



**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**MODALIDAD: INVESTIGACIÓN**



**TEMA:**

**“EFECTO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL  
DE *Eucalyptus globulus* L. EN SISTEMAS DE LIBERACIÓN  
PROLONGADA”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PRESENTADO COMO REQUISITO PREVIO  
PARA OPTAR AL GRADO DE QUÍMICOS Y FARMACÉUTICOS**

**AUTORES:**

Castro Zambrano Javier Ernesto

Palma Cajape Lauro Fernando

**TUTORA:**

Lcda. Carolina Santiago, Ph.D.

**COTUTORA:**

Q.F. Fernanda Kolenyak Dos Santos, Ph. D

**GUAYAQUIL-ECUADOR**

**2018**



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
CARRERA QUÍMICA Y FARMACIA  
UNIDAD DE TITULACIÓN



Presidencia  
de la República  
del Ecuador



Plan Nacional  
de Ciencia, Tecnología,  
Innovación y Saberes



SENESCYT  
Secretaría Nacional de Educación Superior,  
Ciencia, Tecnología e Innovación

## FICHA DE REGISTRO DE TESIS/TRABAJO DE GRADUACIÓN

<b>TÍTULO Y SUBTÍTULO:</b>	EFECTO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Eucalyptus globulus</i> Labill EN SISTEMAS DE LIBERACIÓN PROLONGADA		
<b>AUTOR(ES)</b> (apellidos/nombres):	CASTRO ZAMBRANAO JAVIER ERNESTO PALMA CAJAPE LAURO FERNANDO		
<b>REVISOR(ES)/TUTOR(ES)</b> (apellidos/nombres):	Dra. Q.F. OLGA ORDÓÑEZ RAMÍREZ (REVISOR) Lcda. CAROLINA SANTIAGO, Ph.D. (TUTORA)		
<b>INSTITUCIÓN:</b>	UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL		
<b>UNIDAD/FACULTAD:</b>	FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS		
<b>MAESTRÍA/ESPECIALIDAD:</b>			
<b>GRADO OBTENIDO:</b>	TERCER NIVEL-QUÍMICO FARMACÉUTICO		
<b>FECHA DE PUBLICACIÓN:</b>	14 SEPTIEMBRE 2018	<b>No. DE PÁGINAS:</b>	68
<b>ÁREAS TEMÁTICAS:</b>			
<b>PALABRAS CLAVES/ KEYWORDS:</b>	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill, microemulsión , actividad antibacteriana		
<b>RESUMEN/ABSTRACT</b> (150-250 palabras):	En el presente trabajo de investigación se realiza el estudio del efecto antibacteriano del aceite esencial de <i>Eucalyptus globulus</i> Labill en sistemas de liberación prologada. Se desarrolló un diagrama de fases para la obtención de sistemas ternarios a base de Tween-80, aceite esencial de <i>Eucalyptus globulus</i> L. y agua destilada, en el cual se logró identificar las regiones en donde se formaron las nanoestructuras (microemulsiones y cristales líquidos). Dichos sistemas se caracterizaron mediante un estudio de estabilidad (apariciencia, color y pH) y microscopía de luz polarizada. Fue posible incorporar de 5 a 50 mg de sulfametoxazol en las microemulsiones (ME). Finalmente se determinó la actividad antibacteriana de los sistemas ME 24, ME 24 *, ME 26 y ME 26 * frente a dos cepas: <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> , de los cuales ME 24* presentó un halo de inhibición de 16±1 mm y ME 24 22±1 mm respectivamente. Ambos resultados superan incluso los valores del control positivo (sulfametoxazol). El presente trabajo constituye el primer reporte de la potencial actividad antibacteriana de las microemulsiones en estudio.		
<b>ADJUNTO PDF:</b>	<input checked="" type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO	
<b>CONTACTO CON AUTOR/ES:</b>	<b>Teléfono:</b> 0994018027 0989942525	<b>E-mail:</b> <a href="mailto:javier.castroz@ug.edu.ec">javier.castroz@ug.edu.ec</a> <a href="mailto:lauro.palmac@ug.edu.ec">lauro.palmac@ug.edu.ec</a>	
<b>CONTACTO CON LA INSTITUCIÓN:</b>	<b>Nombre: SEDE CIENCIAS Químicas</b>		
	<b>Teléfono:</b> 042293680		
	<b>E-mail:</b> <a href="http://www.fcq.ug.edu.ec">www.fcq.ug.edu.ec</a>		



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
CARRERA QUÍMICA Y FARMACIA  
UNIDAD DE TITULACIÓN



Dr. CARLOS SILVA HUILCAPI  
DIRECTOR DE LA CARRERA  
FACULTAD CIENCIAS QUÍMICAS  
UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL

Ciudad.-

De mis consideraciones:

Envío a Ud. el Informe correspondiente a la tutoría realizada al Trabajo de Titulación "EFECTO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Eucalyptus globulus* Labill EN SISTEMAS DE LIBERACIÓN PROLONGADA" de los estudiantes JAVIER ERNESTO CASTRO ZAMBRANO Y LAURO FERNANDO PALMA CAJAPE, indicando que han cumplido con todos los parámetros establecidos en la normativa vigente:

- El trabajo es el resultado de una investigación.
- Los estudiantes demuestran conocimiento profesional integral.
- El trabajo presenta una propuesta en el área de conocimiento.
- El nivel de argumentación es coherente con el campo de conocimiento.

Adicionalmente, se adjunta el certificado de porcentaje de similitud y la valoración del trabajo de titulación con la respectiva calificación.

Dando por concluida esta tutoría de trabajo de titulación, **CERTIFICO**, para los fines pertinentes, que los estudiantes están aptos para continuar con el proceso de revisión final.

Atentamente,

Lcda. Carolina del Rosario Santiago Dugarte, Ph. D.

C.I.: 1757829237

Guayaquil, 30 de agosto 2018

Sr. Doctor  
Carlos Silva H.  
VICEDECANO  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL  
Ciudad.-

De mis consideraciones:

Envío a Ud. el Informe correspondiente a la **REVISIÓN FINAL** del Trabajo de Titulación **EFFECTO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Eucalyptus globulus* L. EN SISTEMAS DE LIBERACIÓN PROLONGADA** de los estudiantes Castro Zambrano Javier Ernesto y Palma Cajape Lauro Fernando. Las gestiones realizadas me permiten indicar que el trabajo fue revisado considerando todos los parámetros establecidos en las normativas vigentes, en el cumplimiento de los siguientes aspectos:

Cumplimiento de requisitos de forma:

- El título tiene un máximo de 17 palabras.
- La memoria escrita se ajusta a la estructura establecida.
- El documento se ajusta a las normas de escritura científica seleccionadas por la Facultad.
- La investigación es pertinente con la línea y sublíneas de investigación de la carrera.
- Los soportes teóricos son de máximo 5 años.
- La propuesta presentada es pertinente.

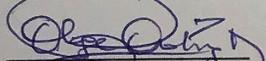
Cumplimiento con el Reglamento de Régimen Académico:

- El trabajo es el resultado de una investigación.
- El estudiante demuestra conocimiento profesional integral.
- El trabajo presenta una propuesta en el área de conocimiento.
- El nivel de argumentación es coherente con el campo de conocimiento.

Adicionalmente, se indica que fue revisado, el certificado de porcentaje de similitud, la valoración del tutor, así como de las páginas preliminares solicitadas, lo cual indica el que el trabajo de investigación cumple con los requisitos exigidos.

Una vez concluida esta revisión, considero que los estudiantes **Castro Zambrano Javier Ernesto** y **Palma Cajape Lauro Fernando** están aptos para continuar el proceso de titulación. Particular que comunicamos a usted para los fines pertinentes.

Atentamente,



DOCENTE TUTOR REVISOR

C.I. 0701083842



**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
CARRERA QUÍMICA Y FARMACIA  
UNIDAD DE TITULACIÓN**



Guayaquil, 6 de Septiembre del 2018

**APROBACIÓN DEL TUTOR**

En calidad de tutora del trabajo de titulación, Certifico que he asesorado, guiado y revisado el trabajo de titulación en la modalidad de investigación, cuyo título es **“EFECTO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Eucalyptus globulus* Labill EN SISTEMAS DE LIBERACIÓN PROLONGADA”**, presentado por **CASTRO ZAMBRANO JAVIER ERNESTO** C.I. No 1716511553 y **PALMA CAJAPE LAURO FERNANDO** C.I. 1311196420, previo a la obtención del título de Químicas Farmacéuticas.

Este trabajo ha sido aprobado en su totalidad y se adjunta el informe de Antiplagio del programa URKUND. Lo certifico.

A handwritten signature in blue ink that reads 'Carolina del Rosario Santiago Dugarte'.

**Lcda. Carolina del Rosario Santiago Dugarte, Ph.D.**

**TUTORA DE TESIS**



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
CARRERA QUÍMICA Y FARMACIA  
UNIDAD DE TITULACIÓN



CERTIFICADO PORCENTAJE DE SIMILITUD

En calidad de tutora del presente trabajo de titulación, **CERTIFICO** que he asesorado, guiado y revisado el trabajo de titulación en la modalidad de investigación, cuyo título es **“EFECTO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Eucalyptus globulus* Labill EN SISTEMAS DE LIBERACIÓN PROLONGADA”**, ha sido elaborado por **JAVIER ERNESTO CASTRO ZAMBRANO** C.I.: 1716511553, y **LAURO FERNANDO PALMA CAJAPE** C.I.: 1311196420, previo a la obtención del título de Químicos y Farmacéuticos.

Este trabajo ha orientado durante todo el periodo de ejecución en el programa antiplagio URKUND quedando el 1% de coincidencia

URKUND

Documento: <https://secure.arkund.com/40039636-119211-280044#q1bKLVayijal1VEqzkzPy0zLTE7MS05VsjLQMzAwsjSxsDQ3Nbi0NjC2sDQ2NKsFAA>

Presentado: 2019-09-21 12:05:10:05:20

Presentado por: CAROLINA DUGARTE (carolina.santiago@ug.edu.ec)

Recibido: carolina.santiago@ug.edu.ec

1% de estas 11 páginas, se componen de texto presente en 2 fuentes.

Categoría	Enlace/nombre de archivo
Fuentes detectadas	TESIS NORBERTO FORNOZANO
Fuentes alternativas	TESIS PALMA CAJAPE LAURO FERNANDO
Fuentes no usadas	TESIS PALMA CAJAPE LAURO FERNANDO

“EFECTO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Eucalyptus globulus* Labill EN SISTEMAS DE LIBERACIÓN PROLONGADA”

Autor: Javier Ernesto Castro Zambrano Lauro Fernando Palma Cajape

Tutor: Lcda. Carolina Santiago Dugarte, Ph.D.

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se realizó el estudio del efecto antibacteriano del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* Labill en sistemas de liberación prolongada. Se desarrolló un diagrama de fases para la obtención de sistemas termalios a base de Tween-80, aceite esencial de *Eucalyptus globulus* L. y agua destilada, en el cual se logró identificar las regiones en donde se forman las nanoestructuras micelomulsionadas y emulsiones aquosas. Dichos sistemas se caracterizaron mediante un estudio de estabilidad (viscosidad, color y pH) y emulsionados de las emulsiones. Fue posible incorporar de 5 a 50 mg de sulfametoxazol en las micelomulsionadas (ME). Finalmente se caracterizó la actividad antibacteriana de los sistemas ME 14, ME 24, ME 30 y ME 26 frente a dos cepas: *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, de las cuales ME 24 presentó un halo de inhibición de 18.11 mm y ME 24 22.11 mm respectivamente. Ambos resultados superan incluso los valores del control positivo (sulfametoxazol).

El presente trabajo constituye el primer reporte de la potencial actividad antibacteriana de las micelomulsionadas en estudio.

<https://secure.arkund.com/view/40039636-119211-280044#q1bKLVayijal1VEqzkzPy0zLTE7MS05VsjLQMzAwsjSxsDQ3Nbi0NjC2sDQ2NKsFAA>==

Carolina Santiago

Lcda. Carolina del Rosario Santiago Dugarte, Ph.D.

C.I.: 1757829237



Roberto Obedespe

## Urkund Analysis Result

**Analysed Document:** TESIS\_CASTRO Y PALMA.docx (D40898949)  
**Submitted:** 8/21/2018 7:05:00 PM  
**Submitted By:** carolina.santiagod@ug.edu.ec  
**Significance:** 1 %

### Sources included in the report:

TESIS FINAL Angy y Lady programa de plagio.docx (D35037003)

### Instances where selected sources appear:

1



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
CARRERA QUÍMICA Y FARMACIA  
UNIDAD DE TITULACIÓN



LICENCIA GRATUITA INTRANSFERIBLE Y NO EXCLUSIVO PARA EL USO NO  
COMERCIAL DE LA OBRA CON FINES NO ACADÉMICOS

Yo, **Javier Ernesto Castro Zambrano** con C.I. No. **1716511553** y **Lauro Fernando Palma Cajape** con C.I. No. **1311196420**, certifico que los contenidos desarrollados en este trabajo de titulación, cuyo título es "EFECTO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Eucalyptus globulus* Labill EN SISTEMAS DE LIBERACIÓN PROLONGADA" son de nuestra absoluta propiedad y responsabilidad y según el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN\*, autorizo el uso de una licencia gratuita intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la presente obra con fines no académicos, en favor de la Universidad de Guayaquil, para que haga uso del mismo, como fuera pertinente.

**Javier Ernesto Castro Zambrano**

C.I.: 1716511553

**Lauro Fernando Palma Cajape**

C.I.: 1311196420

\*CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN (Registro Oficial n. 899 - Dic./2016) Artículo 114.- De los titulares de derechos de obras creadas en las instituciones de educación superior y centros educativos.- En el caso de las obras creadas en centros educativos, universidades, escuelas politécnicas, institutos superiores técnicos, tecnológicos, pedagógicos, de artes y los conservatorios superiores, e institutos públicos de investigación como resultado de su actividad académica o de investigación tales como trabajos de titulación, proyectos de investigación o innovación, artículos académicos, u otros análogos, sin perjuicio de que pueda existir relación de dependencia, la titularidad de los derechos patrimoniales corresponderá a los autores. Sin embargo, el establecimiento tendrá una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra con fines académicos.



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
CARRERA QUÍMICA Y FARMACIA  
UNIDAD DE TITULACIÓN



Guayaquil, 6 de Septiembre del 2018

**CERTIFICACIÓN DEL TUTOR REVISOR**

Habiendo sido nombrado **Dra. Q.F. Olga Ordóñez Ramírez**, tutor del trabajo de titulación **“EFECTO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE esencial *Eucalyptus glóbulos* L. EN SISTEMAS DE LIBERACIÓN PROLONGADA”** certifico que el presente trabajo de titulación, elaborado por **Javier Ernesto Castro Zambrano** C.I. No **1716511553**. y **Lauro Fernando Palma Cajape** C.I. **1311196420**, con mi respectiva supervisión como requerimiento parcial para la obtención del título de **Químicos Farmacéuticos**, en la Facultad de Ciencias Químicas ha sido **REVISADO Y APROBADO** en todas sus partes, encontrándose apto para su sustentación.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Olga Ordóñez Ramírez', written over a horizontal line.

