



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA “*In Vitro*” DEL ACEITE
ESENCIAL DE *Ocimum basilicum* (ALBAHACA) FRENTE A
Escherichia coli y *Staphylococcus aureus* UROPATÓGENOS.**

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. CESAR ALFREDO HUAYLLAPUMA CALLA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PUNO – PERÚ

2022



DEDICATORIA

A Dios por darme la oportunidad de vivir, brindarme la sabiduría, paciencia y alegría ayudándome y protegiéndome hasta llegar a cumplir mis metas.

A mis padres, Cesar Huayllapuma Santa Cruz y Delia Marina Calla Valencia, con todo mi amor y cariño, a ellos me debo y por ellos estoy donde estoy, por su apoyo incondicional en los momentos difíciles, brindándome toda su sabiduría y experiencia. Gracias papas los amo.

A mi hermano Yan Hubert, por apoyarme en cada momento y brindarme mucha alegría, enseñándome el significado de perseverancia.

A mi novia Linda Shommer, por ayudarme, motivarme y ser el apoyo incondicional para llegar a cumplir esta meta.

Cesar Alfredo Huayllapuma Calla



AGRADECIMIENTOS

A mi alma mater, Universidad Nacional del Altiplano - Puno, por brindarme la oportunidad de poder concluir mis estudios superiores y proporcionarme las condiciones para desarrollarme académicamente.

A la poderosa Escuela Profesional de Biología perteneciente a la Facultad de Ciencias Biológicas, por permitirme conocer los diferentes ámbitos de esta hermosa carrera y lograr ser un profesional de éxito.

A todos los docentes, auxiliares y trabajadores administrativos quienes me apoyaron e impartieron sus sabias enseñanzas, por brindarme sus experiencias que ayudaron en mi formación profesional.

Mi más sincero agradecimiento a mi asesor de tesis Mg. Dante Mamani Sairitupac, por su tiempo, paciencia, sabiduría y por brindarme sus valiosas sugerencias para llegar a la conclusión de este trabajo.



ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

RESUMEN 13

ABSTRACT..... 14

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. OBJETIVO GENERAL 17

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 17

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES..... 18

2.2. MARCO TEÓRICO..... 20

2.2.1. Actividad antimicrobiana 20

2.2.2. Pruebas de actividad antimicrobiana. 30

2.2.3. Agentes microbianos causantes de ITU..... 34

2.2.4. Resistencia a los antimicrobianos..... 38

2.2.5. Ciprofloxacino. 40

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ÁREA DE ESTUDIO. 42



3.2. TIPO DE ESTUDIO.....	42
3.3. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.....	44
3.4. MÉTODO DE CAMPO.	46
3.4.1. Obtención y procesamiento de la albahaca.....	46
3.4.2. Obtención del aceite esencial de <i>Ocimum basilicum</i> (albahaca).....	47
3.5. MÉTODO DE LABORATORIO.....	48
3.5.1. Obtención de las muestras de orina.	48
3.5.2. Preparación de medios de cultivo para el aislamiento de <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y evaluación de la actividad antimicrobiana.	49
3.5.3. Preparación de medios diferenciales.	52
3.5.4. Preparación del estándar Mc Farland.	55
3.5.5. Preparación de los inóculos.	56
3.6. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Ocimum basilicum</i> (ALBAHACA).....	57
3.7. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA “In vitro” DE <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>.	59
3.8. LECTURA DE PLACAS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS... ..	60

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Ocimum basilicum</i> (ALBAHACA) FRENTE A <i>Escherichia coli</i> Y <i>Staphylococcus aureus</i> UROPATÓGENOS.....	63
--	-----------



4.2. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA “<i>in vitro</i>” DE <i>Escherichia coli</i> Y <i>Staphylococcus aureus</i>, FRENTE AL ACEITE ESENCIAL DE <i>Ocimum basilicum</i> (albahaca).	67
V. CONCLUSIONES	77
VI. RECOMENDACIONES	78
VII. REFERENCIAS	79
ANEXOS	97

ÁREA: Ciencias Biomédicas.

LÍNEA: Diagnostico y Epidemiologia.

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 25 de julio del 2022



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta <i>Ocimum basilicum</i> L. (albahaca)	24
Figura 2. Método antibiograma disco en placa	32
Figura 3. Áreas de inhibición del método antibiograma disco en placa.	33
Figura 4. Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de <i>Ocimum basilicum</i> (albahaca) frente a <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> , sin diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) representadas con letras iguales (A, A).	64
Figura 5. Promedios de halos de inhibicion y tratamientos del aceite esencial de <i>Ocimum basilicum</i> (albahaca) frente a <i>Escherichia coli</i> en la que se observa diferencia estadística significativa a diferentes concentraciones expresado por letras diferentes, comparado con el antibiotico Ciprofloxacino.	69
Figura 6. Promedios de halos de inhibicion y tratamientos del aceite esencial de <i>Ocimum basilicum</i> (albahaca) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> en la que se observa diferencia estadística significativa a diferentes concentraciones expresado por letras diferentes, comparado con el antibiotico Ciprofloxacino.	74
Figura 7. Resultado del análisis de Chi – cuadrado para la concentracion minima inhibitoria del aceite esencial de <i>Ocimum basilicum</i> (albahaca) frente a <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> , realizado en el promagra estadístico infoStat version libre.	97
Figura 8. Resultado del análisis de varianza (anova) y Tukey para la susceptibilidad del aceite esencial de <i>Ocimum basilicum</i> (albahaca) frente a <i>Escherichia coli</i> , realizado en el promagra estadístico infoStat version libre	97



- Figura 9.** Resultado del análisis de varianza (anova) y Tukey para la susceptibilidad del aceite esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca) frente a *Staphylococcus aureus*, realizado en el promagra estadístico infoStat versión libre. 98
- Figura 10.** a) *Ocimum basilicum* (albahaca), b) albahaca luego del proceso de secado; Laboratorio, Laboratorio/ Taller de frutas y hortalizas, Escuela profesional de Ingeniería Agroindustrial – UNA Puno, marzo 2021..... 98
- Figura 11.** Adición de hojas secas de *Ocimum basilicum* (albahaca) en el extractor de aceites esenciales; Laboratorio/ Taller de frutas y hortalizas, Escuela profesional de Ingeniería Agroindustrial – UNA Puno, marzo 2021..... 99
- Figura 12.** Proceso final de la obtención del aceite esencial de albahaca, a la izquierda inicio de la obtención, a la derecha producto final obtenido (aceite esencial); Laboratorio Microbiología de Alimentos, FCCBB – UNA Puno, marzo 2021..... 99
- Figura 13.** Preparación de medios de cultivo enriquecidos para la obtención e identificación de microorganismos (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*); Laboratorio Microbiología de Alimentos, FCCBB – UNA Puno, marzo – mayo 2021..... 100
- Figura 14.** Inoculación de bacterias uropatógenas en los medios de cultivo preparados; Laboratorio Microbiología de Alimentos, FCCBB – UNA Puno, marzo – mayo 2021..... 100
- Figura 15.** Aislamientos de bacterias uropatógenas a partir de muestras de orina con infección urinaria, *Staphylococcus aureus* (izquierda), *Escherichia coli* (derecha); observación de bacterias gram positivas (a) y gram negativas (b)



- en el microscopio; Laboratorio Microbiología de Alimentos, FCCBB –
UNA Puno, marzo – mayo 2021. 101
- Figura 16.** Pruebas bioquímicas para la identificación de *Escherichia coli*, Laboratorio
Microbiología de Alimentos, FCCBB – UNA Puno, marzo – mayo 2021.. 101
- Figura 17.** Elaboracion de concentraciones al 20%, 40%, 60%, 80% y 100% del aceite
esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca); Laboratorio Microbiología de
Alimentos, FCCBB – UNA Puno, marzo – mayo 2021..... 102
- Figura 18.** Preparación de los discos de sensibilidad a base del aceite esencial de
Ocimum basilicum (albahaca); Laboratorio Microbiología de Alimentos,
FCCBB – UNA Puno, marzo – mayo 2021. 102
- Figura 19.** Evaluacion de los resultados obtenidos para determinar la concentracion
minima inhibitoria del aceite esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca)
frente a *Escherichia coli*; Laboratorio Microbiología de Alimentos, FCCBB
– UNA Puno, marzo – mayo 2021. 103
- Figura 20.** Evaluacion de los resultados obtenidos para determinar la concentracion
minima inhibitoria del aceite esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca)
frente a *Staphylococcus aureus*; Laboratorio Microbiología de Alimentos,
FCCBB – UNA Puno, marzo – mayo 2021. 104
- Figura 21.** Medicion de los halos de inhibicion obtenidos luego del periodo de
incubacion de 24 horas; Laboratorio Microbiología de Alimentos, FCCBB
– UNA Puno, marzo – mayo 2021. 105
- Figura 22.** Susceptibilidad antimicrobiana del aceite esencial de *Ocimum basilicum*
(albahaca) frente a *Escherichia coli*; Laboratorio Microbiología de
Alimentos, FCCBB – UNA Puno, marzo – mayo 2021..... 105



Figura 23. Susceptibilidad antimicrobiana del aceite esencial de *Ocimum basilicum*

(albahaca) frente a *Staphylococcus aureus*; Laboratorio Microbiología de

Alimentos, FCCBB – UNA Puno, marzo – mayo 2021..... 106



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diseño experimental para determinar la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de <i>Ocimum basilicum</i> (albahaca) frente a <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> , marzo – mayo 2021.....	44
Tabla 2. Diseño experimental para la susceptibilidad antimicrobiana del aceite esencial de <i>Ocimum basilicum</i> “albahaca” frente a <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> , marzo – mayo 2021.....	45
Tabla 3. Tabla de estandarización de halos de inhibición (mm) para enterobacterias. ..	60
Tabla 4. Tabla de estandarización de halos de inhibición (mm) para <i>Staphylococcus spp.</i>	60
Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial <i>Ocimum basilicum</i> (albahaca) frente a <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> , marzo – mayo 2021.	63
Tabla 6. Promedio de halos de inhibición en milímetros (mm) a diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>Ocimum basilicum</i> (albahaca) frente a <i>Escherichia coli</i> y su respuesta antimicrobiana, marzo – mayo 2021.....	68
Tabla 7. Promedio de halos de inhibición en milímetros (mm) a diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>Ocimum basilicum</i> (albahaca) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y su respuesta antimicrobiana, marzo – mayo 2021. ..	72



ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

ITU	: Infección del Tracto Urinario
UCI	: Unidad de Cuidados Intensivos
AE	: Aceites Esenciales
BGN	: Bacterias Gram Negativas
BGP	: Bacterias Gram Positivas
CMI	: Concentración Mínima Inhibitoria
OMS	: Organización Mundial de la Salud
UFC	: Unidad Formadora de Colonias
Mm	: Milímetros
Kg	: Kilogramos
<i>Et al</i>	: y colaboradores
R₁, R₂, R₃	: Repetición 1, 2 y 3



RESUMEN

Las infecciones del tracto urinario representan uno de los principales problemas de salud pública en distintas poblaciones humanas, generándose al mismo tiempo incremento de resistencia a antibióticos ante tratamientos convencionales inadecuados. En tal sentido, considerando el uso de plantas medicinales como una alternativa de tratamiento, se determinó la actividad antimicrobiana “*in vitro*” del aceite esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca) frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* uropatógenos aislados de pacientes del Centro de Salud Simón Bolívar de la Ciudad de Puno. La extracción del aceite esencial fue por arrastre a vapor, realizado en el laboratorio de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó por dilución en placa de agar Mueller Hinton al 0.1%; 0.2%; 0.5%; 1.0%; 2.5% y 5%; y la susceptibilidad antimicrobiana por el método de Kirby Bauer en discos de papel filtro al 20%, 40%, 60%, 80% y 100% teniendo como control el antibiótico ciprofloxacino. Los datos fueron analizados mediante la prueba de Chi-cuadrado, análisis de varianza y rangos múltiples de Tukey. La CMI del aceite esencial frente a *E. coli* fue de 1.0% y para *S. aureus* 0.5%, sin diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$). La susceptibilidad antimicrobiana de *E. coli* y *S. aureus*, presentó respuesta resistente al 20%, 40% y 60% de aceite esencial. Sin embargo, *E. coli* al 80% y 100% mostró respuesta intermedia a diferencia de *S. aureus* que fue sensible, con diferencia estadística significativa ($p < 0.05$). No todas las concentraciones superaron la actividad del antibiótico control. Se concluye que el aceite esencial de albahaca presenta actividad antibacteriana sobre *E. coli* y *S. aureus* según las CMI y las respuestas de susceptibilidad obtenidas.

Palabras clave: Infecciones de tracto urinario, antibiótico, resistencia antimicrobiana, susceptibilidad, concentración mínima inhibitoria.



ABSTRACT

Urinary tract infections represent one of the main public health problems in different human populations, generating at the same time an increase in antibiotic resistance in the face of inadequate conventional treatments. In this sense, considering the use of medicinal plants as a treatment alternative, the *in vitro* antimicrobial activity of *Ocimum basilicum* (basil) essential oil against *Escherichia coli* and uropathogenic *Staphylococcus aureus* isolated from patients at the Simon Bolivar Health Center in the city of Puno was determined. The essential oil was extracted by steam extraction, carried out in the laboratory of the Professional School of Agroindustrial Engineering. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by dilution on Mueller Hinton agar plate at 0.1%; 0.2%; 0.5%; 1.0%; 2.5% and 5%; and antimicrobial susceptibility by the Kirby Bauer method on filter paper discs at 20%, 40%, 60%, 80% and 100%, using the antibiotic ciprofloxacin as a control. The data were analyzed by Chi-square test, analysis of variance and Tukey's multiple ranges. The MIC of the essential oil against *E. coli* was 1.0% and for *S. aureus* 0.5%, without significant statistical differences ($p > 0.05$). The antimicrobial susceptibility of *E. coli* and *S. aureus* showed a resistant response to 20%, 40% and 60% of essential oil. However, *E. coli* at 80% and 100% showed intermediate response unlike *S. aureus* which was sensitive, with significant statistical difference ($p < 0.05$). Not all concentrations exceeded the activity of the control antibiotic. It is concluded that basil essential oil presents antibacterial activity on *E. coli* and *S. aureus* according to the MICs and susceptibility responses obtained.

Keywords: Urinary tract infections, antibiotic, antimicrobial resistance, susceptibility, minimum inhibitory concentration.



