) en la cual presenta 4 clasificaciones según la concentración del aceite o mezcla siendo: Fuerte ($>500 \mu\text{g/mL}$), Moderada ($500 \mu\text{g/mL} < \text{MIC} < 5000 \mu\text{g/mL}$), Débil ($5000 \mu\text{g/mL} < \text{MIC} < 20000 \mu\text{g/mL}$) y Ausente ($< 20000 \mu\text{g/mL}$).

Para determinar el sinergismo y antagonismo de los aceites esenciales se utilizó la técnica planteada por Buldain et al. (2017) llamada tablero de damas o *checkerboard* para lo cual se determinó el FIC de cada aceite esencial, y se clasificó por la metodología planteada por Méndez et al. (2012) que presenta cuatro formas de categorización, Sinergismo ($\text{FIC} \leq 0.5$), Sinergismo Parcial ($0.5 < \text{FIC} < 1$), Adición o Indiferencia ($1 \leq \text{FIC} < 2$) y Antagonismo ($\text{FIC} \geq 2$), para lo cual se utilizó la fórmula siguiente para cada una de las mezclas binarias y ternarias.

$$\text{FIC} = \frac{A}{\text{CIM}_A} + \frac{B}{\text{CIM}_B}$$

Dónde:

A= es la CIM de la combinación

CIM_A = es la CIM del aceite 1 puro

B= CIM de la combinación

CIM_B = es la CIM del aceite 2 puro

Para el análisis estadístico se utilizó la fórmula planteada por Rubegeta et al. (2018) con la cual es posible determinar el porcentaje de inhibición de los aceites naturales y sus mezclas binarias y ternarias.

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{OD_{\text{Control Negativo}} - OD_{\text{Experimental}}}{OD_{\text{Control Negativo}}} * 100$$

Dónde:

$OD_{\text{Control Negativo}}$ = Absorbancia del control negativo

$OD_{\text{Experimental}}$ = Absorbancia del aceite/mezcla en tiempo 22

Dado que se realizaron cuatro repeticiones de cada tratamiento los resultados obtenidos del porcentaje de inhibición de los aceites esenciales se normalizaron tomando en cuenta el MIC de cada uno para lo cual se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Dato normalizado} = \frac{MIC_A * OD_A}{OD_{A \text{ mayor}}}$$

Dónde:

MIC_A = MIC del aceite A

OD_A = Absorbancia del aceite A que se requiere normalizar

$OD_{A \text{ mayor}}$ = Mayor absorbancia del aceite A

Estos datos normalizados fueron analizados estadísticamente mediante un método no paramétrico, el cual fue Kruskal-Wallis en los programas estadísticos R studio 32 bits e Infostat.

Capítulo 3

3. Resultados y Discusión

3.1 Composición química y calidad de los aceites esenciales

Los resultados del control de calidad de los aceites esenciales generaron los siguientes datos.

- Densidad

Tabla 7.

Densidades obtenidas de los aceites esenciales puros y mezclas

Aceite/Mezcla	Densidad promedio (g/mL)	Aceite/Mezcla	Densidad promedio (g/mL)
A	0.919	ADC	0.937
B	0.984	ADE	0.971
C	0.890	AEB	0.942
D	0.870	AEC	0.92
E	0.921	AED	0.889
F	0.905	BCA	0.917
AB	0.911	BCD	0.91
AC	0.906	BCE	0.913
AD	0.916	BDA	0.934
AE	0.959	BDC	0.893
BC	0.887	BDE	0.898
BD	0.895	BEA	0.925
BE	0.905	BEC	0.935
CD	0.916	BED	0.910
CE	0.891	CDA	0.929
DE	0.912	CDB	0.964
ABC	0.897	CDE	0.939
ABD	0.891	CEA	0.928
ABE	0.931	CEB	0.903
ACB	0.951	CED	0.901
ACD	0.952	DEA	0.981
ACE	0.917	DEB	0.894
ADB	0.929	DEC	0.904

Nota: Elaborado por: Los Autores, 2018

La densidad promedio en g/mL obtenida de *Curcuma longa* (A), *Cymbopogon citratus* (B), *Zingiber officinale* (C) y *Ocotea quixos* (D) está dentro de los rangos establecidos

en la ficha técnica de cada producto siendo 0.9100 - 0.9200 (ver anexo 1), 0.9750 – 0.9850 (ver anexo 2), 0.890 – 0.900 (ver anexo 3) y 0.82 – 0.92 (ver anexo 4), respectivamente (Fundación Chankuap, 2009).

Según Feriotto et al. (2018) la densidad de *Thymus vulgaris* (F) es de 0.895 g/mL la cual se encuentra aproximada a la densidad promedio obtenida en el presente estudio. En el caso de *Melaleuca armillaris* (E) el valor obtenido como densidad promedio está dentro del rango mencionado por Morales et al.(2012) el cual es 0.9205 – 0.9210 g/mL.

Como menciona Ortuño (2006) los aceites esenciales tienen una densidad menor a la del agua (1mg/mL) dado que están formados por cadenas y anillos, las densidades de las mezclas binarias y ternarias se ajustan al parámetro antes mencionado.

- Índice de refracción

Tabla 8.

Índices de refracción obtenidos de los aceites esenciales puros y mezclas

Aceite/Mezcla	Índice de refracción promedio	Aceite/Mezcla	Índice de refracción promedio
A	1.490	ADC	1.479
B	1.491	ADE	1.476
C	1.483	AEB	1.487
D	1.530	AEC	1.489
E	1.477	AED	1.479
F	1.497	BCA	1.498
AB	0.996	BCD	1.480
AC	0.997	BCE	1.475
AD	0.992	BDA	1.494
AE	0.986	BDC	1.485
BC	1.486	BDE	1.470
BD	1.480	BEA	1.486
BE	1.472	BEC	1.483
CD	1.481	BED	1.474
CE	1.477	CDA	1.496
DE	1.466	CDB	1.484
ABC	1.495	CDE	1.470
ABD	1.484	CEA	1.493
ABE	1.477	CEB	1.479
ACB	1.493	CED	1.474
ACD	1.486	DEA	1.488
ACE	1.481	DEB	1.475
ADB	1.487	DEC	1.475

Nota: Elaborado por: los Autores, 2018

El índice de refracción obtenido para *Curcuma longa* (A), *Cymbopogon citratus* (B), *Zingiber officinale* (C), *Ocotea quixos* (D), está dentro de los rangos establecidos en la ficha técnica de cada producto siendo de 1.4800 – 1.500 (ver anexo 1), 1.4800 – 1.5000 (ver anexo 2), 1.4700 – 1.490 (ver anexo 3), 1.520 – 1.530 (ver anexo 4), respectivamente (Fundación Chankuap, 2009).

En el caso de *Melaleuca armillaris* (E) el valor obtenido como índice de refracción está dentro del rango mencionado por Morales et al. (2012) el cual es 1.4773 – 1.775.

Thymus vulgaris (F) tiene un valor que se encuentra dentro de los rangos propuestos por Chambi & Quiroz (2017) 1.4950 – 1.505 en sus estudios.

Con los análisis antes mencionados se puede determinar que los aceites esenciales utilizados cumplen con los parámetros de calidad establecidos por la casa comercial y pueden ser usados en el presente estudio.

- Análisis Cromatógrafo

Tabla 9.

Principales compuestos identificados en el aceite esencial de *Curcuma longa*

Compuestos identificados	(%)
α-Felandreno	8.38
1,8 Cineol	3.75
Terpinoleno	2.55
α-Curcumeno	2.60
α-Zingibereno	3.81
β-Sesquifelandreno	4.79
α-Turmerona	21.71
Cymene	1.76

Elaborado por: Los Autores, 2018

Tabla 10.

Principales compuestos identificados en el aceite esencial de *Cymbopogon citratus*

Compuestos identificados	(%)
Myrcene	13.71
Linalool	1.21
Neral	31.89
Geranial	40.25
Geraniol	2.98

Elaborado por: Los Autores, 2018

Tabla 11.

Principales compuestos identificados en el aceite esencial de *Zingiber officinale*

Compuestos identificados	(%)	Compuestos identificados	(%)
α-Pinoeno	3.49	Geranial	3.95
Camphene	12.18	Germacrene D	2.51
Myrcene	1.36	Ar-Curcumeno	8.11
Limoneno	1.95	Cis,β-Panasinsene	1.15
β-Felandreno	3.75	Cadineno	3.80
1,8 Cineol	4.43	α-Farneseno	16.31
Borneol	1.16	β-Sesquifelandreno	14.32
Neral	2.82	Zingibereno	17.31

Elaborado por: Los Autores, 2018

Tabla 12.

Principales compuestos identificados en el aceite esencial de *Ocotea quixos*

Compuestos identificados	(%)
β-Pinoeno	1.26
Cinnamaldehido	3.24
α-Copaene	4.55
β-cariofileno	12.13
Acetato de cinnamilo	17.66
α-Humulene	8.20
α-Selinene	9.13
Germacrene	4.56
Bisabolene	1.94

Elaborado por: Los Autores, 2018

Tabla 13.

Principales compuestos identificados en el aceite esencial de *Melaleuca armillaris*

Compuestos identificados	(%)
α-Pinoeno	3.31
β-Pinoeno	1.38
Myrcene	1.49
1,8-Cineol	56.88
α-Terpineol	7.29

Elaborado por: Los Autores, 2018

Tabla 14.

Principales compuestos identificados en el aceite esencial de *Thymus vulgaris*

Compuestos identificados	(%)	Compuestos identificados	(%)
<i>α</i>-Thujene	1.81	Terpinene	15.21
<i>α</i>-Pinene	1.63	Linalool	3.07
3-Octeno	1.02	Borneol	1.09
Myrcene	1.97	Thymol	26.28
Carene	2.42	Carvacrol	7.11
Cymene	11.26	Caryophyllene	2.25

Elaborado por: Los Autores, 2018

Los efectos de distintos factores físicos y ambientales sobre las plantas medicinales influyen en el contenido de sus compuestos activos, pudiendo variar el porcentaje de componente de una planta a otra de la misma especie (Muñoz et al., 2004).