**DOCENTE TUTOR REVISOR**

**C.I. No. 0701083842**



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
CARRERA QUÍMICA Y FARMACIA  
UNIDAD DE TITULACIÓN



---

### CERTIFICADO DEL TRIBUNAL

El Tribunal de Sustentación del Trabajo de Titulación de los Señores **JAVIER ERNESTO CASTRO ZAMBRANO** y **LAURO FERNANDO PALMA CAJAPE**, después de ser examinado en su presentación, memoria científica y defensa oral, da por aprobado el Trabajo de Titulación.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Olga Ordóñez Ramírez', written over a horizontal line.

**DRA. Q.F. OLGA ORDÓÑEZ RAMÍREZ**  
**PRESIDENTE-MIEMBRO 1 DEL TRIBUNAL**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Meribary Monsalve P.', written over a horizontal line.

**PhD. MERIBARY MONSALVE P.**  
**DOCENTE-MIEMBRO 2 DEL TRIBUNAL**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'María Elena Jiménez M.Sc.', written over a horizontal line.

**Q.F. MARÍA ELENA JIMÉNEZ M.Sc.**  
**DOCENTE-MIEMBRO 3 DEL TRIBUNAL**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Francisco Palomeque Romero', written over a horizontal line.

**Ab. FRANCISCO PALOMEQUE ROMERO**

**SECRETARIO ENCARGADO**



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
CARRERA QUÍMICA Y FARMACIA  
UNIDAD DE TITULACIÓN



**CARTA DE AUTORÍA DEL TRABAJO:**  
**“EFECTO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL  
DE *Eucalyptus globulus* Labill EN SISTEMAS DE LIBERACIÓN  
PROLONGADA”**

Guayaquil, 21 de Agosto de 2018

Yo, **JAVIER ERNESTO CASTRO ZAMBRANO**, autor de este trabajo declaro ante las autoridades de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guayaquil, que la responsabilidad del contenido de este TRABAJO DE TITULACIÓN, me corresponde a mí exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guayaquil.

Declaro también es de mi autoría, que todo el material escrito, salvo el que está debidamente referenciado en el texto. Además ratifico que este trabajo no ha sido parcial ni totalmente presentado para la obtención de un título, ni en una Universidad nacional, ni una extranjera.

  
\_\_\_\_\_  
**Javier Ernesto Castro Zambrano**  
C.I.: 1716511553



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
CARRERA QUÍMICA Y FARMACIA  
UNIDAD DE TITULACIÓN



**CARTA DE AUTORÍA DEL TRABAJO:**

**“EFECTO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Eucalyptus globulus* Labill EN SISTEMAS DE LIBERACIÓN PROLONGADA”**

Guayaquil, 21 de Agosto de 2018

Yo, **LAURO FERNANDO PALMA CAJAPE**, autor de este trabajo declaro ante las autoridades de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guayaquil, que la responsabilidad del contenido de este TRABAJO DE TITULACIÓN, me corresponde a mí exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guayaquil.

Declaro también es de mi autoría, que todo el material escrito, salvo el que está debidamente referenciado en el texto. Además ratifico que este trabajo no ha sido parcial ni totalmente presentado para la obtención de un título, ni en una Universidad nacional, ni una extranjera.

  
Lauro Fernando Palma Cajape

C.I.: 1311196420

## AGRADECIMIENTOS

*Agradecemos a dios en primer lugar por acompañarnos y guiarnos a lo largo de nuestras carreras.*

*A nuestros padres y familiares más cercanos los cuales fueron parte fundamental para llegar a la meta; por brindarnos fuerza y tiempo.*

*A nuestros amigos que en todo momento estuvieron ayudándonos y compartiendo momentos llenos de alegría.*

*Y un agradecimiento a nuestros profesores a lo largo de la carrera; especialmente a nuestros tutores, Ph.D. Carolina Del Rosario Santiago y Ph.D. Fernanda Kolenyak Dos Santos, las cuales dedicaron la gran parte de su tiempo y por habernos brindaron de su conocimiento para poder lograr este trabajo.*

*También un agradecimiento especial para todo el personal de Laboratorios AVVE y Dra. Celeste Carrillo T. por habernos apoyado durante todo el trayecto de este proyecto.*

**Javier Castro Zambrano y Fernando Palma Cajape**

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	XV
ABSTRACT .....	XVI
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I. PROBLEMA .....	3
I.1 Formulación del problema .....	3
I.2 Justificación e Importancia .....	3
I.3 Hipótesis .....	4
I.4 Objetivo general .....	4
I.5 Objetivos específicos .....	4
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO .....	5
II.1 Taxonomía, morfología y distribución geográfica del <i>Eucalyptus globulus</i> L. .....	5
II.2 Aceite esencial del <i>Eucalyptus globulus</i> L. ....	7
II.3 Métodos de extracción de aceites esenciales.....	9
II.3.1 Destilación por arrastre de vapor .....	9
II.3.2 Hidrodestilación con trampa de Clevenger.....	9
II.4 Antibióticos.....	10
II.5 Sulfamidas .....	11
II.5.1 Sulfametoxazol .....	12
II.6 Microemulsiones (ME).....	13
II.7 Tensoactivos .....	14
II.8 Diagrama de fases ternario .....	15
II.9 Técnicas de caracterización de microemulsiones.....	15
II.9.1 Microscopía de luz polarizada.....	16
II.10 Evaluación “ <i>in vitro</i> ” de la actividad antibacteriana .....	16
II.10.1 Método de difusión o Kirby - Bauer .....	17
II.10.2 Bacterias.....	17
II.10.2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	17
II.10.2.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	17

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	18
III.1 Diseño experimental.....	18
III.2 Metodología de la investigación .....	19
III.3 Equipos, aparatos, materiales y reactivos .....	19
III.3.1 Equipos:.....	19
III.3.2 Aparatos: .....	19
III.3.3 Materiales: .....	19
III.3.4 Reactivos químicos:.....	20
III.3.5 Reactivos biológicos: .....	20
III.4 Muestra .....	20
III.5 Técnicas y métodos .....	21
III.5.1 Extracción del aceite esencial del <i>Eucalyptus globulus</i> L.....	21
III.5.2 Construcción del diagrama de fase ternario .....	21
III.5.2.1 Caracterización macroscópica de las microemulsiones.....	23
III.5.3 Caracterización microscópica de las microemulsiones: Microscopia de Luz polarizada .....	23
III.5.4 Solubilidad del sulfametoxazol .....	23
III.5.5 Estabilidad de las microemulsiones .....	23
III.5.6 Evaluación “ <i>in vitro</i> ” de la actividad antibacteriana.....	24
CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	25
IV.1 Rendimiento del Extracción del aceite esencial del <i>Eucalyptus globulus</i> L. ....	25
IV.2 Construcción del diagrama de fases para la optimización de las microemulsiones. ....	27
IV.2.1 Evaluación macroscópica .....	28
IV.3 Evaluación Microscópica: Microscopia de Luz polarizada .....	29
IV.4 Solubilidad .....	32
IV.5 Evaluación del Estudio de Estabilidad.....	33
IV.6 Evaluación “ <i>in vitro</i> ” de la actividad antibacteriana.....	34
CONCLUSIONES.....	37
RECOMENDACIONES.....	39
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

GLOSARIO.....	46
ANEXOS .....	48

### ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Eucalyptus globulus</i> L. ....	6
<b>Figura 2.</b> Distribución actual de los bosques <i>Eucalyptus</i> .....	7
<b>Figura 3.</b> Estructura molecular del Eucaliptol .....	8
<b>Figura 4.</b> Estructura molecular del prontosil .....	11
<b>Figura 5.</b> Grupo funcional de la sulfamida .....	11
<b>Figura 6.</b> Derivados de las sulfamidas. ....	12
<b>Figura 7.</b> Estructuras de las micelas. ....	13
<b>Figura 8.</b> Diagrama de fases ternario. ....	15
<b>Figura 9.</b> Mecanismo de acción de la luz polarizada .....	16
<b>Figura 10.</b> Diagrama de fases ternario de los sistemas nanoestructurados.....	27
<b>Figura 11.</b> Microscopia de luz polarizada (muestras LC y ME).....	30

### ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Taxonomía de <i>Eucalyptus globulus</i> .....	5
<b>Tabla II.</b> Composición del aceite esencial de <i>Eucalyptus globulus</i> L. identificado por GC / MS.....	8
<b>Tabla III.</b> Clasificación de los Tensoactivos .....	14
<b>Tabla IV.</b> Porcentajes de los componentes utilizados para el desarrollo de ME. 22	
<b>Tabla V.</b> Porcentaje de rendimiento de las hojas del <i>E. globulus</i> L.....	25
<b>Tabla VI.</b> Estudios organolépticos .....	28
<b>Tabla VIII.</b> Caracterización de los sistemas nanoestructurados.....	31
<b>Tabla IX.</b> Solubilidad del fármaco .....	32
<b>Tabla VII.</b> Lectura de pH.....	34

<b>Tabla X.</b> Resultados del efecto de las ME solos y en combinación al antibiótico en diferentes bacterias.....	35
--	----

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Diseño experimental realizado en el presente trabajo. ....	18
--	----

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo I. Identificación y descripción de la especie por el Herbario Guay.....	48
Anexo II. Extracción del aceite esencial de <i>Eucalyptus globulus</i> L.....	50
Anexo III. Preparación de los sistemas de liberación prolongada .....	51
Anexo IV. Observaciones del microscopio de luz polarizada .....	52
Anexo V. Evaluación antibacteriana.....	53
Anexo VI. Resultados de la evaluación antibacteriana.....	54

**“EFECTO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Eucalyptus globulus* Labill EN SISTEMAS DE LIBERACIÓN PROLONGADA”**

**Autoras:** Javier Ernesto Castro Zambrano  
Lauro Fernando Palma Cajape

**Tutora:** Lcda. Carolina Santiago Dugarte, Ph. D.

**RESUMEN**

En el presente trabajo de investigación se realiza el estudio del efecto antibacteriano del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* Labill en sistemas de liberación prolongada. Se desarrolló un diagrama de fases para la obtención de sistemas ternarios a base de Tween-80, aceite esencial de *Eucalyptus globulus* L. y agua destilada, en el cual se logró identificar las regiones en donde se formaron las nanoestructuras (microemulsiones y cristales líquidos). Dichos sistemas se caracterizaron mediante un estudio de estabilidad (aparición, color y pH) y microscopía de luz polarizada. Fue posible incorporar de 5 a 50 mg de sulfametoxazol en las microemulsiones (ME). Finalmente se determinó la actividad antibacteriana de los sistemas ME 24, ME 24 \*, ME 26 y ME 26 \* frente a dos cepas: *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, de los cuales ME 24\* presentó un halo de inhibición de  $16\pm 1$  mm y ME 24  $22\pm 1$  mm respectivamente. Ambos resultados superan incluso los valores del control positivo (sulfametoxazol). El presente trabajo constituye el primer reporte de la potencial actividad antibacteriana de las microemulsiones en estudio.

**Palabras claves:** *Eucalyptus globulus* Labill, sistemas nanoestructurados, microemulsiones, actividad antibacteriana

**“EFFECT OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL OF  
*Eucalyptus globulus* Labill IN PROLONGED RELEASE SYSTEMS”**

**Authors:** Javier Ernesto Castro Zambrano  
Lauro Fernando Palma Cajape

**Advisor:** Lcda. Carolina Santiago Dugarte, Ph. D.

**ABSTRACT**

In the present project of investigation the study of the antibacterial effect of the essential oil of *Eucalyptus globulus* Labill is carried out in systems of prolonged release. A phase diagram was developed to obtain ternary systems based on Tween-80, essential oil of *Eucalyptus globulus* L. and distilled water, in which it was possible to identify the regions where the nanostructures were formed (microemulsions and liquid crystals). These systems were characterized by a stability study (appearance, color and pH) and polarized light microscopy. It was possible to incorporate 5 to 50 mg of sulfamethoxazole into the microemulsions (ME). Finally, the antibacterial activity of the ME 24, ME 24 \*, ME 26 and ME 26 \* systems was determined against two strains: *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, of which ME 24 \* presented an inhibition halo of  $16\pm 1$  mm and ME 24  $22\pm 1$  mm respectively. Both results exceed even the values of the positive control (sulfamethoxazole). The present work constitutes the first report of the potential antibacterial activity of the microemulsions under study.

**Keywords:** *Eucalyptus globulus* Labill, nanostructured systems, microemulsions and antibacterial activity.

## INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales son sustancias aromáticas de base lipídica, presentes en la mayoría del reino vegetal. Éstos se encuentran ampliamente distribuidos en las distintas partes de la planta, tales como: raíces, tallos, hojas, flores y frutos (Ribeiro & Alva, 2001).

Por lo general, los aceites esenciales tienen un olor agradable, a excepción de aquellos que poseen en su composición derivados azufrados. Se consideran mezclas muy variadas y complejas, incluso hasta más de 100 componentes, entre los que se mencionan: alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, ácidos, mono terpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos (Martínez, 2003).

Debido a los diversos compuestos que contienen los aceites esenciales, se les atribuyen un sin número de propiedades farmacológicas, entre las que se encuentran: antimicrobiana (Inouye *et al*, 2006), antihelmíntica (Topiar, 2015), antioxidante (Singh, 2012), antiespasmódica y digestiva (Stashenko, 2009).

En el reino vegetal, la familia Myrtaceae es reconocida por su potencial actividad antimicrobiana, y entre los géneros más representativos se tienen el *Eucalyptus* (Paosen, Saising, Wira & Piyawan, 2017). Los principales componentes que se encuentran en mayor proporción en los aceites esenciales obtenidos de dicho género son: el cineol, terpineol, eudesmol y felandreno (Martínez, 2003).

En la actualidad, la industria farmacéutica ha incorporado el estudio de nuevas alternativas tecnológicas para mejorar las limitaciones de los fármacos. Como parte de este avance, se encuentran los sistemas de liberación prolongada (microemulsiones), los cuales son reconocidos por aumentar la solubilidad y permeabilización del fármaco que contienen (Gao et al., 2009).

Por otro lado, estudios realizados en Latinoamérica han demostrado que las bacterias gram positivas y gram negativas contribuyen al aumento de enfermedades por infecciones bacterianas y por ende a la elevación de las tasas de mortalidad de la población (Juárez, 2008). En Ecuador, las patologías provocadas por bacterias tienen un nivel alarmante debido a que han desencadenado problemas graves de salud, como es el caso de las infecciones en el tracto urinario ocasionada principalmente por *Escherichia Coli* (Carmona & Alonso, 2008), así lo catalogó el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC) quien reportó que un 10.3% de mujeres fueron afectadas por este padecimiento antes de alcanzar los 30 años de edad (INEC, 2013). Por otra parte, el Registro de Estadísticas Vitales manifestó que en el año 2016 una de las principales causas de mortalidad en menores de 1 año fueron: dificultad respiratoria del recién nacido, con el 15,91%, seguida por la sepsis bacteriana con el 7,13%; mientras que como causa de la mortalidad en la niñez, la neumonía por organismo no especificado obtuvo un 5,8% (INEC, 2016).

