

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**



**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

“EFECTO ANTIMICROBIANO *IN VITRO* DEL ACEITE  
ESENCIAL DE EUCALIPTO (*Eucalyptus spp.*) SOBRE CEPAS  
CERTIFICADAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*”

“Documento Final del Proyecto de Investigación como requisito para  
obtener el grado de Médico Veterinario Zootecnista”

**AUTOR:** MARÍA JOSÉ MOROCHO NÚÑEZ

**TUTOR:** DRA MAYRA MONTERO

CEVALLOS-ECUADOR

2018

i

## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“La suscrita, MARÍA JOSÉ MOROCHO NÚÑEZ, portadora de la cédula de identidad número: 180448308-7 libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de Investigación titulado: “EFECTO ANTIMICROBIANO *IN VITRO* DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO (*Eucalyptus spp.*) SOBRE CEPAS CERTIFICADAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*.” es original, auténtico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indiquen las fuentes de información consultadas”.

.....  
MARÍA JOSÉ MOROCHO NÚÑEZ

C.I. 180448308-7

## DERECHOS DE AUTOR

“Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “EFECTO ANTIMICROBIANO *IN VITRO* DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO (*Eucalyptus spp.*) SOBRE CEPAS CERTIFICADAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus.*” como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Médico Veterinario Zootecnista, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él”.

.....  
MARÍA JOSÉ MOROCHO NÚÑEZ

C.I. 180448308-7

**“EFECTO ANTIMICROBIANO *IN VITRO* DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO (*Eucalyptus spp.*) SOBRE CEPAS CERTIFICADAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus* ”**

REVISADO POR:

.....

Dra. Mg. Mayra Montero

**TUTOR**

.....

Dr. Mg. Pedro Díaz

**ASESOR DE BIOMETRÍA**

**MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN:**

FECHA

.....

Ing. Mg. Hernán Zurita

**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN**

.....

.....

Dr. Mg. Pedro Díaz.

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN**

.....

.....

Méd. Diana Avilés, PhD

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN**

.....

## ÍNDICE

Portada .....	i
Declaración de originalidad .....	ii
Derechos de autor .....	iii
Índice .....	v
Índice de tablas .....	viii
Resumen.....	ix
Summary .....	x
Capítulo I .....	1
Introducción .....	1
Capítulo II .....	4
Revisión de literatura o marco teórico .....	4
2.1. Antecedentes investigativos.....	4
2.2. Categorías fundamentales o marco conceptual.....	7
2.2.1. Aceites esenciales .....	7
2.2.2. Cepas bacterianas.....	9
2.2.3. Medios de cultivo.....	11
2.2.4. Métodos de estudio de la sensibilidad .....	12
2.2.5. Unidad de análisis .....	13
Capítulo III.....	15
3.1 Hipótesis .....	15
3.2. Objetivos.....	15
3.2.1. Objetivo general:.....	15
3.2.2. Objetivos específicos: .....	15
Capítulo IV .....	16
Materiales y métodos .....	16
4.1. Ubicación geográfica .....	16
4.2. Características del lugar.....	16
4.3. Equipos y materiales .....	16
4.3.1. Material experimental .....	16
4.3.2. Agentes biológicos.....	16

4.3.3. Equipos .....	17
4.3.4. Materiales de laboratorio .....	17
4.3.5. Sustancias o reactivos .....	17
4.4. Factores en estudio.....	18
4.5. Tratamientos .....	18
4.6. Diseño experimental .....	19
4.7. Manejo de la investigación .....	19
4.7.1. Obtención del material biológico.....	19
4.7.2. Obtención del material experimental.....	20
4.7.3. Elaboración de las concentraciones de aceite de eucalipto.....	20
4.7.4. Elaboración de medios de cultivo.....	20
4.7.5. Activación de las cepas.....	20
4.7.6. Preparación de discos de sensibilidad.....	20
4.8. Variables respuesta .....	21
4.8.1. Concentración mínima inhibitoria (cmi).....	21
4.8.2. Concentración mínima bactericida (cmb).....	22
4.8.3. Sensibilidad bacteriana .....	22
4.9. Procesamiento de la informacion.....	22
Capítulo V.....	23
Resultados y discusión.....	23
5.1. Resultados.....	23
5.1.1. Concentración mínima inhibitoria (cmi).....	23
5.1.2. Concentración mínima bactericida (cmb).....	24
5.1.3. Prueba de difusión por disco.....	24
5.2. Discusión .....	25
Capítulo VI .....	27
Conclusiones, bibliografía y anexos .....	27
6.1. Conclusiones.....	27
6.2. Referencias bibliográficas.....	28
6.3. Anexos .....	36
Capitulo VII.....	43
Propuesta.....	43
7.1. Datos informativos.....	43

7.2. Antecedentes de la propuesta.....	43
7.3. Justificación .....	43
7.4. Objetivos.....	43
7.5. Análisis de factibilidad .....	44
7.6. Fundamentación.....	44
7.7. Metodología, modelo operativo.....	44
7.8. Administración.....	44
7.9. Previsión de la evaluación .....	45

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones meteorológicas .....	16
Tabla 2. Cepas y concentraciones del aceite de eucalipto ( <i>Eucalyptus spp.</i> ) .....	19
Tabla 3. Número de tratamientos y repeticiones para <i>Echerichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> .....	19
Tabla 4. Concentraciones del aceite esencial de Eucalipto ( <i>Eucalyptus spp.</i> ) .....	20
Tabla 5. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de eucalipto ( <i>Eucaliptus spp.</i> ) .....	23
Tabla 6. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del aceite esencial de Eucalipto ( <i>Eucaliptus spp.</i> ) .....	24



## RESUMEN

El objetivo del proyecto de investigación fue evaluar *in vitro* el efecto antimicrobiano del aceite esencial de Eucalipto (*Eucalyptus spp.*) sobre cepas certificadas de *Escherichia coli* ATCC25922 y *Staphylococcus aureus subsp. aureus* ATCC292113; en el cual se evaluaron diluciones del aceite de eucalipto 30%, 60% y 90% con etanol al 98%. Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria utilizando el método de microdilución en caldo, cada inóculo bacteriano fue estandarizado al 0,5 de la escala de MacFarland en el espectrofotómetro, obteniendo como resultado que los tubos al 60% y 90% de aceite de eucalipto no presentaron turbidez para *Escherichia coli*, característica similar que presentó la cepa *Staphylococcus aureus subsp. aureus* en las diluciones al 60% y 90%, también se determinó la Concentración Mínima Bactericida por medio de la siembra de las diluciones mencionadas anteriormente en el agar Mueller-Hinton en la cual no se observó crecimiento de colonias al 60% y 90% para las dos cepas evaluadas. La prueba de difusión por disco mostró la sensibilidad de las cepas evaluadas al aceite de eucalipto, presentando para *Escherichia coli* un halo mínimo de 10,25mm al 30% y un diámetro máximo de 10,95mm al 90% mientras que para la cepa *Staphylococcus aureus subsp. aureus* obtuvimos como valor mínimo 10,95mm al 30% y un valor máximo 14,45mm al 60% de dilución. El aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus spp.*) presenta propiedades antibacterianas para bacterias Gram negativas *Escherichia coli* y Gram positivas *Staphylococcus aureus subsp. aureus*.

**Palabras claves:** Concentración Mínima Inhibitoria, Concentración Mínima Bactericida, MacFarland, Mueller-Hinton, espectrofotómetro.

## SUMMARY

The objective of the research project was to evaluate in vitro the antimicrobial effect of Eucalyptus essential oil (*Eucalyptus spp.*) on certified strains of *Escherichia coli* ATCC25922 and *Staphylococcus aureus subsp. aureus* ATCC292113; in which dilutions of eucalyptus oil were evaluated 30%, 60% and 90% with 98% ethanol. The Minimum Inhibitory Concentration was determined using the broth microdilution method, each bacterial inoculum was standardized to 0.5 of the MacFarland scale in the spectrophotometer, obtaining as a result that the 60% and 90% eucalyptus oil tubes did not present turbidity for *Escherichia coli*, similar characteristic that presented the strain *Staphylococcus aureus subsp. aureus* in the 60% and 90% dilutions, the Bactericidal Minimum Concentration was also determined by seeding the dilutions mentioned above in the Mueller-Hinton agar in which no growth of colonies was observed at 60% and 90% for the two strains evaluated. The disc diffusion test showed the sensitivity of the evaluated strains to eucalyptus oil, presenting for *Escherichia coli* a minimum halo of 10.25mm at 30% and a maximum diameter of 10.95mm at 90% while for the *Staphylococcus aureus strain subsp. aureus* obtained a minimum value of 10.95mm at 30% and a maximum value of 14.45mm at 60% dilution.

Eucalyptus essential oil (*Eucalyptus spp.*) Has antibacterial properties for Gram-negative *Escherichia coli* and Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus sbsp.aureus*.

Keywords: Minimum Inhibitory Concentration, Bactericidal Minimum Concentration, MacFarland, Mueller-Hinton, spectrophotometer.

## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN

El empleo de sustancias naturales en el tratamiento de procesos patológicos, constituye en la actualidad un desafío en la medicina, sin duda el reino vegetal ofrece variedad de sustancias potencialmente útiles (Stockwell, 1988). Entre los productos naturales, los aceites esenciales y las plantas medicinales han recibido especial atención como posibles agentes naturales para la conservación de los alimentos (Burt, 2004). De hecho, se ha informado que los aceites esenciales y sus componentes principales poseen un amplio espectro de actividad antimicrobiana (Gachkar *et al.*, 2007).