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, nacional y regional, las infecciones del tracto urinario (ITU), luego de las infecciones respiratorias son una de las principales causas de infección bacteriana (Chura, 2017), afectando a personas de diversas edades tanto en hombres, mujeres, ancianos y niños, teniendo mayor importancia en mujeres gestantes (Zea, 2013). Anteriormente, en los años ochenta, la resistencia a fármacos era prácticamente inexistente, hoy en día hay muchos países de todo el mundo en donde es ineficaz el tratamiento con fármacos en más de la mitad de los pacientes (Mamani, 2017), siendo las causas más frecuentes la antibioticoterapia previa sin receta médica, ITUs recurrentes, retención urinaria, los factores genéticos, la obstrucción del flujo de orina y el reflujo (Montañez *et al.*, 2015; Pérez *et al.*, 2021), debido a estos se considera un problema para la salud pública. Así mismo Calsin (2017) indica que, en el Perú de todos los casos de infecciones coligadas a la atención en salud, el 19% es por infección del tracto urinario.

Las ITU son procesos inflamatorios que implican la multiplicación de microorganismos que invaden los tejidos adyacentes del aparato genitourinario (Expósito *et al.*, 2019). La bacteria *Escherichia coli* es el microorganismo uropatógeno más representativo, tanto en ITU no complicadas (75%) como en complicadas (65%) (Delgado, 2019). Este microorganismo posee factores de virulencia especializados, como adhesinas, toxinas, sistemas de adquisición de hierro, capas de polisacáridos invasoras que no están presentes en las cepas comensales y patógenas intestinales (Vila *et al.*, 2016).

Por otro lado, *Staphylococcus aureus* es una bacteria gram positiva, que posee similar actividad a las endotoxinas de las bacterias gram negativas (Beleño y Sijona,



2021). Es el principal microorganismo patógeno de infecciones nosocomiales, siendo una de ellas las infecciones de tracto urinario (Ponce, 2019).

La utilización de las plantas medicinales surgió con el hombre y desde tiempos antiguos se utilizaron por ensayo error aquellas sustancias como extractos, que ofrecían curar enfermedades. Esta práctica médica transitaba y se perfeccionaba por varias generaciones, por lo que se designó como medicina tradicional (Illanes, 2018). Los aceites esenciales entre otras formas de obtención de metabolitos secundarios con actividad biológica, son utilizados por diversas producciones, así mismo las investigaciones muestran que los aceites esenciales, poseen actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral y antitóxica (Aquino, 2017). Actualmente los científicos y profesionales de las ciencias médicas aumentaron su interés en este campo debido a los diferentes beneficios reales que aportan a la salud humana. Cada vez más la población confía en los medios terapéuticos naturales debido al temor y a la desconfianza de muchos resultados clínicos negativos (Landa, 2017).

En la investigación se ha obtenido aceite esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca), posteriormente se realizó las pruebas de concentración mínima inhibitoria y susceptibilidad, demostrando su actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Para así poder contrarrestar el aumento progresivo de la resistencia antimicrobiana, reduciendo los casos de infecciones causadas por las bacterias resistentes a antibióticos, como también, dar un valor científico al uso empírico que le da la población en general, orientando su uso como agentes antimicrobianos naturales a bajo costo y accesibles, incrementando el valor económico y comercial de dichas plantas. Por tal motivo, los objetivos fueron los siguientes:



1.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antimicrobiana “*in vitro*” del esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca) frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* uropatógenos.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca) frente a cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* uropatógenos.

Evaluar la susceptibilidad antimicrobiana “*in vitro*” de las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, frente al aceite esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca).



CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES

Ríos (2019), registró un incremento progresivo en la susceptibilidad antimicrobiana del aceite esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca) a diferentes concentraciones y tiempos de incubación sobre *Prevotella intermedia*. Idénticamente, Arteaga (2018), observó el aumento del diámetro en el halo de inhibición a medida que aumenta las concentraciones del aceite esencial de *O. basilicum* presentando halos de 11; 14; 15 y 17 mm frente a *S. aureus*. Puelles (2018), frente a la misma bacteria evaluó el efecto antibacteriano del aceite esencial de albahaca obteniendo inhibición a concentraciones de 100% (13.95 mm) y 75% (13.25 mm). Por otro lado Tigasi (2017), demostró actividad inhibitoria a concentraciones de 10% con promedio de inhibición de 22.56 mm sobre cepas de *Enterococcus faecalis*.

Celis y Rodríguez (2017), determinaron la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de albahaca a diferentes concentraciones frente a *Escherichia coli*, obteniendo halos de inhibición de 7.15; 9.10 y 13.95 mm. Rojas (2018), comprobó ese efecto antibacteriano del aceite esencial de albahaca contra la misma bacteria, obteniendo resultados de 13.35 mm al 5%, 13.9 mm al 10% y 15.55 mm al 15%. Así mismo Olivares (2018), con las mismas concentraciones, obtuvieron halos de inhibición de 11.50; 11.95 y 14.5 mm frente a *Staphylococcus aureus*. Por otra parte Malca y Osoreo (2021), también comprobaron el efecto antibacteriano empleando extractos etanólicos de albahaca a concentraciones de 100 y 50% frente a bacterias gram positivas y negativas, obteniendo para *S. aureus* halos de inhibición de 14.87 mm y 11.43 mm y para *E. coli*. 23.67 mm y 18.87 mm respectivamente.



Olano y Frias (2022), reportaron la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico de albahaca frente a *Staphylococcus aureus* a concentraciones de 50%; 75% y 100% con halos de inhibición de 10.33; 11.48 y 13.64 mm respectivamente. Igualmente Abbasy *et al.*, (2015), demostraron la actividad antibacteriana de la albahaca frente a *Bacillus cereus* (25 mm), *Escherichia coli* (11 mm), *Salmonella typhimurium* (10 mm) y *Staphylococcus aureus* (9 mm). Por otro lado en Perú, determinaron el efecto antibacteriano del extracto acuoso de albahaca frente al crecimiento de *Escherichia coli*, logrando halos de inhibición de 9, 11 y 12 mm (Calderón y Torres, 2014). Así mismo en Colombia, adquirieron 100% de actividad antifúngica, a concentraciones de 10000 ppm de aceite esencial de albahaca contra el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Pérez *et al.*, 2018).

Flores (2020), determinó el efecto antibacteriano de 4 diluciones del extracto etanólico de albahaca sobre *Escherichia coli*, obteniendo inhibición al 75% y 100%. De igual manera Ancalla y Solis (2017), evaluaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de albahaca a diferentes concentraciones sobre *Streptococcus mutans* ATCC, logrando una susceptibilidad a concentraciones de 100%, 50% y 25%, con una CMI de 1% y una CMB de 1.2%. Por otro lado Carballo *et al.*, (2014), señalaron la actividad antimicrobiana de los extractos de albahaca frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y otras bacterias, obteniendo una CMI de 1500 mg/kg para *E. coli* y 750 mg/kg para *S. aureus*. Así mismo otro estudio demostró que el aceite esencial de 2 especies de *Ocimum* poseían diferente actividad microbiana la cual el aceite de *O. gratissimum* resultó ser más inhibitoria frente a *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *Candida albicans*, pero el aceite de *O. basilicum* mostró mejor CMI contra *C. albicans* (Anand *et al.*, 2011).



Rivas *et al.*, (2015), evaluaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de albahaca, obteniendo una CMI de 100 mg/dl, con halos inhibitorios de 12 y 11 mm para bacterias gram positivas, mientras que para bacterias gram negativas fue de 200 mg/dl, con halos de inhibición de 9 y 8 mm. Así mismo en otro estudio similar lo probaron contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* encontrando halos de inhibición de 30.56, 16.11 y 23.58 mm, con una CMI de 36-18 µg/mL, 18 µg/mL y 18-9 µg/mL (Moghaddam *et al.*, 2011). Otro estudio evaluó por diversos extractos la actividad antimicrobiana de la albahaca, obteniendo inhibición con el extracto de metanol sobre *E. coli*, *Shigella*, *E. coli RSHI*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *P. aeruginosa* con halos de inhibición entre 13 y 15 mm (Kaya *et al.*, 2008). Así mismo Carrillo (2020), comprobó la efectividad inhibitoria entre la mezcla de los aceites esenciales de albahaca y orégano concluyendo que para *Staphylococcus aureus* la CMI está presente en la mezcla 7 con 33% del aceite esencial de albahaca y obteniendo un halo de inhibición de 24.02mm.

2.2. MARCO TEÓRICO

2.2.1. Actividad antimicrobiana

2.2.1.1. Actividad antimicrobiana de las plantas medicinales.

La utilización terapéutica de las plantas medicinales en la medicina, las cuales sustituyen fármacos únicos o combinados, obteniendo sus esencias o extractos en las diferentes formas de preparación con la finalidad de mejorar el estado de salud (Huanca, 2021). Cumpliendo un rol fundamental para curar enfermedades en las personas. En la actualidad las comunidades, fundamentalmente rurales, las utilizan acumulando prácticas ancestrales de selección, manejo y conservación de conocimientos que han transmitido de una generación a otra (INS, 2014). Así mismo el uso terapéutico de las plantas



medicinales está referido generalmente al tratamiento y prevención de problemas respiratorios, digestivos, nervioso, circulatorios, endocrinos, genitourinarios, dérmicos entre otros (Balarezo, 2018).

Se desarrollaron con éxito líneas de investigación, la cual muchas de ellas se basan en las propiedades antiinflamatorias y antiinfecciosas de plantas que son utilizadas en la medicina popular, contribuyendo innovadoramente en la terapia antimicrobiana, en la que destacan muchos productos naturales que contienen bioactivos la cual se han aislado a partir de plantas, que resultan importantes no solo por el uso directo como agentes terapéuticos o como prototipos de compuestos clave para el desarrollo de nuevos medicamentos, sino también como agentes de ensayos bioquímicos (Prieto *et al.*, 2004)

La actividad de las plantas medicinales hacia los microorganismos es compleja y aún no ha sido completamente entendido y explicado. La acción dependerá del tipo de microorganismo y está principalmente relacionado con la membrana externa y la estructura de la pared celular (Baca, 2017). Son numerosas las investigaciones que se realizan enfocadas a la búsqueda de nuevos componentes con actividades biológicas que partan de fuentes naturales. Dentro de ellos un considerable número de estudios han sido encaminados hacia la evaluación de actividades antimicrobianas en aceites esenciales de plantas medicinales como aromáticas, empleando técnicas *in vitro* dada la sencillez y reproducibilidad de las mismas (Hernández y Rodríguez, 2001).

2.2.1.2. Principios activos de las plantas medicinales.

El principio activo es una molécula que se deriva del metabolismo en organismos vegetales y que tiene actividad farmacológica, por lo tanto sirve para ser usada de forma terapéutica (Herrera, 2020). Es una sustancia de composición química definida que causa una reacción fisiológica específica en un organismo, dentro de estos algunos de los



considerados importantes son los grupos funcionales como los glucósidos, alcaloides, vitaminas, ácidos grasos esenciales, taninos, minerales, flavonoides, saponinas, resinas, terpenos, compuestos fenólicos, aceites esenciales y lactonas (Blanco *et al.*, 2020). Los principios activos se pueden hallar tanto en la especie vegetal completa, como solo en algunas partes de ella como en las hojas, flores, semillas, frutos, raíces y hasta en la misma corteza (Berdonces, 1995). En relación a su estructura química, se disponen de dos grandes grupos, el primero, son productos resultantes del metabolismo primario, las cuales intervienen de manera directa en la supervivencia, crecimiento y reproducción de la planta, el segundo son productos que derivan del metabolismo secundario, siendo estas sintetizadas para la defensa y adaptación mas no cumplen ningún rol fisiológico en el desarrollo y crecimiento vegetal (Palacios, 2008).

Metabolitos secundarios. Las plantas desarrollaron diversas estrategias de defensa contra condiciones de estrés tanto bióticos como abióticos, estas sintetizan enzimas que degradan la pared celular de microorganismos o que tienen la capacidad de inactivar tóxicos de origen microbiano (Sepúlveda *et al.*, 2003). Como parte de la respuesta de defensa química contra el daño se induce la síntesis y acumulación de compuestos, conocidos como metabolitos secundarios las cuales son derivados del metabolismo primario (Pérez y Jiménez, 2011) del carbono (Ávalos y Pérez, 2009).

Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular, participan en los procesos de adaptación de las plantas a su entorno, como es el establecimiento de la simbiosis con otros organismos, a su vez sintetizan metabolitos cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas como el consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados), el ataque por microorganismos ya sea por virus, bacterias y hongos, la competencia por el espacio de suelo, la luz y los nutrientes entre las diferentes especies



de plantas y la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico (Sepúlveda *et al.*, 2003).

Aproximadamente 20 000 estructuras de metabolitos secundarios son las que se conocen y relacionados a su composición química son clasificados en dos principales grupos: Los nitrogenados y los no nitrogenados. Los metabolitos secundarios que tienen nitrógeno incluyen a los alcaloides, aminoácidos no proteicos, aminas, glucósidos (saponinas, glicósidos cardíacos, glicósidos cianogénicos) y glucosinolatos. Los no nitrogenados se dividen en terpenoides (entre los que se encuentran aceites esenciales, hormonas y pigmentos), poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides (Ávalos y Pérez, 2009; Sepúlveda *et al.*, 2003).

Dichos metabolitos, transmitidas sus propiedades curativas han sido la base de la medicina, incrementando su arsenal terapéutico, utilizándolos en la elaboración de fármacos o fitofármacos (Rojas *et al.*, 2015). Por estas razones el estudio de los metabolitos presentes en las plantas sea convertido en un enorme reto, de ahí la necesidad de utilizar tecnologías para su producción, caracterización e identificación (Pérez y Jiménez, 2011).

2.2.1.3. *Ocimum basilicum* L. (albahaca).

Nombres vulgares: Albahaca de Castilla, alhábega, alfábega, basílico, basil, hierba real, hierba de los reyes, alfavaca, albahaca francesa, de limón, mondonguera, moruna, albahaca blanca, albahaca dulce, albahaca de jardín, albahaquita y calamento (Cambie y Ash, 1994).



Figura 1. Planta *Ocimum basilicum* L. (albahaca)

Fuente: Elaboración propia.

a. Descripción botánica.

Planta aromática y medicinal (confiere propiedades digestivas, espasmolíticas, carminativas y antisépticas especialmente contra bacterias y parásitos), anual, herbácea, frondosa, de tallos erguidos y ramificados, que alcanza de 20 a 50 cm de altura (Ministerio de Salud Chile, 2018). Posee hojas que tienen un tamaño de 2 a 5 cm, oblongas, suaves, pecioladas, opuestas, de forma oval-lanceoladas u oval con bordes ligeramente dentadas. Las flores son blancas o blanco rosa, zigomorfas, estando reunidas en corimbos axilares, dispuestas de 5 a 6 flores por cada verticilo, ubicándose en la parte alta del tallo o en los extremos de las ramas. El fruto es un tetraquenio, la cual contiene 4 semillas ovaes, lisas y cuyo color varía del marrón al negro (Fernández, 2012). Perteneciente a la familia de las lamiáceas, conjuntamente con otras plantas aromáticas como lo es la menta, salvia, tomillo, lavanda y orégano (Condori, 2002).

b. Distribución geográfica.