Los compuestos identificados en cada uno de los aceites esenciales por el cromatógrafo de gases acoplado a masas se encuentran reportados en las Tablas 9,10,11 y 12, algunos de los componentes presentes en dichas tablas se encuentran en las fichas técnicas de los productos de la fundación Chankuap (ver anexo 1,2,3 y 4) de donde se obtuvieron los aceites. En la Tabla 13 se presentan los componentes del aceite esencial de *Melaleuca armillaris* mismos que son presentados en el estudio de Amri et al. (2012) en el cual se analiza los componentes de la familia *Myrtaceae*. Los componentes principales del aceite esencial de *T. vulgaris* presentados en la Tabla 14 muestra similitud a los compuestos reportados por Acosta et al. (2014) donde realiza un análisis físico químico del aceite esencial de tomillo.

3.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM)

La CIM de cada bacteria se la determino mediante la metodología utilizada por Başer & Buchbauer (2015) en la cual presenta cuatro niveles de eficacia de los aceites naturales siendo fuerte, moderado, débil y ausente. Tomando en cuenta esto se procedió a la clasificación de los aceites, obteniendo los siguientes resultados.

Tabla 15.

MIC de las bacterias en estudio para cada aceite esencial y mezcla

Aceites esenciales / Mezclas	MIC <i>Aeromona salmonicida</i> (mg/mL)	MIC <i>Pseudomona fluorescens</i> (mg/mL)	MIC <i>Aeromona hydrophila</i> (mg/mL)
A	0.3 (F)	40 (A)	20 (D)
B	0.075 (F)	5 (M)	2.5 (M)
C	0.3 (F)	20 (D)	2.5 (M)
D	0.15 (F)	5 (M)	2.5 (M)
E	0.6 (M)	20 (D)	5 (M)
AB	0.075 (F)	10 (D)	1.25 (M)
AC	0.6 (M)	40 (A)	10 (D)
AD	0.3 (F)	10 (D)	10 (D)
AE	1.2 (M)	40 (A)	20 (D)
BC	0.075 (F)	20 (D)	1.25 (M)
BD	0.075 (F)	5 (M)	1.25 (M)
BE	0.15 (F)	20 (D)	2.5 (M)
CD	0.6 (M)	10 (D)	5 (M)
CE	1.2 (M)	20 (D)	10 (D)
DE	0.3 (F)	5 (M)	5 (M)
ABC	0.3 (F)	20 (D)	2.5 (M)
ABD	0.6 (M)	5 (M)	2.5 (M)
ABE	0.3 (F)	20 (D)	2.5 (M)
ACB	0.15 (F)	5 (M)	2.5 (M)
ACD	0.3 (F)	5 (M)	5 (M)
ACE	0.6 (M)	10 (D)	10 (D)
ADB	0.3 (F)	20 (D)	1.25 (M)
ADC	0.6 (M)	5 (M)	10 (D)
ADE	0.6 (M)	20 (D)	10 (D)
AEB	0.075 (F)	10 (D)	2.5 (M)
AEC	0.3 (F)	20 (D)	5 (M)
AED	0.15 (F)	5 (M)	10 (D)
BCA	0.075 (F)	10 (D)	5 (M)
BCD	0.075 (F)	5 (M)	5 (M)
BCE	0.075 (F)	10 (D)	5 (M)
BDA	0.075 (F)	10 (D)	5 (M)
BDC	0.075 (F)	20 (D)	2.5 (M)
BDE	0.075 (F)	10 (D)	2.5 (M)
BEA	0.075 (F)	20 (D)	5 (M)
BEC	0.075 (F)	10 (D)	10 (D)
BED	0.075 (F)	5 (M)	5 (M)
CDA	0.15 (F)	10 (D)	10 (D)
CDB	0.075 (F)	5 (M)	5 (M)
CDE	0.15 (F)	10 (D)	10 (D)
CEA	0.3 (F)	20 (D)	20 (D)
CEB	0.15 (F)	10 (D)	2.5 (M)
CED	0.15 (F)	10 (D)	5 (M)
DEA	0.15 (F)	20 (D)	10 (D)
DEB	0.075 (F)	10 (D)	2.5 (M)
DEC	0.15 (F)	10 (D)	5 (M)
F	0.075 (F)	2.5 (M)	0.62 (M)
Cloranfenicol	0.6 (M)	2.5 (M)	0.62 (M)
Enrofloxacin	0.009 (F)	0.156 (F)	0.156 (F)

Nota: F (Fuerte), M (Moderado), D (Débil), A (Ausente), Valores en negrilla mejores MIC

Elaborado por: Los Autores, 2018

Como se muestra en la Tabla 15 los tratamientos utilizados tuvieron buena actividad inhibitoria dado que no se tiene la clasificación de ausente en *Aeromona Salmonicida* y *Aeromona hydrophila*, por otro lado, en *Pseudomona fluorescens* existe la presencia de tratamientos que no tienen actividad inhibitoria dado que tienen la clasificación de ausente.

El aceite esencial de *Curcuma longa* tiene una actividad fuerte contra *A. salmonicida* con 0.30 (mg/mL) lo cual se corrobora con el estudio de Yeo Shin Yi (2015) en el cual indica que *C. longa* tiene actividad antibacteriana positiva hacia *Aeromonas* sp, en el caso de *Aeromona hydrophila* el MIC obtenido fue de 20 (mg/mL) que en la clasificación esta como un aceite con actividad débil lo que indica que de igual manera inhibe en cierto grado el crecimiento, por lo que está dentro de la actividad positiva antes mencionada. En cuanto a *P. fluorescens* el MIC obtenido fue de 40 (mg/mL) lo que dice que el aceite no tiene una actividad inhibitoria, existen pocos estudios sobre *P. fluorescens* con *C.longa* por lo que al realizar la comparación con el trabajo realizado por Chauhan, Keni, & Patel (2017) en donde se analizó la actividad inhibitoria de *C.longa* se obtienen resultados parecidos ya que en los dos estudios no existió una actividad fuerte del aceite.

En lo referente al aceite esencial de *Cymbopogon citratus* en el trabajo realizado por De Silva et al. (2017) informa que este aceite es efectivo contra el 78 % de *Aeromonas* spp. estando entre ellas *A. salmonicida* y *A. hydrophila*, por otro lado Starliper et al. (2015) reporta que las bacterias *Aeromonas* spp estudiadas fueron sensibles al aceite de *C. citratus* dándole un realce importante a este aceite, con esto se confirma los resultados obtenidos en este estudio en donde se observa una actividad fuerte contra *A. salmonicida* con 0.075 (mg/mL) y una actividad media contra *A. hydrophila* con 2.5 (mg/mL). El MIC obtenido para *P.fluorescens* fue de 5 (mg/mL) lo cual indica que

el aceite esencial tiene una actividad moderada frente a esta bacteria como lo menciona también Singh, Sinha, & Kumar (2016) en su estudio donde 95.6 % de las *pseudomonas* estudiadas fueron sensibles. El aceite esencial de *C. citratus* es un agente antimicrobiano muy efectivo para controlar las enfermedades producidas por bacterias Gram negativas patógenas (De Silva et al., 2017)

Según Snoussi et al. (2016) el aceite esencial de *Zingiber officinale* tiene una gran actividad sobre las bacterias Gram negativas, en nuestros resultados se obtuvo una actividad fuerte contra *Aeromona salmonicida*, y una actividad media contra *Aeromona hydrophila* teniendo 0.30 (mg/mL) y 2.5 (mg/mL) respectivamente, según el mismo autor el MIC presentado para *Aeromona hydrophila* es de 0.10 (mg/mL), la eficiencia de *Zingiber officinale* es corroborado por Payung, Tumbol, & Manoppo (2017) donde el aceite influyó en la resistencia de los peces frente a la infección por *A. hydrophila*. Por otra parte en el estudio de Şener et al. (2017) sobre *P.fluorescens* con el aceite esencial de *Z.officinale* obtiene un MIC de 3.125 (µg/mL) lo cual se puede deber a cambios en las concentraciones de los componentes del aceite esencial dado que el aceite estudiado posee zingibereno 22 % como componente mayoritario, mientras que el aceite usado en el presente estudio tiene 17.32 % ya que la variación en la composición puede afectar la actividad del aceite (Bakkali et al., 2008).

El aceite esencial de *Ocotea quixos* presenta una actividad moderada frente a *A. hydrophila* con un MIC de 2.5 (mg/mL), en el caso de *P.fluorescens* el MIC obtenido fue de 5 (mg/mL) lo que le da una actividad moderada y en *A. salmonicida* presenta una actividad fuerte con un MIC de 0.15 (mg/mL), con lo que se puede determinar que el aceite de *Ocotea quixos* tiene una actividad positiva en cuanto a inhibición de crecimiento. *Ocotea quixos* es una planta nativa de Ecuador por lo que no existen investigaciones de la eficacia de este aceite en las bacterias del presente estudio. Sin

embargo se puede recalcar su gran actividad inhibitoria como lo menciona Bruni et al. (2004) en su publicación donde el aceite esencial de *Ocotea quixos* es comparado con el de *T. vulgaris* obteniéndose resultados a favor de la especie nativa de Ecuador.

Según Amri et al. (2012) los aceites esenciales del genero *Melaleuca* tienen actividad inhibitoria dependiendo de la especie, en el caso de *Melaleuca armillaris* en su investigación este aceite demostró baja actividad antimicrobiana. En el presente estudio se obtuvieron valores de MIC de 0.6 (mg/mL) para *A. salmonicida* teniendo una actividad moderada, 20 ($\mu\text{g/mL}$) para *P. fluorescens* dando como resultado una actividad débil y de 5 (mg/mL) para *A. hydrophila* teniendo una actividad moderada.