En las últimas décadas, la demanda de productos derivados de plantas para usos terapéuticos se ha incrementado (Hermann, & Von Richter, 2012). Países en vías de desarrollo utilizan plantas aromáticas en la atención primaria de salud en las zonas rurales siendo las más utilizadas salvia, tomillo, orégano, canela y también el eucalipto (Kamatou, 2005). El 80% de las poblaciones de los países en desarrollo utilizan estos recursos tradicionales (Begossi, 1996), con la utilización de plantas medicinales se hace énfasis en la fitoterapia como una alternativa al tratamiento de procesos patológicos, ya que hace mucho tiempo las plantas medicinales son vistas como medicamentos no químicos de la naturaleza (Veiga-Junior 2008). El uso de aceites esenciales tiene fines clínicos de gran importancia en la investigación científica y la aplicación industrial por sus diferentes actividades biológicas como antimicrobianos (Lo Cantore *et al.*, 2009), antioxidantes (Dutra *et al.*, 2008) y antiinflamatorios (Chao *et al.*, 2005).

El eucalipto es un árbol de la familia Myrtaceae, que incluye 140 géneros y unas 900 especies y subespecies (Vecchio *et al.*, 2016), las especies de eucaliptos son bien conocidas como una fuente rica en aceites esenciales, se las obtienen por medio del método de arrastre de vapor o de hidrodestilación (Singh *et al.* 2012; Marzough *et al.* 2011). El efecto biológico de gran interés investigativo que presenta el eucalipto es la actividad antimicrobiana, propiedad que radica en su composición química al contener el compuesto 1,8-cineol (Tyagi & Malik, 2011).

La resistencia a los antimicrobianos plantea una grave amenaza para el tratamiento efectivo de infecciones causadas por bacterias, hongos y virus, en todo el mundo, la resistencia a los antibióticos está aumentando en bacterias como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, informaron una susceptibilidad antibiótica reducida, que excedió el 50% en la mayoría de los países que proporcionaron datos al Informe mundial de vigilancia de la resistencia antimicrobiana de la OMS (OMS, 2014). Con el aumento de la resistencia de patógenos al utilizar antibacterianos sintéticos y la tendencia actual por parte de los consumidores de no adquirir productos con este tipo de sustancias, se ha generado un interés considerable en la investigación de los aceites esenciales como agentes antimicrobianos (Yáñez & Cuadro 2012). Esta resistencia creciente ha generado la necesidad de desarrollar nuevos agentes antimicrobianos, los aceites esenciales son buenos candidatos y sus compuestos aislados, incluidos terpenos y terpenoides (1,8-cineol, carvacrol) y compuestos aromáticos (cinamaldehído y eugenol) tienen actividad antimicrobiana contra una amplia gama de patógenos, con diversos espectros de actividad (Bassole & Juliani 2012).

Se define como aceite esencial a una mezcla compleja de componentes como hidrocarburos, que presentan alta volatilidad evaporándose al hacer contacto con el aire (Bello, 1999), se los obtiene a partir de las diferentes partes de las plantas flores, semillas, hojas, yemas, ramas, corteza, frutos y raíces (Burt, 2007), a los aceites esenciales se les considera productos del metabolismo secundario de las plantas como alcaloides, flavonoides, saponinas y taninos (Bandoni *et al.*, 2009; Madsen & Bertelsen 1995). La actividad bactericida y antifúngica de estas sustancias está estrechamente relacionada con los fenoles y monoterpenos que poseen, debido a que son capaces de tener una interacción directa con el citoplasma del patógeno o bien, gracias a su hidrofobicidad pueden incorporarse a los lípidos de la membrana celular bacteriana en donde se da lugar a una fuga de iones y otros compuestos de la bacteria (Asbahani, 2015). Los efectos antimicrobianos de los aceites esenciales están relacionados con su composición y efectos citotóxicos que causan daño a la membrana celular, los compuestos de los aceites esenciales son lipofílicos y pasan a través de la pared celular y la membrana citoplásmica interrumpiendo la estructura de las capas de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos, haciendo que la membrana sea permeable (Bakkali *et al.*, 2008).

El presente trabajo de investigación tiene como propósito comprobar la actividad antimicrobiana in vitro del aceite esencial de Eucalipto (*Eucalyptus spp.*) sobre las cepas bacterianas de *Escherichia coli* y *Sphylococcus aureus subsp. aureus*.

## CAPÍTULO II

### REVISIÓN DE LITERATURA O MARCO TEÓRICO

#### 2.1.ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Según Reyes et al., (2012), en su investigación sobre los aceites esenciales como alternativa de antimicrobianos naturales, demostraron que los aceites derivados de las plantas poseen efectos antibacterianos, descubriendo que los componentes químicos como el 1,8-Cineol, carvacrol, eugenol son los responsables de este efecto y entre los métodos más usados para la evaluación antimicrobiana se incluye: dilución, difusión, caja Petri invertida y cámara hermética.

Brochot et al., (2017) mostró que en las mezclas de aceites de diferentes plantas incluida el aceite esencial de eucalipto (*E. globulus*) a 3.52% poseen una actividad altamente antibacteriana contra las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, presentando concentraciones inhibitorias para *Staphylococcus aureus* 0,38% y para *Escherichia coli* 0,75%, mientras que las concentraciones bactericidas mínimas fueron de 0,38% para *S. aureus* y 1,5% para *E. coli*.

Wayne (2015), menciona que para determinar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales se puede usar el método de difusión en placa para demostrar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por microdilución en caldo teniendo en cuenta los estándares de la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) M2-A7 y NCCLS M 27-A2 respectivamente.

Yáñez y Cuadro (2012) identificaron los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de *Eucalyptus globulus*, encontrando como componente primordial el 1,8-Cineol o Eucaliptol al 77 y 82%, el cual actúa en sinergia con otros principios activos antibacterianos, tales como: -Pineno, Limoneno, -Terpineno, -Copaeno, Guaiol, -Terpinen-4-ol y -Terpineol.

En el estudio de Ait-Ouazzou *et al.*,(2011) el aceite esencial extraído de *Eucalyptus globulus* presentó un solo compuesto, el 1,8-cineol, que representó el 79,85% del aceite que es el compuesto que se relaciona con el efecto antibacteriano, aunque se identificaron otros 18 compuestos: limoneno, p-cimeno y  $\alpha$ -terpineno, también se encontraron en el aceite de *Eucalyptus globulus* como componentes principales, por lo tanto, este aceite esencial también mostró un alto contenido de monoterpenos oxigenados (80,65%).

Según Burt (2007), la composición química del aceite esencial del eucalipto es muy diverso teniendo como componente principal el cineol o eucaliptol, el mismo que le da la acción bactericida además encontraron: terpineol, carburos terpénicos, alcoholes alifáticos, aldehídos y cetonas.

En el estudio de Safaei-Ghomi & Ahd (2010), la CMI del aceite de la mayoría de especies de eucalipto se halla en el rango de 100 a 1000 ppm para la mayoría de bacterias, debido a las diferencias en composición de los diferentes aceites, el método utilizado contra la cepa de *Escherichia coli* muestra una la CMI de 500 ppm, contra *Bacillus subtilis* la CMI de 125 ppm, *Staphylococcus aureus* 250 ppm y finalmente *Candida albicans* de 125 ppm.

Según Gilles *et al.*,(2010), de las cinco concentraciones de aceite esencial que analizaron (20%, 40%, 60%, 80% y 100%) en el estudio de la actividad antibacteriana, a partir del método de difusión en disco el AE de la especie *Eucalyptus globulus* en una concentración del 40%, obtenido por el método arrastre de vapor y con hojas secas, bajo las condiciones estipuladas del estudio, demostró poseer mayor eficacia en cuanto a la actividad antibacteriana frente a las cinco cepas de interés: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus subtilis* y *Enterococcus faecalis*; el aceite esencial foliar de la especie *Eucalyptus globulus* presentó la CMI más bajas frente a las bacterias Gram positivas, tales como: *E. faecalis*, *B. subtilis* y *S. aureus* con valores de 23.4  $\mu\text{g/mL}$ , 16.5  $\mu\text{g/mL}$ , 12.4  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente.

Según Vieira *et al.*,(2017), los resultados obtenidos del método de difusión en disco de agar contra *Staphylococcus aureus* reportaron un valor de 36mm y para la cepa de

*Escherichia coli* los halos formados tuvieron un valor de 9mm utilizando el aceite de *Eucalyptus globulus Labill*, todos los aceites esenciales utilizados para este estudio presentaron actividad antimicrobiana contra las bacterias probadas, con la excepción de los aceites esenciales de *R. officinalis*, *F. vulgare* y *F. vulgare* que no mostraron ningún efecto contra *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Domingo (2010), menciona que los aceites esenciales elaborados con hoja de eucalipto tienen un compuesto orgánico volátil llamado eucaliptol o 1,8-cineol el mismo que le da propiedades antisépticas eficaces contra patógenos respiratorias en humanos.

Medina *et al.*, 2013, determinaron la susceptibilidad de las cepas de *Escherichia coli* ATCC25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC25933, bacterias Gram negativas y Gram positivas respectivamente ante aceites esenciales de *Allium sativum*, *Cinnamomum verum* y *Dysphania ambrosioides* que presentan una composición química similar a la del aceite esencial de eucalipto que son responsables del efecto antimicrobiano de los extractos estudiados en la mencionada investigación, para tal objetivo se realizaron ensayos de susceptibilidad antimicrobiana mediante la metodología de difusión radial en placa de agar y consistió en medición del halo de inhibición del crecimiento bacteriano de acuerdo a las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Salazar *et al.*, (2009), determinó en 10 productos herbolarios que contenían *A. sativum*, *Peumus boldus*, *Eucalyptus globulus*, *Mentha piperita*, ninguno de ellos presentó actividad contra *Escherichia coli* con la máxima concentración analizada (1000 mg/mL), mientras que por otro lado seis productos que contenían *P. boldus*, *E. globulus* y *S. officinalis* fueron los más activos contra *Staphylococcus aureus* con valores de MIC 500 a 62.5 mg/mL.