Es una planta perenne, originaria de Asia menor, proveniente específicamente de la India, el nombre de *Ocimum* descende del griego “ókimon” que significa labio perfumado y oloroso, en mención al aroma de sus hojas y basilicum o basilikon que



significa rey real o regio (Ancalla and Solis, 2017). El género *Ocimum* está representado aproximadamente por más de 150 especies y tiene una extensa distribución geográfica por todas las regiones de clima tropical y subtropical. (Sánchez *et al.*, 2000). Actualmente se cultiva en diversos climas de todas las regiones de América tropical; se produce en altitudes de 0 a 1000 metros sobre el nivel del mar, en climas templados y cálidos, no resiste las heladas, ni temperaturas inferiores a -2° C (Álvarez y Rico, 2018).

c. Clasificación taxonómica.

***Ocimum basilicum* L. (albahaca)** (Condori, 2002).

Reino	: Plantae
División	: Magnoliophyta
Superdivisión	: Spermatophyta
Clase	: Maganoliopsida
Subclase	: Asteriadae
Orden	: Lamiales
Familia	: Lamiaceae
Subfamilia	: Nepetoideae
Género	: <i>Ocimum</i>
Especie	: <i>Ocimum basilicum</i> L.

d. Principios activos de la albahaca.

Según Celis y Rodríguez (2017), mencionan que la albahaca es rica en aceites esenciales (0.2 – 1 %). Ésta se compone de 55% de acetato de linalilo, cineol, ocimeno, geraniol, metilcinamato, borneol, pineno, estragol, anetol, beta cariofileno, alfa terpineol, eugenol, linalol y alcanfor. Teniendo estos últimos cuatro componentes, actividad antibacteriana. Igualmente, May *et al.* (2008), indican la presencia de taninos, flavonoides saponinas y terpenos volátiles. Así mismo, Padalia *et al.* (2017), señalan los componentes predominantes en el aceite esencial de la mayoría del género *Ocimum*, siendo los



monoterpenoides (linalol, 1,8-cineol, alcanfor, citral, timol, ocimenes, geraniol), los fenilpropanoides (metil chavicol, eugenol, metil eugenol, metil cinamato) y los sesquiterpenoides (β -elemeno, β -cariofileno, trans- α -bergamoteno, (E)- α -bisaboleno, β -bisaboleno).

Por otro lado Rojas (2018), indica que el porcentaje de estragol o metilchavicol que tiene el aceite esencial de albahaca es de (65-85%), linanol (75%) y eugenol (20%). Mientras que Ramírez *et al.* (2013), afirman que el eugenol es uno de los compuesto del aceite esencial de albahaca que mejora la actividad antioxidante y se encuentra en mayor cantidad, sirviendo como antioxidante natural en la industria farmacéutica y de alimentos.

e. Propiedades medicinales de la albahaca.

Los usos farmacológicos más importantes de la albahaca son la actividad anticancerígena, la actividad radio protectora, la actividad antimicrobiana, los efectos antiinflamatorios, la actividad inmunomoduladora, la actividad antiestrés, la actividad antidiabética, la actividad antipirética, la actividad antiartrítica, la actividad oxidante, como agente profiláctico en enfermedades cardiovasculares (Shahrajabian *et al.*, 2020) actividades antiespasmódicas, analgésicas, diuréticas, antidiarreico, estimulante y antiviral (Carrillo, 2020).

2.2.1.4. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales.

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales está directamente relacionada con la composición química, la cual tienen un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de microorganismos. Illanes (2018), menciona que los productos cítricos presentan un promedio de 40 compuestos, que se ven influenciados por métodos específicos de extracción, separación y de cultivo. Ancalla y Solis (2017), indican que la actividad antimicrobiana de los aceites puede ser aprovechadas en la preparación de



productos farmacéuticos como por ejemplo el aceite de citronela que es conocido por su espectro antimicrobiano frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, así como también otros compuestos con efecto antibacteriano más conocidos como el orégano y romero.

El modo de acción de los aceites esenciales depende principalmente de su carácter hidrófilo o hidrófobo por la cual tienen la capacidad de alterar y penetrar en la estructura lipídica de la pared celular perturbando estructuras celulares lo que lleva a la desnaturalización de las proteínas y a la destrucción de la membrana celular, haciéndolas más permeables, lo que conduce a rupturas o fugas citoplasmática, lisis celular y eventualmente la muerte del microorganismo (Cano, 2007; Smith *et al.*, 1998). Como también Lamont *et al.* (2015) indican que el mecanismo por el cual los aceites esenciales inhiben la proliferación microbiana parece ser la alteración del funcionamiento de la membrana, esto causa despolarización y degradación de la permeabilidad de la membrana, pérdida del contenido celular y finalmente la muerte del microorganismo, la cual puede ser evaluada como la concentración mínima inhibitoria (CMI), en donde se define como una concentración mínima requerida del aceite esencial que tenga la capacidad de frenar el crecimiento (Smith *et al.*, 1998), o la concentración mínima letal que asegure la reducción de un 99.9% de la población del microorganismo (Burt, 2004).

2.2.1.5. Composición química de los aceites esenciales.

Se reconocieron aproximadamente cuatrocientos componentes químicos constituyentes de los aceites esenciales. La composición compleja que integra los aceites esenciales pertenece de manera casi exclusiva a grupos característicos distintos, siendo los de mayor importancia el grupo de los terpenos, el grupo de los compuestos derivados del fenilpropano, los terpenos provenientes del ácido chi químico (aromáticos), los



terpenos originarios del ácido acético y otros compuestos procedentes de la degradación de terpenos (Gonzalez, 2004).

Terpenos: Dentro de los aceites esenciales se encuentran solamente los terpenos más volátiles (cuya masa molecular no es demasiado elevada), habiendo 2 grupos de gran importancia: monoterpenos y sesquiterpenos la cual presentan de 10 y 15 átomos de carbonos.

A. Monoterpenos.

Son componentes de las esencias volátiles, se encuentran casi siempre hidrocarburos; estos pueden ser: Acíclicos (ocimeno, mirceno), monocíclicos (α - y γ -terpineno, p-cimeno) o bicíclicos (pino, canfeno, sabineno), en ocasiones constituyen más del 90% del aceite esencial como en el caso de citrus y trementinas (Fernandez, 2019; Pantalón y Saboya, 2015). Existen muchas moléculas funcionalizadas como:

- a. **Alcoholes** : Acíclicos (linalol, geraniol y citronelol), monocíclicos (mentol, α -terpineol, 1-terpinen-4-ol), bicíclicos (borneol y fenol).
- b. **Aldehídos** : En su mayoría acíclicos (geranial, neral y citronelal).
- c. **Cetonas** : Acíclicos (tagetona), monocíclicas (mentona, isomentona, carvona y pulegona), bicíclicas (alcanfor, fenol y tujonas).
- d. **Ésteres** : Acíclicos (acetato o propionato de linalilo, acetato de citronelilo), monocíclicos (acetato de mentilo y acetato de α -terpinilo), bicíclicos (acetato de isobornilo).
- e. **Éteres** : 1,8 – cineol, dill-éter, tetrahidrofuránicos o di- y tetrahidropiránicos.
- f. **Peróxidos** : Ascaridol.
- g. **Fenoles** : Timol y carvacrol.



B. Sesquiterpenos.

Las variaciones estructurales son varias siendo los más frecuentes, alcoholes, cetonas e hidrocarburos. El alargamiento de la cadena (FPP) aumenta el número de ciclaciones posibles, de ahí la gran variedad de estructuras conocidas (se han descrito más de una centena de esqueletos diferentes). Citando algunos sesquiterpenos característicos de los aceites esenciales: hidrocarburos mono o policíclicos (β - bisaboleno, β -cariofileno, longifoleno), alcoholes (farnesol, carotol, β -santalol, patchulol), cetonas (nootkatona, cis-longipinano-2,7-diona, β -vetivona), aldehídos (sinensales) y ésteres (acetato de cedrilo) (Fernandez, 2019; Pantaléon y Saboya, 2015).

2.2.1.6. Localización de los aceites esenciales en la planta.

Los aceites esenciales dentro del reino vegetal se encuentran muy difundidas, siendo de las 295 familias de plantas, 60 a 80 especies vegetales productoras de dichos aceites, entre las cuales 38 crecen en los trópicos, 17 exclusivamente en climas templados, 8 en climas tropicales como templados y 24 familias de plantas habitan en diferentes climas (Montoya, 2010). Los aceites esenciales se pueden conseguir tanto de plantas cultivadas como de plantas silvestres, la composición, así como la cantidad del aceite esencial es diferente de una especie a otra y dentro de los mismos géneros de la planta. Se producen y se almacenan en células glandulares que tapizan el interior de las hojas y tallos; en pelos glandulares de las plantas o en otras células especializadas (Zuni, 2017). Los aceites esenciales, se pueden encontrar en la planta entera o en diferentes partes de la planta, por ejemplo en las hojas y tallos (albahaca, ajeno, canela, cedrón, citronela, eucalipto, hierbabuena, limoncillo, patchouli, toronjil, menta, romero, salvia), en las raíces (azafrán, cúrcuma, jengibre, sazafrán, cálamo, sándalo, valeriana), en la corteza (canela, cedro, pino, eucalipto, abeto, ciprés), en las flores (clavo de olor, manzanilla,



tomillo, geranio, jazmín, rosa, lavanda, albahaca, etc.), en la cáscara del fruto (limón, mandarina, naranja, etc.), en los frutos (anís, cardamomo, hinojo, cilantro, laurel, nuez moscada, perejil, pimienta, etc.) y en las semillas (comino, anís, cardamomo, eneldo, hinojo, cítricos etc.) (Gonzalez, 2004).

2.2.2. Pruebas de actividad antimicrobiana.

2.2.2.1. Concentración mínima inhibitoria

La actividad *in vitro* de los antibacterianos es cuantificada y evaluada periódicamente mediante algunas variantes de las metodologías de dilución. Uno de estos métodos es la concentración mínima inhibitoria conocida por sus siglas CMI que se define como la mínima cantidad de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento, multiplicación y producción visible de un microorganismo en incubación a 37°C después de 24 hrs (Cavalieri *et al.*, 2005). La CMI ha sido establecido como el “Gold standard” frente a diferentes métodos que evalúan la susceptibilidad antimicrobiana; así mismo dicho método confirma resistencias inusuales, como también da respuestas definitivas cuando lo obtenido por otros métodos es indeterminado (Horna *et al.*, 2012). Las pruebas de la CIM pueden ser elaboradas usando como medios de cultivo en agar o caldo (Cavalieri *et al.*, 2005).

Las técnicas de dilución en agar o caldo, pueden ser utilizadas para medir cuantitativamente la actividad “*in vitro*” de un agente antibacteriano o antimicrobiano frente a un cultivo patógeno (Ramirez y Marin, 2009). Estos métodos se basan en la fabricación de una serie de placas con agar o caldo, a los cuales se les añade el antibiótico en distintas concentraciones, la más común es la que utiliza diluciones seriadas al medio, por ejemplo: 1, 2, 4, 8, 16 µg/ml, etc. Seguidamente se inoculan cada uno de las placas o tubos con una suspensión estandarizada de la bacteria en estudio. Por ultimo las pruebas



se examinan después de incubar a 37 °C y se establece la concentración mínima inhibitoria del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado (Malbran, 2012). El valor obtenido orienta al clínico sobre que concentración de antibiótico necesita alcanzar para poder inhibir el microorganismo infectante en el sito de contagio (Pérez, 2021).

2.2.2.2. Susceptibilidad antimicrobiana

El estudio de la sensibilidad de los agentes antimicrobianos frente a los microorganismos es parte de las funciones que realizan a diario los laboratorios de Microbiología. La cual se lleva a cabo mediante antibiogramas y su objetivo principal es evaluar la susceptibilidad *in vitro* enfrentando uno o varios antimicrobianos frente a un patógeno. El resultado obtenido sirve como factor predictivo de la eficacia clínica del agente antimicrobiano una vez se conoce la sensibilidad del microorganismo causante de la infección, así mismo, reduce la duración de la estancia hospitalaria, la morbimortalidad, ayuda a una mejor evolución del paciente y a la disminución de los costes sanitarios. Además, es una herramienta básica para evitar el mal uso de los agentes antimicrobianos, pudiendo tener como consecuencia, entre otros males, la selección de microorganismos resistentes que supone un problema progresivo de salud pública a nivel mundial (Garín *et al.*, 2012).

El principio de la técnica consta del uso de una cantidad constante de antimicrobianos en un reservorio como por ejemplo discos de papel, aplicado sobre la superficie del agar en el cual se ha cultivado el microorganismo problema. Se formará así por difusión, una gradiente de concentración entre el antimicrobiano y la sensibilidad del microorganismo, de la cual estará representada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento alrededor del reservorio. Conjuntamente, el diámetro conseguido dependerá no solo de la carga del disco y la sensibilidad del microorganismo, sino también del grosor

de la capa del agar, su composición y pH, la capacidad de difusión del antibiótico en ese medio, la temperatura y la velocidad de duplicación bacteriana (Malbrán, 2001).

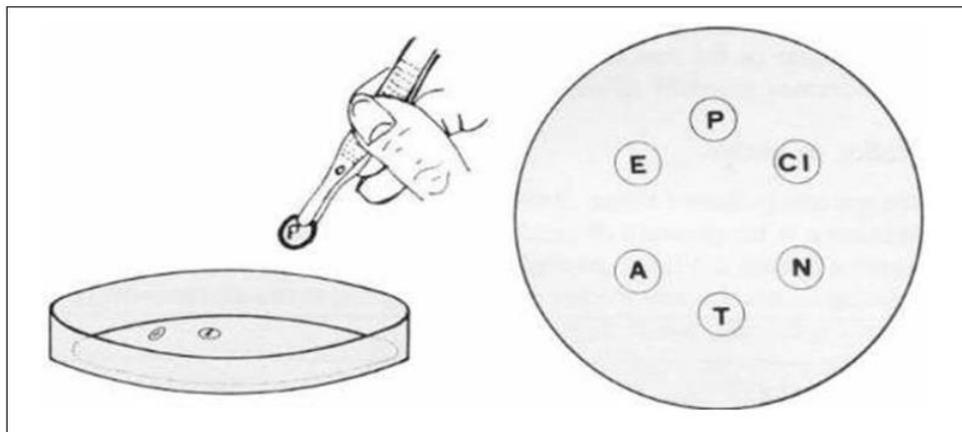


Figura 2. Método antibiograma disco en placa

Fuente: Garín *et al.* (2012)

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos frente a los agentes antimicrobianos puede realizarse mediante distintos métodos de los cuales requieren de al menos tres condiciones: 1. Aislamiento absoluto de la cepa que se va a trabajar (los cultivos mixtos dan resultados incongruentes y falsos); 2. Identificación adecuada de la cepa aislada, en la medida de lo posible a nivel de especie (tanto el tipo de antibiograma como la interpretación de los resultados dependen directamente de la especie problema); 3. Medios y consumibles adecuados para cada problema (Garín *et al.*, 2012).