En vista de lo mencionado, el presente trabajo tiene como finalidad estudiar el efecto de la actividad antibacteriana otorgado por el aceite esencial del *Eucalytus globulus* L. y sulfametoaxol en un sistema de liberación prolongada.

## **CAPITULO I. PROBLEMA**

### **I.1 Formulación del problema**

En base a los antecedentes expuestos en la introducción se plantea la siguiente formulación del problema:

¿Qué efecto tendrán las microemulsiones obtenidas del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* L. y sulfametoxazol sobre la actividad antibacteriana?

### **I.2 Justificación e Importancia**

La resistencia antibiótica es un fenómeno biológico natural debido a las mutaciones y a la gran capacidad de las bacterias de transferir horizontalmente su material genético, existiendo una clara correlación entre el uso de antibióticos y la resistencia bacteriana (Mosquito & Ruiz, 2011).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2014) la resistencia antibiótica en las personas infectadas por *Staphylococcus aureus*, tienen un 64% más de probabilidad de muerte que las personas infectadas por bacterias con cepas no resistentes. Adicionalmente, esto conlleva otras consecuencias el aumento del costo de la atención sanitaria, pues alarga la estancia del paciente en el hospital y requiere de mayores cuidados intensivos.

En los últimos años, se ha dado considerable énfasis al desarrollo de sistemas nanoestructurados como transportadores de fármacos, ya que éstos presentan diversas ventajas, tales como: aumento de la solubilidad y la alta capacidad de mejorar el perfil farmacocinético del fármaco (Ghosh, 2006).

Por tal motivo se propone estudiar el efecto antibacteriano de microemulsiones compuestas por el aceite esencial del *Eucalyptus globulus* L. y el sulfametoxazol en ensayos *in vitro*.

### **I.3 Hipótesis**

Las microemulsiones obtenidas del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* L. en combinación sulfametoxazol tendrán efecto sobre la actividad antibacteriana.

### **I.4 Objetivo general**

Estudiar el efecto de la actividad antibacteriana del aceite esencial del *Eucalyptus globulus* L. en sistemas de liberación prolongada.

### **I.5 Objetivos específicos**

- Construir un diagrama de fases ternario para la identificación de las microemulsiones.
- Determinar la solubilidad del sulfametoxazol en las microemulsiones preparadas a partir del aceite esencial del *Eucalyptus globulus* L.
- Evaluar la actividad antibacteriana de las microemulsiones obtenidas del aceite esencial del *Eucalyptus globulus* L. y sulfametoxazol.

## CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

### II.1 Taxonomía, morfología y distribución geográfica del *Eucalyptus globulus* L.

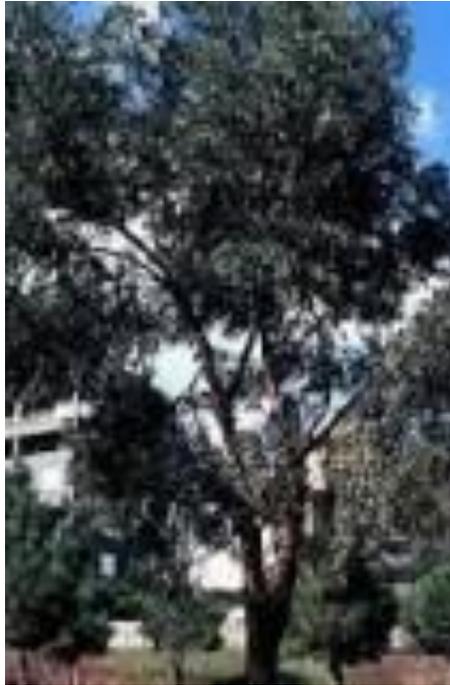
El género *Eucalyptus* está conformado por aproximadamente 500 especies, de las cuales 494 son auténticas de Australia y Tasmania. En el Ecuador se han introducido algunas especies de *Eucalyptus*, en donde el *E. globulus* L. es la especie que mejor se ha adaptado a las condiciones climáticas (Carrere, 2005). En la **Tabla I** se observa la posición taxonómica de la especie en estudio.

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Rosidae
Orden:	Myrtales
Familia:	Myrtaceae
Tribu:	Eucalypteae
Género:	<i>Eucalyptus</i>
Especie:	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill

Fuente: Vinueza, 2013

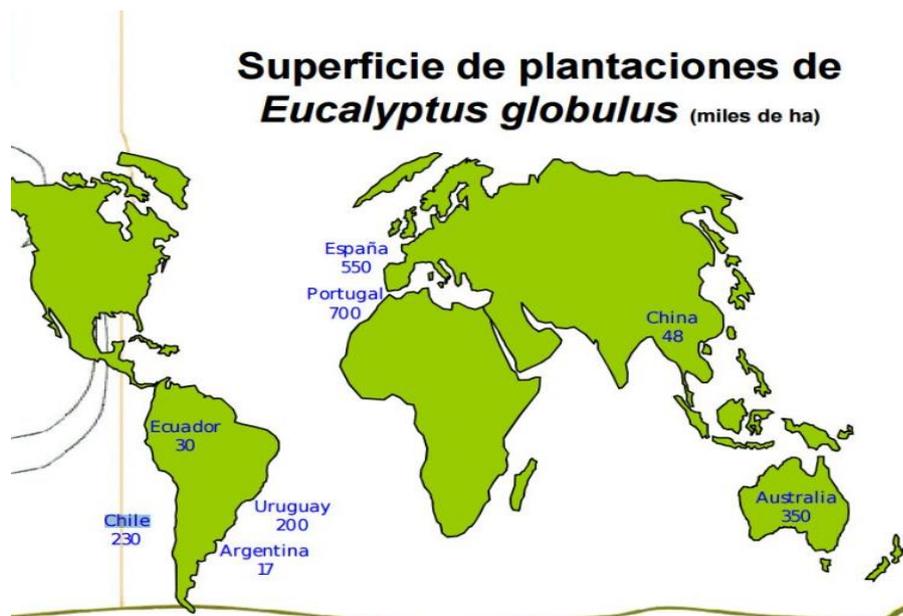
Con respecto a la morfología esta especie se puede presentar como un árbol perennifolio que puede llegar a medir 50 m de altura, la corteza del tronco tiene una tonalidad clara y lisa que termina desprendiéndose en tiras marrón oscuro. Tiene dos tipos de hojas: en las plantas más jóvenes tienen hojas opuestas, ovaladas y sésiles, a diferencia de los árboles crecidos se hacen alternas, coriáceas con un limbo asimétrico en forma de hoz, pecioladas y colgantes. Las flores se encuentran solitarias en las axilas de las ramas

superiores, son grandes, tetrámeras, con cáliz y corola fusionados formando una tapadera leñosa (Renobales, 2001). En la **Figura 1** se observa la morfología de *E. globulus* Labill.



**Figura 1.** *Eucalyptus globulus* L.  
Fuente: Vinueza, 2013

La distribución natural de la familia de los *Eucalyptus* se hallan en Australia y el sudeste asiático, aunque éstos se han extendido por el resto de Asia y Europa entre los 1.000 y 2.000 metros de altitud (Terrón, 2013). En Ecuador la especie *Eucalyptus globulus* L. fue introducida en la sierra entre 2.200 y 3.300 metros de altitud, al inferior del Callejón Interandino (Vinueza, 2013). En la **Figura 2** se observa la distribución actual de los bosques de *Eucalyptus* y su ocupación en hectáreas.



**Figura 2.** Distribución actual de los bosques *Eucalyptus*.  
Fuente: Ramírez, 2017

## II.2 Aceite esencial del *Eucalyptus globulus* L.

El aceite esencial de la hoja del *Eucalyptus globulus* L. es de los más utilizados a nivel medicinal debido sus propiedades antibacterianas, antioxidante y antiinflamatoria (Mota *et al.* 2015).

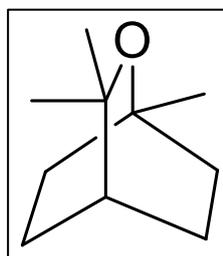
Según estudios fitoquímicos realizados al aceite esencial obtenido de las hojas del *E. globulus* Labill determinaron la presencia de monoterpenos hidrocarbonados y oxigenados; sesquiterpenos hidrocarbonados y oxigenados; y ésteres. En la **Tabla II** se observa la composición química del aceite esencial de *E. globulus* Labill identificado por GC/MS.

**Tabla II.** Composición del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* L. identificado por GC / MS.

No	Compuesto	Cantidad (%)
1	$\alpha$ -Pineno	3,3
2	Mirceno	3
3	$\alpha$ -Felandreno	6
4	1,8-cineol	58,1
5	Terpinoleno	2,9
6	Mircenol	2,1
7	Trans-pinocarveol	0,7
8	Pinocarvona	0,5
9	Trans-carvenol	2,8
10	Neo-isodididrocarvonol	3,6
11	Acetato de Isobornilo	1,1
12	Acetato de verbanol	0,6
13	Germacreno A	1,5
14	Trans-Calameneno	1,5
15	Espatuleno	0,8
16	$\alpha$ -Eudesmol	3,2
17	Dihidro-eudesmol	2,8
18	Acetato de Cariofileno	0,5
19	Z-Acetato de nuciferol	2,3

Fuente: Azadbakht, 2018.

El componente principal es el 1,8-cineol (eucaliptol), constituyendo entre el 58% (Goldbeck *et al.* 2014) y 84% (Azadbakht, 2018) de los componentes químicos presentes (Goldbeck *et al.* 2014). En la **Figura 3** se observa la estructura química del eucalipto.



**Figura 3.** Estructura molecular del Eucaliptol  
Fuente: Hąc-Wydro & Szydło, 2016

### **II.3 Métodos de extracción de aceites esenciales**

Los aceites esenciales se pueden extraer de las muestras vegetales mediante varios métodos como son: destilación por arrastre de vapor e hidrodestilación (Martínez, 2003).

La destilación por arrastre de vapor es el método más empleado por ser sencillo y por tener un bajo costo, aunque tenga el inconveniente de ser un método que se requiera de varios periodos largos de tiempo para poder extraer lo que se requiere (Da Porto et al, 2009).

El método que se empleó para la realización de este proyecto es la de hidrodestilación con trampa de Clevenger por tener un fundamento semejante al de arrastre de vapor, pero con la diferencia que se obtiene en menor tiempo las extracciones.

#### ***II.3.1 Destilación por arrastre de vapor***

Este proceso se lleva a cabo la vaporización selectiva de compuestos formada por un compuesto volátil y otros compuestos no volátiles. En este caso existirán dos fases inmiscibles una orgánica y la otra acuosa, donde cada uno de ellos ejercerán su propia presión de vapor y corresponderá a la del líquido puro a una temperatura de referencia (Ortuño, 2006).

#### ***II.3.2 Hidrodestilación con trampa de Clevenger***

La hidrodestilación es un método que se asemeja al de arrastre de vapor. Se introduce el material vegetal en un matraz que contenga agua llevándolo a ebullición, resultando la condensación de los aceites esenciales de la planta obtenidos en la trampa de Clevenger (Beneke, Peters, Glasser & Hildebrandt, 2012).

## II.4 Antibióticos

Desde tiempos remotos se conoce que las civilizaciones utilizaban especies vegetales como agentes antibacterianos, por ejemplo para el tratamiento del carbunco. A partir del descubrimiento de la penicilina, se han generado numerosos antibióticos para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Lamentablemente el abuso de los antibióticos y el mal manejo de éstos, generan que los microorganismos produzcan resistencia disminuyendo o anulando el efecto del medicamento (Muñoz, 2004).

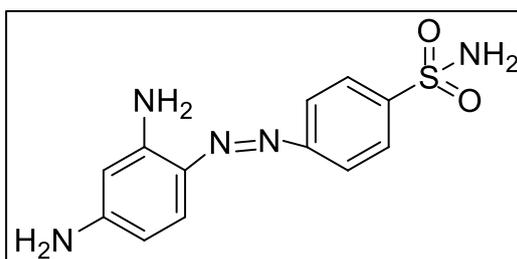
De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 60% de las infecciones adquiridas en los hospitales son causadas por microorganismos resistentes a los antibióticos. Las bacterias son capaces de realizar muchos “trucos” que les permiten desarrollar resistencia frente a estos compuestos, de tal manera que producen enzimas que convierten la molécula activa en otra completamente inactiva e inefectiva (Habeck, 2001).

Los antibióticos son sustancias químicas que inhiben el crecimiento de bacterias (bacteriostáticas) o matan bacterias (bactericidas) (Vester, 2001). Estos se pueden clasificar según su mecanismo de acción (Bailón, 2009):

- Antibióticos que actúan inhibiendo la pared bacteriana como es el grupo de los betalactámicos.
- Antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis proteica este grupo se encuentran los Aminoglucósidos, Macrólidos, Lincosaminas, Esterptograminas y Oxazolidinoma.
- Antibióticos que inhiben la replicación ADN como son las Quinolonas.
- Antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis de ácido fólico este grupo está compuesto por las sulfamidas.

## II.5 Sulfamidas

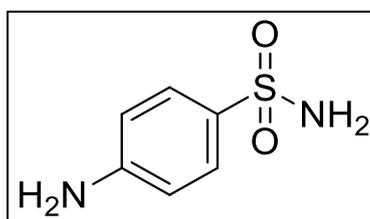
El descubrimiento de las sulfamidas se produjo por serendipia mediante la síntesis de un colorante rojo, llamado *prontosil rubrum*, el cual presentaba propiedades antibacterianas *in vivo* frente a *Streptococcus* y *Staphylococcus* en animales de experimentación (Pinos, 2015). En la **Figura 4** se observa la estructura molecular del prontosil.