Patra y Saxena (2010), mencionan que adicionar en el alimento concentraciones de aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus spp.*), eneldo (*Anethum graveolens*), orégano (*Origanum vulgare*), canela (*Cinnamomum verum*), hinojo (*Foeniculum vulgare*), enebro (*Juniperus communis*), pino insigne (*Pinus mugos*), clavo (*Syzygium*



*aromaticum*) o tomillo (*Thymus vulgaris*), inhibe el crecimiento de algunas bacterias metanogénicas del rumen (*Methanobrevibacter smithii*, *M. ruminantium*, *Methanosphaera stadtmanae*) referencia significativa para el efecto antibacteriano de los aceites esenciales derivados de plantas.

Pecarski et al., (2014), en el estudio de evaluar y comparar la actividad antimicrobiana de cuatro aceites esenciales que pertenecen a la familia Lamiaceae (salvia, orégano, tomillo) y aceite de eucalipto (*Eucalyptus globules*), muestra que todos los aceites esenciales presentan un gran potencial de actividad antimicrobiana contra varias bacterias y levaduras de *Cándida albicans*, utilizando la difusión de agar método con pozos.

Elaissi (2012), la actividad de los aceites esenciales de Eucalyptus varia significativamente dentro de las especies y dentro de las cepas, la fuerte actividad antimicrobiana se relaciona no solo con un alto contenido de un componente principal como 1,8-cineol, las bacterias Gram positivas *S. aureus* y *Enterococcus faecalis* son las más sensibles, mientras que las bacterias Gram negativas *P. aeruginosa* y *Escherichia coli* son las más resistentes, el aceite de eucalipto tiene una perspectiva interesante en la aplicación terapéutica para el tratamiento de algunas infecciones bacterianas.

## **2.2.CATEGORÍAS FUNDAMENTALES O MARCO CONCEPTUAL**

### **2.2.1. ACEITES ESENCIALES**

Los aceites son sustancias olorosas obtenidas a partir de plantas mediante destilación en corriente de vapor o por expresión del material vegetal, los aceites esenciales se caracterizan por ser una mezcla compleja de varios compuestos de aromas volátiles pertenecientes a diferentes clases de la química orgánica: hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres y fenoles. (Bakkali *et al.*, 2008). Los AE son el producto final del metabolismo secundario de las plantas aromáticas, constituidos por terpenos con actividad y composición variada; después de la extracción generalmente son líquidos y rara vez sólidos o pastosos, diversas investigaciones han permitido establecer su actividad antibacteriana, antimicótica, antiparasitaria, antiviral e insecticida (Alzamora *et al.*, 2001).

## **EUCALIPTO (*Eucalyptus spp.*)**

### **➤ Descripción**

*Eucalyptus* (*Eucalyptus spp.*), es un gran género de la familia *Myrtaceae*, que incluye 900 especies y subespecies (Vecchio *et al* 2016). Este árbol alto siempre verde es nativo de Australia y Tasmania (Elliot, & Jones, 1990). En la antigüedad, la planta de eucalipto fue utilizada por los aborígenes para diversos propósitos, como medicina y como alimento, hoy en día, la planta se utiliza en silvicultura (madera, combustible, pulpa de papel), plantación ambiental (control de la erosión hídrica y eólica), como fuente de aceites esenciales (aceites medicinales, perfumería) (Elliot, W. R., & Jones, D. L.1990). Entre todas las especies de eucaliptos australianos, *E. globulus*, se introdujeron ampliamente en el extranjero (Damjanovi -Vratnica 2011), y se cultivaron en gran parte en las regiones subtropicales y mediterráneas, se utiliza considerablemente en la industria de la celulosa, así como para la producción de aceite de eucalipto, se extrae a escala comercial en muchos países y se adopta en perfumería, cosméticos, alimentos, bebidas, aromaterapia y fitoterapia (Takahashi, 2004). Las plantas de eucalipto llaman la atención de los investigadores y ecologistas de todo el mundo porque representan una fuente de madera de crecimiento rápido, así como una fuente de petróleo utilizada para varios propósitos, el aceite se extrae de hojas, frutos, cogollos y corteza mostrando actividades antibacterianas, antisépticas, antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas (Dixit *et al.*,1997),mientras que (Egawa *et al.*,1977) describe que por esta razón se utiliza en el tratamiento de enfermedades respiratorias (Silva 2003 y Williams 1998).

El aceite esencial de *Eucalyptus* presenta propiedades antisépticas, bactericidas e insecticidas; esto último se debe a la presencia de 1,8-cineol, compuesto característico del género *Eucalyptus*, que ha sido considerado como un fumigante; además, no es tóxico para mamíferos, es de bajo costo, constituye un recurso renovable, posee un manejo que produce abundante follaje como residuo (Mossi *et al.* ,2011).

### **➤ Composición Química**

El Eucalipto es una rica fuente de compuestos fitoquímicos como flavonoides, alcaloides, taninos y propanoides de la hoja, el tallo y la raíz de la planta (Dixit *et al.*, 2012). Varios componentes volátiles como aromadendreno 1,8-cineol (eucaliptol), -

gurjunene, globulol,  $\beta$ -pinene, pipertone, -,  $\beta$ -y -terpinen-4-ol, y allo-aromadendrene tanto en hojas como en brotes, el eucaliptol es, en particular, el componente principal y el más importante encontrado en el eucalipto, también en brotes de la planta se encuentra borneol, ácido caproico, citral, eudesmol, fenchone, p-mentano, myrecene, myrtenol, -terpineol, verbinona, asparagina, cisteína, glicina, ácido glutámico, ornitina y treonina (Boulekbache-Makhlouf *et al.*, 2010), el eucaliptol representa el 79.85% de la composición química total (Stackpole *et al.*, 2011).

### ➤ Descripción Botánica

Es una especie heliófita que requiere plena exposición para su crecimiento, las hojas son pecioladas, lanceoladas, desprovistas de vellosidades, tienen una coloración verde mate, las hojas adultas son peciolas de 1 a 3 cm, miden por lo regular de 12 a 22 cm de largo por 0,8 a 1,5 cm de ancho, pinatinervias e irregularmente anastomosadas (Brako & Zarucchi, 1993).

### ➤ Clasificación Taxonómica del *Eucalyptus*

Reino: Plantae

Filo: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Myrtales

Familia: Myrtaceae

Género: *Eucalyptus*

Especie: *Eucalyptus spp.*

## 2.2.2. CEPAS BACTERIANAS

### *Staphylococcus aureus subsp. aureus ATCC292113*

*Staphylococcus aureus* es un patógeno oportunista responsable de un amplio espectro de enfermedades, que van desde infecciones de piel y tejidos blandos hasta neumonía; desde su descubrimiento por el médico Alexander Ogston en 1880, *Staphylococcus aureus* es considerado uno de los patógenos más relevantes hoy en día por su virulencia,

su habilidad para causar distintos tipos de infecciones y su capacidad para adaptarse a diferentes condiciones ambientales (Cervantes *et al.*, 2014).

#### ➤ **Características microbiológicas**

El género *Staphylococcus* está formado por cocos gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5µm, agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas, Ogston introdujo el nombre de *Staphylococcus*, del griego *staphyle* que significa racimo de uvas, para describir a los cocos responsables de inflamación y supuración, son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula, aunque existen algunas cepas que desarrollan una cápsula de limo, son anaerobias facultativas y la mayoría de los estafilococos producen catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre); característica que se utiliza para diferenciar el género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalasa negativos (Kuroda *et al.*, 2001).

El género *Staphylococcus* es relativamente resistente a altas temperaturas, la resistencia a la desecación es notable; pueden permanecer infecciosos en el medio ambiente durante largos períodos (Almeida, 2013).

#### ➤ **Características morfológicas**

La pared celular del *S. aureus* contiene polisacáridos, proteínas antigénicas y otras sustancias, el péptidoglucano suministra el exoesqueleto rígido de la pared celular, el péptidoglucano es importante en la patogenia de la infección así induce la producción de interleucina-1 (pirógeno, endógeno) y de anticuerpos opsónicos en los monocitos; y puede atraer químicamente a los leucocitos polimorfos nucleares, posee actividad parecida a endotoxina, los ácidos teicoicos, polímeros de glicerol o fosfato ribitol, están unidos al péptidoglucano de la bacteria, algunas cepas del *Staphylococcus aureus* poseen cápsulas que inhiben la fagocitosis por los leucocitos polimorfos nucleares a menos que se encuentren presentes anticuerpos específicos, la mayor parte de las cepas de *Staphylococcus aureus* poseen coagulasa, o factor de coagulación sobre la superficie de la pared celular; la coagulasa se une de manera no enzimática al fibrinógeno y produce la agregación de las bacterias (Almeida, 2013).

## ***Escherichia coli***

La *E. coli* es una bacteria que se encuentra normalmente en el tracto gastrointestinal de los seres humanos y animales de sangre caliente, debido a su elevada presencia en el tracto gastrointestinal y en las heces, la *Escherichia coli* se utiliza como el indicador principal de contaminación fecal en la evaluación de la inocuidad de los alimentos y el agua; la mayoría de las *Escherichia coli* son organismos comensales inofensivos cuando se encuentran en su hábitat intestinal natural, las *E. coli* patógenas se distinguen de otras *E. coli* por su capacidad de provocar enfermedades mediante mecanismos genéticamente controlados, como la producción de toxinas, la adhesión e invasión de células huésped, la interferencia con el metabolismo celular y la destrucción de tejidos (Brandl, 2006).

- **Características microbiológicas**

La bacteria *E. coli* se caracteriza por ser un bacilo Gram negativo, no esporulante, producción de indol a partir de triptófano, no utilización de citrato como fuente de carbono y no producción de acetoina además, fermenta la glucosa y la lactosa con producción de gas. Como todas las bacterias Gram negativas, la cubierta de *Escherichia coli* consta de tres elementos: la membrana citoplasmática, la membrana externa y, entre ambas, un espacio periplásmico constituido por péptido-glucano, esta última estructura confiere a la bacteria su forma y rigidez, y le permite resistir presiones osmóticas ambientales relativamente elevadas, la *Escherichia coli* es una bacteria mesófila, su óptimo de desarrollo se encuentra en el entorno de la temperatura corporal de los animales de sangre caliente (Benvenuto, 2017).