Categoría de interpretación de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos:

Según Malbrán (2012), menciona la clasificación basada en la respuesta *in vitro* de un antibiótico a un microorganismo en los niveles que éste alcanza en sangre o tejidos con una dosificación habitual;

- a. Categoría SENSIBLE:** Indica que una infección causada por el organismo en estudio puede ser tratada adecuadamente a la dosis de antibiótico recomendada para el tipo de infección y la especie infecciosa, a menos que su uso esté contraindicado.

- b. Categoría INTERMEDIO:** Muestra cepas que pueden ser inhibidas por concentraciones más altas de antibióticos, siempre que se aumente la dosis. (como betalactámicos) o concentrados fisiológicamente en los tejidos afectados (ejemplo quinolonas y betalactámicos en la orina). También se refiere a una "zona buffer" que evita que pequeños factores técnicos difíciles de controlar causen grandes diferencias en la interpretación
- c. Categoría RESISTENTE:** Se refiere a las cepas que no son inhibidas por las concentraciones del antimicrobiano que normalmente son alcanzadas a dosis habituales y caen en el rango donde son mecanismos específicos de resistencia microbiana (por ejemplo, β -lactamasas).

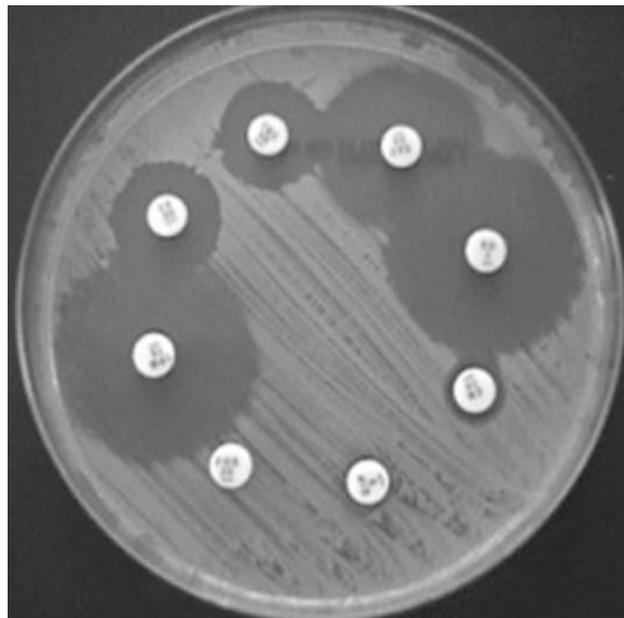


Figura 3. Áreas de inhibición del método antibiograma disco en placa.

Fuente: Garín et al. (2012).



2.2.3. Agentes microbianos causantes de ITU.

2.2.3.1. *Escherichia coli*.

Este microorganismo es el ser vivo más estudiado y conocido desde todos los aspectos de la ciencia. Originalmente descrita por Theodore Escherich en el año de 1885 y nombrada *Bacterium coli commune*, actualmente llamada como *Escherichia coli*. Es simbiótico con el ser humano y forma parte representativa del microbiota oriunda del colon (Agurto, 2016) pertenece a la familia Enterobacteriaceae, son bacilos gram negativos, miden de 2 a 4 μm de largo por 0.4 a 0.6 μm de ancho, con fimbrias y flagelos peritricos, no esporulados. Crecen con facilidad en medios enriquecidos como agar MacConkey, que presenta como única fuente de carbono la glucosa o el glicerol, crece rápidamente en condiciones aerobias como anaerobias en un promedio de 12 a 18 horas de incubación. En el medio de agar crecen colonias de 2 a 5 mm de diámetro, son lisas y con bordes completos, son fermentadores de glucosa, a menudo producen gas, reducen los nitratos a nitritos, son oxidasa negativos (Castro, 2014) y tienen un contenido de DNA de guanina más citocina de 39 a 59% (Jawetz, 2011). Poseen fimbrias o pilli, que son órganos de fijación, a su vez poseen lipopolisacáridos (LPS) de la pared bacteriana que se constituyen en cadenas laterales, tienen actividad tóxica, además poseen antígenos que caracterizan a las especies como son los somáticos O, los flagelares H y los capsulares K (Canase y Canase, 2012). Su clasificación es de acuerdo a su patogenicidad, virulencia y toxicidad las cuales son: Enteropatógena (EPEC), Enterotoxigénica (ETEC), Enteroinvasiva (EIEC), Enteroagregativa (EA_gEC), Difusoadherente (DAEC) (Agurto, 2016).

Escherichia coli es la especie de bacteria identificada con mayor frecuencia en los laboratorios clínicos y ha sido incriminada en enfermedades infecciosas que afectan casi a cualquier tejido y sistema orgánico humano (Koneman *et al.*, 2006). Son responsables



del 80% de las infecciones de tracto urinario adquiridas de forma comunitaria y del mismo número de las infecciones hospitalarias, su hallazgo en alimentos o en agua, es un indicativo de contaminación fecal. *Escherichia coli* no suele ser un microorganismo patógeno pero puede causar infecciones urinarias y ciertas cepas segregan enterotoxinas que producen la diarrea del viajero y en ocasiones enfermedades muy graves (Tortora *et al.*, 2007).

a. Factores de virulencia.

La capacidad de *Escherichia coli* de colonizar el colon no es considerado como factor de virulencia, teniendo la misma capacidad otras especies no patógenas, pero esta acción de colonización es el primer paso para causar infección en el aparato urinario. Estas cepas tienen la capacidad de adherirse de manera íntima a células de la mucosa de la vejiga, provocando una respuesta inflamatoria e invadiendo a las células epiteliales, los factores de virulencia de *Escherichia coli* uropatógena según Castro (2014), son:

- Fimbria tipo 1** : Encargadas de la adherencia al epitelio y a la matriz tisular, invasión de células uroepiteliales y formación de biopelículas.
- Fimbria P** : Encargadas a la adherencia al epitelio y a la matriz tisular e inducción de citocinas.
- Fimbria S** : Encargadas a la adherencia a células de la mucosa, células endoteliales y a la matriz tisular.
- Flagelos** : Movilidad o motilidad, siendo capaz de ascender desde la uretra hasta la vejiga urinaria.
- Cápsula** : Antifagocítica, anticomplemento, resistencia sérica.



LPS : Componente estructural de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, tiene un efecto tóxico directo sobre células de respuesta inflamatoria como leucocitos polimorfonucleares, células monocíticas y linfocitos T y B, alterando la producción de una serie de citoquinas involucradas en la respuesta inmunológica.

Proteínas Mem Ext. : Formación de poros a través de las cuales se transportan proteínas, posible ensamblaje de fimbrias.

A su vez Rojas *et al.* (2006), mencionan a la producción de ureasa, enzima con actividad urealítica, con la capacidad de hidrolizar la urea incrementando la concentración de amonio en la orina y elevando el pH urinario, y la producción de hemolisinas, citolisina formadora de poros que tiene la capacidad de interactuar y muchas veces lisa diferentes tipos de células. El proceso de lisis de los hematíes provoca la liberación hemoglobina, la cual es utilizada como una fuente de hierro, un componente esencial para la multiplicación bacteriana. Así mismo, Agurto (2016), señala a los plásmidos, que son factores de virulencia extracromosómicos, poseen forma anular y contienen genes para otorgar resistencia de los antibióticos y otras sustancias.

2.2.3.2. *Staphylococcus aureus.*

El adjetivo “aureus” deriva del latín dorado, aludiendo al color de las colonias, debido a los pigmentos que se acumulan en este microorganismo cuando se desarrolla sobre la superficie de los medios en placa dándole ese tan característico matiz amarillo a dorado. Son cocos gram positivos, está formada por esferas de 0.5 a 1.5 μm de diámetro (Murray *et al.*, 2014) puede presentarse solas, en pares y formando racimos a manera de uvas o moras, las paredes de estas células están formadas por ácido teicoico. Las colonias



de *Staphylococcus aureus* pueden ser cremosas, circulares, lisas y de borde completo o entero, con un diámetro promedio de 7 mm, es anaerobio facultativo, mejorando el crecimiento en presencia de oxígeno, produce la enzima catalasa, crece y soporta elevadas concentraciones de cloruro de sodio (7.5 – 10%), por esta razón el microorganismo es halófilo (Agurto, 2016). Aunque forma parte de la microflora humana normal en especial de las fosas nasales, puede causar infecciones oportunistas importantes en condiciones apropiadas como en el colon y la vagina; prácticamente todas las personas son portadoras de este germen en uno u otro momento de su vida (Algorta *et al.*, 2006).

a. Factores de virulencia.

Son las características estructurales, genéticas o bioquímicas que permite a un microorganismo causar malestares, el resultado clínico de una infección depende de la eficiencia de los mecanismos de defensa del hospedero y la virulencia del patógeno. *Staphylococcus aureus* expresa numerosos factores de virulencia potenciales (Nau y Metzgar, 2019). Según Castro (2014), indica los siguientes factores de virulencia:

Capsula : Ayuda la unión a superficies y evade fagocitosis.

Proteína A : Une la IgG por la porción Fc impidiendo la opsonización y acción del complemento.

Ácido teicoico : Ayuda la unión a la fibronectina en la superficie de las mucosas.

Coagulasa : Formación de coágulos de fibrina.

Hialuronidasa : Facilita la diseminación rompiendo el ácido hialurónico.

Lipasa : Hidroliza lípidos favoreciendo su presencia en la piel

Fibrinolisisina : Disuelve los coágulos de fibrina, lo que facilita su propagación.



- Catalasa** : Catalizador de conversión de peróxido de hidrogeno.
- DNasa** : Depolimerizan el DNA celular liberado en los procesos purulentos.
- Hemolisinas** : Toxicas para hematíes, fibroblastos, plaquetas y diversas células.
- Leucocidinas** : Toxicas para polimorfonucleares como macrófagos y neutrófilos.
- Enterotoxinas** : Actúan como superantígenos (proliferación de células T y liberación de citocinas).
- Toxinas Exf** : Proteasas que rompen los puentes intercelulares en la epidermis

2.2.4. Resistencia a los antimicrobianos.

El descubrimiento y el uso de los antibióticos ha sido uno de los mayores logros científicos del siglo XX. Durante el primer uso de los antibióticos, las infecciones bacterianas se consideraban contenidas, se utilizaban para curar infecciones potencialmente letales, como también los cortes, las heridas infectadas y varias enfermedades bacterianas. Sin embargo, el uso generalizado de antibióticos ha, promovido la aparición de patógenos resistentes a los antibióticos (Kumar y Schweizer, 2005). Según la Organización Mundial de la Salud en el año 2020 define que la resistencia a los antimicrobianos surge cuando diferentes tipos de microorganismos como por ejemplo las bacterias, se modifican a lo largo del tiempo y dejan de ser susceptibles a los medicamentos, razón por la cual los hace más difícil de tratar y a consecuencia hace que el riesgo de propagación de la enfermedad incremente, ocasionando formas graves de la enfermedad y posteriormente la muerte.

La resistencia se da por el mecanismo mediante el cual la bacteria puede disminuir la acción de los agentes antimicrobianos (Férrandez *et al.*, 2003) puede denominarse natural, cuando presenta un rasgo esencial y permanente al organismo que la hace



naturalmente resistente (Cunha, 2000) o adquirida, cuando el microorganismo por medio de una mutación en su propio ADN obtiene resistencia o por la adquisición de ADN a partir de otra fuente (Todar, 2014). Así mismo, la resistencia puede transmitirse de forma vertical (generación en generación), como también de forma lateral u horizontal de genes, la cual es un proceso por el que el material genético contenido en pequeños paquetes de ADN puede transferirse entre bacterias individuales de la misma especie o incluso entre especies diferentes, es mediada a través de plásmidos u otro material genético movable como integrones y transposones. Existen al menos tres mecanismos posibles como la transducción, la transformación y la conjugación (Wright, 2005).

Las bacterias han evolucionado varios mecanismos principales que les confieren resistencia a los antibióticos las cuales son el eflujo del antibiótico desde la célula a través de un conjunto de proteínas de bombeo asociadas a la membrana; la modificación de sitio diana del antibiótico; la alteración o disminución de la permeabilidad de la membrana celular bacteriana; y mediante la síntesis de enzimas modificadoras que se dirigen selectivamente a la actividad de los antibióticos y la destruyen (Wright, 2005). Todos estos mecanismos pueden modificar químicamente el antibiótico, hacerlo inactivo mediante su eliminación física de la célula, modificar el sitio de destino para que no se pueda utilizar mediante la eliminación física de la célula, o modificar el sitio objetivo para que no sea reconocido por el antibiótico. El modo más común es la inactivación enzimática del antibiótico. Una enzima celular existente que se modifica para que reaccione con el antibiótico de tal manera que ya no afecte al microorganismo. Una estrategia alternativa utilizada por muchas bacterias es la alteración del sitio objetivo del antibiótico (Todar, 2014).

Escherichia coli es el agente causal más frecuente de las infecciones bacterianas más comunes incluyendo las del tracto urinario y la bacteremia, causa el 80% de todas



las ITU adquiridas en la comunidad entre personas sanas, y aproximadamente la mitad de infecciones ocurre entre pacientes hospitalizados y personas con diabetes (Foxman y Brown, 2003). En estas últimas épocas, se observa el aumento de la resistencia de este microorganismo a los principales antibióticos de uso clínico como la ampicilina, ciprofloxacino, sulfametoazol/trimetoprim, estreptomina y tetraciclina (Puig *et al.*, 2011). Debido al primordial mecanismo involucrado que es la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) que concede resistencia a las cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación. La tasa de producción de BLEE por las enterobacterias en países de latinoamérica es más alta que en otras regiones del mundo a consecuencia del uso irracional y masivo de antibióticos (Garcia, 2012).