Teniendo en cuenta los controles utilizados en el presente estudio se pudo determinar que el aceite esencial de *T. vulgaris* tiene un MIC de 0.075 (mg/mL) en *Aeromona salmonicida* al igual que el aceite de *Cymbopogon citratus* por lo que se puede decir que tienen similar actividad inhibitoria (ver anexo 5). Según Acosta, Castro, Roque, & Felix (2014) el componente mayoritario del aceite esencial de *T. vulgaris* es el timol al cual se le confiere su actividad antimicrobiana, por otro lado Shah et al. (2011) refiere que los componentes α -citral y β -citral al formar parte del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* le proveen de una fuerte actividad antimicrobiana en bacterias Gram positivas y Gram negativas. En el caso de *Pseudomona fluorescens* y *Aeromona hydrophila* no se registró valores similares al MIC de *T. vulgaris*.

La Concentración Mínima Inhibitoria de *Curcuma longa*, *Zingiber officinale*, *Ocotea quixos* y *Melaleuca armillaris* en *Aeromona salmonicida* es mayor o igual a la MIC obtenida del cloranfenicol que fue uno de los antibióticos utilizados como control positivo. En *Pseudomona fluorescens* y *Aeromona hydrophila* ninguno de los tratamientos tuvo mejor o igual actividad que el cloranfenicol. Según Cota, Hurtado,

Pérez, & Alcántara (2014) las bacterias han adquirido resistencia al cloranfenicol en los últimos años, por lo que esto podría explicar el comportamiento de las bacterias en el presente estudio.

Por otro lado en la Enrofloxacin usada de igual manera como control químico se determinó que tiene una actividad inhibitoria fuerte dado que no se observó turbidez en la microplaca en todas las diluciones probadas al igual que en todas las bacterias, este antibiótico es de tercera generación ya que en su estructura presenta un flúor que le ayuda a aumentar la biodisponibilidad del fármaco (Otero et al., 2001).

Por otra parte las mezclas binarias y ternarias de la presente investigación no se pueden contrastar con estudios que se hayan realizado con los mismos aceites y en las mismas proporciones dado que no existen, pero se puede analizar los MICs obtenidos para cada bacteria. En el caso de *Aeromonas salmonicida* tanto las mezclas binarias ternarias se obtuvieron, un 20 % con actividad media, y un 80 % de tratamientos con actividad fuerte en las cuales están presentes *Cymbopogon citratus* y *Ocotea quixos*.

Como se puede observar en la Tabla 15 *Pseudomonas fluorescens* tuvo resultados de 70 % de actividad débil, 25 % de actividad moderada y 5 % de actividad ausente, lo que quiere decir que fue la bacteria con más resistencia los tratamientos probados, en *Aeromonas hydrophila* se obtuvo un 67.5 % de actividad moderada y 32.5 % de actividad débil. No se conoce los mecanismos de acción citotóxica de los aceites esenciales por los cuales las bacterias pueden adquirir resistencia o adaptación a estos, pero se ha descrito los mecanismos de acción de los aceites sobre las bacterias (Pino, 2015).

3.3 Sinergismo y Antagonismo de los aceites esenciales

Para determinar el sinergismo o antagonismo de los aceites esenciales en las mezclas se utilizó la metodología planteada por Buldain et al. (2017) llamada tablero de damas o *checkerboard* para lo cual se determinó el FIC de cada aceite esencial, para obtener resultados se utilizó la clasificación planteada por Méndez et al. (2012) obteniéndose los siguientes datos.

Tabla 16.
FIC de las mezclas de aceites esenciales

Aceites esenciales / Mezclas	FIC <i>Aeromona salmonicida</i>	FIC <i>Pseudomona fluorescens</i>	FIC <i>Aeromona hydrophila</i>
AB	1.25 (I)	2.25 (A)	0.5625(SP)
AC	4 (A)	3 (A)	4.5 (A)
AD	3 (A)	2.25 (A)	4.5 (A)
AE	6 (A)	3 (A)	5 (A)
BC	1.25 (I)	5 (A)	1 (I)
BD	1.5 (I)	2 (I)	1 (I)
BE	2.25 (A)	5 (A)	1.5 (I)
CD	6 (A)	1 (I)	4 (A)
CE	6 (A)	2 (I)	6 (A)
DE	2.5 (A)	1.25 (I)	3 (A)
ABC	5 (A)	3 (A)	2 (I)
ABD	12 (A)	1.5 (I)	2 (I)
ABE	4.5 (A)	3(A)	1.5 (I)
ACB	2.25 (A)	1.25 (I)	0.75(SP)
ACD	2.5 (A)	1.25 (I)	2.5 (A)
ACE	2 (I)	0.75(SP)	3 (A)
ADB	4.025 (A)	6 (A)	0.625(SP)
ADC	2.5 (A)	0.75(SP)	5 (A)
ADE	1.5 (I)	3 (A)	3 (A)
AEB	2 (I)	2.5 (A)	1.125 (I)
AEC	1.25 (I)	1.5(I)	2.25 (A)
AED	1.125 (I)	1.25(I)	3 (A)
BCA	1.25 (I)	0.75(SP)	4.25 (A)
BCD	1.5 (I)	1.5 (I)	6 (A)
BCE	1.125 (I)	1.5 (I)	5 (A)
BDA	1.25 (I)	2.25 (A)	4.25 (A)
BDC	1.25 (I)	1.5 (I)	3 (A)
BDE	1.125 (I)	1.5 (I)	2.5 (A)
BEA	0.75 (SP)	1.5 (I)	2.25 (A)
BEC	0.75 (SP)	1 (I)	8 (A)
BED	1 (I)	1.25 (I)	4 (A)
CDA	0.75 (SP)	1.25 (I)	2.5 (A)
CDB	1.125 (I)	2 (A)	3 (A)
CDE	0.5 (S)	1 (I)	4 (A)
CEA	1.25 (I)	1.25 (I)	3 (A)
CEB	2.12 (A)	2.5 (A)	1.25 (I)
CED	1.125 (I)	2.5 (A)	2.5 (A)
DEA	1 (I)	4.5 (A)	2.5 (A)
DEB	1.25 (I)	3 (A)	2 (A)
DEC	1 (I)	1.5 (I)	3 (A)

Nota: S (Sinergismo), SP (Sinergismo parcial), I (Indiferencia o adición), A (Antagonismo)

Elaborado por: Los Autores, 2018

En la presente investigación no se encontraron claros efectos sinérgicos entre los aceites en estudio, obteniendo la mayoría indiferencia o adición y antagonismo entre ellos, a excepción de la mezcla CDE conformado por los aceites *Zingiber officinale*,

Ocotea quixos y *Melaleuca armillaris* en *Aeromona salmonicida* la cual produjo sinergismo. Gutierrez, Barry-Ryan, & Bourke (2008) sugirió que los componentes minoritarios tienen mayor influencia para la actividad biológica que los componentes principales de los aceites esenciales mezclados y pueden tener efectos sinérgicos o influencia potenciadora.

Se considera al sinergismo y sinergismo parcial como una actividad positiva y a la indiferencia o adición y antagonismo como una actividad negativa (Méndez et al., 2012)

3.4 Análisis estadístico de los aceites puros y mezclas en cada bacteria

Prueba de Kruskal-Wallis para *Pseudomona fluorescens*

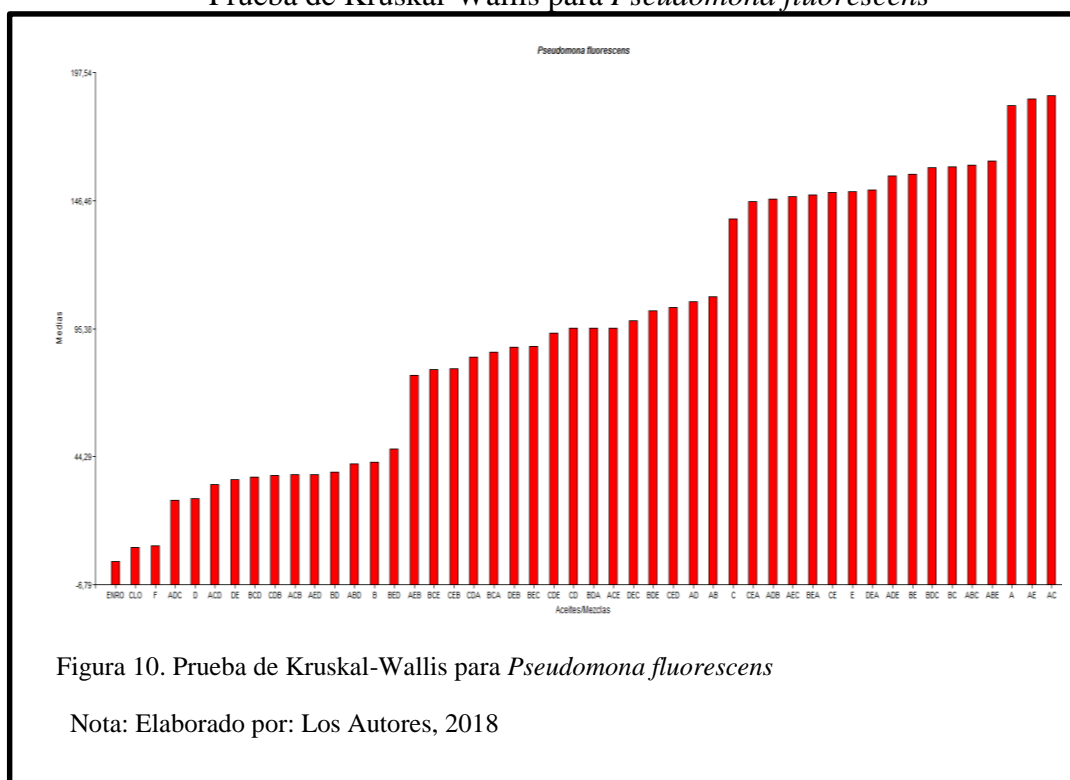


Figura 10. Prueba de Kruskal-Wallis para *Pseudomona fluorescens*

Nota: Elaborado por: Los Autores, 2018

Como se puede observar en la figura 7 la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis con $p < (0.05)$ lo que indica que existe diferencia significativa entre los tratamientos probados para *Pseudomona fluorescens*, siendo el mejor control Enrofloxacina y el mejor tratamiento la mezcla ternaria ADC que la componen los

aceites *Curcuma longa*, *Ocotea quixos* y *Zingiber officinale* , la mejor mezcla binaria fue DE conformada por *Ocotea quixos* y *Melaleuca armillaris*, el peor tratamiento para esta bacteria fue la mezcla binaria AC formado por *Curcuma longa* y *Zingiber officinale*, en aceites puros *Curcuma longa* y en mezclas ternarias ABE la cual está formada por *Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus* y *Melaleuca armillaris* según las medias obtenidas.