**Figura 4.** Estructura molecular del prontosil

Fuente: Bentley, 2009

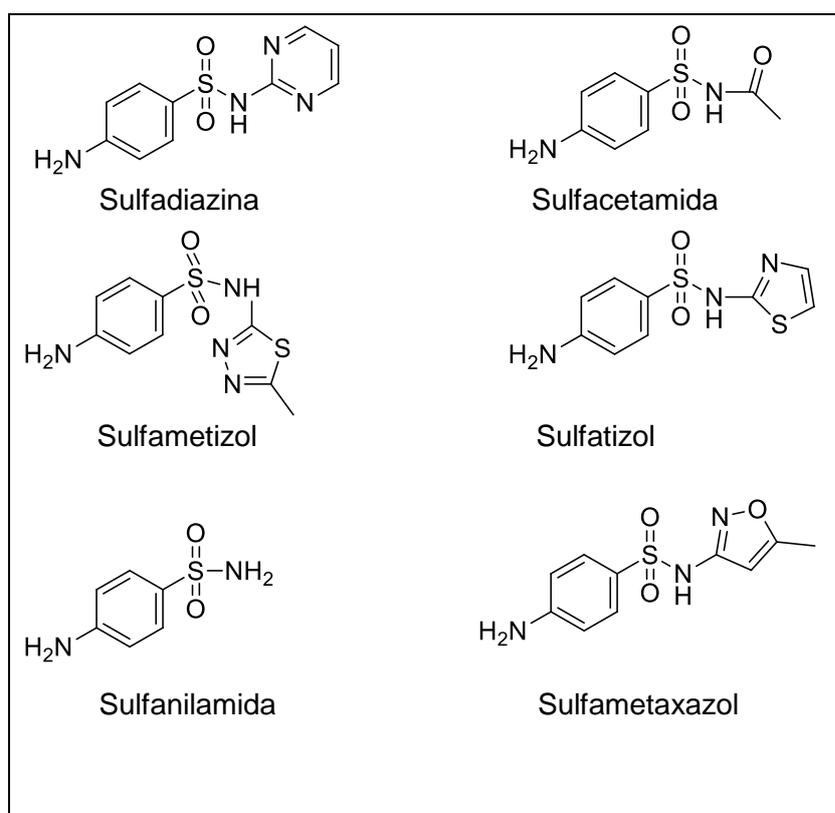
Las sulfamidas fueron los primeros agentes antibacterianos, desde su descubrimiento en la década de 1930 han sido el punto de partida del tratamiento de enfermedades infecciosas, disminuyendo de esta manera las tasas de mortalidad. Son antimicrobianos bacteriostáticos, sintéticos de amplio espectro, inicialmente con actividad frente a una gran variedad de microorganismos Gram positivos y Gram negativos (Castañeda, 2007). En la **Figura 5** se observa la estructura molecular del grupo funcional de la sulfamida.



**Figura 5.** Grupo funcional de la sulfamida

Fuente: Castañeda, 2007

El término sulfamida ha sido utilizado como nombre genérico para designar los derivados del *p*-aminobenzonosulfonamida, la mayoría de ellas son relativamente insolubles en agua. Dentro de este grupo podemos encontrar los siguientes compuestos: sulfametizol, sulfadiazina, sulfacetamida, sulfatiazol, sulfanilamida y sulfametoxazol, los cuales presentan diferencias en sus propiedades farmacocinéticas y efectos secundarios (Bailón, 2009). En la **Figura 6** se observa las estructuras moleculares de los derivados de las sulfamidas.



**Figura 6.** Derivados de las sulfamidas.

Fuente: Bentley, 2009.

### **II.5.1 Sulfametoxazol**

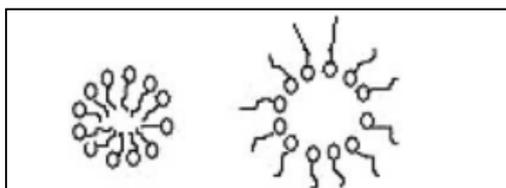
El sulfametoxazol se clasifica como un antibiótico bacteriostático, cuya actividad primaria es contra cepas susceptibles de *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, y anaerobios orales. Adicionalmente, puede ser usado como una alternativa para los antibióticos basados en amoxicilina (Berzas, 2001).

Es un antibiótico ampliamente administrado que pocas veces produce efectos adversos. En la mayoría de las ocasiones éstos suelen ser leves, tales como: reacciones de hipersensibilidad y/o intolerancia gastrointestinal (Oyarzabal, 2005).

## II.6 Microemulsiones (ME)

Las ME fueron introducidas en la década de los 40 por Schulman, son sistemas de liberación prolongadas compuestas por agua, aceite y tensoactivo, los cuales se caracterizan por ser sistemas ópticamente isotrópicos y termodinámicamente estables (Kuchlyan *et al.*, 2016).

Estos sistemas se pueden preparar en una amplia gama de concentraciones de tensoactivos y de relación aceite/agua o agua/aceite. Las microemulsiones permiten la incorporación de compuestos hidrófilos y lipófilos en función de su estructura interna. Las micelas son gotas de aceite en agua y las micelas inversas son gotas de agua en aceite como se observa en la **Figura 7** (Ghosh, 2006).



**Figura 7.** Estructuras de las micelas.

Fuente: Ghosh, 2006.

Las microemulsiones se forman espontáneamente cuyo tamaño podría variar entre 20 nm a 200 nm. Estos sistemas muestran un papel importante en su variedad de facetas de administración de fármacos, ya que pueden resistir una gran cantidad de principio activo debido a su alta capacidad de solubilización, y por ende aumentando la biodisponibilidad del mismo (Fanun, 2008).

## II.7 Tensoactivos

El término tensoactivo denota a sustancias cuya actividad superficial o interfacial es usada para disminuir la tensión de la interfaz. Generalmente son moléculas que contienen un grupo de cabeza polar y una cola apolar, por lo tanto, tienen afinidad con disolventes polares y no polares. Estas moléculas se asocian mediante las diferentes fuerzas inter e intramoleculares (Rao *et al.*, 2009).

Los tensoactivos se pueden organizar en distintas formas, entre las cuales se encuentran las micelas esféricas, micelas en forma de espiral, micelas inversas o hexagonales micelas inversas (Rao *et al.*, 2009).

A continuación, la **Tabla III** muestra la clasificación de los principales tensoactivos.

<b>Tabla III. Clasificación de los Tensoactivos</b>	
<b>Aniónicos</b>	Son sales de sodio que al ionizarse producen iones positivos ( $\text{Na}^+$ ) y negativos (surfactante activo). Los más importantes son: alquilbenceno sulfonatos lineales, los alcoholes etoxilados sulfatos y los alquil sulfatos (Zamudio, 2010).
<b>Catiónicos</b>	Poseen grupos funcionales que se ionizan en disolución acuosa originando iones orgánicos con carga positiva y responsables de la actividad superficial. En su composición presentan grupos nitrogenados del tipo sal amina grasa o de amonio cuaternario (Rios, 2014).
	Carecen de grupos polares cargados, pero poseen grupos como los etoxilatos, $-(\text{O}-\text{CH}_2-$

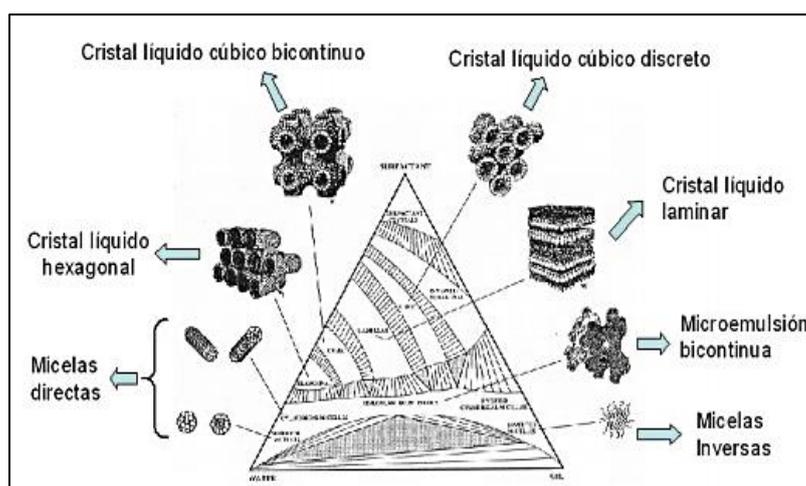
<b>No iónicos</b>	CH <sub>2</sub> )-OH, que muestran gran afinidad hacia las moléculas de agua debido a las fuertes interacciones dipolo-dipolo en los enlaces de hidrógeno (Katime, Quintana & Villacampa, 2003).
-------------------	--

Elaborado por: Autores

## II.8 Diagrama de fases ternario

Es una presentación grafica de tres componentes como por ejemplo aceite, tensoactivo y agua para la formación de sistemas, este tipo de sistemas consta de tres variables independientes como la temperatura, presión y las concentraciones de los tres componentes (Novelo, 2010).

Estos diagramas son utilizados con la finalidad de identificar el rango de las concentraciones de los componentes, se las grafican sobre un triángulo equilátero representando en un sistema ordenado que cuyos ejes son las diferentes estructuras cuales se requieran reconocer, se puede observar en la Figura 8 el Diagrama de fase ternario (Fernández, 2006).



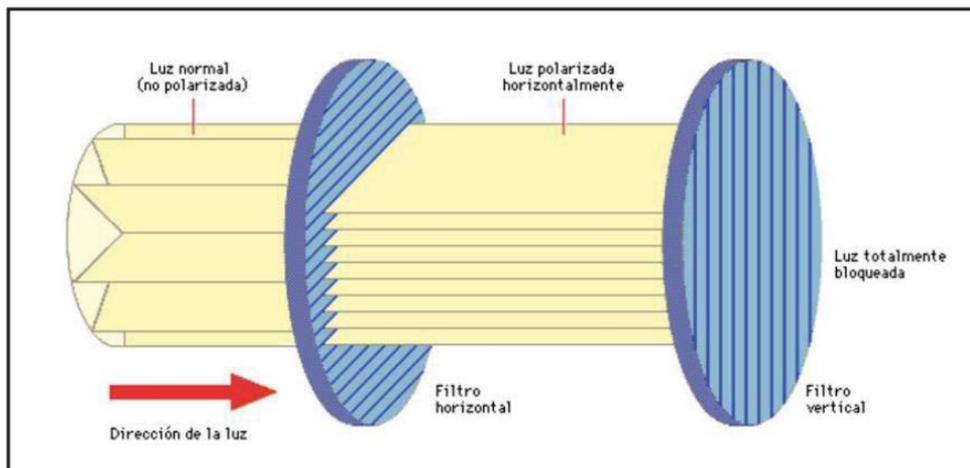
**Figura 8.** Diagrama de fases ternario.

Fuente: Fernández 2006

## II.9 Técnicas de caracterización de microemulsiones

### II.9.1 Microscopía de luz polarizada

Se fundamenta en que las moléculas ordenadas pueden rotar en el ángulo del plano en que vibra la luz polarizada. Es una modificación del microscopio óptico de campo claro en la que se coloca un filtro de polarización entre la fuente luminosa y la muestra, seguido de un segundo filtro llamado analizador, que va ubicado entre la lente objetivo y el observador. La capacidad de los cristales o las sustancias paracrystalinas de rotar en el plano de luz polarizada se lo denomina birrefringencia (Ross & Wojciech, 2008). En **Figura 9** se observa el Mecanismo de acción de la luz polarizada



**Figura 9.** Mecanismo de acción de la luz polarizada

Fuente: Narváez, 2012

### II.10 Evaluación “*in vitro*” de la actividad antibacteriana

### ***II.10.1 Método de difusión o Kirby - Bauer***

En la actualidad este método es ampliamente utilizado para evaluar los aceites esenciales con actividad antimicrobiana, estableciendo la relación que existe entre las concentraciones de la sustancia y el halo de inhibición de crecimiento que se desarrolla en la superficie del medio de cultivo (Stella & Marín, 2009).

Este método se basa en la utilización de discos impregnados del compuesto a evaluar, utilizando concentraciones conocidas que nos permitan establecer de manera cuantitativa el efecto de diferentes compuestos sobre las cepas de las bacterias (Barry & Thornsberry, 1979).

### ***II.10.2 Bacterias***

#### ***II.10.2.1 Escherichia coli***

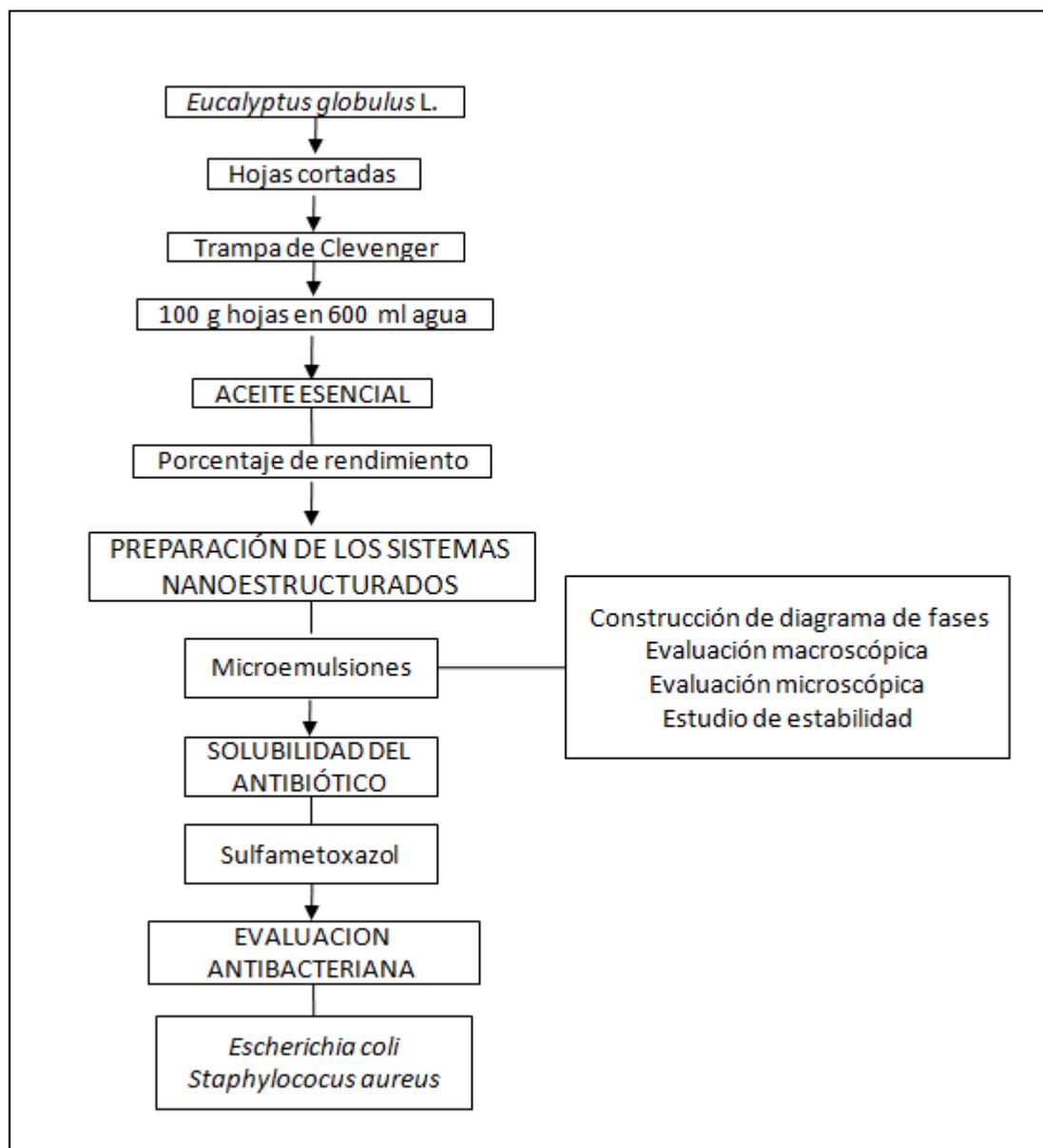
Es una bacteria gramnegativa que se puede encontrar en el sistema digestivo de los animales y seres humanos. Debido a que forma parte de la flora intestinal se puede utilizar como indicador para detectar y medir el grado de contaminación fecal en agua y alimentos (Franco, 2013).