Hace cuarenta años, el *Staphylococcus aureus* era uno de los patógenos bacterianos más comunes (sobre todo en el caso de las infecciones nosocomiales) y era fácilmente erradicado por la penicilina, hoy en día la mayoría de los aislados de *S. aureus* son resistentes a la penicilina (Dever y Dermody, 1991), debido a la adquisición del gen *mecA*, el cual codifica una proteína ligadora de penicilinas alterada (PBP2a) que no permite la unión con los β -lactámicos. El gen *mecA* forma parte de un complejo móvil (*mec*) que reside dentro de una isla genómica en un sitio específico dentro del cromosoma de *Staphylococcus aureus* denominado cassette cromosómico estafilocócico (SCC) (Garcia, 2012). Si bien los antimicrobianos son indispensables para la medicina ya sea humana como animal, se considera también que son los responsables del surgimiento de la resistencia en todo tipo de microorganismos (Miranda, 2011).

2.2.5. Ciprofloxacino.

El ciprofloxacino es un medicamento de amplio espectro utilizado desde anteriores años en el tratamiento de múltiples tipos de infecciones (Lima *et al.*, 2002), es



un agente bactericida, que interactúa intracelularmente inhibiendo la ADN girasa, enzima bacteriana esencial para la duplicación, transcripción y reparación del ADN bacteriano (Colegio Medico del Perú, 2018). El ciprofloxacino es una quinolona sintética de segunda generación y agente bactericida de amplio espectro, habitualmente prescrito a nivel hospitalario y ambulatorio para el manejo de infecciones microbiológicas que son consideradas leves a persistentes (Franco *et al.*, 2012).

El mecanismo de acción de las quinolonas es inhibir la acción de las topoisomerasas tipo II (topoisomerasa IV y ADN girasa). Siendo el blanco principal en las bacterias gram negativas, el ADN girasa, mientras que la topoisomerasa IV actúa como la diana secundaria. El ADN girasa es una enzima compuesta por cuatro subunidades; dos, tipo A y dos, tipo B codificadas por *gyrA* y *gyrB*, que son las encargadas de catalizar el super enrollamiento negativo del ADN. Para el caso de la topoisomerasa IV, el blanco principal para las bacterias gram positivas, se trata también de una enzima con cuatro subunidades codificadas por *parC* y *parE*, similares a *gyrA* y *gyrB* (Mosquito *et al.*, 2011). El grupo de las quinolonas tienen una excelente acción contra infecciones gastrointestinales y urinarias, siendo así que las nuevas quinolonas se han convertido en un armamento muy importante contra mayor número de infección, pero lamentablemente debido al uso irracional de estos medicamentos, se incrementa progresivamente las cepas resistentes (Macri *et al.*, 2017).



CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ÁREA DE ESTUDIO.

La investigación se realizó en el departamento, provincia y distrito de Puno situado en una altitud de 3824 m.s.n.m. y está ubicado al extremo sur este del Perú, entre los 13°00'00" y 17°17'30" de latitud sur y los 71°06'57" y 68°48'46" de longitud oeste del meridiano de Greenwich. La obtención de la muestra de albahaca (*Ocimum basilicum*) fue de los mercados Unión y Dignidad ubicado en las coordenadas 15°50'24.2" S 70°01'11.5" W y mercado Laykakota ubicado en las coordenadas 15°50'47.3" S 70°01'15.1" W. Las muestras de orina para el aislamiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* fueron proporcionadas por el Centro de Salud I-3 "Simón Bolívar". La obtención del aceite esencial de albahaca se realizó en el Laboratorio/Taller de frutas y hortalizas de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial. Las pruebas de concentración mínima inhibitoria y susceptibilidad antimicrobiana se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno.

3.2. TIPO DE ESTUDIO.

La investigación se realizó de tipo experimental, en razón a que se manejó una o más variables de estudio, para controlar el aumento o disminución y su efecto en las conductas observadas, llevándolo a cabo en condiciones controladas. Teniendo pruebas y controles, distribuidos en tres grupos:

- Un primer grupo, control positivo: Antibiótico ciprofloxacino para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.



- Un segundo grupo, control negativo: Etanol al 96°
- Un tercer grupo, tratamiento con aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum*) a diferentes concentraciones.

POBLACIÓN Y MUESTRA.

Muestras microbiológicas:

Los aislamientos de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* se obtuvieron a partir de 30 muestras de orina al mes durante marzo a mayo del 2021, colectadas en el laboratorio del Centro de Salud I – 3 “Simón Bolívar”, de pacientes que asisten al consultorio externo y son diagnosticados con infección urinaria.

Muestras de albahaca (*Ocimum basilicum*):

Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia, en razón a la población de la planta estudiada (albahaca), siendo de gran cantidad y variedad en los mercados expendedores de la provincia de Puno, por consiguiente, se obtuvieron 15 kilos en total de los mercados Unión y dignidad y Laykakota de la ciudad de Puno.

Criterios de inclusión.

- Urocultivos con infección urinaria positivos a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* identificadas a partir de muestras de orina del Centro de Salud Simón Bolívar.
- Hojas y tallos de “albahaca” sin señales de daño físico o enfermedad y en buen estado de desarrollo.

Criterios de exclusión.

- Urocultivos negativos o presencia de uropatógenos distintos a las bacterias en estudio.
- Material vegetal que contenga señales notables de daño y este en mal estado de desarrollo o crecimiento.

3.3. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.

La distribución de las unidades de análisis para el estudio del efecto del aceite esencial de *Ocimum basilicum* frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, correspondió a un diseño experimental y fue de la siguiente manera:

Tabla 1. Diseño experimental para determinar la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca) frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, marzo – mayo 2021.

Repeticiones	Control Negativo*	Concentraciones del aceite esencial de albahaca en agar Mueller Hinton						
		0.1%	0.2%	0.5%	1%	2.5%	5%	Total
		1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1	1	7
3	1	1	1	1	1	1	1	7
Total	3	3	3	3	3	3	3	21

*Control Negativo: Medio de cultivo Mueller Hinton sin concentración de aceite esencial.

Fuente: Elaboración propia

Para determinar la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Ocimum basilicum* “albahaca”, se trabajó con 21 unidades experimentales por mes, conformado por 7 tratamientos y 3 repeticiones para cada dosis utilizada, además se utilizó un control negativo (medio de cultivo Mueller Hinton sin aceite esencial de

albahaca). Cada unidad experimental estuvo compuesta por concentraciones del aceite esencial a 0.1%, 0.2%, 0.5%, 1%, 2.5% y 5% dispuestos de la siguiente manera:

1° Concentración.: 0.02 ml de aceite esencial + 19.98 ml de Agar MH =0.1 %

2° Concentración.: 0.04 ml de aceite esencial + 19.96 ml de Agar MH =0.2 %

3° Concentración.: 0.1 ml de aceite esencial + 19.90 ml de Agar MH =0.5%

4° Concentración.: 0.2 ml de aceite esencial + 19.80 ml de Agar MH =1%

5° Concentración.: 0.5 ml de aceite esencial + 19.50 ml de Agar MH =2.5%

6° Concentración.: 1.0 ml de aceite esencial + 19.00 ml de Agar MH =5%

Tabla 2. Diseño experimental para la susceptibilidad antimicrobiana del aceite esencial de *Ocimum basilicum* “albahaca” frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, marzo – mayo 2021.

Repeticiones	Control ciprofloxacino	Concentraciones del aceite esencial de albahaca					Total
		20%	40%	60%	80%	100%	
1	1	1	1	1	1	1	6
2	1	1	1	1	1	1	6
3	1	1	1	1	1	1	6
Total	3	3	3	3	3	3	18

Fuente: Elaboración Propia

Para determinar la susceptibilidad antimicrobiana del aceite esencial de “albahaca” frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, se trabajó frente a cada especie, 18 unidades experimentales por mes, conformado por 6 tratamientos en total y se realizaron 3 repeticiones por cada concentración utilizada. Teniendo un control de referencia (antibiótico ciprofloxacino) y un control negativo (etanol al 96°), así también 5 concentraciones del aceite esencial de *Ocimum basilicum* (20%, 40%, 60%, 80% y 100%) aplicados sobre discos de papel filtro Whatman N°4 exento de cenizas, a volúmenes de 20 µl por concentración aplicada. Se utilizó el antibiótico ciprofloxacino para comparar el efecto inhibitorio del aceite esencial frente a *Escherichia coli* y



Staphylococcus aureus, ya que se conoce la sensibilidad de ambas bacterias, de acuerdo al manual de procedimientos para la prueba antimicrobiana de sensibilidad del Instituto Nacional de Salud (2002).

3.4. MÉTODO DE CAMPO.

3.4.1. Obtención y procesamiento de la albahaca.

a. Obtención del material vegetal.

Inicialmente hay que tener en cuenta que, dependiendo de la planta en estudio, se debe distinguir donde se encuentran más intensamente los principios activos, así mismo la etapa de crecimiento, parte de la planta y lugar de procedencia (Sisa, 2004).

b. Procedimiento.

Se adquirió 15 Kg de albahaca, entre tallos y hojas (Figura 10) de los mercados Unión y Dignidad, y Laykakota. Todas éstas en un buen estado biológico sin señales de daños, enfermedad o presencia de ciertos tipos de parásitos. Se seleccionaron y se separaron las impurezas como ramas secas, tallos dañados y la presencia de algún otro contaminante. Luego se almacenaron en cajas con papel Kraft previamente etiquetadas, con el propósito de impedir su deterioro o algún maltrato del vegetal durante el traslado. Seguidamente el material vegetal (albahaca) fue trasladado al Laboratorio/Taller de frutas y hortalizas de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional de Altiplano.

c. Secado del material vegetal

Fundamento. – Consiste en la eliminación del agua que están presentes en los tejidos y células de la planta, con la finalidad de evitar alguna alteración de los componentes del



vegetal por la acción de la humedad persistente (Huerta, 2015). Las hojas deben ser secadas con el tallo, sin desprenderlas (Zuni, 2017).

Procedimiento. – Se realizó en un entorno resguardado de la luz solar, ventilada y sin sobreponer los tallos para su desecación adecuada por un tiempo de 15 días aproximadamente, para así lograr un secado apropiado de la albahaca (Figura 10 - b).

3.4.2. Obtención del aceite esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca).

a. Método de destilación por arrastre a vapor de agua.

Fundamento: La extracción por arrastre de vapor se utiliza para conseguir la separación de compuestos levemente volátiles e insolubles en agua, de otras sustancias no volátiles combinados con ellas. Se efectúa cuando se calienta el material vegetal y el vapor por presión entra en contacto con las células de las partes de las plantas y las rompe, liberando la esencia y atrapándola en las gotas de agua del vapor, luego se enfría y condensa en el destilador (Obregon, 2018).

b. Procedimiento:

- **Albahaca:**

Luego del secado de aproximadamente 15 días, se apartaron las hojas de los tallos manualmente, y se cargó en un destilador, colocándose en total 4 Kg de material vegetal seco, de manera que forme un lecho fijo compacto (Figura 11), se dio el tiempo necesitado para que el agua caliente y el vapor suba por presión y entre en contacto con la célula de las hojas, las rompa y libere la esencia contenida, para que así sea atrapada en las gotas de agua del vapor; el vapor se condensa y vuelve a ser líquido por medio del ingreso de agua fría que está en flujo constante, el líquido resultante pasa a la pera de decantación donde se aparta el agua (hidrolato o “esencia de rosas”) del aceite esencial. Dicha



sustancia contiene el principio activo de la albahaca y está compuesto por las sustancias químicas que tiene actividad antimicrobiana y se probó en esta investigación. El agua y el aceite por diferencia de densidades flota en la superficie de la pera de decantación. Finalmente, el proceso acabó cuando el volumen del aceite esencial depositado en la bureta no se modifica con el tiempo, para luego ser retirado y almacenado en frascos pequeños con tapa de color ámbar (debidamente esterilizados). El proceso de extracción se realizó en un periodo de 2 horas con 30 minutos y se obtuvo 15 ml de aceite esencial de albahaca de 4 Kg de vegetal seco, los frascos acaramelados se pusieron en refrigeración hasta su posterior utilización en los análisis (Figura 12).

3.5. MÉTODO DE LABORATORIO.

3.5.1. Obtención de las muestras de orina.

Se obtuvo las muestras de orina para urocultivo, de personas con infección urinaria provenientes del laboratorio del Centro de Salud Simón Bolívar nivel I – 3. El transporte y bioseguridad se tomó en cuenta por ser sustancias infecciosas, por lo que se aplicó la técnica de triple embalaje. Esta técnica de embalaje se constituye de tres componentes: El depósito primario, el embalaje secundario y el empaquetado externo. El recipiente primario contiene las muestras de orina la cual debe ser hermético y sellado, a prueba de fugas y estar debidamente rotulado, estas fueron envueltas en bolsas herméticas y con material absorbente, siendo en caso de fuga o rotura, apropiado para absorber todo el líquido derramado, subsiguiente a ello se trasladó en un recipiente (caja) de Tecnopor bien cerrado, hasta llegar al laboratorio.



3.5.2. Preparación de medios de cultivo para el aislamiento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y evaluación de la actividad antimicrobiana.

a. AGAR MACCONKEY.

Fundamento:

Es un medio de cultivo diferencial y selectivo para el aislamiento de enterobacterias obtenidas a partir de orina, heces, alimentos y aguas residuales (Agurto, 2016). Está diseñado para aislar selectivamente bacilos gram negativos y entéricos (se encuentran normalmente en el tracto intestinal) y diferenciarlos sobre la base de la fermentación de la lactosa. En el medio de crecimiento o cultivo, las peptonas, contribuyen con los nutrientes requeridos para el crecimiento bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable; la mezcla de cristal violeta y las sales biliares, son los agentes selectivos que inhiben considerablemente el crecimiento del microbiota gram positiva. La lactosa es fermentada y disminuye el pH alrededor de la colonia, produciendo un viraje del color del indicador del pH (rojo neutro), la absorción en las colonias, como también la precipitación de las sales biliares. Las bacterias no fermentadores de lactosa causan colonias incoloras (Benavides, 2018).

Procedimiento:

Como especifica el fabricante, se preparó 1.0 g de agar macconkey con 20 ml de agua destilada (Figura 13). Se esterilizó el medio de cultivo en una autoclave, a 120°C por 30 minutos, pasado el tiempo se hizo el plaqueo vertiendo el medio en cada placa estéril, luego se esperó su solidificación y se verificó el pH (7.2 – 7.4). Seguidamente, se realizó el aislamiento de las muestras de orina de pacientes con infección urinaria, siendo inoculadas en el medio de cultivo agar macconkey, mediante estrías en los 4 cuadrantes. Se realizó 3 repeticiones por mes desde marzo a mayo. Para la identificación se observó



las características de las colonias en el medio de cultivo, siendo la bacteria *Escherichia coli*, aquellas colonias que presentaban una coloración roja o rosada con un halo turbio. Finalmente se realizó tinción gram, prueba de catalasa e inoculación en pruebas bioquímicas de TSI, LIA, CITRATO, INDOL para su completa identificación. Obteniéndose en total 12 aislamientos de *Escherichia coli* por mes.

b. AGAR SAL Y MANITOL.