### **2.2.3. MEDIOS DE CULTIVO**

Un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos (Solano, 2005).

#### **a) Medios de cultivo no selectivos**

Son aquellos que permiten el crecimiento de una gran variedad de microorganismos (Castro, 2014).

- **Caldo cerebro-corazón.-** La infusión de cerebro y corazón ha resultado ser efectiva en el cultivo de una amplia variedad de microorganismos, incluidos muchos tipos de patógenos, se ha utilizado como medio base para las nuevas fórmulas de medios de cultivo cuando se suplementa con sangre o agentes selectivos (Casado *et al.*, 2012).

#### **b) Medios de cultivo selectivo**

Son aquellos que permiten el crecimiento de un tipo de microorganismos determinado, inhibiendo el desarrollo de los demás (Castro, 2014).

- **Agar Manitol salado.-** es un medio de cultivo que se utiliza normalmente en microbiología, permite el crecimiento de un determinado grupo de bacterias mientras que inhibe el crecimiento de otras, este medio es importante en el laboratorio clínico debido a que es capaz de distinguir los microorganismos patogénicos en un corto periodo de tiempo, contiene una alta concentración (- 7.5%-10%) de sal (NaCl), haciéndolo selectivo para *Staphylococcus* debido a que el nivel de NaCl es inhibitorio para la mayoría de las bacterias (Casado *et al.*, 2012).
- **Agar Mueller Hinton.-** es un medio utilizado para realizar las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en microorganismos aeróbicos por el método de Bauer-Kirby, debido a su contenido en inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina es bajo, la mayoría de los patógenos microbianos crece satisfactoriamente (Rivas, Miliwebsky, & Deza, 2007).
- **Agar MacConkey.-** las sales biliares y el cristal violeta ejercen una inhibición significativa sobre las bacterias gram positivas, la lactosa y el indicador rojo neutro permiten comprobar la degradación de ese disacárido; las colonias lactosa positivas (*Escherichia coli*) aparecen roja con halo turbio; las lactosas negativas (*Salmonella spp.*) son incoloras (Gentilini *et al.*, 2007).

#### **2.2.4. MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD**

El estudio de la sensibilidad bacteriana es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica pero la determinación de la sensibilidad no implica solo realizar un conjunto de técnicas y medir los resultados, es necesario saber

interpretar los mismos y darles el significado que realmente tienen, para la determinación de la sensibilidad se han utilizados métodos cuantitativos que permiten determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM) y los métodos cualitativos (disco difusión); son aquellos que permiten clasificar directamente a un microorganismo como sensible o resistente, siendo uno de los métodos más utilizados en la práctica diaria por la obtención de datos de manera rápida y la interpretación de los resultados (Wikler, 2006).

- **Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

Es la concentración mínima capaz de inhibir el crecimiento de microorganismos, cuando la CMI sea menor, la susceptibilidad del microorganismo será mayor al fármaco usado (Botana, 2002).

- **Concentración Mínima Bactericida (CMB)**

Corresponde a la mínima concentración de antibiótico que elimina el 99,9 % del número original de bacterias. Refleja la capacidad de un fármaco de disminuir de forma sustancial el número de bacterias (Botana, 2002).

- **Método de difusión por disco.**

Consiste en depositar, en la superficie del agar de una caja petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes sustancias, tan pronto el disco impregnado de la sustancia se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y la sustancia difunde al agar, la sustancia difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición (Estrada, 2010).

### **2.2.5. Unidad de Análisis**

Cervantes et al., (2014) clasifican taxonómicamente *Staphylococcus aureus subsp. aureus* de la siguiente manera:

- **Taxonomía**

- Dominio: Bacteria
- Filo: Firmicutes

- Clase: Bacili
- Orden: Bacillales
- Familia: Staphylococcaceae
- Género: *Staphylococcus*
- Especie: *S. aureus*
- Subespecie: *aureus*

Haugen et al., (2007) clasifican taxonómicamente *Escherichia coli* de la siguiente manera:

➤ **Taxonomía**

- Dominio: Bacteria
- Filo: Proteobacteria
- Clase: Gammaproteobacteria
- Orden: Enterobacteriales
- Familia: Enterobacteriaceae
- Género: *Escherichia*
- Especie: *E. coli*



## CAPÍTULO III

### 3.1 HIPÓTESIS

Las cepas bacterianas certificadas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* presentan sensibilidad bacteriana al aceite de eucalipto (*Eucalyptus spp.*).

### 3.2. OBJETIVOS

#### 3.2.1. Objetivo General:

Evaluar in vitro el efecto antimicrobiano del aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus spp.*) sobre cepas certificadas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus subsp. aureus*.

#### 3.2.2. Objetivos Específicos:

1 Determinar la concentración del aceite de eucalipto (30%, 60% y 90%) de mayor sensibilidad para las cepas bacterianas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus subsp. aureus*.

2 Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) del aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus spp.*) sobre cepas certificadas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus subsp. aureus*.

3 Determinar la sensibilidad bacteriana mediante halos de inhibición al aplicar aceite de eucalipto (*Eucalyptus spp.*) en las cepas bacterianas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus subsp. aureus*.

## CAPÍTULO IV

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1. UBICACIÓN GEOGRÁFICA

La presente investigación se realizó en la Universidad Técnica de Ambato, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias campus Querochaca ubicado a 1km de la vía Cevallos-Quero de la provincia de Tungurahua con las coordenadas geográficas: Latitud 1°22'3.45"S, Longitud 78°36'30.75"O y una altitud de 2883 msnm.

#### 4.2. CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR

La investigación se desarrolló en el laboratorio de Bacteriología de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, en el que se maneja un ambiente controlado con condiciones ambientales de 19 °C y 40 % de humedad. Las condiciones meteorológicas del campus Querochada se presentan en la tabla 1.

**Tabla 1. Condiciones meteorológicas**

PARÁMETRO	VALOR
Temperatura:	13°
Humedad relativa:	78%
Precipitación:	10mm
Vientos:	11Km/hora

#### 4.3. EQUIPOS Y MATERIALES

##### 4.3.1. Material Experimental

- Aceite esencial de Eucalipto (*Eucalyptus spp.*)

##### 4.3.2. Agentes Biológicos

- Cepa bacteriana *Staphylococcus aureus subsp. aureus ATCC292113*
- Cepa bacteriana *Echerichia coli ATCC25922*

#### **4.3.3. Equipos**

- Cámara de flujo laminar
- Incubadora
- Agitador magnético con calentador.
- Refrigeradora
- Autoclave
- Espectrofotometro

#### **4.3.4. Materiales de laboratorio**

- Utensilios y vidriería de laboratorio.
- Pipetas volumétricas de 1 ml, 5 ml, y 10 ml.
- Discos en blanco de sensibilidad bacteriana marca OXOID.
- Pizeta.
- Lámparas de alcohol.
- Papel aluminio.
- Asas metálicas.
- Cajas Petri desechables.
- Aspersor (atomizador).
- Espátulas.
- Algodón.
- Gasa.
- Cepillos para limpieza de materiales.
- Mascarillas.
- Mandiles.
- Guantes.
- Gorros.
- Calculadora.
- Cuaderno de Apuntes.
- Esferos, lápices.

#### **4.3.5. Sustancias o Reactivos**

- Agar Muller Hinton.
- Agar MacConkey.

- Agar Sal Manitol
- Caldo Cerebro- Corazón.
- Suero fisiológico estéril.
- Tubo # 0.5 de la escala de McFarland.
- Etanol al 98%.
- Agua destilada.

#### **4.4.FACTORES EN ESTUDIO**

El proyecto de investigación tuvo como factores de estudio:

A) Aceite esencial de eucalipto (*Eucalytus spp.*)

A1. Testigo etanol al 98%

A2. 30% dilución del aceite de eucalipto con etanol

A3. 60% dilución del aceite de eucalipto con etanol

A4. 90% dilución del aceite de eucalipto con etanol

B) Cepas Bacterianas

B1. *Staphylococcus aureus subsp. aureus ATCC292113*

B2. *Echerichia coli ATCC25922*

#### **4.5.TRATAMIENTOS**

La investigación evaluó el efecto antimicrobiano sobre cepas certificadas de: *Echerichia coli ATCC25922* y *Staphylococcus aureus subsp. aureus ATCC292113* utilizando las siguientes diluciones (T, 30%, 60% y 90%) de aceite de eucalipto para las dos cepas, aplicándose en discos de sensibilidad marca Oxoid impregnados con 0,2ml de cada concentración del aceite de eucalipto y ubicados en la superficie del agar Muller Hinton. Con un total de 20 repeticiones, repartidas en cuatro discos por cada caja Petri. Los tratamientos se presentan en la tabla 2 y 3.

**Tabla 2. Cepas y concentraciones del aceite de eucalipto (*Eucalyptus spp.*)**

Cepas bacterianas	Aceite de Eucalipto
	T= etanol 98%
B1 <i>Echerichia coli</i>	A1= 30 %
B2 <i>Staphylococcus aureus subsp. Aureus</i>	A2= 60 %
	A3= 90%

B=Bacterias, T=Testigo, A=Aceite

**Tabla 3. Número de tratamientos y repeticiones para *Echerichia coli* y *Staphylococcus aureus subsp. aureus*.**

Número	Tratamientos	Descripción
T	Etanol 98%	
1	B1A1	Se realizó cinco repeticiones con 4 discos de sensibilidad empapados cada uno con 0,2ml de aceite de eucalipto al 30 %, 60%, y 90% respectivamente en cada caja petri y para cada cepa bacteriana, realizando el mismo proceso para el testigo empapados de etanol al 98%.
2	B1A2	
3	B1A3	
4	B2A1	
5	B2A2	
6	B2A3	

B=Bacteria, A=Aceite

#### 4.6.DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental utilizado fue el diseño completamente al azar (DCA) 2X4, con 20 repeticiones. Se realizó el análisis de varianza y la prueba de TUKEY al 5% para comparar los tratamientos.