#### ***II.10.2.2 Staphylococcus aureus***

Es un microorganismo grampositivo que se encuentra ampliamente diseminado en el ambiente debido a que posee características particulares de virulencia y resistencia contra antibióticos. Su distribución se extiende a nivel mundial y el impacto en la morbilidad es considerable a nivel comunitario e intrahospitalario (Zendejas, 2014).

## CAPÍTULO III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

### III.1 Diseño experimental



**Esquema 1.** Diseño experimental realizado en el presente trabajo.

Elaborador por los autores

## III.2 Metodología de la investigación

Se realizó un estudio experimental que está dividido en dos fases, la primera fase que consistió en la extracción del aceite esencial de las hojas de *E. globulus* L.; preparación de los sistemas de liberación prolongada; construcción del diagrama de fases, caracterización de los sistemas ,el estudio de estabilidad y determinar la solubilidad del sulfametoxazol en las microemulsiones esta fase se realizó en el Laboratorio de Análisis Orgánico y en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guayaquil.

La segunda fase consistió en la evaluación antibacteriana de los sistemas de liberación prolongados solos y en combinación con sulfametoxazol frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en el área de microbiología del Laboratorio AVVE.

## III.3 Equipos, aparatos, materiales y reactivos

### III.3.1 Equipos:

- Balanza Analítica marca BOECO BBL-31
- Microscópico Zeiss Axiostar plus
- pHmetro (Oaklon)
- Incubadora

### III.3.2 Aparatos:

- Hornilla eléctrica HACEB EM-1

### III.3.3 Materiales:

- Beakers (50-400 mL)
- Balón de destilación (1000 mL)
- Trampa de Clevenger

- Refrigerante
- Tubos de ensayo
- Gradilla de tubos de ensayo
- Pipetas graduadas (1-10 mL)
- Auxiliar de pipetas
- Agitador de vidrio
- Mangueras
- Soporte universal y pinzas
- Espátula
- Envases de plástico (3-30 g)
- Caja petri
- Discos en blanco (vírgenes)
- Hisopos

#### **III.3.4 Reactivos químicos:**

- Tween 80<sup>®</sup>
- Aceite esencial de *Eucalyptus globulus* L.
- Agua destilada
- Sulfametoxazol

#### **III.3.5 Reactivos biológicos:**

- *Escherichia coli* (ATCC25922)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC25923)

### **III.4 Muestra**

El material vegetal fue encontrado en Tungurahua en el Cantón Pelileo Parroquia Salasaca. Una vez obtenido el *Eucalyptus globulus* L; fue transportado al Laboratorio de Análisis Orgánico de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guayaquil.

Como último paso se realizó la identificación de la muestra vegetal por el M.Sc. Xavier Cornejo, curador del Herbario GUAY de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Guayaquil, quien determinó la especie como *Eucalyptus globulus* L.

### **III.5 Técnicas y métodos**

#### ***III.5.1 Extracción del aceite esencial del Eucalyptus globulus L.***

El aceite esencial fue obtenido por medio de hidrodestilación utilizando la trampa de Clevenger. El procedimiento se llevó a cabo de la siguiente manera: se cortaron hojas frescas manualmente en trozos pequeños, luego se pesaron 100 g del material vegetal y se introdujo en un balón (1000 mL) con 600 mL de agua destilada para someter a calentamiento por 1 hora. Finalmente, se recolectó en un tubo de ensayo estéril el aceite esencial obtenido.

#### ***III.5.2 Construcción del diagrama de fase ternario***

El diagrama de fase ternario se desarrolló con la mezcla de Tween-80®, aceite esencial de *Eucalyptus globulus* L. y agua destilada, a distintas proporciones según las combinaciones tal como se muestra en la **Tabla IV** del diagrama para formar los sistemas. Las mezclas se realizaron con agitación manual (1 a 3 minutos) y se mantuvieron a temperatura de  $25 \pm 1$  °C durante 24h para completar el equilibrio del sistema.

<b>Tabla IV.</b> Porcentajes de los componentes utilizados para el desarrollo de ME				
<b>Región</b>	<b>N°</b>	<b>T-80 (%)</b>	<b>Aceite esencial (%) <i>Eucalyptus globulus</i> L.</b>	<b>Agua (%)</b>
<b>1</b>	1	10	10	80
	2	10	20	70
	3	10	30	60
	4	10	40	50
	5	10	50	40
	6	10	60	30
	7	10	70	20
	8	10	80	10
<b>2</b>	9	20	10	70
	10	20	20	60
	11	20	30	50
	12	20	40	40
	13	20	50	30
	14	20	60	20
	15	20	70	10
<b>3</b>	16	30	10	60
	17	30	20	50
	18	30	30	40
	19	30	40	30
	20	30	50	20
	21	30	60	10
<b>4</b>	22	40	10	50
	23	40	20	40
	24	40	30	30
	25	40	40	20
	26	40	50	10
<b>5</b>	27	50	10	40
	28	50	20	30
	29	50	30	20
	30	50	40	10
<b>6</b>	31	60	10	30
	32	60	20	20
	33	60	30	10
<b>7</b>	34	70	10	20
	35	70	20	10
<b>8</b>	36	80	10	10

Elaborado por: Autores

### *III.5.2.1 Caracterización macroscópica de las microemulsiones*

Una vez preparados todos los sistemas ternarios estos se lograron clasificar mediante observación directa, de acuerdo a sus características físicas: color y apariencia.

### ***III.5.3 Caracterización microscópica de las microemulsiones: Microscopia de Luz polarizada***

Las estructuras de los sistemas formados se analizaron por medio de un Microscópico Zeiss Axiostar plus<sup>®</sup>, el cual fue equipado con la luz polarizada utilizando polarizadores cruzados para poder observar y diferenciar la presencia de sistemas nanoestructurados en cada muestra (Microemulsiones o Cristales líquidos).

### ***III.5.4 Solubilidad del sulfametoxazol***

La solubilidad del sulfametoxazol fue evaluada añadiendo 5 mg del fármaco a 1 g de microemulsión, por separado hasta la saturación del sistema. Todos los ensayos de solubilidad se realizaron a temperatura ambiente.

### ***III.5.5 Estabilidad de las microemulsiones***

Los sistemas nanoestructurados se basaron en la determinación de pH, a temperatura ambiente durante tres meses (0, 15, 30, 60 y 90 días). Para evaluar el tiempo cero se consideró un periodo de 24 horas, debido a que este es el tiempo necesario para la estabilización total del sistema. Durante este tiempo los sistemas fueron almacenados en el Laboratorio de Análisis Orgánico de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guayaquil.

### **III.5.6 Evaluación “in vitro” de la actividad antibacteriana**

Para el análisis antibacteriano se utilizaron las siguientes bacterias: *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. En cada uno de los análisis se empleó el siguiente procedimiento:

**Técnica de Kirby Bauer Modificado:** para la preparación de los inóculos de los microorganismos, se sembraron las cepas ATCC en 5 mL de caldo ICC (Infusión Cerebro-Corazón), por 24 horas a 37 °C. Después se preparó una suspensión microbiana ajustada a la concentración de 0.5 en la escala de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL). Se procedió a estriar las bacterias en la caja Petri con Agar Mueller Hinton (40 mL) y se colocaron con la ayuda de pinzas estériles los discos (6 mm), previamente impregnados con 100  $\mu$ L de ME. Las cajas Petri fueron incubadas a 37 °C por 24 horas; luego se realizó la lectura de los halos de inhibición (mm) interpretadas de acuerdo a las técnicas de comprobación de la actividad terapéutica de las plantas medicinales, donde se considera que la bacteria es sensible al extracto (S) si el halo es mayor a 9 mm, intermedia o moderada (I) si el halo mide entre 6-9 mm y Resistente (R) si la longitud del halo es menor a 6 mm. Esta prueba se efectuó por triplicado para comprobar la repetibilidad del método. Como control positivo se usó el antibiótico (una solución con la misma concentración de cada sistema de microemulsión); como controles negativos el Tween-80 (100  $\mu$ L) y aceite esencial (100  $\mu$ L).

## CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### IV.1 Rendimiento del Extracción del aceite esencial del *Eucalyptus globulus* L.

Luego de haber realizado 48 extracciones del aceite esencial de las hojas del *E. globulus* L. se obtuvieron aproximadamente 69 mL, cuyo rendimiento es de 1.4%, con un coeficiente de variación de 9.3. En la **Tabla V** se observa el porcentaje de rendimiento de cada una de las extracciones llevadas a cabo durante la realización del trabajo experimental.

**Tabla V.** Porcentaje de rendimiento de las hojas del *E. globulus* L.

N#	Cantidad de hojas (g) de <i>E. globulus</i> L.	Volumen obtenido de Aceite esencial (ml)	% Rendimiento
1	100	1,6	1,6
2	100	1,5	1,5
3	100	1,7	1,7
4	100	1,4	1,4
5	100	1,5	1,5
6	100	1,5	1,5
7	100	1,5	1,5
8	100	1,6	1,6
9	100	1,4	1,4
10	100	1,7	1,7
11	100	1,3	1,3
12	100	1,5	1,5
13	100	1,4	1,4
14	100	1,4	1,4
15	100	1,4	1,4
16	100	1,6	1,6
17	100	1,5	1,5
18	100	1,4	1,4
19	100	1,2	1,2

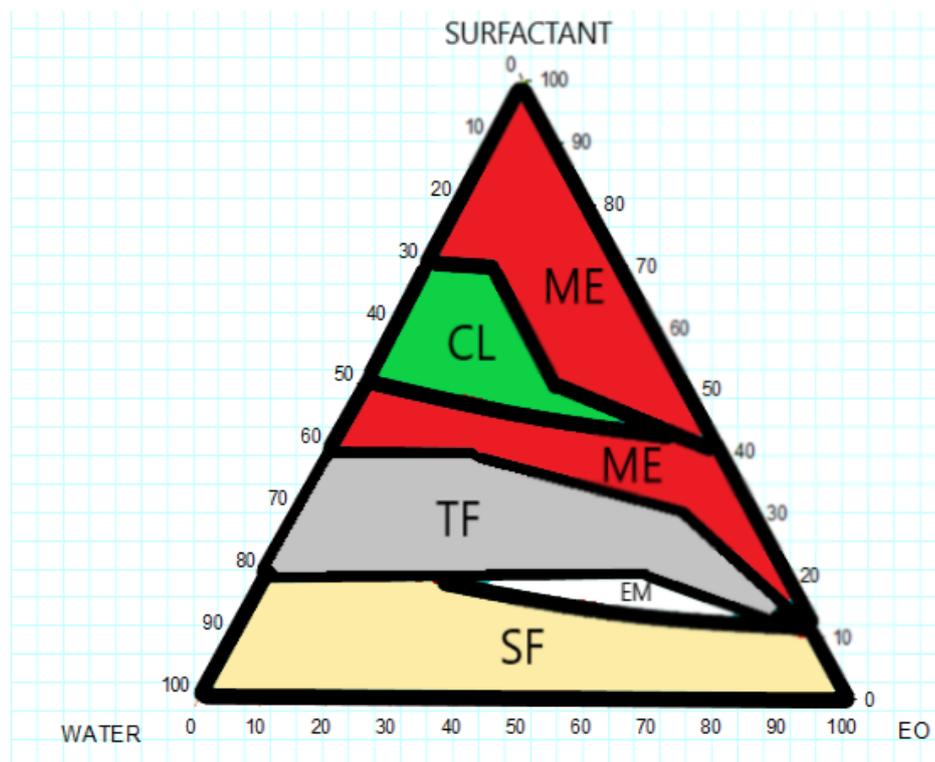
20	100	1,4	1,4
21	100	1,3	1,3
22	100	1,6	1,6
23	100	1,4	1,4
24	100	1,3	1,3
25	100	1,5	1,5
26	100	1,3	1,3
27	100	1,5	1,5
28	100	1,3	1,3
29	100	1,6	1,6
30	100	1,8	1,8
31	100	1,4	1,4
32	100	1,3	1,3
33	100	1,2	1,2
34	100	1,3	1,3
35	100	1,3	1,3
36	100	1,4	1,4
37	100	1,5	1,5
38	100	1,4	1,4
39	100	1,3	1,3
40	100	1,3	1,3
41	100	1,5	1,5
42	100	1,5	1,5
43	100	1,3	1,3
44	100	1,6	1,6
45	100	1,3	1,3
46	100	1,4	1,4
47	100	1,4	1,4
48	100	1,5	1,5
<b>PROMEDIO</b>		1,4	1,4
<b>CV</b>		9,3	9,3

Según estudios realizados en la extracción del aceite esencial de *E. globulus* L. han determinado 1.6% de rendimiento estos resultados son congruentes con los obtenidos en este trabajo experimental.

## IV.2 Construcción del diagrama de fases para la optimización de las microemulsiones.

Con los resultados, presentados en la **Figura 10** es posible observar que la mezcla T80/aceite esencial/agua formó diferentes organizaciones de la matriz de los sistemas, los sistemas fueron ópticamente transparentes, para la caracterización de los sistemas que inicialmente se consideró el grado de viscosidad.

Los sistemas transparentes fluidos fueron considerados microemulsiones (ME) mientras, los más viscosos fueron considerados cristales líquidos (CL), fueron clasificados como emulsiones (EM) todas las regiones blancas opacas. Sistemas que presentaron dos fases fueron clasificados como separación de fases (SF) mientras que los sistemas con una fase que estaba en el intermedio entre blancas opacas y transparentes fueron clasificadas como transición de fases (TF).



**Figura 10.** Diagrama de fases ternario de los sistemas nanoestructurados

Es posible observar que la formación de los sistemas es directamente proporcional a la concentración de tensoactivo ya que pequeñas concentraciones de tensoactivos no fueron posibles estabilizar la mezcla produciendo de esta manera separación de fases (SF). El aumento de la concentración de tensoactivo llevo a una mayor organización de los sistemas formando ME y CL.

#### **IV.2.1 Evaluación macroscópica**

De acuerdo a la **Tabla VI** se observa el estudio organoléptico de los sistemas preparados con la construcción del diagrama de fases.