Prueba de Kruskal-Wallis para *Aeromona salmonicida*

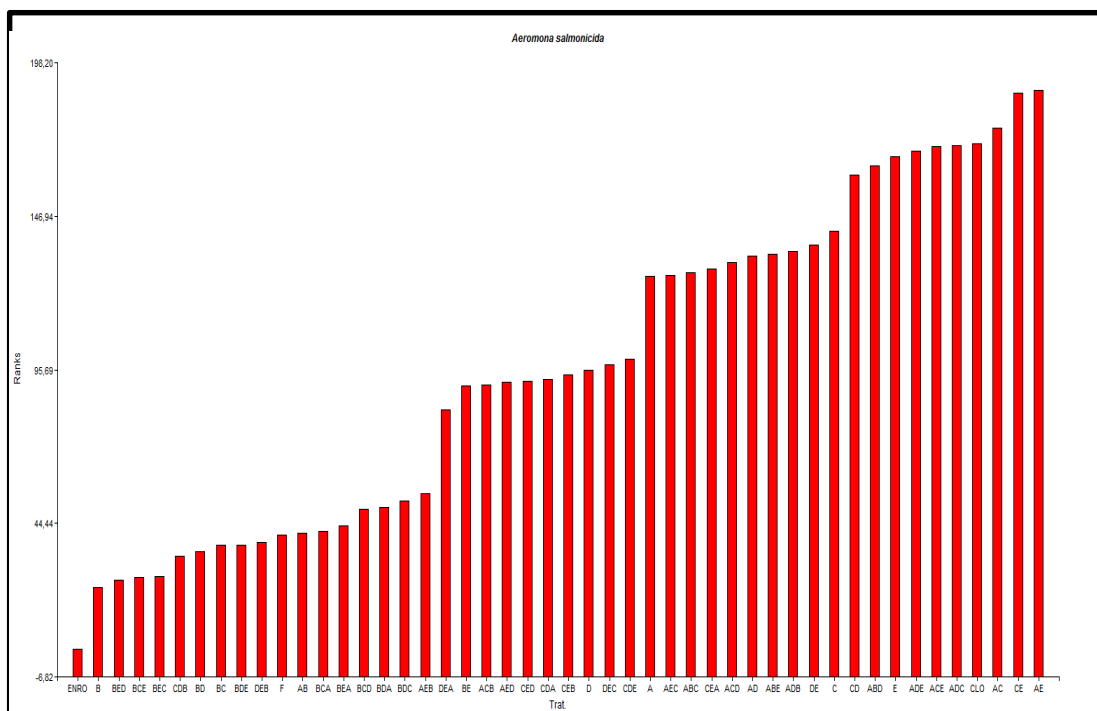


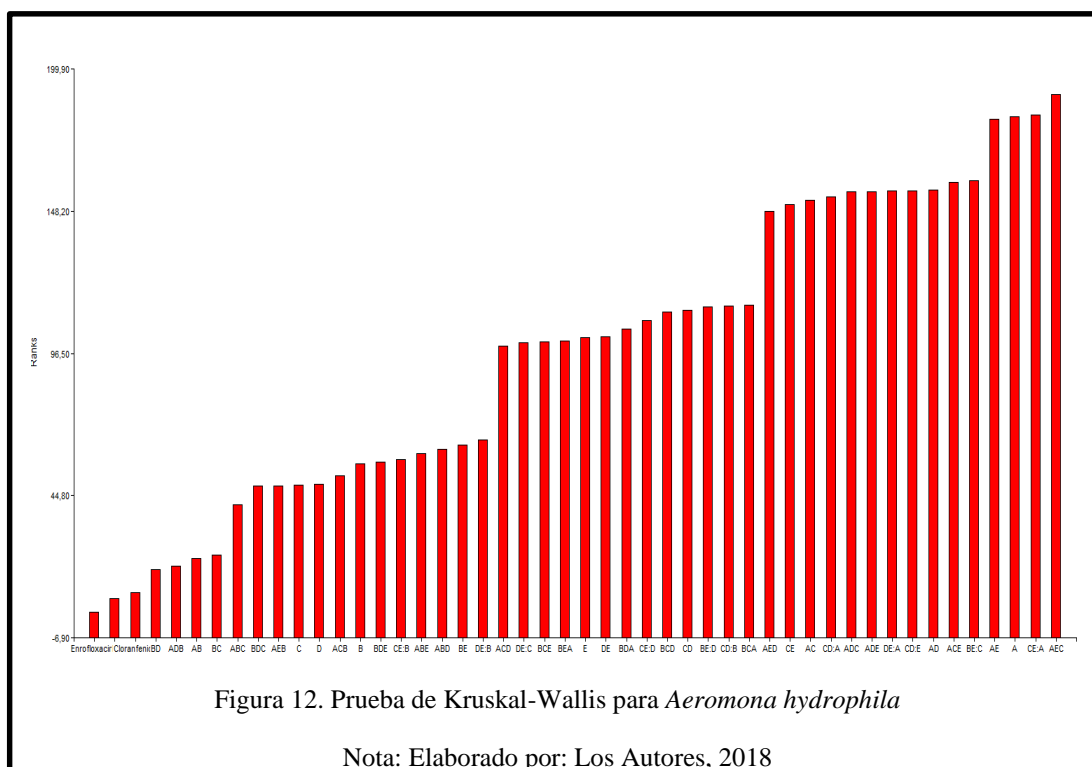
Figura 11. Prueba de Kruskal-Wallis para *Aeromona salmonicida*

Nota: Elaborado por: Los Autores, 2018

Los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis representados en la figura 8 presenta valores de $p > (0.05)$ lo que indica que existe diferencia significativa entre los tratamientos probados para *Aeromona salmonicida*, siendo el mejor control Enrofloxacina, el mejor tratamiento la mezcla ternaria BED que la componen los aceites *Cymbopogon citratus*, *Melaleuca armillaris* y *Ocotea quixos*, la mejor mezcla

binaria fue BD formada por *Cymbopogon citratus* y *Ocotea quixos* y *Zingiber officinale* en aceites puros la mejor fue B la cual es *Cymbopogon citratus*. El peor tratamiento para esta bacteria fue la mezcla binaria AE formada por *Curcuma longa* y *Melaleuca armillaris*, la mezcla ternaria ADC formada por *Curcuma longa*, *Ocotea quixos* y *Zingiber officinale* y en aceites puros E *Melaleuca armillaris*, según las medias obtenidas.

Prueba de Kruskal-Wallis para *Aeromona hydrophila*



Para *Aeromona hydrophila* los resultados obtenidos en la prueba de Kruskal-Wallis representados en la figura 9 de igual manera dio valores de $p > (0.05)$ lo que indica que existe diferencia significativa entre los tratamientos probados para esta bacteria, siendo el mejor control Enrofloxacina y el mejor tratamiento la mezcla binaria BD que la componen los aceites *Cymbopogon citratus* y *Ocotea quixos*, la mezcla ternaria ADB conformada por los aceites *Curcuma longa*, *Ocotea quixos* y *Cymbopogon citratus*, y

el peor tratamiento para esta bacteria fue la mezcla ternaria AEC formada por *Curcuma longa*, *Melaleuca armillaris* y *Zingiber officinale* en cuanto aceites puros A *Curcuma longa* y en mezcla binaria AE *Curcuma longa* y *Melaleuca armillaris*.

Conclusiones

Los análisis físicos químicos de densidad e índice de refracción realizada a los aceites esenciales puros y sus mezclas, dieron como resultado que los mismos se encontraban en óptimas condiciones para el desarrollo de la investigación ya que estuvieron dentro de los límites de calidad para los aceites esenciales.

La GC-MS realizada a los aceites esenciales permitió reconocer sus principales componentes siendo: *Curcuma longa* (tumerona), *Cymbopogon citratus* (geranial), *Zingiber officinale* (zingibereno), *Ocotea quixos* (acetato de cinnamilo), *Melaleuca armillaris* (eucaliptol) y *Thymus vulgaris* (timol), además de otros compuestos en menor cantidad, constituyendo quimiotipos particulares de cada aceite esencial, con composición química diferente de la reportada en la literatura.

Se pudo determinar que *Aeromona salmonicida* ATCC 33658 fue una bacteria muy sensible a las mezclas probadas, por esta razón la mayoría de los tratamientos utilizados tienen una actividad inhibitoria fuerte con un MIC de 0.075 mg/mL (B, BC, BCA, BCD, BCE, BDA, BDC, BDE, BEA, BEC, BED, CDB, DEB), también se comprobó estadísticamente mediante la prueba de Kruskal-Wallis que el mejor tratamiento fue B (*Cymbopogon citratus*), siendo esta concentración igual al MIC de 0.075 mg/mL de *T. vulgaris* que fue utilizado como control positivo natural y mejor que el control positivo cloranfenicol donde su MIC fue de 0.6 mg/mL, es decir que en este caso B (*Cymbopogon citratus*) tiene una efectividad ocho veces mayor a la droga sintética.