Fundamento:

Consta de un medio altamente selectivo, debido a que posee una elevada concentración de salinidad, la cual inhibe el desarrollo de bacterias no halófilas (Agurto, 2016). Los *Staphylococcus coagulasa* positiva hidrolizan el manitol y acidifican el medio; resultando colonias que aparecen rodeadas de una zona amarilla brillante. Por el contrario, los *Staphylococcus coagulasa* negativa, muestran colonias rodeadas de una zona roja o púrpura. Las colonias sospechosas bien diferenciadas, se repicaron en un medio sin exceso de cloruro de sodio, para luego efectuar la prueba de la coagulasa. En el medio de cultivo, los constituyentes como la pluripeptona y el extracto de carne, constituyen la fuente de carbono fermentable y el cloruro de sodio (que está en elevada concentración) es el componente selectivo que prohíbe el crecimiento de la flora acompañante, por último, el rojo de fenol que actúa como indicador de pH (Mendo, 2003).

Procedimiento:

Por indicaciones del fabricante, se preparó 2.22 g de agar sal y manitol con 20 ml de agua destilada (Figura 13). Se esterilizó el medio de cultivo en una autoclave, a 120°C por 30 minutos, pasado el tiempo se hizo el plaqueo vertiendo el medio en cada placa estéril, a continuación, se esperó su solidificación y se verificó el pH (7.2 – 7.4). Posteriormente, se realizó el aislamiento de las muestras de orina, inoculándolas en el



medio de cultivo agar sal y manitol, mediante estrías en los 4 cuadrantes. Luego se observó las características de las colonias en el medio de cultivo y se identificó como *Staphylococcus aureus* aquellas colonias que presentan una coloración amarilliza rodeadas de una zona del mismo color. Finalmente se realizó tinción gram y prueba de la coagulasa. Igualmente se realizó 3 repeticiones por mes desde marzo a mayo, obteniendo en total 5 aislamientos de *Staphylococcus aureus* por mes.

c. AGAR MUELLER HINTON.

Fundamento:

Es un medio de cultivo nutritivo no selectivo que promueve el desarrollo microbiano, por su composición ha sido recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para ser utilizado en forma rutinaria en la realización de antibiogramas, debido a que presenta buena reproducibilidad en las pruebas de sensibilidad y presenta un contenido bajo de inhibidores como sulfonamidas, tetraciclinas y trimetoprima, la mayoría de patógenos microbianos crece satisfactoriamente y finalmente existen suficientes datos recopilados que avalan la experiencia de las pruebas de sensibilidad realizadas en este medio (Britania, 2021).

Procedimiento:

Según descripción del fabricante para su pertinente hidratación, se preparó 0.68g de agar Mueller Hinton con 20 ml de agua destilada (equivalente a 1 placa), dependiendo a cada objetivo específico (Figura 13). Luego el medio de cultivo se esterilizó en una autoclave, a 120°C por 30 minutos, pasado el tiempo y antes que se enfríe y se solidifique completamente el medio de cultivo, se efectuó el plaqueo dispersando 20 ml de medio en cada placa estéril, seguidamente se esperó su solidificación y se verificó el pH (7.2 – 7.4); empleando tiras reactivas. Para finalizar, se incubaron durante 10 a 30 minutos a 35°C, a



fin de evitar la acumulación de humedad en la tapa de las placas, y se almacenaron a temperatura de 8 a 10 °C hasta su utilización.

3.5.3. Preparación de medios diferenciales.

a. Agar Triple Azúcar Hierro (TSI).

Fundamento: Determina la capacidad del microorganismo de abordar un hidrato de carbono específico agregado en un medio de crecimiento básico, ya sea con producción de gases o sin ella, junto con la determinación de ácido sulfhídrico (Apaza, 2016). Es un medio diferencial que determina si una bacteria gram negativo utiliza la lactosa, glucosa o sacarosa de manera fermentativa formando sulfuros de hidrogeno. La descomposición del azúcar produce un ácido que hace que el indicador rojo de fenol se vuelva amarillo; de lo contrario, se producirá la alcalinidad, lo que hará que el indicador se vuelva rojo oscuro. El tiosulfato se reduce a sulfuro de hidrógeno, que reacciona con las sales de hierro para formar sulfuro de hierro de coloración negro. La presencia de agujeros en el medio se debe a la formación de gas (dióxido de carbono) fruto de la fermentación (Macfaddin, 2003).

b. Agar Lisina Hierro (LIA).

Fundamento: Evalúa la capacidad enzimática de un microorganismo para descarboxilar un aminoácido como arginina y lisina, para la formación de una amina, con la resultante alcalinidad. Siendo el indicador purpura de bromo cresol y formando el hidrogeno sulfurado a partir del tiosulfato sódico se muestra por la formación del sulfuro ferroso (Apaza, 2016). Existen 3 descarboxilasas importantes que son utilizadas para la identificación bacteriana; siendo la lisina, arginina y ornitina, éstas son enzimas inducidas o adaptativas. Sólo se integran cuando un organismo es sembrado en un ambiente ácido



en presencia de un sustrato específico, y los productos de descarboxilación cambian el pH a límites alcalinos (Bailón *et al.*, 2003).

c. Citrato de Simmons.

Fundamento: Determina si un microorganismo es capaz de utilizar al citrato como única fuente de carbono para su metabolismo, provocando alcalinidad. La descomposición del citrato contenido en el cultivo forma ácidos intermedios, la cual se volatilizan permaneciendo el catión sodio en el medio, así como también los radicales oxidrilos, produciendo alcalinización en el medio, el azul de bromo timol es el indicador que hace virar de un color verde a azul (Macfaddin, 1990). Ciertas bacterias pueden suministrar energía en ausencia de producción o fermentación del ácido láctico, la cual emplean el citrato como única fuente de carbono (Apaza, 2016).

d. Agar SIM (Movilidad, Indol, Sulfuro)

Fundamento: El medio Sim permite evidenciar la movilidad, producción de indol y la formación de sulfuro. Las bacterias tienen movilidad o motilidad a través de sus flagelos, que se localizan principalmente entre los bacilos (microorganismos en forma de bastoncillos). Las bacterias que son móviles pueden tener un solo flagelo o contener varios; asimismo su localización es variada con la especie bacteriana y las condiciones de cultivo. Las bacterias que carecen de flagelos son no móviles (Bailón *et al.*, 2003). El Indol es un compuesto que determina la capacidad de una bacteria para separar Indol a partir del triptófano, siendo éste un aminoácido que puede ser oxidado por algunas bacterias para la formación de 3 metabolitos indólicos principales: Indol, escatol (metil indol) y ácido indolacético (Macfaddin, 2003).



Procedimiento:

- Se preparó los medios diferenciales como especifica el fabricante para cada uno de los compuestos en tubos de ensayo de 13 x 100 mm: Para TSI (0.31 gr para 5 ml de agua destilada), LIA (0.17 gr para 5 ml de agua destilada), CITRATO (0.12 gr para 5 ml de agua destilada) y SIM (0.15 gr para 5 ml de agua destilada).
- Se esterilizó los medios diferenciales en una autoclave, a 120°C por 30 minutos (Figura 13), seguidamente se puso en una posición inclinada para formar picos de flauta con una capa basal profunda. Se esperó su solidificación y se incubaron durante 30 minutos a 35°C, conservándose a temperatura de 8 a 10 °C hasta su utilización.
- Para la identificación bacteriana, se tomó una colonia bien diferenciada de *Escherichia coli* del medio de cultivo macconkey con una aza de siembra en punta, seguidamente se inoculó en cada uno de los medios diferenciales, por medio de punción y estrías, para luego incubar a 37°C por 24 horas (Figura 16).

e. TINCION GRAM

Fundamento:

Coloración diferencial más utilizada en laboratorios de microbiología y bacteriología. Esta técnica permite clasificar a las bacterias en dos grandes categorías; gram positivas y gram negativas (Olivares, 2012). Se fundamenta en la diferencia estructural a nivel de la pared celular en ambos grupos. Las bacterias gram positivas poseen una gruesa pared celular la cual rodea la membrana citoplasmática; la pared está compuesta por peptidoglicano o mureína y ácido teicoico. Aquí es retenido el complejo de cristal violeta iodo después del tratamiento con el colorante y el mordiente lugol (Corrales y Caycedo, 2020). Las bacterias gram negativas presentan una bicapa más



externa de lípidos, llamada membrana externa y poseen una pared celular más delgada que no contribuye a la retención del complejo cristal violeta, el que al perderse después de la decoloración con una mezcla proporcional de alcohol acetona las dejas expeditas para aceptar el contra colorante rojo safranina, es cual es agregado hacia el final de la tinción (González *et al.*, 2020).

Procedimiento:

Se tomó un inóculo bien aislado del cultivo puro de *Escherichia coli* como también de *Staphylococcus aureus* y con la ayuda de un asa de siembra se procedió a extenderlo en una lámina portaobjeto y se fijó con la flama de un mechero. Seguidamente, se esparció cristal violeta por 1 minuto sobre el frotis. Pasado el tiempo, se lavó con bastante agua. Luego, se cubrió con lugol por 1 minuto más y transcurrido el tiempo se lavó con bastante agua. Consecutivamente, se cubrió con decolorante alcohol acetona por un lapso de 30 segundos y pasado el tiempo se lavó con bastante agua. Para finalizar, se vertió con safranina (colorante de contraste) y se dejó actuar por 1 minuto, para luego lavar con abundante agua (Figura 15, a – b).

3.5.4. Preparación del estándar Mc Farland.

Fundamento:

El inóculo bacteriano debe contener una cantidad normatizada de unidades formadoras de colonias (UFC), para minimizar la variación de la población bacteriana, esta cantidad es de 1×10^8 UFC/ml la que se determinó mediante el estándar de Mc Farland (INS, 2002).



Procedimiento:

Para estandarizar la densidad óptica del inóculo se utilizó una suspensión de sulfato de bario como estándar de turbidez (0.5 de la escala de Mac Farland). Para prepararlo se procedió de la siguiente manera: Se añadió 0.5 ml de $BaCl_2$ a 99.5 ml de H_2SO_4 . Seguidamente se comprobó la densidad correcta del estándar utilizando un espectrofotómetro; teniendo una absorbancia de 0.03 – 0.10 a 625 nm para el estándar 0.5 de Mac Farland. Se repartieron de 2 – 4 ml de la solución en tubos semejantes a los que se emplean para preparar los inóculos y se conservaron guardados lejos de la luz solar y a temperatura ambiente. Previo a su uso y para adquirir una turbidez homogénea, se agito enérgicamente cada estándar.

3.5.5. Preparación de los inóculos.

Las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* luego de estar cultivadas y debidamente identificadas, se procedió a seleccionar y recoger con un asa de Kolle 4 a 5 colonias con similar morfología, teniendo cuidado de no recolectar restos del medio de cultivo (Figura 14). Se preparó con estas colonias una suspensión de 4 ml en suero fisiológico, inmediatamente la suspensión bacteriana fue incubada a 37°C hasta obtener la turbidez del estándar (2 horas). Finalmente se realizó el ajuste a la turbidez del inóculo por comparación visual, añadiendo solución salina al 0.9%, hasta adquirir una turbidez equivalente al tubo del estándar de Mc Farland, para ello, se observaron los tubos utilizando un fondo blanco y una línea negra como contraste.



3.6. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DEL ACEITE ESENCIAL DE *Ocimum basilicum* (ALBAHACA).

Para poder obtener los resultados de este objetivo, se realizaron los procedimientos recomendados por Coronado y Cauna (2013).

MÉTODO: Dilución en placa.

FUNDAMENTO:

La técnica de dilución en placa o agar, comprende la dispersión de la muestra en estudio en un medio sólido, cada célula bacteriana al presentarse en la superficie del medio de agar, se multiplicará y dará origen a un cumulo de células que originan una colonia, permitiendo su cuantificación (Lechevallier *et al.*, 1980; Ramírez *et al.*, 2017). Se utilizó para medir cuantitativamente la actividad “*in vitro*” de un antibacteriano frente a un cultivo microbiano, estos métodos se basan en la preparación de una serie de placas con caldos o agar, a los cuales se les añade el antibiótico o aceite esencial en diferentes concentraciones. Luego se inoculan cada uno de las placas con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio. Las pruebas se examinan después de incubar 24 horas a 37 °C y se determina la concentración mínima inhibitoria (CMI) del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado (Torrico y Trigo, 2003).

PROCEDIMIENTO:

Para determinar la concentración mínima inhibitoria se inoculó en placas de agar Mueller - Hinton más el aceite esencial de albahaca (preparados en diferentes concentraciones, 0.1%; 0.2%; 0.5%; 1%; 2.5% y 5%), una suspensión bacteriana de las cepas en estudio (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*) teniendo como referencia el estándar de Mc Farland (1×10^8 UFC). Así mismo, se preparó una placa control sin ninguna concentración de aceite (control de crecimiento). Luego se procedió a incubar

por 24 horas, transcurrido el tiempo se inspeccionaron las placas en busca de desarrollo, seguidamente se realizó la observación del crecimiento de colonias para señalar a que concentración mínima inhibitoria (CMI) la bacteria mostraba sensibilidad.

a. Método estadístico.

Para establecer si existe o no, relación estadística significativa, se utilizó la prueba no paramétrica de Chi – Cuadrado (X^2), para comparar las posibles diferencias del aceite esencial de albahaca frente a los aislamientos de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* obtenido de orinas patógenas del centro de Salud I – 3 Simón Bolívar. Esta prueba instituye la independencia o dependencia de 2 variables, aceptando o rechazando la hipótesis nula, teniendo en cuenta criterios como los grados de libertad y el nivel de confiabilidad al 5% (Canales, 2016). Se utilizó para este análisis el software estadístico Infostat (2019) versión libre.

Prueba no paramétrica de Chi – Cuadrado (X^2), cuya formula estadística es la siguiente:

$$x_c^2 = \sum_{i=1}^c \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

Donde:

X^2 : Chi – Cuadrado calculado.

O_i : Frecuencias Observadas de la i – ésima columna.

E_i : Frecuencias esperadas de la i – ésima columna.

Las pruebas estadísticas se evaluaron:

Las pruebas son significativas; si el resultado es $p < a 0.05$.

Las pruebas no son significativas; si el resultado es $p > a 0.05$



3.7. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA “*In vitro*” DE *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

MÉTODO: Difusión con discos.