**Tabla VI.** Estudios organolépticos

<b>Sistema</b>	<b>Color</b>	<b>Apariencia</b>
1-10	Blanco/ Incoloro	Heterogéneo
11-14	Blanco	Homogéneo
15-23	Amarillo	Fluido
24	Amarillo	Viscosa
25	Amarillo	Viscosa
26	Amarillo	Fluido
27	Amarillo	Viscosa
28	Amarillo	Viscosa
29	Amarillo	Viscosa
30	Amarillo	Fluido
31	Amarillo	Viscosa
32	Amarillo	Viscosa
33	Amarillo	Fluido
34	Amarillo	Fluido
35	Amarillo	Fluido
36	Amarillo	Fluido

Elaborados: por Autores

Transcurridas 24 horas de la preparación de los sistemas, las muestras 1-10 presentaron heterogeneidad, ya que se observa la separación de fases. Esto puede deberse a la baja concentración de T-80. Cabe recalcar que los tensoactivos cumplen una función importante en la estabilidad de sistemas heterogéneos, debido a la disminución de la tensión interfacial entre el aceite y agua (Rao *et al.*, 2009).

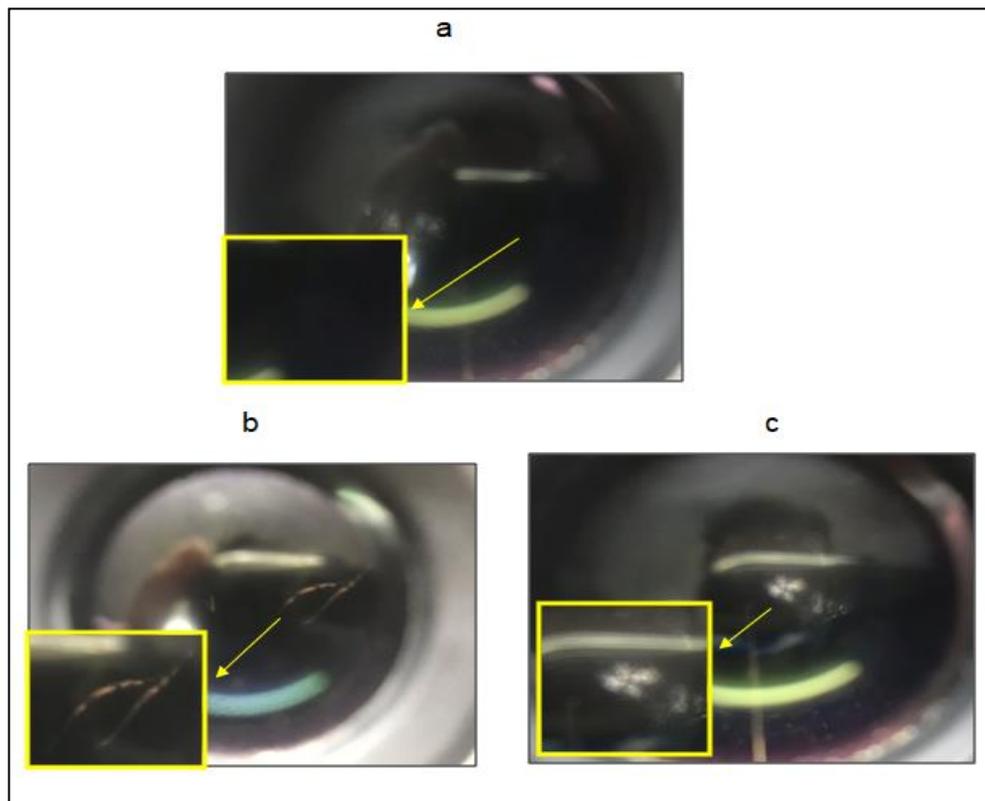
Las muestras 11-14 mostraron aspecto homogéneo y coloración blanquecina, esto sugiere la formación de emulsiones. Por otro lado, los sistemas 15-23 se presentaron una apariencia opalescente, lo cual podría tratarse de una transición de fase.

Finalmente se seleccionaron los sistemas del 24-36 para realizar los siguientes análisis debido a que estos presentaron una apariencia homogénea y translúcida.

### **IV.3 Evaluación Microscópica: Microscopia de Luz polarizada**

La microscopía de luz polarizada es una técnica representada como ondas electromagnéticas que posibilitan estudiar y caracterizar materiales anisotrópicos, debido a la refracción de la luz que pasa por un filtro polarizador a diferentes velocidades (Vermey *et al.*, 2015).

Esta técnica muestra la representación gráfica de cristales líquidos con la presencia de cruces de malta para la fase lamelar y estrías para la fase hexagonal. En el caso de las microemulsiones, sólo se observa la formación de un campo oscuro (Froelich, *et al.*, 2017). Como un ejemplo de lo observado en cristales líquidos y microemulsiones, la **Figura 11** muestra los resultados de la microscopía de luz polarizada de las ME sin sulfametoxazol.



**Figura 11.** Microscopia de luz polarizada (muestras LC y ME)

a: Campo oscuro (ME)

b: Estirias (LC)

c: Cruz de malta (LC)

En la **Figura 11c** es posible observar la presencia de cruces de malta, lo que indica la formación de cristales líquidos de fase lamelar; y en la **Figura 11b** la formación de estirias, sugiriendo la formación de cristales líquidos de fase hexagonal.

Las estructuras de los cristales líquidos también fueron descritas por Vicentini y colaboradores (2008), quienes desarrollaron y caracterizaron CL para la incorporación de la quercetina, en el análisis de microscopia de luz polarizada. Los resultados mostraron la presencia de cruces de malta y estirias, sugiriendo de esta manera las fases lamelar y hexagonal.

Otros resultados fueron demostrados por Kuchlyan y colaboradores (2016), los cuales observaron la presencia de estrías indicando la formación cristales líquidos de fase hexagonal y las cruces de malta con los de fase lamelar. Los resultados presentados por los autores, respalda el concepto de cristales líquidos de fases lamelar (**Figura 11c**) y fase hexagonal (**Figura 11b**).

En la (**Figura 11a**) se observa la formación de un campo oscuro lo cual podría indicar la presencia de ME. Resultados semejantes fueron descritos por Froelich *et al.*, (2017), que observaron la presencia de un campo oscuro en los estudios de microscopía de luz polarizada. En este caso los autores sugieren la formación de ME. Otro trabajo reportado por Chávez *et al.*, (2013), los autores caracterizaron microemulsiones y cristales líquidos, en los resultados de microscopía de luz polarizada, ellos observaron la ausencia de gotas para las microemulsiones, y visualizaron un campo oscuro. Considerando lo expuesto anteriormente, como se pretende estudiar las ME, se seleccionaron las muestras que presentaron campo oscuro en la microscopía de luz polarizada para la continuación del trabajo.

Mediante esta técnica se lograron caracterizar los sistemas nanoestructurados en microemulsión y en cristales líquidos, de acuerdo lo observado en el microscopio de luz polarizada **Anexo IV**. En la **Tabla VIII** se aprecia los resultados obtenidos.

**Tabla VIII.** Caracterización de los sistemas nanoestructurados

<b>Sistemas</b>	<b>Observaciones</b>	<b>Nanoestructuras</b>
24	Campo oscuro	Microemulsión
25	Campo oscuro	Microemulsión
26	Campo oscuro	Microemulsión
27	Campo oscuro	Microemulsión
28	Cruz de malta y Estrías	Cristales Líquidos
29	Cruz de malta	Cristales Líquidos

30	Campo oscuro	Microemulsión
31	Cruz de malta	Cristales Líquidos
32	Cruz de malta	Cristales Líquidos
33	Campo oscuro	Microemulsión
34	Cruz de malta	Cristales Líquidos
35	Campo oscuro	Microemulsión
36	Campo oscuro	Microemulsión

#### IV.4 Solubilidad

En vista de que en el presente trabajo se pretende evaluar la actividad antibacteriana, se decidió estudiar el comportamiento de los sistemas de microemulsiones, debido al menor tamaño de partícula que estos presentan (100 nm aproximadamente). Esto es con la finalidad de aumentar la posible eficacia de las muestras frente a los microorganismos ensayados.

Conforme a la metodología utilizada para la solubilidad del sulfametoxazol se utilizaron las 6 microemulsiones obtenidas perteneciente a las regiones 4, 5 y 6 por tener éstas menor porcentaje de tensoactivo, 40%, 50% y 60% respectivamente. Los resultados obtenidos de la solubilidad del antibiótico se demuestran en la **Tabla IX**.

**Tabla IX.** Solubilidad del fármaco

Región	Muestra	Masa	Resultado
4	24	1g	20 mg
	25	1g	10 mg
	26	1g	5 mg
5	27	1g	-
	30	1g	40 mg
6	33	1g	50 mg

Elaborado por los autores

En la región 4 todos poseen el mismo porcentaje de tensoactivo (40%), sin embargo la diferencia en la cantidad de antibiótico que incorpora cada sistema dependerá del porcentaje de aceite. El sistema 24 logró incorporar la máxima cantidad de antibiótico con respecto a las ME 25 y 26. Esto significa que a medida que aumenta el porcentaje de aceite esencial de *E. globulus L.* disminuye la solubilidad del sulfametoxazol.

En la región 5 posee un 50% de tensoactivo, no obstante la ME 27 con un 10% de aceite esencial sufrió una saturación al agregar 5 mg de antibiótico. El sistema 30 (40% de aceite) logró soportar 40 mg de antibiótico, eso quiere decir que a medida que aumenta el porcentaje de aceite aumenta la capacidad de incorporación del antibiótico.

El sistema 33 se comparó con el sistema 24 ya que poseen el mismo porcentaje (30%) de aceite esencial. Como se observa en la **Tabla IX** el sistema 33 logró incorporar 50 mg de antibiótico mientras que la muestra 24 soportó 20 mg del fármaco. Este resultado indica que a mayor porcentaje de tensoactivo la solubilidad del sulfametoxazol aumenta.

Finalmente, al comparar las tres regiones estudiadas se observa que la solubilidad del fármaco dependerá de la concentración del tensoactivo.

#### **IV.5 Evaluación del Estudio de Estabilidad**

En el presente trabajo se decidió estudiar el efecto del aceite esencial del *E. globulus L.* en la actividad antibacteriana empleando sólo las ME 24 y 26 por las siguientes razones: ambas pertenecen a la región 4 es decir presentan la menor proporción de tensoactivo y ambas representan el menor y mayor porcentaje de aceite esencial respectivamente.

De los dos puntos seleccionados anteriormente se continuó con el estudio de estabilidad, el cual consistió en determinar el pH en un periodo de

tiempo de tres meses a temperatura ambiente. Los valores obtenidos se reflejan en la **Tabla VII**.

**Tabla VII.** Lectura de pH

N# Muestra	pH				
	0 días	15 días	30 días	60 días	90 días
24	4.17	4.55	4.19	4.29	4,33
26	4.65	4.37	4.65	5.47	5,40

Elaborados: por Autores

En términos generales se observa una ligera inestabilidad de ambos sistemas en los 15 primeros días. La ME 24 presentó menor valor de pH que la ME 26 en el tiempo cero.

Pasado 30 días los sistemas presentaron una estabilidad regular. Las ME 24 fueron más estables que la ME 26. Estos resultados son congruentes con los obtenidos por Reyes y Baque (2018). Las autoras desarrollaron la “Influencia de la Concentración Tensoactivo y agua en la formación de Cristales Líquidos utilizados en fármacos de baja solubilidad (Gemfibrozilo)”.

#### **IV.6 Evaluación “*in vitro*” de la actividad antibacteriana**

##### **Técnica de Kirby Bauer Modificado**

Por medio de esta técnica fue posible evaluar la actividad antibacteriana de los sistemas seleccionados utilizando dos tipos de bacterias: Una gram negativa (*Escherichia coli*) y una gram positiva (*Staphylococcus aureus*). Se consideró como control positivo el sulfametoxazol (diferentes concentraciones) y el aceite esencial; y como control negativo el Tween 80<sup>®</sup>. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla X**.

**Tabla X.** Resultados del efecto de las ME solos y en combinación con el antibiótico en diferentes bacterias

Bacterias	Zona de inhibición en las (mm) ME solos y en combinación con el antibiótico				Control positivo			Control negativo
	24	24*	26	26*	Sulfa. 15mg	Sulfa. 5mg	Aceite esencial	Tween 80®
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 Gram negativo	2±1 (R)	16±1 (S)	1±1 (R)	10±1 (S)	6±1	4±1	8±1	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923 Gram positivo	22±1 (S)	-	-	12±1 (S)	14±1	9±1	13±1	-

S.: Sulfametoxazol  
X\*: ME en combinación con el antibiótico

S= sensible > 9 mm  
I= intermedia o Moderada 6-9 mm  
R= resistente < 6 mm

Los datos obtenidos por la técnica de Kirby Bauer dan como resultado: que las bacterias Gram negativas como la *E. coli* son sensibles a los sistemas de aceite esencial en combinación con el antibiótico presentando halos de inhibición de 16±1 mm y de 10±1 mm, valores incluso mayores que los halos de inhibición de los controles positivos, sulfametoxazol 15 y 5 mg respectivamente.

Por otro lado, el halo de inhibición obtenido de ME 24 (22±1 mm) frente al *S. aureus* superó en gran medida los controles positivos; a diferencia de la *E. coli* este mismo sistema ME 24 no se obtuvo un halo de inhibición por presentar resistencia bacteriana.

Cabe recalcar que los sistemas sin la combinación del antibiótico frente a las bacterias Gram negativas (*E. coli*) presentan resistencia. Esto ocurre por las

alteraciones de permeabilidad que se van produciendo en la bicapa lipídica de la bacteria, debido a los distintos cambios localizados en las porinas, cuyas proteínas son las encargadas de formar puentes en la membrana externa que regulan la entrada de distintas moléculas. De tal manera que no permitirán el paso de ciertas sustancias y por consecuencia su efecto antibacteriano será nulo (Tafur *et al.*, 2008).

Generalmente el sulfametoxazol se comercializa de forma conjunta con la trimetoprima (antibiótico sintético bacteriostático) en dosis altas que van desde los 40 a 800 mg; en contraste con los resultados obtenidos en el presente trabajo la actividad antibacteriana de las ME, en combinación o no con el antibiótico, mostraron que a menor dosis tienen mayor potencia.

Así mismo destaca la posible sinergia entre el sulfametoxazol y el aceite esencial del *Eucalyptus globulus* L., lo cual sugeriría el empleo de un sistema nanoestructurado, conformado por un derivado sintético y un producto natural, que presenten menores efectos adversos.

## CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos en el presente trabajo de titulación se puede concluir:

- Con respecto a la extracción del aceite esencial de *E. globulus* L. da como resultado un porcentaje de rendimiento de 1.4% y C.V. 9.3% obtenidos en 48 extracciones de cada 100 g de material vegetal. Dicho porcentaje de extracción fue suficiente para poder preparar los sistemas nanoestructurados y evaluar el efecto antibacteriano.
- Al concluir con la construcción de diagramas de fases ternarios, se identificaron las diferentes regiones formadas mediante caracterización macroscópica: separación de fase, emulsiones, transición de fase y sistemas nanoestructurados. Éstos últimos fueron confirmados mediante microscopia de luz polarizada, en las cuales un campo oscuro y cruces de malta correspondieron a ocho microemulsiones (24, 25, 26, 27, 30, 33, 35 y 36) y cinco cristales líquidos (28, 29, 31, 32 y 34) respectivamente.
- Mediante el estudio de estabilidad se demostró que a medida que transcurría el tiempo (0, 15, 30, 60, 90 días) las microemulsiones mantuvieron estable su color y apariencia. Sin embargo el pH sufre un ligero aumento debido a que los sistemas alcanzan una mejor reorganización estructural.
- Se determinó la solubilidad del sulfametoxazol en las microemulsiones preparadas a partir del aceite esencial del *E. globulus* L.; teniendo como resultado que a mayor porcentaje de tensoactivo aumenta la solubilidad del antibiótico en el sistema.