Los tratamientos utilizados en *Aeromona hydrophila* ATCC 35654 tuvieron una actividad inhibitoria moderada con un MIC de 1.25 mg/mL (AB, BC, BD, ADB), pudiendo determinar que el MIC de estos tratamientos no supero el MIC obtenido los

controles positivos químicos y naturales. Estadísticamente se determinó mediante la prueba de Kruskal-Wallis que el mejor tratamiento fue BD (*Cymbopogon citratus* y *Ocotea quixos*).

En el caso de *Pseudomona fluorescens* ATCC 13525 el mejor MIC obtenido fue de 5 mg/mL estando dentro de la actividad moderada (B, D, BD, DE, ABD, ACB, ACD, ADC, AED, BCD, BED, CDB), en la prueba de Kruskal-Wallis se determinó que el mejor tratamiento fue ADC (*Curcuma longa*, *Ocotea quixos* y *Zingiber officinale*). En esta bacteria se obtuvieron resultados de actividad inhibitoria ausente en tres tratamientos utilizados (A, AC, AE) demostrando que esta bacteria es menos susceptible a los aceites esenciales y a sus mezclas probadas.

En cuanto a la interacción entre los aceites en las mezclas binarias y ternarias probadas en las tres bacterias, se obtuvo una sola mezcla con actividad sinérgica en *Aeromona salmonicida* siendo CDE (*Zingiber officinale*, *Ocotea quixos* y *Melaleuca armillaris*).

En general se determinó que en todos los tratamientos utilizados que tuvieron una actividad biológica frente a estas tres bacterias están presentes los aceites esenciales: *Cymbopogon citratus* y *Ocotea quixos* y los aceites que menor actividad presentaron fueron *Curcuma longa* y *Melaleuca armillaris*.

Recomendaciones

Preparar el colorante TTC se debe realizar con agua destilada estéril y en ambiente estéril, dado que en la preparación este no debe tornarse de color rosado, sino mantenerse transparente, si esta coloración existiese quiere decir que existe contaminación.

Realizar pruebas *in vitro* de los mejores resultados para después poder extrapolar a pruebas *in vivo* ya que los aceites esenciales son una buena opción por sus características antibacteriales

Trabajar con más aceites esenciales para estas bacterias dado que son de interés acuícola a nivel mundial, además de ser buena alternativa para dejar de lado el uso de antibióticos.

Estudiar los modos de administración y aplicación de posibles productos a base de los aceites esenciales con los mejores resultados. Por disolver, por alimentos, utilización de forma parenteral en peces infectados.

Probar nuevas metodologías estadísticas que corroboren o refuten los resultados obtenidos por las fórmulas convencionales utilizadas.

Referencias

- Abd-El-Rhman, A. M. M. (2009). Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 27(3), 454-459. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.06.015>
- Acosta, O., Castro, A., Roque, M., & Felix, L. (2014). Determinación de la composición química del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. «Tomillo», determinada por cromatografía de fase gaseosa, espectrometría de masa GCIMS y análisis de su actividad antimicrobiana. *Ciencia e Investigación*, 3(2), 69-78.
- Alvarez, J., Alvarez, A., Austin, B., & Agurto, C. (2000). Especies de *Vibrio* y *Aeromonas* aisladas del intestino de camarones marinos sanos silvestres y cultivados en Venezuela, 25(1), 5-27.
- AlYahya, S. A., Ameen, F., Al-Niaem, K., Al-Sa'adi, B., Hadi, S., & Mostafa, A. (2018). Histopathological studies of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in blue tilapia, *Oreochromis aureus*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(1), 182-185. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.10.019>
- Amri, I., Mancini, E., De Martino, L., Marandino, A., Lamia, H., Mohsen, H., ... De Feo, V. (2012). Chemical composition and biological activities of the essential oils from three *Melaleuca* species grown in Tunisia. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(12), 16580-16591. <https://doi.org/10.3390/ijms131216580>
- Antolines, J., de Colmenares, N., Linares, S., Darghan, E., Usubillaga, A., Darghan, E., & Linares, S. (2008). Evaluación de variables agronómicas en el cultivo de

- limonaria (*Cymbopogon Citratus* Stapf) para la producción de aceite esencial. *Interciencia*, 33(9), 693-699.
- Asbahani, A. E., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. H. A., Casabianca, H., ...
Elaissari, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483(1-2), 220-243.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>
- Austin, B., & Austin, D. (2016). Pseudomonads. En *Bacterial Fish Pathogens* (pp. 475-498). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-32674-0_9
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016a). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016b). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Bannai, M. (2013). Case Study: Diagnosis of *Aeromonas hydrophila* Infection Carassius gibelio Fish in Shatt Al-Arab River, South of Iraq. *International Journal of Aquaculture*, 3(0). Recuperado de <http://biopublisher.ca/index.php/ija/article/view/941>
- Barbosa, C., Silva, C., & Teixeira, R. (2013). *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 78(1), 13.
- Bartkova, S., Pimlampas, L., Aarestrup, F. M., & Dalsgaard, I. (2017). Epidemiology of Danish *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in Fish Farms Using

- Whole Genome Sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 8.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02411>
- Başer, K. H. C., & Buchbauer, G. (2015). *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis.
- Baumgartner, W., Ford, L., & Hanson, L. (2017). Lesiones causadas por la virulenta *Aeromonas hydrophila* en el bagre de cultivo (*Ictalurus punctatus* e *I. punctatus* × *I. furcatus*) en Mississippi. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 29(5), 747-751. <https://doi.org/10.1177/1040638717708584>
- Bhagat, M., Sangral, M., Pandita, S., Vironica, Gupta, S., & Bindu, K. (2017). Pleiotropic Chemodiversity in Extracts and Essential Oil of *Melaleuca viminalis* and *Melaleuca armillaris* of Myrtaceae Family. *Journal of Exploratory Research in Pharmacology*, 2(4), 113-120.
<https://doi.org/10.14218/JERP.2016.00036>
- Blumenthal, M., Goldberg, A., & Brinckmann, J. (2000). *Herbal medicine: expanded Commission E monographs ; herb monographs, based on those created by a Special Expert Committee of the German Federal Institute for Drugs and Medical Devices* (1. ed). Newton, Mass: Integrative Medicine Communications.
- Borboa, J., Rueda, E. O., Acedo, E., Ponce, J. F., Cruz, M., & García, J. L. (2010). [EVALUATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY IN VITRO OF ESSENTIAL, 10.
- Bruni, R., Medici, A., Andreotti, E., Fantin, C., Muzzoli, M., Dehesa, M., ... Sacchetti, G. (2004). Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm.

- (Lauraceae) flower calices. *Food Chemistry*, 85(3), 415-421.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.019>
- Buldain, D., Buchamer, A., Marchetti, L., Aliverti, F., Borja, C., & Mestorino, O. N. (2017). Efecto antimicrobiano de la combinación de cloxacilina con aceite esencial de *Melaleuca armillaris* frente a *Staphylococcus aureus*. *Analecta Veterinaria*, 37(2). <https://doi.org/10.24215/15142590e014>
- Caicedo, K. (2013). Enfermedad Pseudomonosis (Bacterias Pseudomonas) | Paradise Tropical Fish – El mejor acuario de El Salvador. Recuperado 3 de mayo de 2018, de <http://paradisetropicalfish.com.sv/2015/09/11/enfermedad-pseudomonosis/>
- Casas, J., Garcia, J., Guayadol, J., & Olive, J. (1994). *Analisis Instrumental 2: Cromatografia i electroforesi* (UPC). Barcelona.
- Chambi, L., & Quiroz, K. (2017). “EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO (*Thymus Vulgaris L.*) Y SU EVALUACIÓN APLICADA A LA CONSERVACIÓN DE EMBUTIDOS TIPO CHORIZO” (Tesis de Pre grado). Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Arequipa. Recuperado de <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/2542/IAchcole.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Chauhan, P., Keni, K., & Patel, R. (2017). Investigation of phytochemical screening and antimicrobial activity of *Curcuma longa*, 4(4), 153-163.
<http://dx.doi.org/10.22192/ijarbs.2017.04.04.021>
- Collahuazo, P. (2012). PLAN DE MANEJO DE LA ESPECIE ISHPINK *Ocotea quixos* (Lam) Kostern EN LA COMUNIDAD DE WAPU. Recuperado de <ps://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/14166/1/UPS-QT11566.pdf>

- Cota, E., Hurtado, L., Pérez, E., & Alcántara, L. (2014). Resistencia a antibióticos de cepas bacterianas aisladas de animales destinados al consumo humano, *I*, 11.
- Coy, C., Eunice, G., & Acosta, G. E. (2013). Actividad antibacteriana y determinación de la composición química de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y cúrcuma (*Curcuma longa*) de Colombia. *Revista Cubana de plantas medicinales*, *18*, 237-246.
- Dallaire-Dufresne, S., Tanaka, K., Trudel, M., Lafaille, A., & Charette, S. (2014). Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. *Veterinary Microbiology*, *169*(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.06.025>
- de Bruijn, I., Liu, Y., Wiegertjes, G., & Raaijmakers, J. (2018). Exploring fish microbial communities to mitigate emerging diseases in aquaculture. *FEMS Microbiology Ecology*, *94*(1). <https://doi.org/10.1093/femsec/fix161>
- de Mendonça, P. M., Rodilla, J. M., Díez, D., Elder, H., Guala, M. S., Silva, L. A., & Pombo, E. B. (2012). Synergistic antibacterial activity of the essential oil of aguariabay (*Schinus molle* L.). *Molecules (Basel, Switzerland)*, *17*(10), 12023-12036. <https://doi.org/10.3390/molecules171012023>
- De Silva, B., Jung, W.-G., Hossain, S., Wimalasena, S. H. M. P., Pathirana, H. N. K. S., & Heo, G.-J. (2017). Antimicrobial property of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against pathogenic bacteria isolated from pet turtles. *Laboratory Animal Research*, *33*(2), 84-91. <https://doi.org/10.5625/lar.2017.33.2.84>
- ESPAE -ESPOL, Álvarez, M., FIMCBOR-ESPOL, P., Rodríguez, J., Menéndez, S., & Quijano, J. (2018). Estudios Industriales: Orientación estratégica para la toma de decisiones – Industria de Acuicultura. Recuperado de