FUNDAMENTO:

El antibiograma disco – placa o difusión con discos consiste en colocar en la superficie del agar de una placa petri (anteriormente inoculada con la bacteria), discos de papel secante de 6 mm empapados con los diferentes antibióticos o sustancias alternas (aceites esenciales o extractos). Tan pronto el disco impregnado de antibiótico u otra sustancia se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico propaga radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Finalmente, transcurridas 18 a 24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición (Picazo, 2000).

PROCEDIMIENTO:

Se empapó un hisopo estéril en una suspensión bacteriana a 1×10^8 UFC/ml (turbidez estándar de Mc Farlan) de las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, luego se inoculó en la superficie de cada placa de agar Mueller Hinton; utilizando el hisopo se esparció en el medio de cultivo en diferentes direcciones para asegurar una repartición uniforme del inóculo, luego con la ayuda de una pinza estéril se colocaron los discos de papel filtro con las diferentes concentraciones del aceite esencial de albahaca sobre la superficie del agar. Como control se utilizó el antibiótico ciprofloxacino para ambas bacterias y como control negativo se utilizó etanol al 96%. Seguidamente se incubó a 37°C durante 24 horas colocando las placas en posición invertida, para su posterior lectura e interpretación (Figura 14).

3.8. LECTURA DE PLACAS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

Pasado el tiempo de incubación, se examinaron cada placa y se procedió a medir los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada disco con una regla milimétrica. Y se compararon con los halos de inhibición del antibiótico control ciprofloxacino, según las tablas que se muestran a continuación.

Tabla 3. Tabla de estandarización de halos de inhibición (mm) para enterobacterias.

Antibacteriano	Concentración del disco	Diámetro en milímetros		
		R	I	S
Quinolonas				
Ciprofloxacina	5 µg	≤ 15	16 – 20	≥ 21

Fuente: Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana del Instituto Nacional de Salud (2002).

Tabla 4. Tabla de estandarización de halos de inhibición (mm) para *Staphylococcus spp.*

Antibacteriano	Concentración del disco	Diámetro en milímetros		
		R	I	S
Fluoroquinolonas				
Ciprofloxacina	5 µg	≤ 15	16 – 20	≥ 21

Fuente: Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana del Instituto Nacional de Salud (2002).

En las tablas 3 y 4 se muestran medidas establecidas de halos de inhibición en milímetros (mm), con la dosis o carga de los antibióticos utilizados: R = Resistente; I = Intermedio; S = Sensible.

a. Método estadístico.

Para la comparación de la susceptibilidad antimicrobiana “*in vitro*” del aceite esencial de *Ocimum basilicum* “albahaca” y el antibiótico ciprofloxacino frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*; se evaluó las diferencias estadísticas entre las concentraciones del aceite esencial de albahaca y el control de los ensayos (antibiótico ciprofloxacino), utilizando el análisis de varianza (anova) de un diseño completamente al azar (DCA) (Canales, 2016), para determinar la existencia de diferencias entre las concentraciones, respecto a la inhibición producida por el efecto del aceite esencial en *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, así mismo se realizó la prueba de rango múltiple de Tukey para realizar la comparación de medias entre los tratamientos. El análisis de varianza se realizó utilizando el siguiente modelo lineal aditivo:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Variable de respuesta (halo de inhibición en mm).

μ = Promedio general.

τ_i = Efecto de la *i*-ésima concentración del aceite esencial de albahaca.

ε_{ij} = Efecto del error experimental.

Las pruebas estadísticas se evaluaron:

Si el resultado es $p < 0.05$; la prueba se considera significativa.

Si el resultado es $p > 0.05$; la prueba se considera no significativa.



b. Prueba de rango Tukey.

Tukey planteó un método para evaluar la hipótesis nula con α siendo exactamente el nivel global de significancia, cuando las muestras poseen tamaños iguales, y en el máximo α , cuando las muestras poseen tamaños diferentes.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DEL ACEITE ESENCIAL DE *Ocimum basilicum* (ALBAHACA) FRENTE A *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus* UROPATÓGENOS.

Los resultados de las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca) frente a las bacterias propuestas; se obtuvo una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 1.0% frente a *Escherichia coli* (Figura 19) en los 3 bioensayos del aceite esencial, evidenciado por la ausencia de crecimiento bacteriano a esta concentración. A diferencia de las concentraciones inferiores (0.1%; 0.2% y 0.5%) que si presentaron crecimiento bacteriano. Así mismo, para *Staphylococcus aureus* la CMI fue de 0.5% (Figura 20), en contraste a las concentraciones inferiores (0.1% y 0.2%) que si mostraron desarrollo. Los resultados fueron similares en las 3 repeticiones de bioensayos del aceite esencial de albahaca frente ambas bacterias (Tabla 5).

Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial *Ocimum basilicum* (albahaca) frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, marzo – mayo 2021.

Concentración de aceite esencial (%)	Crecimiento de <i>Escherichia coli</i> (UFC)			Crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> (UFC)		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
	Control (-) en Agar Mueller Hinton	+	+	+	+	+
0.1	+	+	+	+	+	+
0.2	+	+	+	+	+	+
0.5	+	+	+	-	-	-

1	-	-	-	-	-	-
2.5	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
concentración						
mínima inhibitoria	1%	1%	1%	0.5%	0.5%	0.5%
(CMI)						

Nota: (+) Crecimiento bacteriano, (-) Ausencia de Crecimiento bacteriano.

Fuente: Elaboración propia

Las diferencias de concentración mínima inhibitoria obtenidas en las dos bacterias frente al aceite esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca); resultó sin diferencia estadística significativa ($X^2=0.29$; GL=6; P=0.9996) (Figura 4) según el análisis estadístico de Chi cuadrado, teniendo en cuenta la significancia de la prueba ($p<0.05$). Indicando que el valor de la CMI de las concentraciones del aceite esencial de albahaca fue similar en las dos bacterias (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*).

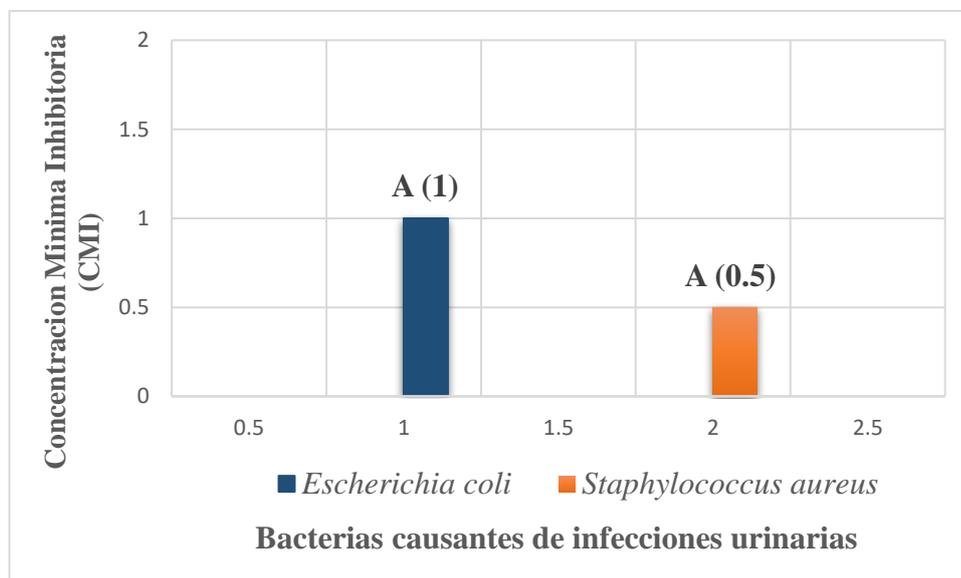


Figura 4. Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca) frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, sin diferencia estadística significativa ($p<0.05$) representadas con letras iguales (A, A).

De acuerdo a los resultados logrados se demuestra que el aceite esencial de *Ocimum basilicum* “albahaca” es una sustancia inhibitoria sobre los aislamientos que



causan infecciones urinarias derivados de las muestras de orina proporcionadas por el Centro de Salud Simón Bolívar, obteniendo una concentración mínima inhibitoria a concentraciones mayores o iguales a 1% frente a *Escherichia coli* (Figura 19) y 0.5% frente a *Staphylococcus aureus* (Figura 20). Estos resultados obtenidos concuerdan con la investigación presentada por Ancalla y Solis (2017), en donde obtuvieron una CMI de 1% frente a *Streptococcus mutans* ATCC 02175. Así también, presenta similitud con el trabajo realizado de Moghaddam *et al.* (2011) con 1.8% de CMI para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. La actividad antimicrobiana de la albahaca se debería a la presencia de los principios activos o metabolitos secundarios, estos componentes se desarrollan en la planta en defensa a condiciones de estrés ya sea de forma abiótica o biótica, formando enzimas que degradan la pared celular de los microorganismos, así también poseen la capacidad de inactivar los tóxicos de origen microbiano (Sepúlveda *et al.*, 2003).

May *et al.*, (2008), mencionan que el aceite esencial de albahaca posee metabolitos secundarios como taninos, flavonoides, saponinas y terpenos volátiles presentes en su estructura. De igual manera Ancalla y Solis (2017), determinaron por cromatografía de capa fina la presencia de compuestos fenólicos, terpenos, flavonoides y alcaloides. Estos metabolitos son los responsables de la actividad antimicrobiana y se constituyen mayormente en los aceites esenciales, observándose en los resultados del presente estudio.

Mena (2012), realizado un estudio sobre el screening fitoquímico de la caracterización del aceite esencial de *Ocimum basilicum*, evidenciando también la presencia de alcaloides, lactonas, cumarinas, triterpenos, esteroides, fenoles, taninos, resinas, azúcares reductores y flavonoides, así mismo menciona que los taninos tienen propiedades de precipitar las proteínas y por lo cual presentan acción antimicrobiana. Por



otro lado Kazanjian y Fariñas (2006), indican que la actividad antibacteriana estaría atribuida a la presencia de taninos, alcaloides, saponinas y polifenoles, que son compuestos altamente antimicrobianos, sin embargo hace énfasis a las saponinas, que desde el punto de vista antimicrobiano son activas para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, debido a que reducen la tensión superficial y actúan sobre los lípidos de la membrana, provocando una alteración de las mismas y llevándolo a la muerte celular.

Otro estudio realizado sobre la actividad antimicrobiana del aceite esencial de albahaca frente a bacterias gram negativas y gram positivas ejecutado en Venezuela, reportan resultados diferentes a los obtenidos en esta investigación, logrando una concentración mínima inhibitoria de 200 mg/dl (equivalente a 20%) para bacterias gram negativas y 100 mg/dl (equivalente a 10%) para bacterias gram positivas (Rivas *et al.*, 2015), esta diferencia de resultado se debería a la concentración empleada de 10 μ l en los discos de papel, ya que en la investigación realizada se utilizó 20 μ l para cada concentración. De la misma forma Carrillo (2020), obtiene otros resultados reportando una CMI de 100 μ l procedente de la mezcla a 75% entre los aceites esenciales de orégano y albahaca frente a *Staphylococcus aureus*, esto debido a que el autor hace una mezcla de estos 2 tipos diferentes de aceites esenciales, estando la albahaca constituida en un 33% solamente.

Los metabolitos secundarios de la albahaca participan en los procesos de adaptación de las plantas, en el establecimiento de la simbiosis con otros organismos, y cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas, como el ataque por microorganismos ya sea por virus, bacterias y hongos (Sepúlveda *et al.*, 2003). Como se describe anteriormente hoy en día se conoce la acción antimicrobiana de las plantas medicinales debido a la presencia de metabolitos secundarios la cual les confiere dicha capacidad de combatir infecciones microbianas (Yáñez, 2014).



La concentración mínima inhibitoria de *Ocimum basilicum* (albahaca) frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* demuestra que a mayores concentraciones de aceite esencial aumenta el efecto inhibitorio. Sin embargo, al realizar la prueba estadística no se obtuvo diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) teniendo una CMI similar en las 6 concentraciones experimentadas del aceite esencial de albahaca debido probablemente a las bajas concentraciones necesarias para encontrar actividad inhibitoria.

4.2. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA “*in vitro*” DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*, FRENTE AL ACEITE ESENCIAL DE *Ocimum basilicum* (albahaca).

a. Susceptibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli*.

Las lecturas de los resultados de los discos de papel filtro impregnados con el aceite esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca) mediante el método de Kirby Baüer frente a *Escherichia coli* a diferentes concentraciones porcentuales, resultaron de la siguiente manera: Para el control antibiótico ciprofloxacino, se obtuvo un valor promedio de 23.17 mm de halos de inhibición, de las cuales el valor máximo alcanzado fue de 23.3 mm y un valor mínimo de 23.0 mm. Con respecto al aceite esencial, para la primera concentración al 20% se obtuvo un promedio de 9.0 mm de inhibición, las cuales oscilaron entre 8.0 mm a 10.0 mm; para la segunda concentración al 40% se obtuvo un promedio de 11.43 mm de inhibición los cuales oscilaron entre 11.2 mm y 11.8 mm; para la tercera concentración al 60% se obtuvo un promedio de inhibición de 14.83 mm las cuales oscilaron entre 13.9 mm y 15.8 mm; para la cuarta concentración al 80% se logró obtener un promedio de 16.83 mm de inhibición con un valor mínimo de 15.5 mm y un valor máximo de 17.8 mm; para la última concentración al 100% se obtuvo un promedio de 17.93 mm de inhibición con un valor mínimo de 17.0 mm y un valor máximo de 18.5

mm (Figura 22). En tanto para el control negativo (disco con etanol al 96%) no se observó ningún tipo de inhibición evidenciando solo el perímetro del disco de prueba (6 mm) (Tabla 6).

Tabla 6. Promedio de halos de inhibición en milímetros (mm) a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca) frente a *Escherichia coli* y su respuesta antimicrobiana, marzo – mayo 2021.

Concentraciones del aceite esencial de <i>Ocimum basilicum</i> (albahaca)	Control negativo *	Repeticiones de los halos de inhibición (mm) frente a <i>Escherichia coli</i>			Promedio de halo (mm)	Respuesta antimicrobiana **
		R ₁	R ₂	R ₃		
		20%	3	9		
40%	3	11.8	11.2	11.3	11.43	Resistente
60%	3	15.8	14.8	13.9	14.83	Resistente
80%	3	17.8	17.2	15.5	16.83	Intermedio
100%	3	18.5	18.3	17	17.93	Intermedio
Ciprofloxacina	3	23.3	23.2	23	23.17	Sensible

Donde: * Etanol al 96%; ** establecido por el Instituto Nacional de Salud (2002): ciprofloxacina 5 µg: Resistente: ≤ 15 mm; Intermedio: 16 – 20 mm; Sensible: ≥ 21 mm.