- En los ensayos “*in vitro*” se lograron obtener resultados que reflejan como las microemulsiones, en combinación o no con el antibiótico, potencian la actividad antibacteriana del sulfametoxazol frente a *E. coli* y *S. aureus*.
- El estudio realizado constituye el primer reporte sobre el efecto antibacteriano del aceite esencial *Eucalyptus globulus* Labill en sistemas nano estructurados microemulsiones.

## RECOMENDACIONES

Con respecto a los resultados obtenidos se plantean las siguientes recomendaciones:

- Realizar estudios de estabilidad por mayor tiempo a diferentes temperaturas de las microemulsiones con y sin principio activo, de tal manera que se pueda obtener información más detallada sobre la conservación de los sistemas.
- Llevar a cabo estudios de calorimetría de barrido (DSC) y el perfil reológico para obtener la caracterización de cada uno de los sistemas de microemulsión.
- Evaluar el comportamiento de las microemulsiones mediante un estudio farmacocinético, para demostrar si estas actúan como transportador de liberación prolongada.
- Se recomienda seguir investigando en el área de microbiología las microemulsiones frente a otros tipos de bacterias grampositivas o gramnegativas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Axer, M., Amunts, K., Grässel, D., Palm, C., Dammers, J., Axer, H., Pietrzyk, U., Zilles, K., (2011). *A novel approach to the human connectome: ultra-high resolution mapping of fiber tracts in the brain*. Neuroimage 54, 1091–101. doi:10.1016/j.neuroimage.2010.08.075

Azadbakht, Ehsan, Maghsoudlou, Y, Khomiri M & Kashiri, M. (2018). *Development and structural characterization of chitosan films containing Eucalyptus globulus essential oil: Potential as an antimicrobial carrier for packaging of sliced sausage*. Food Packaging and Shelf Life, 1(1),65-72.

Bailón, M. (2009). *Uso de técnicas separativas miniaturizadas con alternativa a la determinación de antibióticos Beta-lactámicos en fármacos, aguas y alimentos*. Universidad de Granada, Granada, España.

Barbarán, C. (2014). *Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de extractos vegetales de las especies de Tabernaemontana frente a cepas de Staphylococcus aureus Y Pseudomonas aeruginosa, de la región loreto, Perú*. Universidad nacional de la amazonia peruana. Perú, Iquitos.

Barry, A., Amsterdam, D., Coyle, M., Gerlach, E., & Thornsberry, C., (1979). "Simple Inoculum Standardizing System for Antimicrobial Disk Susceptibility Test." *J. Clin. Microbiology*. American society for microbiology, volume 10, pp. 910-918.

Beneke, D., Peters, M., Glasser, D., & Hildebrandt, D. (2012). *Understanding distillation using column profile maps*. (pp. 1, 2, 48, 206).

Bentley, R. (2009). *Different roads to discovery; Prontosil (hence sulfa drugs) and penicillin (hence  $\beta$ -lactams)*. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 36(6), 775-786.

Berzas, J. Castañeda, G. & Guzmán, F. (2001). *Determinacion de sulfametoxazol, sulfamiazina y compuestos asociados en preparaciones farmacéuticas mediante electroforesis de zona capilar*. ELSEVIER, volumen 918, pp. 205-210.

Carmona, J. & Alonso, F. (2008). *Bacteriuria asintomática en la consulta de atención primaria*. Sistema Nacional de Salud, 32(2), 45-51.

Carrere, R. (2005). *Pinos y eucaliptos en Ecuador: símbolos de un modelo destructivo*. Quito-Ecuador.

Castañeda, Y. (2007). *Caracterización de reacciones adversas reportadas con trimetoprim/sulfametoxazol al programa distrital de farmacovigilancia*. Universidad de ciencias aplicadas y ambientales. Bogotá. Colombia.

Chavez, G. Irán, P. Luzardo, M. Bravo, B. & Máquez, N. (2013) *Caracterización de cristales líquidos por microscopía óptica en sistemas surfactante polietoxilado-alcano-agua*. Química Nova vol.36 no.9. São Paulo. Brazil.

Da Porto, C., Decorti, D. & Kikic, I. (2009). *Flavour compounds of Lavandula angustifolia L. to use in food manufacturing: Comparison of three diferente extraction methods*. Food Chemistry. 112:1072-1078.

Duran, X. (2017) *El impacto de los bosques de eucaliptos en recursos hídricos*. Agencia catalán Del agua.

Fanun, M. (2008). *Microemulsions Properties and Applications*. En *Surfactant Science*. Boca Ratón. Estados Unidos.

Fernández, A. (2006). *Preparación, caracterización y estabilidad de emulsiones y micorelmusiones O/W*. Universidad de Granada. Granada.

Franco, P. Ramírez, L. Orozco, M. & López, A. (2013). *Determinación de Escherichia Coli e identificación del serotipo O157:H7 en carne de cerdo comercializada en los principales supermercados de la ciudad de Cartagena*. Revista lasallista de investigación - Vol. 10 No. 1 - 2013 - 91•100

Froelich, A., Osmałek, T., Snela, A., Kunstman, P., Jadach, B., Olejniczak, M., & Bialas, W. (2017). *Nuevos geles basados en microemulsiones para la administración tópica de indometacina: formulación, propiedades fisicoquímicas y estudios de liberación de fármacos in vitro*. Journal of Colloid and Interface Science (507), 323-336.

Gao, J. Zhong, W. He, J. Li, H. Zhang, H. Zhou, G. Li, B. Lu, Y. Zou, H. Kou, G. Zhang, D. Wang, H. Guo, Y. & Zhong, Y. (2009) *Tumor-targeted PE38KDEL delivery via PEGylated anti-HER2 immunoliposomes*. Int J Pharm. 374(1-2):145-52.

Ghosh, -P. (2006). *Microemulsions: A Potential Drug Delivery System*. Drug Delivery Research Laboratory, Pharmacy Department, The M.S. Universidad de Baroda, Vadodara, India.

Goldbeck JC, Nascimento JE, Jacob RG, Fiorentini ÂM, Silva WP. (2014). *Bioactivity of essential oils from Eucalyptus globulus and Eucalyptus urograndis against planktonic cells and biofilms of Streptococcus mutans*. Ind Crops Prod. 60:304–309

Habeck, M. (2001). "Trojan Antibiotics". Drug Discovery Today. Vol. 6, N° 7, pp. 330-31.

Hac-Wydro, K. & Szydło, K. (2016). *The influence of environmentally friendly pesticide – Eucalyptol – alone and in combination with terpinen-4-ol – on model bacterial membranes*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 146(3), 918-923, <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.07.044>.

Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC). (2016). *Estadísticas Vitales: Registro Estadístico de nacidos vivos y defunciones*. Quito, Ecuador.

INEC. (2013). *Tabulados Egresos Hospitalarios*. Quito, Ecuador

Inouye, S.; Uchida, K.; ABE, S. (2006). *Volatile composition and vapour activity against Trichophyton mentagrophytes of 36 aromatic herbs cultivated in Chichibu district in Japan*, The International Journal of Aromatherapy 16, pp. 159–168.

INPPAZ. (2000). Instituto Panamericano de Protección de los Alimentos y Zoonosis. *Taller internacional sobre vigilancia de Salmonella y de la resistencia antimicrobiana en patógenos transmitido por los alimentos*. (Tesis doctoral). Argentina, Buenos Aires.

Juarez, M. (2008). *Comparación del rendimiento del aceite esencial de dos especies de Eucalipto (Eucalyptus citriodora Hook y Eucalyptus camaldulensis Dehnh), aplicando el método de hidrodestilación a nivel laboratorio* (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

Katime, I. Quintana, J. Villacampa, R. (2003). *Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizadas por polímeros y agentes tensoactivos*. Revista Iberoamericana de Polímeros, 4, 123.

Kuchlyan, J., Kundu, N & Sarkar, N. (2016). *Ionic liquids in microemulsions: Formulation and characterization*. Department of Chemistry, Indian Institute of Technology, Kharagpur, 721302 WB, India.

Martínez, A. (2003). *Aceites esenciales*. Universidad de Antioquia. Medellín. Colombia.

Mosquito, S. & Ruiz, J. (2011). *Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en Escherichia coli asociadas a diarrea*. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú. Peru Med Salud Publica, pp. 648-656.

Mota Vde S, Turrini RN, Poveda Vde B. (2015). *Antimicrobial activity of Eucalyptus globulus oil, xylitol and papain: a pilot study*. Rev Esc Enferm USP. 49:216-220.

Muhammad MT, Khan MN. (2018). *Eco-friendly, biodegradable natural surfactant (Acacia Concinna): An alternative to the synthetic surfactants*. Journal of Cleaner Production, doi: 10.1016/j.jclepro.2018.04.016.

Muñoz, D. (2004). *Los antibióticos y su situación actual*. Universidad de Antioquia. Colombia.

Narváez, D. (2012). *Histología: Texto complementario para el estudio del Tema 2 "El microscopio"*.

Novelo, A. & Garcia, J. (2010). *Trayectorias en diagramas ternarios*. Universidad Nacional Autónoma de México. *Educ. quím.*, 21(4), 300-305, 2010.

Organización Mundial de la Salud, (2014). *Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos*. *Vitae*, vol. 11, pp 21-33.

Ortuño, M. (2006). *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes*.

Oyarzabal, I. & Zubiaurre, L. (2005). *Inestabilidad por trimetoprim-sulfametoxazol en paciente nefrectomizado e inmunocompetente con infección del tracto urinario por heparina de bajo peso molecular*. *ELSEVIER*, volume 36, páginas 170-171.

Paosen, J. Saising, A. Wira Septama, S. Piyawan, V. (2017). *Green synthesis of silver nanoparticles using plants from Myrtaceae family and characterization of their antibacterial activity*, *Materials Letters*. Department of Microbiology, Faculty of Science, and Natural Product Research Center of Excellence, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand.

Piedrasanta, R. (2007) *Comparación química y de rendimiento del aceite esencial de hoja y raíz de valeriana prionophylla standl. De dos diferentes localidades de Guatemala*. Universidad San Carlos de Guatemala, Guatemala.

Pinos, P. (2015). *Antibacterianos. Aspectos farmacológicos y quimiofarmacéutico. (Grado de farmacia)*. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de farmacia. Madrid, España.

Rao Y.S. et al. (2009). *Microemulsions: A Novel Drug Carrier System*. *International Journal of Drug Delivery Technology*; 1(2): 39-41.

Renobales, G. & Sallés, J. (2001). *Plantas de interés farmacéutico: Eucalyptus globulus*. Universidad del País Vasco, Lejona – España.

Ribeiro, O. & Alva, A. (2001). *Extracción y caracterización del aceite esencial de jengibre (Zingiber officinale)*. *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria*, 1(1), 38-42.

Ríos, F. (2014). *Comportamiento ambiental de tensoactivos comerciales: biodegradabilidad, toxicidad y ozonización*. (Tesis doctoral). Universidad de Granada, Granada. España.

Ross, M. & Wojciech, P. (2008). *Histología: Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular*. (5) 974p. España.

Seija, V. (2006). *Temas de Bacteriología y Virología Médica, Principales grupos de antibióticos*.

Shiva, C. (2007). *Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento*. (Tesis doctoral). Universidad autónoma de Barcelona. España, Barcelona.

Singh, H., Kaur, S., Negi, K., Kumari, S., Saini, V., Batish, D. & Kohli, K. (2012). *Assessment of in vitro antioxidant activity of essential oil of Eucalyptus citriodora (lemon-scented Eucalypt; Myrtaceae) and its major constituents*. LWT- Food Sci. Technol. 48, pp. 237–241.

Stashenko, E. (2009). *Aceite esencial. Centro nacional de investigaciones para agroindustrialización de especies vegetales aromáticas y medicinales tropicales. Universidad industrial Santander*. Bogotá, Colombia.

Stella L. & Marin D. (2009). *Scientia et Technical. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal*. n 42. Páginas 263 – 268.

Tafur, J.D., Torres, J.A. and Villegas, M.V. (2008) *Mechanisms of Antibiotic Resistance in Gram Negative Bacteria*. Infect, 12, 227-232.

Terrón, C., Paz, N., Leboeiro, C., Lobato, C. & Otero, A. (2013). *Los eucaliptos en Galicia*. Universidad de Vigo, España.

Topiar, M., Sajfrtova, M., Pavela, R., & Machalova, Z., (2015). *Comparison of fractionation techniques of CO2 extracts from Eucalyptus globules L.— composition and insecticidal activity*. J. Supercrit. Fluids 97, pp. 202–210.

Vermey, B., Chapman, M., Cooke S., Kilani, S. (2015). *The relationship between sperm head retardance using polarized light microscopy and clinical outcomes*. School of Women's and Children's Health, University of New South Wales, High Street, Kensington, Sydney, NSW 2052, Australia.

Vester, B. & Douthwaite, S. (2001). *Macrolide resistance Conferred by Base substitutions in 23SrRNA*. Antimicrob Agents Chemother. 45(1):1-12.

Vicentini, F., Casagrande, R., Georgetti, S., Bentley, M., Vitória, B. & Fonseca, M. (2008). *Influencia del vehículo en la actividad antioxidante de la Quercetina: la formulación líquido cristalina*. Latin American Journal of Pharmacy. Vol.26, no. 06.

Vinueza, I. (2013). *Ficha técnica No. 15 Eucalyptus globulus. Ministerio de apicultura, ganadería, acuacultura y pesca*. Ecuador forestal. Ecuador.

Zamudio, E. (2010). *Tratamiento biológico de las aguas residuales generadas en el lavado de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo*. Tesis Maestría en Bioprocesos. México D.F: Instituto Politécnico Nacional. Unidad profesional interdisciplinaria de biotecnología. 118 p.

Zendejas, G. Avalos, H. & Soto, M. (2014) *Microbiología general de Staphylococcus aureus: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación*. Rev Biomed 2014; 25:129-143. Universidad de la Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo, México.

## **GLOSARIO**

### **Aceite esencial:**

Sustancia líquida concentrada compuesta por sustancias aromáticas volátiles que poseen la mayoría de especie vegetal.

### **Antibacteriana:**

Aquel que sirve para combatir las infecciones causadas por bacterias.

### **Bacteriostático:**

Sustancia que no produce la muerte a una bacteria pero impide su reproducción.

### **Biodisponibilidad:**

Hace referencia a la velocidad y a la cantidad con las cuales un fármaco es absorbido y alcanza su punto de acción en el organismo.