http://www.espae.espol.edu.ec/wp-content/uploads/2018/01/ei_acuicultura.pdf

- EUCAST. (2003). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(8), ix-xv. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00790.x>
- FAO, O. de las N. U. para la A. y la A. (2016). *Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016*. Roma: Food & Agriculture Org.
- Farag, R. S., Shalaby, A. S., El-Baroty, G. A., Ibrahim, N. A., Ali, M. A., & Hassan, E. M. (2004). Chemical and biological evaluation of the essential oils of different *Melaleuca* species. *Phytotherapy Research: PTR*, 18(1), 30-35. <https://doi.org/10.1002/ptr.1348>
- Feriotto, G., Marchetti, N., Costa, V., Beninati, S., Tagliati, F., & Mischiati, C. (2018). Chemical Composition of Essential Oils from *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon citratus*, and *Rosmarinus officinalis*, and Their Effects on the HIV-1 Tat Protein Function. *Chemistry & Biodiversity*, 15(2), e1700436. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700436>
- Figueras, M. J. (2005). Clinical relevance of *Aeromonas* sM503. *Reviews in Medical Microbiology*, 16(4), 145–153. <https://doi.org/10.1097/01.revmedmi.0000184410.98677.8a>
- Fundacion Chankuap. (2009). Fichas técnicas. Recuperado 8 de mayo de 2018, de <http://chankuap.org/catalogo/fichas-tecnicas/>
- Gutierrez, J., Barry, C., & Bourke, P. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International*

- Journal of Food Microbiology*, 124(1), 91-97.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.028>
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, 124(1), 91-97.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.028>
- Hamad, A., Alifah, A., Permadi, A., & Hartanti, D. (2016). Chemical constituents and antibacterial activities of crude extract and essential oils of *Alpinia galanga* and *Zingiber officinale*. *International Food Research Journal*, 23(2), 837-841.
- Instituto Nacional de Pesca. (2016). Acuacultura [Gubernamental]. Recuperado 22 de mayo de 2018, de <http://www.institutopesca.gob.ec/acuacultura/>
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2010). The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), 35-73.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00039-09>
- Kizhakkayil, J., & Sasikumar, B. (2011). Diversity, characterization and utilization of ginger: a review. *Plant Genetic Resources*, 9(03), 464-477.
<https://doi.org/10.1017/S1479262111000670>
- Kouame, N. M., Kamagate, M., Koffi, C., Die-Kakou, H. M., Yao, N. A. R., & Kakou, A. (2016). *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: ethnopharmacologie, phytochimie, activités pharmacologiques et toxicologie. *Phytothérapie*, 14(6), 384-392. <https://doi.org/10.1007/s10298-015-1014-3>
- Li, T., Long, M., Ji, C., Shen, Z., Gatesoupe, F.-J., Zhang, X., ... Li, A. (2016). Alterations of the gut microbiome of largemouth bronze gudgeon (*Coreius guichenoti*) suffering from furunculosis. *Scientific Reports*, 6, 30606.
<https://doi.org/10.1038/srep30606>

- López, V., & Gutiérrez, C. (2005). Detección por GC-MS de trimetilamina como causa del mal olor.
- Márquez, J. G. (2018). *SELECCIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES COMO INHIBIDORES DE BACTERIAS PATÓGENAS DE PECES Y UTILIZACIÓN EN ACUICULTURA*. Universidad de Cadiz, Puerto Real. Recuperado de <http://rodin.uca.es/xmlui/bitstream/handle/10498/20197/TFM%20Extractos%20vegetales%20inhibidores%20de%20bacterias%20patogenas%20acuicultura%20Jorge%20Garcia.pdf?sequence=1>
- Martínez, R., Ortega, M., Herrera, J., Kawas, J., Zarate, J., & Robles, R. (2015). Uso De Aceites Esenciales En Animales De Granja. *Interciencia*, 40(11), 744-750.
- Méndez, D., Hernandez, A., González, M. G., Martinez, A., García, C., & Tostado, J. (2012). Sinergismo Bactericida entre Timol y Carvacol ante cepas bacterianas causantes Demastitis en ganado bovino, *I2*(1), 111-116.
- Méndez, N., Angulo, A., & Contreras, O. (2016). Actividad antibacteriana in vitro de *Curcuma longa* (Zingiberaceae) frente a bacterias nosocomiales en Montería, Colombia. *Revista de Biología Tropical*, 64(3). <https://doi.org/10.15517/rbt.v64i3.20848>
- Moon, Y.-S., Lee, H.-S., & Lee, S.-E. (2018). Inhibitory effects of three monoterpenes from ginger essential oil on growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* and their gene regulation in aflatoxin biosynthesis. *Applied Biological Chemistry*, 61(2), 243-250. <https://doi.org/10.1007/s13765-018-0352-x>
- Morales, C., Marrero, D., González, V., Quintana, F., & González, I. (2012). Composición química del aceite esencial de las partes aéreas de *Melaleuca quinquenervia*. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 43, 1-2.

- Morales, Y. E., Herrera, M. C., & Muñoz, J. (2007). Cloranfenicol, un antibiótico clásico como alternativa en el presente. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 38(1). Recuperado de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=57938108>
- Muñoz, D., Vogel, H., & Razmili, I. (2004). Variación de compuestos químicos en hojas de poblaciones de *Drimys* spp. (Magnoliophyta: Winteraceae) en Chile. *Revista chilena de historia natural*, 77(1), 43-50. <https://doi.org/10.4067/S0716-078X2004000100005>
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451-1474. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>
- Nidhi Rao, M. S., & Mittal, S. (2014). An in vitro Evaluation of the Antimicrobial Activity of *Curcuma longa* against Selected Pathogenic Microorganisms. *Research Journal of Science and Technology*, 6(2), 71-74.
- Nikkhah, M., Hashemi, M., Habibi, N., & Farhoosh, R. (2017). Synergistic effects of some essential oils against fungal spoilage on pear fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 257, 285-294. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.021>
- Noga, E. (2010). *Fish Disease: Diagnosis and Treatment, Second Edition* (Segunda edición). USA: Editorial Office.
- Nolkemper, S., Reichling, J., Stintzing, F. C., Carle, R., & Schnitzler, P. (2006). Antiviral effect of aqueous extracts from species of the Lamiaceae family against Herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro. *Planta Medica*, 72(15), 1378-1382. <https://doi.org/10.1055/s-2006-951719>

- Noriega, P., & Dacarro, C. (2008). Aceite foliar de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm.: actividad antimicrobiana y antifúngica. *La Granja*, 7(1), 3. <https://doi.org/10.17163/lgr.n7.2008.01>
- Ortiz, J. (2015). *ACUACULTURA* (Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE). Sangolqui. Recuperado de <http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/10164>
- Ortuño, M. (2006). *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes* (Primera Edición). aiyana ediciones.
- Otero, J. L., Mestorino, O. N., & Errecalde, J. O. (2001). Enrofloxacin: una fluorquinolona de uso exclusivo en veterinaria. *Analecta Veterinaria*, 21, n.º 1. Recuperado de <http://hdl.handle.net/10915/11128>
- Paucar, L. M., Salvador, R., Guillén, J., Capa, J., & Moreno, C. (2015). Comparative study of physical-chemical features of sacha inchi oil (*Plukenetia volubilis* L.), olive oil (*Olea europaea*) and fish oil. *Scientia agropecuaria*, 279-290. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.04.05>
- Payung, C., Tumbol, R., & Manoppo, H. (2017). El jengibre dietético (*Zingiber officinale*) mejora la resistencia de la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) contra *Aeromonas hydrophila*. *10(4)*, 962-968.
- Peatman, E., Mohammed, H., Kirby, A., Shoemaker, C., Yildirim-Aksoy, M., & Beck, B. (2018). Mechanisms of pathogen virulence and host susceptibility in virulent *Aeromonas hydrophila* infections of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 482, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.09.019>
- Pino, J. A. (2015). *Aceites esenciales: química, bioquímica, producción y usos*. Havana, UNKNOWN: Editorial Universitaria. Recuperado de

<http://ebookcentral.proquest.com/lib/bibliotecaupssp/detail.action?docID=4183571>

- Rubegeta, E., Ahmad, A., Kamatou, G. P. P., Sandasi, M., Sommerlatte, H., & Viljoen, A. M. (2018). Headspace analysis, antimicrobial and anti-quorum sensing activities of seven selected African Commiphora species. *South African Journal of Botany*. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.03.001>
- Sacchetti, G., Guerrini, A., Noriega, P., Bianchi, A., & Bruni, R. (2006). Essential oil of wild *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) leaves from Amazonian Ecuador. *Flavour and Fragrance Journal*, 21(4), 674-676. <https://doi.org/10.1002/ffj.1648>
- Şener, N., Özkinalı, S., Gür, M., Güney, K., Özkan, O. E., & Khalifa, M. M. (2017). Determination of antimicrobial activity and chemical composition of pimento & ginger essential oil. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 51(3), S230-S233. <https://doi.org/10.5530/ijper.51.3s.19>
- Shah, G., Shri, R., Panchal, V., Sharma, N., Singh, B., & Mann, A. (2011). Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass). *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2(1), 3. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.79796>
- Sharma, P. K., Singh, V., & Ali, M. (2016). Chemical composition and antimicrobial activity of fresh rhizome essential oil of *Zingiber officinale* Roscoe. *Pharmacognosy Journal*, 8(3), 185-190. <https://doi.org/10.5530/pj.2016.3.3>
- Silby, M., Winstanley, C., Godfrey, S., Levy, S., & Jackson, R. (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(4), 652-680. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x>