#### 4.7.MANEJO DE LA INVESTIGACIÓN

##### 4.7.1. Obtención del material biológico

Las cepas certificadas *Echerichia coli* ATCC25922 y *Staphylococcus aureus subsp. aureus* ATCC292113 se las adquirió en el laboratorio MEDIBAC.

#### 4.7.2. Obtención del material experimental

El aceite de eucalipto se lo adquirió en la empresa SiFaL, mediante el método de destilación por arrastre de vapor con una concentración al 100% de pureza.

#### 4.7.3. Elaboración de las diluciones del aceite de eucalipto

Se utilizó etanol al 98% como solvente, las diluciones se calcularon mediante el método de dilución, las mismas fueron calculadas en 5 ml de volumen, como se observa en la tabla 4.

**Tabla 4. Diluciones del aceite esencial de Eucalipto (*Eucalyptus spp.*)**

SUSTANCIAS	DILUCIONES		
	30%	60%	90%
ETANOL AL 98%	3,5ml	2ml	0,5ml
ACEITE DE EUCALIPTO	1,5ml	3ml	4,5ml

#### 4.7.4. Elaboración de medios de cultivo

Se prepararon los medios de cultivo para la experimentación según lo recomendado por la casa comercial.

#### 4.7.5. Activación de las Cepas

Para la activación de las cepas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus subsp. aureus*, se hidrató las cepas bacterianas, según reporta la casa comercial, y se procedió a realizar la siembra en agar MacConkey para *Escherichia coli* y agar Manitol Salado para *Staphylococcus aureus subsp. aureus* por estriamiento con asa bacteriológica en caja petri rotulada.

#### 4.7.6. Preparación de discos de sensibilidad

Se ubicaron 20 discos de sensibilidad por cada concentración 30%, 60% y 90%, comprendidos en 4 discos por cada caja Petri, obteniendo un total de 5 cajas por cada concentración y un total de 20 repeticiones, posteriormente con ayuda de un pipeta de

pasteur se impregno 0.2ml para cada disco con las concentraciones respectivas de aceite de Eucalipto (*Eucalyptus spp.*).

#### **4.8.VARIABLES RESPUESTA**

##### **4.8.1. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

Se realizó de acuerdo con la metodología usada por Lujan (2006), para lo cual se tomó cuatro colonias bien aisladas de cada una de las cepas y con la ayuda de un asa bacteriológica se las transfirió a 5 ml de caldo Cerebro-Corazón y se dejó incubar a 37°C durante 2 horas hasta que se manifestó una turbidez ligeramente visible, mediante mediciones en el espectrofotómetro, con el fin de obtener un valor de 0.5 de absorbancia.

Posteriormente los tubos fueron incubados a 37° C por 24 horas y una vez transcurrido este tiempo los resultados fueron los siguientes:

##### **Cepa *Escherichia coli***

- En el tubo N° 1 se colocó 1 ml de la dilución de la cepa en caldo Cerebro-Corazón más 1 ml del aceite esencial de eucalipto al 30 %, obteniendo un valor de 640nm.
- En el tubo N° 2 se colocó 1 ml de la dilución de la cepa en caldo Cerebro-Corazón más 1 ml del aceite esencial de eucalipto al 60 %, obteniendo un valor de 542nm.
- En el tubo N° 3 se colocó 1 ml de la dilución de la cepa en caldo Cerebro-Corazón más 1 ml del aceite esencial de eucalipto al 90 %, obteniendo un valor de 539nm.

##### **Cepa *Staphylococcus aureus subps. aureus***

- En el tubo N° 1 se colocó 1 ml de la dilución de la cepa en caldo Cerebro-Corazón más 1 ml del aceite esencial de eucalipto al 30 %, obteniendo un valor de 615nm.
- En el tubo N° 2 se colocó 1 ml de la dilución de la cepa en caldo Cerebro-Corazón más 1 ml del aceite esencial de eucalipto al 60 %, obteniendo un valor de 450nm.

- En el tubo N° 3 se colocó 1 ml de la dilución de la cepa en caldo Cerebro-Corazón más 1 ml del aceite esencial de eucalipto al 90 %, obteniendo un valor de 480nm.

#### **4.8.2. Concentración Mínima Bactericida (CMB)**

Se tomó como referencia el procedimiento realizado por Sadiki et al., (2014) donde para establecer la CMB de las bacterias certificadas de *Staphylococcus aureus subsp aureus ATCC29213* y *Escherichia coli ATCC25922*, se tomaron los tubos y se sembró en agar Mueller Hinton dejando incubar a 37°C por 24 horas y posteriormente observando el crecimiento de colonias, la concentración al 30% identificó desarrollo de colonia para las dos cepas bacterianas, mientras que las concentraciones al 60% y 90% no existió crecimiento de colonias.

#### **4.8.3. Sensibilidad bacteriana**

Con un asa bacteriológica se tomó cuatro colonias por igual para cada cepa, posteriormente se inocularon en 5ml de caldo Cerebro-Corazón y se incubaron a 37°C por 2 horas hasta conseguir la turbidez del tubo N°5 de la escala de MacFarland evaluado por espectrofotómetro y una vez estandarizada la cepa se procedió a cultivar con ayuda de un hisopo estéril por estriado múltiple en agar Mueller Hinton, dejando reposar por 15 minutos antes de colocar los discos de sensibilidad OXOID impregnados con 0,2ml de cada concentración de aceite de Eucalipto y ubicándolos en cada caja petri. Con ayuda de una pinza estéril se colocó 4 discos de sensibilidad en la superficie de cada placa distribuidos, de forma que no se produjo superposición de los halos de inhibición y se llevó a incubación a 37°C por 24 horas y finalmente mediante el uso de una regleta se realizó la medición de los halos de inhibición.

### **4.9.PROCESAMIENTO DE LA INFORMACION**

El análisis estadístico, se realizó utilizando el Programa SPSS 2017 versión 23.



## CAPÍTULO V

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.1. RESULTADOS

##### 5.1.1. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

**Tabla 5. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus spp.*)**

Cepa	Inóculo estandarizado	Concentración Mínima Inhibitoria		
		30%	60%	90%
		Turbidez por espectofotometría		
<i>E. coli</i>	650nm	640nm	542nm	539nm
<i>S. aureus</i>	625nm	615nm	450nm	480nm

nm= Nanómetros

En la tabla 5 se presenta la Concentración Mínima Inhibitoria en las diluciones al 60% y 90% de aceite de Eucalipto para la cepa *Staphylococcus aureus subsp. aureus* con un valor de 450nm y 480nm respectivamente, mientras que para *Escherichia coli* las diluciones al 60% y 90% presento un valor de 542nm y 539nm respectivamente, determinando así que el aceite esencial de Eucalipto es eficaz al inhibir el crecimiento de ambas cepas bacterianas; tanto al 60% y 90% de dilución siendo de mayor efectividad para *Staphylococcus aureus subsp. aureus*.

### 5.1.2. Concentración Mínima Bactericida (CMB)

**Tabla 6. Concentración Mínima Bactericida (CMB) del aceite esencial de Eucalipto (*Eucalyptus spp.*)**

Cepa	Concentración Mínima Bactericida		
	30%	60%	90%
	Crecimiento de colonias		
<i>Escherichia coli</i>	+	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-

Positivo (+), Negativo (-)

En la tabla 6 se demuestra la Concentración Mínima Bactericida (CBM) en la cual no existió crecimiento de colonias en las diluciones al 60% y 90% del aceite de Eucalipto para las dos cepas bacterianas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus subsp. aureus* mientras que la dilución al 30% del aceite presentó un desarrollo de colonias para ambas cepas de la investigación.

### 5.1.3. Prueba de difusión por disco

**Tabla 7. Sensibilidad bacteriana (mm) del aceite de Eucalipto (*Eucalyptus spp.*) sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus subsp. aureus*.**

CEPAS	CONCENTRACIONES				
	30%	60%	90%	E.E	Valor de P
<i>E.coli</i>	10,25 <sup>b</sup>	10,65 <sup>ab</sup>	10,95 <sup>a</sup>	0,1230	<.0,01
<i>S. aureus</i>	10,95 <sup>b</sup>	14,45 <sup>a</sup>	13,65 <sup>a</sup>	0,4820	<.0,001

ab= Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). (E.E= Error estándar.

En la tabla 7 se demuestra el efecto antibacteriano del aceite esencial de eucalipto sobre ambas cepas bacterianas, siendo más específica para *Staphylococcus aureus subsp. aureus* a la dilución del 60% presentando un valor de 14,45mm, mientras que para la cepa *Escherichia coli* la dilución de mayor eficacia resulto ser del 90% con un valor de 10.95mm, las diluciones al 30% y 60% no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) ya que presentan valores de 10,25mm y 10,65mm respectivamente, misma relación que

se manifiesta con las diluciones al 60% y 90% con valores de 10,65mm y 10,95mm para la cepa de *Escherichia coli*; por otro lado los resultados para la cepa *Staphylococcus aureus subsp. aureus* muestra que las diluciones al 60% y 90% no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) siendo estadísticamente iguales con valores de 14,45mm y 13,65mm respectivamente, en relación al 30% con 10,95mm en los halos de inhibición.

Al analizar los resultados permiten aceptar la hipótesis planteada con respecto a la sensibilidad bacteriana del aceite esencial de Eucalipto (*Eucalyptus spp.*).