### **Carbunco:**

Enfermedad infecciosa y contagiosa, producida por una bacteria, que padecen los animales, en especial el ganado bovino y ovino.

### **Compuestos Hidrófilos:**

Es una sustancia que tiene afinidad por el agua.

### **Enfloración:**

Extracción en frío de la esencia de una flor mediante el contacto de una materia grasa.

### **Hidrodestilación:**

Es uno de los métodos de extracción de aceites esenciales en el cual el material vegetal se encuentra sumergido en agua en ebullición.

### **Inmiscible:**

Que no puede ser mezclado.

**Isotrópica:**

Verse igual en todas direcciones sin importar la posición del o los observadores que se encuentren en él.

**Serendipia:**

Es un descubrimiento o un hallazgo afortunado, valioso e inesperado que se produce de manera accidental o casual.

**Sésiles:**

Se suele utilizar en botánica para expresar la falta de un órgano que sirva de pie o soporte.

**Surfactante:**

Los surfactantes, que también se denominan tensioactivos o tensoactivos, se componen de partes hidrófobas (que rechazan el agua) y partes hidrófilas (que son solubles en agua).

**Sustancias aromáticas:**

Son compuestos volátiles que se detectan con los receptores olfatorios.

**Viscosidad:**

Consistencia espesa y pegajosa de una cosa.

## ANEXOS

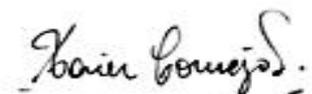
### **Anexo I.** Identificación y descripción de la especie por el Herbario Guay

**Herbario GUAY**  
Facultad de Ciencias Naturales  
Universidad de Guayaquil

De: Biól. Xavier Cornejo, curador asociado  
Para: Dra. Carmen Bonifaz, Decana Fact. CCNN y Directora Herbario GUAY  
Fecha: Miércoles, 9 de Mayo de 2018  
Asunto: Identificación de especimen y descripción de la especie  
Registro GUAY de identificación: 069

Saludos cordiales. Por medio de la presente se entrega la identificación y descripción morfológica de 1 colección de planta vascular, recibida en el Herbario GUAY el día Martes 8 de Mayo del año en curso. La identificación de la muestra, ha sido solicitada por Q. F. Carolina Santiago Dugarte, mediante oficio dirigido a usted con fecha 23 de Abril de 2018, para el proyecto de investigación: "Efecto de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de eucalipto en sistemas de liberación prolongada", concerniente al trabajo de titulación de los estudiantes Lauro Fernando Palma Cajape y Javier Ernesto Castro Zambrano, pertenecientes al décimo semestre de la carrera de Química y Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guayaquil.

Atentamente,



Biól. Xavier Cornejo  
Curador Herbario GUAY

Adj.: Identificación  
cc. Herbario GUAY



RECIBIDO

09 MAY 2018

Av. Juan Tarcá Marengo y Av. Gómez Lince s.o.  
P.O. Box 09-01-10634  
Guayaquil-Ecuador

**Herbario GUAY**  
Facultad de Ciencias Naturales  
Universidad de Guayaquil

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex. Takht.

Superorden: Rosanae Takht.

Orden: Myrtales Juss. ex Bercht. & J. Presl

Familia: Myrtaceae Juss.

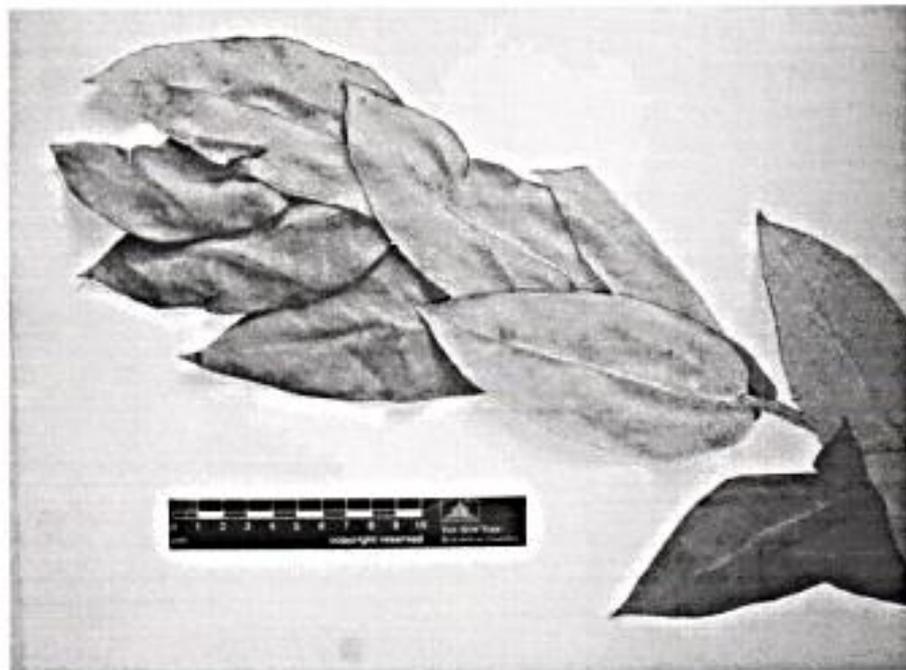
Género: *Eucalyptus* L'Her

Nombre científico: *Eucalyptus globulus* Labill

Nombre vernáculo: Eucalipto

Descripción taxonómica:

Árbol; ramas terminales con tallos fuertemente tetragonales cubiertos por un indumento blanquinoso. Hojas simples, opuestas, sésiles; lámina cartácea, lanceolada, ca. 8-15 x 4-7 cm, base cordada, ápice agudo hasta obtuso, glauca y glabra en el envés. Flores y frutos no vistos.



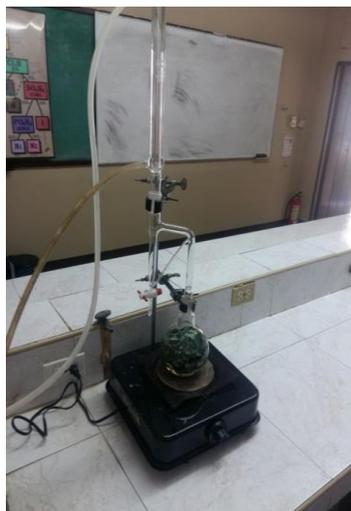
Av. Juan Tanca Marengo y Av. Gómez Lince s.n.  
P.O. Box 09-01-10634  
Guayaquil-Ecuador

2

**Anexo II.** Extracción del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* L.



**1)** Material Vegetal en el balón de destilación



**2)** Montaje del equipo



**3)** Obtención del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* Labill

**Anexo III.** Preparación de los sistemas de liberación prolongada



**1)** Tensoactivo



**2)** Aceite esencial de *E.globulus L.*



**3)** Agua destilada



**4)** Agitación manual de los componentes

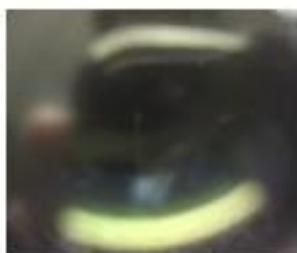


**5)** Resultado final de los sistemas preparados

**Anexo IV. Observaciones del microscopio de luz polarizada**



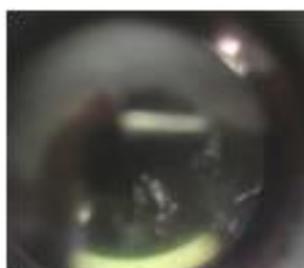
Sistema 24. Campo oscuro



Sistema 25. Campo oscuro



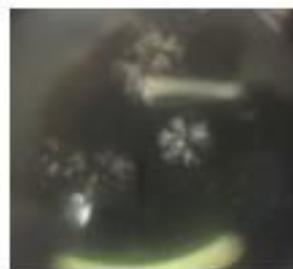
Sistema 26. Campo oscuro



Sistema 27. Campo oscuro



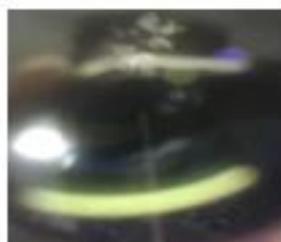
Sistema 28. Estrias



Sistema 29. Cruz de malta



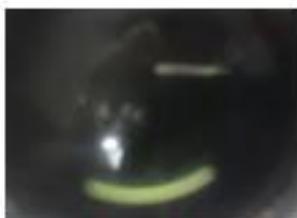
Sistema 30. Campo oscuro



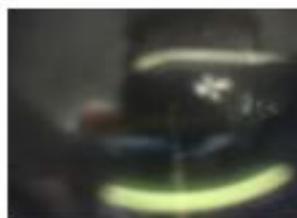
Sistema 31. Cruz de malta



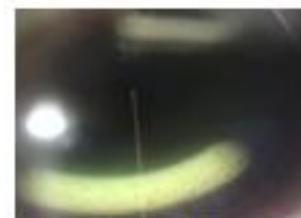
Sistema 32. Cruz de malta



Sistema 33. Campo oscuro



Sistema 34. Cruz de malta



Sistema 35. Campo oscuro



Sistema 36. Campo oscuro

**Anexo V. Evaluación antibacteriana**



**1) Colocación de discos**



**2) Impregnación de discos**

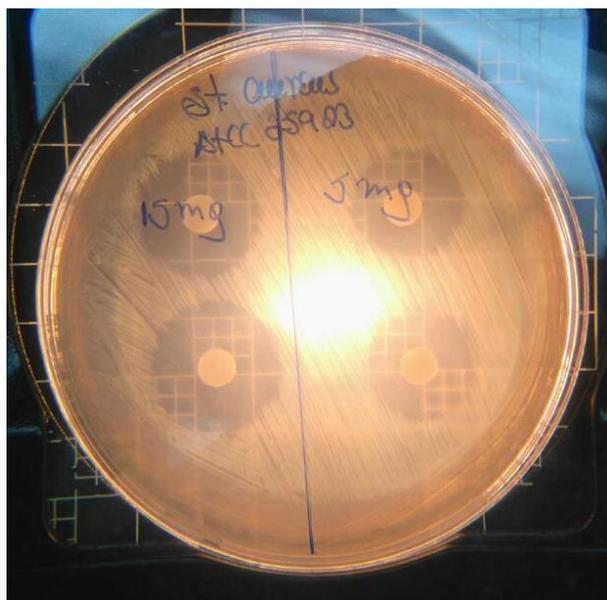


3) Medición de halos de inhibición

**Anexo VI.** Resultados de la evaluación antibacteriana



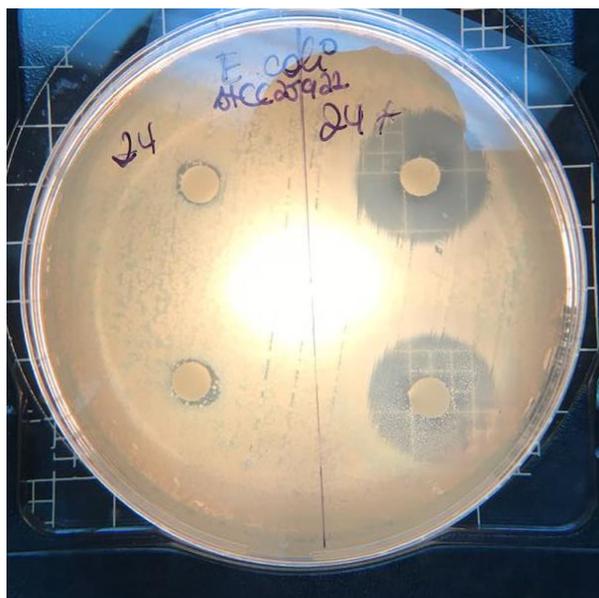
1) *Staphylococcus aureus* frente a ME 26, ME26\* y Tween 80



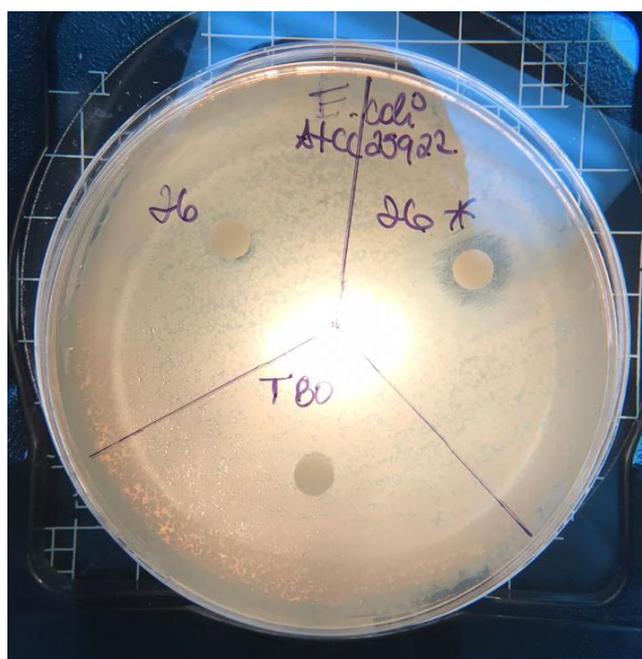
2) *Staphylococcus aureus* frente a control positivo



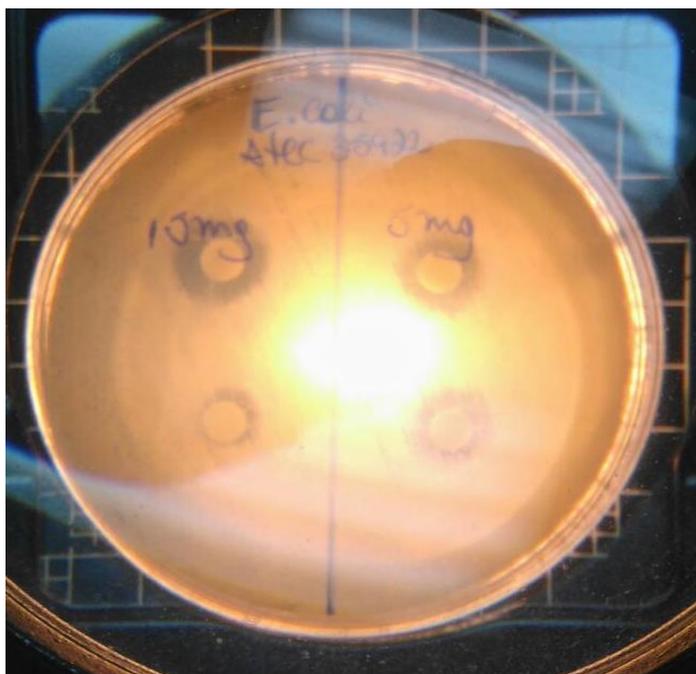
3) *Staphylococcus aureus* frente a ME 24, ME24\*



4) *Escherichia coli* frente a ME 24, ME24\*



5) *Escherichia coli* frente a ME 26, ME26\* y Tween 80



6) *Escherichia coli* frente a control positivo