- Singh, B., Sinha, D., & Kumar, V. (2016). Effect of Herbal Antimicrobials on Bacterial Strains of Foods of Vegetable and Animal Origin. *Journal of Food Chemistry and Nanotechnology*, 2(1). <https://doi.org/10.17756/jfcn.2016-019>
- Snuossi, M., Trabelsi, N., Ben Taleb, S., Dehmeni, A., Flamini, G., & De Feo, V. (2016). Laurus nobilis, Zingiber officinale and Anethum graveolens Essential Oils: Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities against Bacteria Isolated from Fish and Shellfish. *Molecules*, 21(10), 1414. <https://doi.org/10.3390/molecules21101414>
- Soto, R., Vega, G., Tamajón, A., & Aldo, L. (2002). Instructivo técnico del cultivo de *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf (caña santa). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 7(2), 0-0.
- Souza, C., Baldissera, M., Vaucher, R., Lopes, L., Vizzotto, B., Raffin, R., ... Baldisserotto, B. (2016). In vivo bactericidal effect of *Melaleuca alternifolia* essential oil against *Aeromonas hydrophila*: Silver catfish (*Rhamdia quelen*) as an experimental model. *Microbial Pathogenesis*, 98, 82-87. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.07.002>
- Srivastava, U., Ojha, S., Tripathi, N. N., & Singh, P. (2015). In vitro antibacterial, antioxidant activity and total phenolic content of some essential oils, 1.
- Starliper, C. E., Ketola, H. G., Noyes, A. D., Schill, W. B., Henson, F. G., Chalupnicki, M. A., & Dittman, D. E. (2015a). An investigation of the bactericidal activity of selected essential oils to *Aeromonas* spp. *Journal of Advanced Research*, 6(1), 89-97. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.12.007>
- Starliper, C. E., Ketola, H. G., Noyes, A. D., Schill, W. B., Henson, F. G., Chalupnicki, M. A., & Dittman, D. E. (2015b). An investigation of the bactericidal activity

- of selected essential oils to *Aeromonas* spp. *Journal of Advanced Research*, 6(1), 89-97. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.12.007>
- Stratev, D., Vashin, I., & Daskalov, H. (2015). Determination of beta-haemolytic activity and minimum inhibitory concentrations of antimicrobial drugs against *Aeromonas hydrophila* strains isolated from fish products. *BULGARIAN JOURNAL OF VETERINARY MEDICINE*, 18(3), 239-247. <https://doi.org/10.15547/bjvm.836>
- Suárez, W., & Herrera, F. (2012). Determinación de factores de virulencia en cepas de *Aeromonas* spp., aisladas a partir de pescado. *Revista MVZ Córdoba*, 17(1), 2846-2851. <https://doi.org/10.21897/rmvz.252>
- Torres, E., Moreno, R., Hermosilla, R., Tamayo, Y., & Guillén, Z. (2014). Estudio de la actividad antibacteriana del aceite esencial de los rizomas de *Curcuma longa* L. *Química Viva*, 13(2), 123-129.
- Vallejo, V. E., Habib, Y., & Roldan, F. (2010). APLICACIÓN DE SALES DE TETRAZOLIO DE NUEVA GENERACION (XTT) PARA LA ESTIMACION DE LA DENSIDAD DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE HIDROCARBUROS EN SUELOS DE LA ECORREGION CAFETERA COLOMBIANA. *Acta Biológica Colombiana*, 15(3), 75-90.
- Villamil Díaz, L., & Martínez-Silva, M. A. (2009). PROBIÓTICOS COMO HERRAMIENTA BIOTECNOLÓGICA EN EL CULTIVO DE CAMARÓN: RESEÑA. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras - INVEMAR*, 38(2), 165-187.
- Viswanatan, S., Manikandan, S., Haniffa, A., & Chairman, K. (2015). Evaluation of resistance against Antibiotics, Antiseptics and Disinfectants in *Aeromonas*

hydrophila isolated from Marketed Fishes. *Pharmaceutical and Biological Evaluations*, 2(2), 40-46.

Yeo Shin Yi, J. (2015). *Antibacterial Properties of Ten Selected Spices Against Aquaculture Bacteria* (Tesis de Pre grado). Universiti Malaysia Kelantan, Malaysia. Recuperado de <http://umkeprints.umk.edu.my/4339/>

Zu, Y., Yu, H., Liang, L., Fu, Y., Efferth, T., Liu, X., & Wu, N. (2010). Activities of ten essential oils towards *Propionibacterium acnes* and PC-3, A-549 and MCF-7 cancer cells. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 15(5), 3200-3210. <https://doi.org/10.3390/molecules15053200>

Anexos

Anexo 1. Ficha técnica del aceite esencial de *Curcuma longa*

FICHA TÉCNICA



Fundación Chankuap', Dirección: Vidal Rivadeneira y Hernando de Benavente, Macas – Ecuador EC140150; Telf.: (593)7-2701763, e-mail: chankuap@mo.pro.ec. Para mayor información contactar: Área de Transformación de productos

ACEITE ESENCIAL CÚRCUMA

(TURMERIC ESSENTIAL OIL)

1. Descripción

El aceite esencial de Cúrcuma (*Curcuma longa*) es un producto obtenido de los rizomas por medio de una destilación por arrastre de vapor.

Se trata de un aceite esencial totalmente natural sin aditivos químicos.

2. Aplicaciones

Ingrediente natural para cosméticos (Aroma)

3. Especificaciones

INCI name (sugerido): *Curcuma longa*

CAS No.: No disponible

EINECS No.: No disponible

COMPUESTO	% Id	COMPUESTO	% Id
<i>α-pineno</i>	1,1	<i>α-Humulene</i>	0,23
<i>Myrcene</i>	0,69	<i>β-Farnesene cis</i>	0,36
<i>α-Phellandrene</i>	20,42	<i>α-Curcumene</i>	2,9
<i>3-Carene</i>	0,35	<i>Zingiberene</i>	6,9
<i>α-Terpinene</i>	1,26	<i>β-Bisabolene</i>	1,23
<i>Cimene</i>	3,61	<i>β-Sesquiphellandrene</i>	5,45
<i>1,8-Cineolo</i>	10,3	<i>Ar-Tumerolo</i>	0,93
<i>δ-Terpinene</i>	1,01	<i>Ar-Tumerone</i>	1,08
<i>Terpinolene</i>	6,19	<i>α-Tumerone</i>	19,79
<i>α, cis Z Bergamotene</i>	0,19	<i>β-Tumerone</i>	7,35
<i>β-Caryophyllene</i>	1,49		

GC-MS Estudio de la Universidad de Ferrara (Italia)

DATO DE ANÁLISIS	RANGO	MÉTODO
Apariencia Visual	Líquido aceitoso transparente	Visual
Color	Ligeramente amarillo	Visual
Olor	Típica nota a especia	Olor
Densidad (g/ml)	0.9100 – 0.9200	<841>USP
Índice de Refracción	1.4800 – 1.500	<831>USP
Índice de Acidez (%)	1.3 – 1.5	Método Interno
Solubilidad en alcohol	Completamente soluble en alcohol 96°	Método Interno

Fuente: (Fundación Chankuap, 2009)

FICHA TÉCNICA



Fundación Chankuap', Dirección: Vidal Rivadeneira y Hernando de Benavente, Macas – Ecuador EC140150; Telf.: (593)7-2701763, e-mail: chankuap@mo.pro.ec. Para mayor información contactar: Área de Transformación de productos

ACEITE ESENCIAL HIERBA LUISA

(SWEETGRASS ESSENTIAL OIL)

1. Descripción

El aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) es un producto obtenido de las hojas y el tallo por medio de una destilación por arrastre de vapor.

Se trata de un aceite esencial totalmente natural sin aditivos químicos.

2. Aplicaciones

Ingrediente natural para cosméticos (Aroma)

3. Especificaciones

INCI name (sugerido): Cymbopogon citratus
CAS No.: No disponible
EINECS No.: No disponible

COMPUESTO	% Id	COMPUESTO	% Id
6 methyl 5 hepten -2-one	0.93	Geranial *	40.25
□ - Myrcene	13.71	2 - Undecanone	0.8
Cis - Ocimene	0.23	Geranic acid	0.83
Trans - Ocimene	0.37	Cinnamic acid methyl ester	0.2
Linalool	1.21	Geranyl acetate	0.23
Allo - Ocimene	0.47	Caryophyllene	0.18
Citronellal	0.21	α - Bergamotene	0.11
α - Thujone	1.89	2 - Tridecanone	0.73
Neral *	31.89	2 - Tetradecanone	0.09
Geraniol	2.98		

GC-MS Estudio de la Universidad de Ferrara (Italia)

DATO DE ANÁLISIS	RANGO	MÉTODO
Apariencia Visual	Líquido aceitoso transparente	Visual
Color	Ligeramente amarillo	Visual
Olor	Típica cítrica leve	Olor
Densidad (g/ml)	0.9750 - 0.9850	<841>USP
Índice de Refracción	1.4800 - 1.5000	<831>USP
Índice de Acidez (%)	1.2 - 1.4	Método Interno
Solubilidad en alcohol	Completamente soluble en alcohol 96°	Método Interno

Fuente: (Fundación Chankuap, 2009)

FICHA TÉCNICA



Fundación Chankuap', Dirección: Vidal Rivadeneira y Hernando de Benavente, Macas – Ecuador EC140150; Telf.: (593)7-2701763, e-mail: chankuap@mo.pro.ec. Para mayor información contactar: Área de Transformación de productos

ACEITE ESENCIAL JENGIBRE

(GINGER ESSENTIAL OIL)

1. Descripción

El aceite esencial de jengibre (*Zingiber officinalis*) es un producto obtenido de los rizomas por medio de una destilación por arrastre de vapor.

Se trata de un aceite esencial totalmente natural sin aditivos químicos.