## 5.2. DISCUSIÓN

El aceite de eucalipto utilizado para la presente investigación mostró resultados positivos al inhibir *in vitro* el crecimiento de las cepas bacterianas *Escherichia coli* ATCC25922 y *Staphylococcus aureus subsp. aureus* ATCC292113; el uso indiscriminado de los antibióticos ha generado una respuesta de supervivencia por parte de los microorganismos estableciendo la temática de la resistencia bacteriana (Cabrera *et al.*, 2007), por lo cual se presenta como alternativa el empleo de productos naturales para reducir este problema, por lo que existe un gran interés en el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales radicando la importancia en su estructura química (Reyes *et al.*, 2012), conociendo así que los aceites esenciales son una opción ante la resistencia de antibióticos de cepas bacterianas muy perjudiciales para la salud (Esquivel *et al.*, 2010). Al analizar los resultados obtenidos en el método de difusión en agar, podemos considerar a esta metodología indicada para evaluar de forma cualitativa y cuantitativa la actividad antibacteriana del aceite de eucalipto misma metodología usada por Yáñez y Cuadro (2012); Sebei *et al.*, (2015); Pecarski *et al.*, (2014) y Ben Hassine *et al.*, (2012), la cual consiste en la medición de halos de inhibición generado por el agente antibacteriano al contacto con la cepa bacteriana (Cona, 2002).

En lo que respecta a la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria se evidenció un efecto marcado del aceite esencial de eucalipto al emplear diluciones al 30%, 60% y 90% sobre el crecimiento bacteriano de las cepas en estudio, demostrándose que la utilización de diluciones menores del aceite esencial de eucalipto como al 25% utilizada por Bachir y Benali (2012), posee la capacidad de reducir la CMI y la CMB, así como también al 20% empleada por Yáñez y Cuadro (2012), este mismo comportamiento reporta Brochot *et al.*, (2017), al utilizar 3,52% de cada uno de los aceites empleados eucalipto, canela, zanahoria y romero, mostrando efecto inhibitorio in

vitro sobre *S. aureus* y *E. coli*. El efecto antibacterial reportado en los estudios antes mencionados probablemente puede estar relacionado a la presencia de compuestos que tiene propiedades antimicrobianas, según Marzoug et al., (2011), esta se debe a la presencia de 1,8-cineol que presenta el aceite esencial de eucalipto, respaldado también por el estudio realizado por Elaissi et al., (2012) y Bugarin et al., (2014). En el estudio realizado por Ben Hassine et al., (2012) la actividad antibacteriana del aceite radica en la hidrofobicidad del mencionado compuesto químico, esta particularidad les permite estar cerca de la membrana de las células lipídicas de las bacterias, alterando la estructura celular y haciéndola permeable permitiendo así la fuga de algunos iones y otros metabolitos, y finalmente responsable de la muerte celular.

La prueba de sensibilidad antibacteriana del aceite de eucalipto sobre *Staphylococcus aureus subsp aureus* reportó un valor máximo de 14,45mm, al igual que Ait-Ouazzou et al.,(2011) presentó halos de 14mm como valor máximo, por otro lado Elaissi, et al., (2012) obtuvo halos de 9mm, mientras que Bugarin, et al.,(2014) demuestra que la actividad antibacteriana del aceite esencial de eucalipto fue más efectivo a una concentración del 100% de aceite contra esta cepa bacteria mostrando valores de 26mm de diámetro al igual que Bachir & Benali (2012), reportó un diámetro de 26,2mm siendo estos valores superior a los encontrados hasta el momento. El halo de inhibición de mayor diámetro que mostró la prueba de sensibilidad para *Escherichia coli* fue de 10,95mm, valor superior en comparación al que presentó Elaissi et al., (2012) que obtuvo un diámetro máximo de 8mm, Vieira et al., (2017) también obtuvo un diámetro máximo de halos de sensibilidad de 9mm por otro lado Bugarin et al (2014), encontró halos con valores de 18mm de diámetro, mientras que Ait-Ouazzou et al. (2011) no reporto halos para esta cepa bacteriana *E. coli*.

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS

#### 6.1. CONCLUSIONES

- Se evaluó *in vitro* el efecto antimicrobiano del aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus spp.*) sobre las cepas certificadas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus subsp aureus*, presentando inhibición del crecimiento bacteriano a partir de la dilución al 30%, 60% y 90% para cada cepa bacteriana evaluada.
- Se determinó la concentración de aceite de eucalipto de mayor sensibilidad para la cepa de *Escherichia coli* siendo esta al 90% y para *Staphylococcus aureus subsp aureus* la dilución de mayor sensibilidad fue al 60%.
- Determinamos la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus spp.*) sobre la cepa certificada de *Escherichia coli* obteniendo el mejor dato al 90% y para *Staphylococcus aureus subsp aureus* al 60% y la Concentración Mínima Bactericida no reportó crecimiento bacteriano para las cepas estudiadas.
- Se determinó la sensibilidad bacteriana mediante halos de inhibición al aplicar aceite de eucalipto (*Eucalyptus spp.*), obteniendo un diámetro eficaz de 14.45mm sobre la cepa *Staphylococcus aureus subsp aureus* y para *Escherichia coli* un diámetro de 10,95mm.

## 6.2. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bachir, R. G., & Benali, M. (2012). Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 2(9), 739-742.
- Acosta, L. O. (2000). *Composición química del aceite esencial de Thymus vulgaris L. "Tomillo" por Cromatografía de Gases-Espectómetro de Masa GC/MS y análisis de su actividad antimicrobiana* (Doctoral dissertation, Tesis para optar al título profesional del Químico Farmacéutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM. Lima).
- Ait-Ouazzou, A., Lorán, S., Bakkali, M., Laglaoui, A., Rota, C., Herrera, A., Pagán, R. and Conchello, P. (2011), Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Thymus algeriensis*, *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis* from Morocco. *J. Sci. Food Agric.*, 91: 2643–2651. doi:10.1002/jsfa.4505
- Almeida Laz, C. (2013). *Incidencia Staphylococcus aureus en la carne de pollo faenado que se expende en el mercado municipal del cantón Quevedo* (Bachelor's thesis, Universidad de Guayaquil. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia).
- Alzamora, L., Morales, L., Armas, L., & Fernández, G. (2001). Medicina tradicional en el Perú: Actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. In *Anales de la Facultad de Medicina* (Vol. 62, No. 2). Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- Bandoni, a. l., Retta, d., Di Leo Lira, p. m., & Baren, c. m. v. (2009). Son realmente útiles los aceites esenciales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(5).
- Bassolé, I. H. N., & Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17(4), 3989-4006.
- Begossi A. Use of ecological methods in ethnobotany: Diversity Indices. *Econ Bot* 1996; 50(3): 280-9. [<http://dx.doi.org/10.1007/BF02907333>]

- Bello, A. (1999). Estudios de aceites esenciales de especie Myrtaceae de la flora de Pinar del Río (Doctoral dissertation, Tesis de Maestría de Universidad del Río]. Brasil).
- Ben Hassine, D., Abderrabba, M., Yvon, Y., Lebrihi, A., Mathieu, F., Couderc, F., & Bouajila, J. (2012). Chemical composition and in vitro evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of *Eucalyptus gillii* essential oil and extracts. *Molecules*, *17*(8), 9540-9558.
- Benvenuto Vargas, V. P. (2017). Determinación de *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP) en agua de mar del Circuito de Playas de la Costa Verde.
- Boland, D. J., Brooker, M. I. H., Chippendale, G. M., Hall, N., Hyland, B. P. M., Johnston, R. D., ... & Turner, J. D. (Eds.). (2006). *Forest trees of Australia*. CSIRO publishing.
- Botana, L. (2002). Farmacología y Terapéutica Veterinaria. Getafe: McGRAWHILL.
- Brandl, M.T. 2006. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annual Review of Phytopathology*, *44*: 367–392
- Boulekbache-Makhlouf, L., Meudec, E., Chibane, M., Mazauric, J. P., Slimani, S., Henry, M., ... & Madani, K. (2010). Analysis by high-performance liquid chromatography diode array detection mass spectrometry of phenolic compounds in fruit of *Eucalyptus globulus* cultivated in Algeria. *Journal of agricultural and food chemistry*, *58*(24), 12615-12624.
- Brako, L., & Zarucchi, J. L. (1993). Catalogue of the flowering plants and Gymnosperms of Peru. Catálogo de las Angiospermas y Gimnospermas del Perú. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden.*, *45*, 1-1286.
- Brochot A, Guilbot A, Haddioui L, Roques C. antibacterial, antifungal, and antiviral effects of three essential oil blends. *MicrobiologyOpen*. 2017;6:e459. <https://doi.org/10.1002/mbo3.459>
- Bugarin, D., Grbovi, S., Ori, D., Miti-ulafi, D., Knežević, J., & Mimica-Duki, N. (2014). Essential oil of *Eucalyptus gunnii* Hook. as a novel source of antioxidant, antimutagenic and antibacterial agents. *Molecules*, *19*(11), 19007-19020.

- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- Burt, S. A. (2007). Antibacterial activity of essential oils: potential applications in food (Doctoral dissertation, Utrecht University).
- Cabrera, C., & Gomez, R., & Zúñiga, A. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Medica*, 38(2), 149-158.
- Casado, C., Torrico, G., & Medina, M. (2012). Medios de cultivo en un laboratorio de microbiología. *Revista de Internet*.
- Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61(1), 28-40.
- Chao, L. K., Hua, K. F., Hsu, H. Y., Cheng, S. S., Liu, J. Y., & Chang, S. T. (2005). Study on the antiinflammatory activity of essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(18), 7274-7278.
- Cona, T. (2002). Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. *Revista chilena de infectología*, 19, 77-81.
- Correa, J. S., Monteiro, E. A., Pavanelli, M. F., & Biazon, A. C. B. (2016). Influência do Extrato Hidroetanólico das Folhas de *Tropaeolum majus* na Restauração Tecidual em Lesões Cutâneas. *Saúde e Pesquisa*, 9(1), 101-109.
- Damjanovi -Vratnica, B., Đakov, T., Šukovi , D., & Damjanovi , J. (2011). Antimicrobial effect of essential oil isolated from *Eucalyptus globulus* Labill. from Montenegro. *Czech Journal of Food Sciences*, 29(3), 277-284.
- Dixit, A., Rohilla, A., & Singh, V. (2012). *Eucalyptus globulus*: A new perspective in therapeutics. *Int J Pharm Chem Sci*, 1(4), 1678-83.
- Domingo Santos, J. M. (2010). El Eucalipto y los Suelos bajo clima Mediterráneo.
- Dutra, R. C., Leite, M. N., & Barbosa, N. R. (2008). Quantification of phenolic constituents and antioxidant activity of *Pterodon emarginatus* vogel seeds. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(4), 606-614.



- Egawa, H., Tsutsui, O., Tatsuyama, K., & Hatta, T. (1977). Antifungal substances found in leaves of Eucalyptus species. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 33(7), 889-890.
- El Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. A., Casabianca, H., ... & Elaissari, A. (2015). Essential oils: from extraction to encapsulation. *International journal of pharmaceutics*, 483(1), 220-243.
- Elaissi, A., Rouis, Z., Mabrouk, S., Salah, K. B. H., Aouni, M., Khouja, M. L., ... & Harzallah-Skhiri, F. (2012). Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils from fifteen Eucalyptus species growing in the Korbous and Jbel Abderrahman Arboreta (North East Tunisia). *Molecules*, 17(3), 3044-3057.
- Elliot, W. R., & Jones, D. L. (1990). *Encyclopaedia of Australian plants suitable for cultivation. Volume 5*. Lothian Publishing Company Pty Ltd.
- Esquivel-Ferriño, P., Pedroza-Cantú, G., Sandoval-Montenegro, N., Mata-Martínez, R. E., Mendoza-Obregón, L., & Balderas-Rentería, I. (2010). Ensayo químico dirigido y estudio del efecto antimicrobiano in vitro de algunos condimentos empleados en la cocina mexicana. *RESPYN*, 10, 23-25
- Estapé, J. V., & Zboromyrska, Y. (2012). Brotes epidémicos causados por Escherichia coli diarreagénicas. *Gastroenterología y Hepatología*, 35(2), 89-93.
- Estrada, S. (2010). Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de romero (Rosmarinus officinalis) y tomillo (Thymus vulgaris). *Ecuador: Escuela Politécnica Superior de Chimborazo*.
- Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M. B., Taghizadeh, M., Astaneh, S. A., & Rasooli, I. (2007). Chemical and biological characteristics of Cuminum cyminum and Rosmarinus officinalis essential oils. *Food chemistry*, 102(3), 898-904.
- Gentilini, E., Reinoso, E., Echeverría, M., & Leardini, N. (2007). *Microbiología veterinaria*. N. O. Stanchi, & P. E. Martino (Eds.). Buenos Aires: Inter-Médica.
- Gilles, M., Zhao, J., An, M., & Agboola, S. (2010). Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian Eucalyptus species. *Food Chemistry*, 119(2), 731-737.
- Haugen, B. J., Pellett, S., Redford, P., Hamilton, H. L., Roesch, P. L., & Welch, R. A. (2007). In vivo gene expression analysis identifies genes required for enhanced

- colonization of the mouse urinary tract by uropathogenic *Escherichia coli* strain CFT073 *dsdA*. *Infection and immunity*, 75(1), 278-289.
- Hermann, R., & von Richter, O. (2012). Clinical evidence of herbal drugs as perpetrators of pharmacokinetic drug interactions. *Planta médica*, 78(13), 1458-1477.
- Kamatou, G. P. P., Viljoen, A. M., Gono-Bwalya, A. B., Van Zyl, R. L., Van Vuuren, S. F., Lourens, A. C. U., ... & Steenkamp, P. (2005). The in vitro pharmacological activities and a chemical investigation of three South African *Salvia* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 102(3), 382-390.
- Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., ... & Lian, J. (2001). Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet*, 357(9264), 1225-1240.
- Lo Cantore, P., Shanmugaiah, V., & Iacobellis, N. S. (2009). Antibacterial activity of essential oil components and their potential use in seed disinfection. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(20), 9454-9461.
- Lozoya, X., & Cañigual, S. (2006). Sobre la Fitoterapia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 5(4), 67.
- Luján, C. G. (2006). *Actividad antibacteriana de extractos vegetales en cepas hospitalarias de "Staphylococcus aureus" con resistencia múltiple* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro).
- Madsen, H. L., & Bertelsen, G. (1995). Spices as antioxidants. *Trends in Food Science & Technology*, 6(8), 271-277.
- Martínez, R. M., Cerrilla, M. E. O., Haro, J. G. H., Garza, J. R. K., Ramos, J. J. Z., & Robles, R. S. (2015). Uso de aceites esenciales en animales de granja. *Interciencia*, 40(11), 744.
- Marzoug, H. N. B., Romdhane, M., Lebrihi, A., Mathieu, F., Couderc, F., Abderraba, M., & Bouajila, J. (2011). Eucalyptus oleosa essential oils: chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of the oils from different plant parts (stems, leaves, flowers and fruits). *Molecules*, 16(2), 1695-1709.

- Medina, D., Mendoza, M., Núñez, L., Pacheco, D. (2013), Actividad Antimicrobiana de Extractos de Ajo, Canela y Epazote contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. *Ciencias Biologicas y Quimicas de la Salud*.
- Mossi, A. J., Astolfi, V., Kubiak, G., Lerin, L., Zanella, C., Toniazzo, G., ... & Restello, R. (2011). Insecticidal and repellency activity of essential oil of *Eucalyptus* sp. against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(2), 273-277.
- Patra, A. K., & Saxena, J. (2010). A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, 71(11), 1198-1222.
- Pecarski, D. M., Knežević-Jugović, Z. D., Dimitrijević-Branković, S. I., Mihajilovski, K. R., & Janković, S. M. (2014). Comparative analysis of the chemical composition and antimicrobial activities of some of Lamiaceae family species and *Eucalyptus* (*Eucalyptus globules* M). *Acta Periodica Technologica*, (45), 201-213.
- Reyes Jurado, F., Palou, E., & López Malo, A. (2012). Vapores de aceites esenciales: alternativa de antimicrobianos naturales. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6(1), 29-39.
- Rivas, M., Miliwebsky, E., & Deza, N. (2007). Manual de procedimientos, Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga a partir de especímenes clínicos. *Buenos Aires: Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas*.
- Sadiki, M. O. U. L. A. Y., Balouiri, M. O. U. N. Y. R., Barkai, H. A. S. S. A. N., Maataoui, H. A. J. A. R., Koraichi, S. I., & Elabed, S. O. U. M. Y. A. (2014). Synergistic antibacterial effect of *Myrtus communis* and *Thymus vulgaris* essential oils fractional inhibitory concentration index. *Int J Pharm Pharm Sci*, 6, 121-124.
- Safaei-Ghomi, J., & Ahd, A. A. (2010). Antimicrobial and antifungal properties of the essential oil and methanol extracts of *Eucalyptus largiflorens* and *Eucalyptus intertexta*. *Pharmacognosy magazine*, 6(23), 172.

- Salazar Aranda, R., Rodríguez, T., Yael, C., Alanís Garza, B. A., Pérez López, L. A., & Waksman de Torres, N. (2009). Evaluación de la actividad biológica de productos herbolarios comerciales. *Medicina universitaria*, *11*(44), 156-164.
- Silva, J., Abebe, W., Sousa, S. M., Duarte, V. G., Machado, M. I. L., & Matos, F. J. A. (2003). Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus. *Journal of ethnopharmacology*, *89*(2), 277-283.
- Singh, H. P., Kaur, S., Negi, K., Kumari, S., Saini, V., Batish, D. R., & Kohli, R. K. (2012). Assessment of in vitro antioxidant activity of essential oil of Eucalyptus citriodora (lemon-scented Eucalypt; Myrtaceae) and its major constituents. *LWT-Food science and Technology*, *48*(2), 237-241.
- Solano, C. (2005). Microbiología general (Prácticas). Retrieved March 13, 2017, from [http://www.unavarra.es/genmic/microgral/manual\\_practicas\\_micagral.pdf](http://www.unavarra.es/genmic/microgral/manual_practicas_micagral.pdf)
- Stackpole, D. J., Vaillancourt, R. E., Alves, A., Rodrigues, J., & Potts, B. M. (2011). Genetic variation in the chemical components of Eucalyptus globulus wood. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, *1*(2), 151-159.
- Stockwell, C. (1988). *Nature's pharmacy: a history of plants and healing*. Random House (UK).
- Sussmann, O., Mattos, L., & Restrepo, A. (2001). Resistencia bacteriana. *Hospital Universitario San Ignacio. Unidad de Infectología. Bogotá-Colombia*, *43*(1), 91.
- Takahashi, T., Kokubo, R., & Sakaino, M. (2004). Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from Eucalyptus maculata. *Letters in applied microbiology*, *39*(1), 60-64.
- Tyagi, A. K., & Malik, A. (2011). Antimicrobial potential and chemical composition of Eucalyptus globulus oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chemistry*, *126*(1), 228-235.
- Vecchio, M. G., Loganes, C., & Minto, C. (2016). Beneficial and Healthy Properties of Eucalyptus Plants: A Great Potential Use. *The Open Agriculture Journal*, *10*(1).
- Veiga-Junior, V. F. (2008). Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Rev bras farmacogn*, *18*(2), 308-13.