2. Aplicaciones

Ingrediente natural para cosméticos (Aroma)

3. Especificaciones

INCI name: *Zingiber officinale*
CAS No.: 8007 – 08 – 7 / 84696 – 15 – 1
EINECS No.: 283 – 634 – 2

COMPUESTO	% Id	COMPUESTO	% Id	COMPUESTO	% Id
Tricyclene	0,25	Geraniolo	1,11	Cis, β - Farnesene	0,67
α Pinene	3,31	Geranialo	0,17	γ - Muurolene	1,81
Canfene	9,98	Bornil acetato	0,29	Ar - Curcumene	8,93
β - Pinene	0,52	δ - Elemene	0,25	γ - Cadinene	3,82
Mircene	0,92	α - Cubenene	0,44	α - Zingiberene	23,94
α - Phellandene	0,41	Copaene	0,84	β - Bisabolene	11,4
1,8 Cineolo + α -	7,67	β - Elemene	1,19	β - Sesquiphellandrene	10,86
Ocimene	0,39	α - Ylangene	0,68	Bisabolene trans, γ	0,61
Borneolo	1,02	β - Cubebene	0,43	Nerolidol	0,51
α - Terpineolo	0,48	δ - Guaiene g - Elemene	0,91	β - Eudesmolo	0,23
Nerolo	0,63	α - Bergamotene	0,36		
Citronellolo	0,37	Allo - Aromandrene	0,53		

GC-MS Estudio de la Universidad de Ferrara (Italia)

DATO DE ANÁLISIS	RANGO	MÉTODO
Apariencia Visual	Líquido aceitoso transparente	Visual
Color	Ligeramente amarillo	Visual
Olor	Típica nota a especia	Olor
Densidad (g/ml)	0.890 – 0.900	<841>USP
Índice de Refracción	1.4700 – 1.490	<831>USP
Índice de Acidez (%)	2.0	Método Interno
Solubilidad en alcohol	Completamente soluble en alcohol 96°	Método Interno

Fuente: (Fundación Chankuap, 2009)

FICHA TÉCNICA



Fundación Chankuap', Dirección: Vidal Rivadeneira y Hernando de Benavente, Macas – Ecuador EC140150; Telf.: (593)7-2701763, e-mail: chankuap@mo.pro.ec. Para mayor información contactar: Área de Transformación de productos

ACEITE ESENCIAL ISHPINK

(ISHPINK ESSENTIAL OIL)

1. Descripción

El aceite esencial de ishpink es un producto obtenido de las hojas y cálices florales de la planta *Ocotea quixos* por medio de una destilación por arrastre de vapor.

Se trata de un aceite esencial totalmente natural sin aditivos químicos.

2. Aplicaciones

Ingrediente natural para cosméticos (Aroma)

3. Especificaciones

INCI name (sugerido): *Ocotea quixos*

CAS No.: No disponible

EINECS No.: No disponible

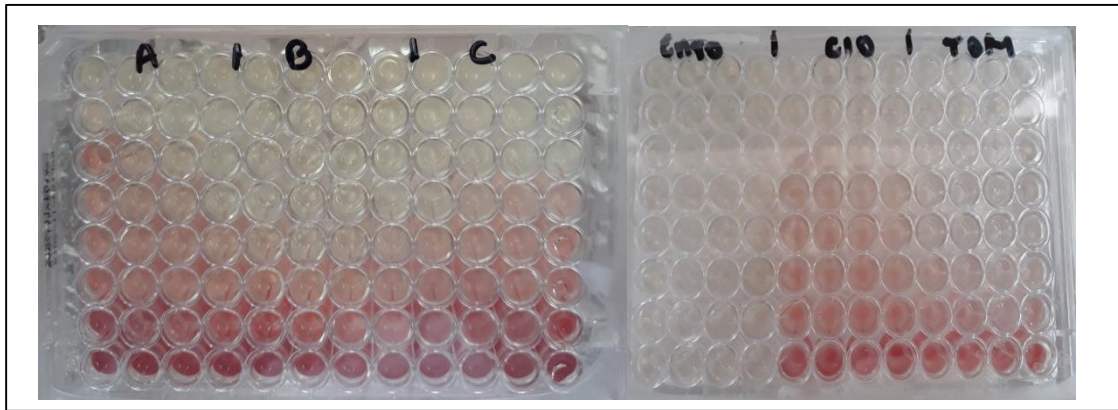
COMPUESTO	% Id	COMPUESTO	% Id	COMPUESTO	% Id
Cardeno	0,124	Mosleno	0,582	Gurjuneno	0,735
Alpha pinene	4,121	Linanool	1,213	Caryophyllene	11,785
Benzaldehyde	1,599	3 phenyl propanal	0,321	Cinnamyl acetate	13,943
1R- alpha pinene	2,263	4 terpineol	0,806	Alpha caryophyllene	7,245
Bicyclo heptane	4,773	Alpha terpineol	0,690	Isoeugenol methyl ester	0,658
Terpinolene	0,375	Cinnamal	13,042	Azulenes	2,763
Cymene	0,206	Alpha cubeno	0,282	Cardimeno	0,664
Camphene	1,694	Copaeno	2,560	Caryophyllene oxide	4,044
Eucalyptol	4,811	Methyl cinnamate	4,992		
Benzyl benzoate	0,567				

GC-MS Estudio de la Universidad de Ferrara (Italia)

DATO DE ANÁLISIS	RANGO	MÉTODO
Apariencia Visual	Líquido aceitoso transparente	Visual
Color	Ligeramente amarillo	Visual
Olor	Típica nota a canela	Olor
Densidad (g/ml)	0.82 – 0.92	<841>USP
Índice de Refracción	1.520 – 1.530	<831>USP
Índice de Acidez (%)	Max. 1.2	Método Interno
Solubilidad en alcohol	Completamente soluble en alcohol 96°	Método Interno
Cinnamal (%)	11.0 – 13.5	GC-MS
Caryophyllene (%)	9.5 – 12.0	GC-MS
Cinnamyl acetate (%)	13.5 – 15.0	GC-MS

Fuente: (Fundacion Chankuap, 2009)

Anexo 5. CIM de *C. longa* (A), *C. citratus* (B), *Z. officinale* (C), comparados con los controles positivos para *Aeromonas salmonicida*



Nota: Elaborado por: Los Autores, 2018

Anexo 6. Codificación de aceites esenciales y sus mezclas

Códigos	Interpretación
A	<i>Curcuma longa</i>
B	<i>Cymbopogon citratus</i>
C	<i>Zingiber officinale</i>
D	<i>Ocotea quixos</i>
E	<i>Melaleuca armillaris</i>
AB	<i>Curcuma longa / Cymbopogon citratus</i>
AC	<i>Curcuma longa / Zingiber officinale</i>
AD	<i>Curcuma longa / Ocotea quixos</i>
AE	<i>Curcuma longa / Melaleuca armillaris</i>
BC	<i>Cymbopogon citratus / Zingiber officinale</i>
BD	<i>Cymbopogon citratus / Ocotea quixos</i>
BE	<i>Cymbopogon citratus / Melaleuca armillaris</i>
CD	<i>Zingiber officinale / Ocotea quixos</i>
CE	<i>Zingiber officinale / Melaleuca armillaris</i>
DE	<i>Ocotea quixos / Melaleuca armillaris</i>
ABC	<i>Curcuma longa / Cymbopogon citratus / Zingiber officinale</i>
ABD	<i>Curcuma longa / Cymbopogon citratus / Ocotea quixos</i>
ABE	<i>Curcuma longa / Cymbopogon citratus / Melaleuca armillaris</i>
ACB	<i>Curcuma longa / Zingiber officinale / Cymbopogon citratus</i>
ACD	<i>Curcuma longa / Zingiber officinale / Ocotea quixos</i>
ACE	<i>Curcuma longa / Zingiber officinale / Melaleuca armillaris</i>
ADB	<i>Curcuma longa / Ocotea quixos / Cymbopogon citratus</i>
ADC	<i>Curcuma longa / Ocotea quixos / Zingiber officinale</i>
ADE	<i>Curcuma longa / Ocotea quixos / Melaleuca armillaris</i>
AEB	<i>Curcuma longa / Melaleuca armillaris / Cymbopogon citratus</i>
AEC	<i>Curcuma longa / Melaleuca armillaris / Zingiber officinale</i>
AED	<i>Curcuma longa / Melaleuca armillaris / Ocotea quixos</i>
BCA	<i>Cymbopogon citratus / Zingiber officinale / Curcuma longa</i>
BCD	<i>Cymbopogon citratus / Zingiber officinale / Ocotea quixos</i>
BCE	<i>Cymbopogon citratus / Zingiber officinale / Melaleuca armillaris</i>
BDA	<i>Cymbopogon citratus / Ocotea quixos / Curcuma longa</i>
BDC	<i>Cymbopogon citratus / Ocotea quixos / Zingiber officinale</i>
BDE	<i>Cymbopogon citratus / Ocotea quixos / Melaleuca armillaris</i>
BEA	<i>Cymbopogon citratus / Melaleuca armillaris / Curcuma longa</i>
BEC	<i>Cymbopogon citratus / Melaleuca armillaris / Zingiber officinale</i>

BED	<i>Cymbopogon citratus / Melaleuca armillaris / Ocotea quixos</i>
CDA	<i>Zingiber officinale / Ocotea quixos / Curcuma longa</i>
CDB	<i>Zingiber officinale / Ocotea quixos / Cymbopogon citratus</i>
CDE	<i>Zingiber officinale / Ocotea quixos / Melaleuca armillaris</i>
CEA	<i>Zingiber officinale / Melaleuca armillaris / Curcuma longa</i>
CEB	<i>Zingiber officinale / Melaleuca armillaris / Cymbopogon citratus</i>
CED	<i>Zingiber officinale / Melaleuca armillaris / Ocotea quixos</i>
DEA	<i>Ocotea quixos/ Melaleuca armillaris / Curcuma longa</i>
DEB	<i>Ocotea quixos/ Melaleuca armillaris / Cymbopogon citratus</i>
DEC	<i>Ocotea quixos/ Melaleuca armillaris / Zingiber officinale</i>
F	<i>Thymus vulgaris</i>

Nota: Elaborado por los Autores,2018