- Vidal, J. E., Ludewick, H. P., Kunkel, R. M., Zähler, D., & Klugman, K. P. (2011). The LuxS-dependent quorum-sensing system regulates early biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae* strain D39. *Infection and immunity*, 79(10), 4050-4060.
- Vieira, M., Bessa, L. J., Martins, M. R., Arantes, S., Teixeira, A. P. S., Mendes, Â., Martins da Costa, P. and Belo, A. D. F. (2017), Chemical Composition, Antibacterial, Antibiofilm and Synergistic Properties of Essential Oils from *Eucalyptus globulus* LABILL. and Seven Mediterranean Aromatic Plants. *Chem. Biodiversity*, 14: n/a, e1700006. doi:10.1002/cbdv.201700006
- Wayne, P. A. (2015). CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-second Informational supplement. CLSI document M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- WHO (World Health Organisation). (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1). Last accessed 23 December 2016.
- Wikler, M. A. (2006). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. *CLSI (NCCLS)*, 26, M7-A7.
- Williams, L. R., Stockley, J. K., Yan, W., & Home, V. N. (1998). Essential oils with high antimicrobial activity for therapeutic use. *International Journal of Aromatherapy*, 8(4), 30-40.
- Yáñez Rueda, X., & Cuadro Mogollón, O. F. (2012). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de las especies *Eucalyptus globulus* y *E. camaldulensis* de tres zonas de Pamplona (Colombia). *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 10(1).

### 6.3. ANEXOS



**Anexo 1.** Diluciones del aceite esencial de Eucalipto (*Eucalyptus spp.*)



**Anexo 2.** Activación e incubación de las cepas bacterianas: *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus subsp aureus*.



**Anexo 3.** Determinación de CMI en el espectrofotometro para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus subsp. aureus*.



**Anexo 4.** Impregnación del aceite esencial de Eucalipto en discos Oxoid

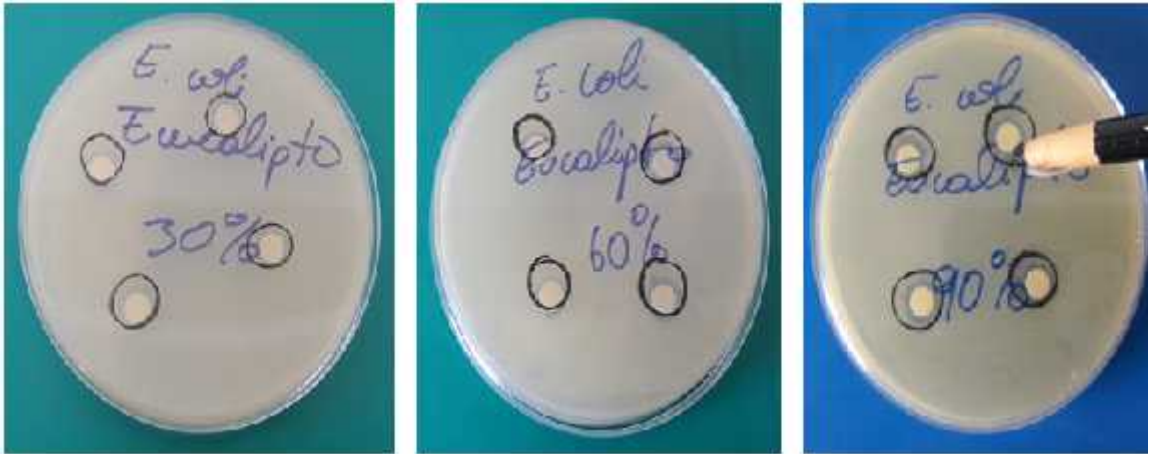


**Anexo 5.** Distribución de discos de sensibilidad con diluciones del aceite de eucalipto sobre la superficie de agar Muller Hinton.



**Anexo 6.** Medición de halos de sensibilidad utilizando una regla





**Anexo 7.** Halos de sensibilidad de *Escherichia coli* al 30%, 60% y 90% del aceite de eucalipto.



**Anexo 8.** Halos de sensibilidad de *Staphylococcus aureus subsp. aureus* al 30%, 60% y 90% del aceite de eucalipto.



**Anexo 9.** Cajas testigo de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus subsp. aureus* con etanol al 98%



**Anexo 10.** Cajas testigo sin formación de halos de inhibición de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus subsp. aureus*

**Anexo 11. Análisis de varianza para la variable sensibilidad antimicrobiana para la cepa *Staphylococcus aureus subsp. aureus*.**

					95% de intervalo de confianza para la media			
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	Límite inferior	Límite superior	Mínimo	Máximo
1,00	20	10,9500	,75915	,16975	10,5947	11,3053	10,00	12,00
2,00	20	14,4500	1,53811	,34393	13,7301	15,1699	11,00	17,00
3,00	20	13,6500	2,00722	,44883	12,7106	14,5894	10,00	17,00
Total	60	13,0167	2,12724	,27463	12,4671	13,5662	10,00	17,00

**Anexo12. Prueba de Tukey al 5% para la variables de sensibilidad antimicrobiana para la cepa *Staphylococcus aureus subsp. aureus*.**

		95% de intervalo de confianza				
Grupos		Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Límite inferior	Límite superior
1,00	2,00	-3,50000*	,48205	,000	-4,6600	-2,3400
	3,00	-2,70000*	,48205	,000	-3,8600	-1,5400
2,00	1,00	3,50000*	,48205	,000	2,3400	4,6600
	3,00	,80000	,48205	,230	-,3600	1,9600
3,00	1,00	2,70000*	,48205	,000	1,5400	3,8600
	2,00	-,80000	,48205	,230	-1,9600	,3600

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

**Anexo 13. Análisis de varianza para la variable sensibilidad antimicrobiana para la cepa *Escherichia coli*.**

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1,00	20	10,2500	,55012	,12301	9,9925	10,5075	10,00	12,00
2,00	20	10,6500	,67082	,15000	10,3360	10,9640	10,00	12,00
3,00	20	10,9500	,82558	,18460	10,5636	11,3364	10,00	13,00
Total	60	10,6167	,73857	,09535	10,4259	10,8075	10,00	13,00

**Anexo14. Prueba de Tukey al 5% para la variables de sensibilidad antimicrobiana para la cepa *Escherichia coli*.**

		Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
1,00	2,00	-,40000	,21865	,169	-,9262	,1262
	3,00	-,70000*	,21865	,006	-1,2262	-,1738
2,00	1,00	,40000	,21865	,169	-,1262	,9262
	3,00	-,30000	,21865	,362	-,8262	,2262
3,00	1,00	,70000*	,21865	,006	,1738	1,2262
	2,00	,30000	,21865	,362	-,2262	,8262

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

## **CAPITULO VII**

### **PROPUESTA**

Elaboración de crema a base de aceite esencial de eucalipto para tratar heridas post quirúrgicas de felinos y caninos.

#### **7.1. DATOS INFORMATIVOS**

Las instituciones involucradas en la presente propuesta serán la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Hospital Veterinario de la Universidad Técnica de Ambato.

#### **7.2. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA**

El agente principal de las infecciones bacterianas postquirúrgicas es causada por *Staphylococcus aureus*, en el presente trabajo se identificó la actividad antimicrobiana del aceite esencial de eucalipto y la predilección por bacterias gram positivas, formando halos de sensibilidad de 10.95mm a 14.45mm ante la bacteria mencionada, confirmando su efecto al determinar CMI con valores que disminuyen respectivamente del inóculo estandarizado y determinando la inhibición del crecimiento de colonias mediante la CMB.

#### **7.3. JUSTIFICACIÓN**

La aplicación del aceite esencial de eucalipto en presentación en crema al 60% sobre heridas postquirúrgicas en felinos y caninos tiene como finalidad la prevención de infecciones en piel provocadas por bacterias como *Staphylococcus aureus*, el uso de una crema directamente sobre las heridas permitirá la absorción directa del principio activo que es el aceite.

#### **7.4. OBJETIVOS**

Aplicar el aceite esencial de eucalipto en crema sobre infecciones postquirúrgicas por *Staphylococcus aureus* en felinos y caninos.

## **7.5. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD**

La obtención del aceite de eucalipto es de fácil adquisición y extracción usando el método de arrastre de vapor, el efecto antimicrobiano que presenta es la principal característica para emplearla como desinfectante, conservante de alimentos y en la fitoterapia, también posee características antioxidantes, antiinflamatorias, antimicóticas y antiparasitarias.

## **7.6. FUNDAMENTACIÓN**

En el ambiente de la clínica las infecciones nosocomiales son comunes a causa de bacterias oportunista como *Staphylococcus aureus* en las heridas postquirúrgicas, al aplicar el aceite esencial de eucalipto en crema al 60% se puede tratar o prevenir el crecimiento bacteriano en tejidos expuestos al medio, el efecto antimicrobiano del eucalipto inhibe el crecimiento bacteriano evitando de la mano infecciones y el uso indiscriminado de antibióticos.

## **7.7. METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO**

Promover el uso de aceites esenciales de plantas, de igual manera elaborar un producto fitofarmacéutico para evitar infecciones post quirúrgicas de caninos y felinos; la obtención del aceite esencial de Eucalipto se hace mediante destilación por arrastre de vapor, en el que se obtienen extracto acuoso y aceite y con ayuda de un tubo de separación se toma el aceite para la formulación de la crema, se utilizará crema liposoluble de fácil difusión para el aceite hasta obtener la concentración deseada.

## **7.8. ADMINISTRACIÓN**

La Universidad Técnica de Ambato mediante la Facultad de Ciencias Agropecuarias, el director del Hospital Docente Veterinario, médicos residentes y estudiantes serán responsables de la realización de esta propuesta que pueda llevar a una adecuada utilización de aceites mediante investigaciones que complementen el uso de aceites en animales.

## **7.9. PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN**

Por medio de la elaboración de la presente propuesta se pretende evitar infecciones en heridas posquirúrgicas en felinos y caninos, además de reducir costos se observara la evolución de los pacientes.