Fuente: Elaboración propia.

Respecto los resultados obtenidos, se estableció la susceptibilidad antimicrobiana del aceite esencial de albahaca frente a las bacterias en estudio. A concentraciones de 20%; 40% y 60%, los aislamientos de *Escherichia coli* mostraron respuesta resistente, mientras que a concentraciones de 80% y 100% mostraron respuesta intermedia. Así mismo, no se logró obtener una respuesta sensible al aceite esencial de albahaca. Por otro lado, los discos del antibiótico control resultaron ser sensibles en todos los bioensayos, tomando como referencia la respuesta de los halos de inhibición de ciprofloxacina, según el manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método

de disco difusión del Instituto Nacional de Salud (2002). Comprobando la efectividad del aceite esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca) frente a las bacterias uropatógenas gram negativas, aisladas de las muestras de orina proporcionadas por el Centro de Salud Simón Bolívar.

Según el análisis de varianza o anova; se obtuvo en las 5 concentraciones aplicadas diferencia estadística significativa ($F_c=109.93$; $gl=5$; $p<0.0001$), indicando que al menos una de las concentraciones propuestas del aceite esencial de albahaca (100%; 80%; 60%; 40% y 20%) fue diferente a las demás, la cual posee efecto antimicrobiano en los aislamientos de *Escherichia coli* procedentes de pacientes con infección urinaria proporcionadas por el Centro de Salud Simón Bolívar I – 3, siendo comparados con el control (ciprofloxacina) y teniendo presente la significancia del 95% de la prueba. Así mismo, realizando la prueba Tukey resultó que la mejor susceptibilidad frente a la bacteria *Escherichia coli* es el control ciprofloxacino, siendo menos susceptible las concentraciones del aceite esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca) aplicados en el estudio (Figura 5 y 8).

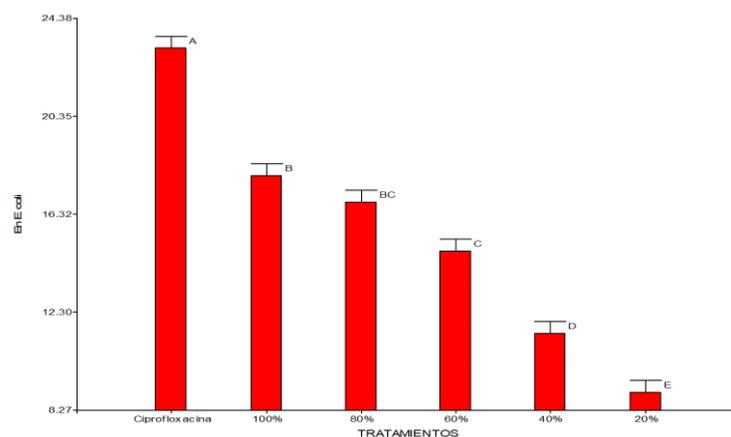


Figura 5. Promedios de halos de inhibición y tratamientos del aceite esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca) frente a *Escherichia coli* en la que se observa diferencia estadística significativa a diferentes concentraciones expresado por letras diferentes, comparado con el antibiotico Ciprofloxacino.



Los resultados obtenidos, presentan similitud con el trabajo de investigación de Celis y Rodriguez (2017), en la que determinan el efecto antibacteriano “*in vitro*” del aceite esencial de albahaca frente a *Escherichia coli* aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario, logrando una inhibición frente a dicha bacteria a concentraciones de 100%. Rojas (2018) y Ríos (2019), reafirman el poder inhibitorio del aceite esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca) frente a las bacterias gram negativas. Sin embargo, plantean concentraciones más bajas al de este estudio. El poder antibacteriano de la albahaca se atribuye a la actividad biológica de sus componen tales como el 1,8-cinelol, linalol, estragol, eugenol y alcanfor, así mismo Celis y Rodriguez (2017) indica que estos compuestos son de mayor composición en la planta. Dicha mención es corroborado por Padalia et al. (2017) reportando a los monoterpenoides (linalol, 1,8-cineol, alcanfor, geraniol), fenipropanoides (eugenol) y sesquiterpenoides como los componentes predominantes en el aceite esencial del género *Ocimum*.

Por otro lado Flores (2020), solo obtiene efecto antibacteriano a concentraciones de 75 y 100% con halos de inhibición de 7.12 mm y 13.53 mm respectivamente frente a *Escherichia coli*. Igualmente Calderon y Torres (2014), frente a la misma bacteria obtienen inhibición solo a dosis de 10 y 20 g con halos de inhibición de 11 mm y 12 mm. Estos resultados son diferentes a los obtenidos en la investigación y se debería al uso de solventes orgánicos, la cual extraen los principios activos, pero en proporciones diferentes que repercute en el efecto del producto (Mamani, 2022). Dicho esto, en la investigación se utilizó el método de arrastre a vapor, donde se obtiene aceites esenciales y estos poseen gran contenido de metabolitos secundarios con potencial antimicrobiano (Huanca, 2021).

Tovar (2007), manifiesta que las diferentes especies de la familia Lamiaceae en lo general son aromáticas y su característica se debe a su contenido de aceites esenciales, es decir, compuestos con distintos atributos ecológicos, alguno de los cuales muestran



bioactividad en pruebas *in vitro*, especialmente inhibiendo el crecimiento bacteriano. Considerando este tipo de actividad fundamental en el uso medicinal, de las distintas especies de esta familia que se utiliza para el tratamiento de dolencias de origen infeccioso, y lo comprueba en su trabajo de investigación sobre la actividad antibacteriana de seis especies medicinales de lamiaceae frente a diferentes bacterias, dentro de estas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Delgado (2021), corrobora lo mencionado anteriormente añadiendo que la familia Lamiaceae posee actividad antibacteriana, debido a la composición química de los aceites esenciales, con una marcada tendencia en la presencia de compuesto de tipo monoterpeno como timol, carvacrol, cineol y borneol.

b. Susceptibilidad antimicrobiana del aceite esencial de albahaca frente a *Staphylococcus aureus*.

De la misma manera, las lecturas de los bioensayos del disco de difusión Kirby Bauer con aceite esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca) a diferentes concentraciones frente a *Staphylococcus aureus*, resultaron de la siguiente manera; al 100% se logró obtener un halo de inhibición promedio de 22.50 mm con un rango mínimo de 21.0 mm y uno máximo de 23.5 mm; al 80% se consiguió un promedio de inhibición de 17.63 mm con un rango mínimo y máximo de 17.00 mm y 18.4 mm respectivamente; a dosis de 60% se logró un promedio de inhibición de 15.53 mm, con un valor mínimo de 15.0 mm y uno máximo de 16.6 mm; a dosis de 40% se obtuvo una inhibición promedio de 13.67 mm, con valor mínimo de 12.5 mm y uno máximo de 14.5 mm; en la última dosis a 20%, solamente se obtiene un promedio de halo de inhibición de 11.67 mm (Figura 23). En tanto para el antibiótico control ciprofloxacina, se obtuvo un valor de promedio de inhibición de 25.02 mm, siendo similar al valor obtenido para *Escherichia coli*. Así mismo para el control negativo (etanol al 96%) no se obtiene halos de inhibición (Tabla 7).

Tabla 7. Promedio de halos de inhibición en milímetros (mm) a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca) frente a *Staphylococcus aureus* y su respuesta antimicrobiana, marzo – mayo 2021.

Concentraciones del aceite esencial de <i>Ocimum basilicum</i> (albahaca)	Control negativo *	Repeticiones de los halos de inhibición (mm) frente a <i>Staphylococcus aureus</i>			Promedio de halo (mm)	Respuesta antimicrobiana **
		R ₁	R ₂	R ₃		
		20%	3	11.0		
40%	3	12.5	14	14.5	13.67	Resistente
60%	3	16.6	15	15.0	15.53	Resistente
80%	3	18.4	17	17.5	17.63	Intermedio
100%	3	23.0	21	23.5	22.50	Sensible
Ciprofloxacina	3	25.2	25.4	25.0	25.02	Sensible

Donde: * Etanol al 96%; ** establecido por el Instituto Nacional de Salud (2002): ciprofloxacina 5 µg; Resistente: ≤ 15 mm; Intermedio: 16 – 20 mm; Sensible: ≥ 21 mm.

Fuente: Elaboración propia.

Para establecer la respuesta antimicrobiana del aceite esencial de albahaca a diferentes concentraciones, junto con el antibiótico ciprofloxacina frente a *Staphylococcus aureus*, se utilizó el Manual de Procedimientos para la Prueba de Susceptibilidad del INS (2002). Categorizando al antibiótico ciprofloxacina como sensible a dosis mayores o iguales a 21 mm; obteniendo en la investigación realizada halos de 25 mm, efecto similar tubo el aceite esencial de albahaca al 100% de concentración, donde se logra un halo de inhibición mayor a 21 mm, teniendo como respuesta sensible; a concentración de 80% se obtiene una respuesta intermedia frente a dicha bacteria. En contraste a concentraciones de 20%, 40% y 60%, la respuesta antimicrobiana fue resistente. El incremento de inhibición se debe a la pureza de concentración misma del aceite esencial de albahaca. Arteaga (2018) observa el mismo patrón en su investigación y concluye que a mayor concentración, incrementa el halo de



inhibición. Por último, se comprueba la efectividad del aceite esencial de albahaca frente a uropatógenos gram positivos (*Staphylococcus aureus*) aislados de muestras de orina con infección urinaria procedentes del Centro de Salud Simón Bolívar.

De igual manera, se analizó estadísticamente los resultados obtenidos utilizando la herramienta estadística de análisis de varianza o anova en la que; se obtuvo en las 5 concentraciones diferencia estadística significativa ($F_c=88.43$; $gl=5$; $p<0.0001$) indicando que al menos una de las concentraciones propuestas del aceite esencial de albahaca (100%; 80%; 60%; 40% y 20%) fue diferente a las demás, la cual posee efecto antimicrobiano en los aislamientos de *Staphylococcus aureus* procedentes de muestras de orina con infección urinaria proporcionadas por el centro de salud Simón Bolívar I – 3, siendo comparados con el control (ciprofloxacina) y teniendo presente la significancia de la prueba. Igualmente, utilizando la prueba Tukey, resultó que la mejor susceptibilidad frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* es el antibiótico ciprofloxacina, sin embargo, a 100% de concentración se observa una susceptibilidad considerable del aceite esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca), según los diámetros de halos de inhibición para el antibiótico control (Figura 6 y 9).

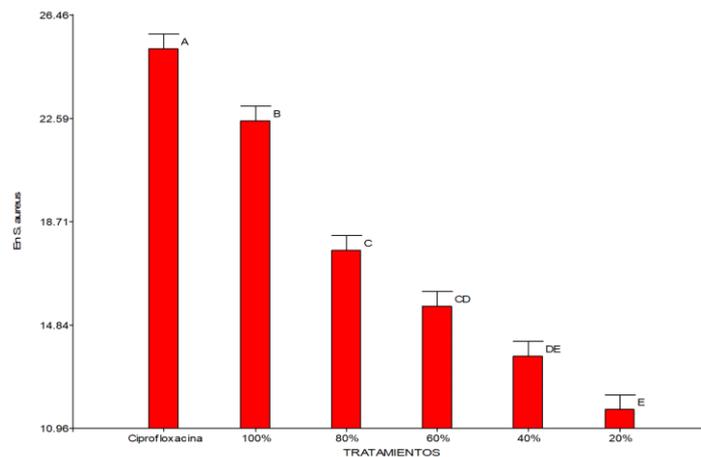


Figura 6. Promedios de halos de inhibición y tratamientos del aceite esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca) frente a *Staphylococcus aureus* en la que se observa diferencia estadística significativa a diferentes concentraciones expresado por letras diferentes, comparado con el antibiotico Ciprofloxacino.

En la investigación se pudo obtener una excelente inhibición del aceite esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca) a concentraciones de 100% debido a que la bacteria *Staphylococcus aureus* se mostró susceptible. Idénticamente Puelles (2018), Ancalla y Solis (2017) obtienen resultados similares de inhibición al 100% frente a *S. aureus* y *Streptococcus mutans*. Así mismo, estos resultados concuerdan con los trabajos de investigación de Olano y Frias (2022) conjuntamente con las de Malca y Osoreo (2021), quienes también obtuvieron una mejor inhibición al 100% de concentración frente a *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, en esta investigación se logró un mejor promedio de inhibición frente a la bacteria gram positiva, debido a la cantidad de planta recolecta en los mercados y el método de extracción utilizado, la cual adquiere mejor concentración de los metabolitos presentes en la planta.

Los aceites esenciales son más eficaces frente a bacterias gram positivas, ya que las bacterias gram negativas contienen una superficie hidrófila en su membrana externa rica en moléculas de lipopolisacáridos, impidiendo así el ingreso de moléculas lipofílicas (Grosvenor *et al.*, 1995), compuestos hidrofóbicos como monoterpenos y sesquiterpenos



(Patiño, 2003) componentes que presenta el aceite esencial de albahaca (Padalia *et al.*, 2017). Por el contrario en las bacterias Gram positivas no existe en su membrana externa una cubierta de lipopolisacáridos, que evitaría la difusión de los compuestos hidrofóbicos presentes en los aceites esenciales, y es ahí que ejercen sus posibles mecanismos de acción antimicrobiana en las bacterias gram positivas como son las de desestabilizar el empaquetamiento de la bicapa lipídica y afectando la estabilidad estructural de la membrana de iones pequeños (Garay, 2015).

Así también Olivares (2018), determinó el efecto antimicrobiano *in vitro* del aceite esencial de albahaca frente a *Staphylococcus aureus*, obteniendo como resultado ausencia de crecimiento bacteriano a concentraciones de 15%; 10% y 5%, concordando con los resultados obtenidos. Así mismo se logra demostrar que existe mejores porcentajes de inhibición del aceite esencial de *Ocimum basilicum* “albahaca” frente a cepas gram positivas, siendo corroborado por Abbasy *et al.*, (2015), en su estudio de investigación, la cual demuestran una mejor actividad antibacteriana frente a bacterias gram positivas que a bacterias gram negativas.

El poder antimicrobiano de la albahaca se constituye en la actividad biológica de algunos de sus componentes como es el 1,8-cinelol, linalol, eugenol, alcanfor y estragol, compuestos más representativos de la planta. Rojas *et al.*, (2012), determinan mediante un cromatógrafo de gases la presencia de linalol (37.17%), eugenol (16.06%), safrol (9.46%) y por ultimo 1,8-cineol (7.68%) en el aceite esencial de albahaca y son corroborados por Vásquez y Chuquilin (2021). Así mismo en el estudio de Beltrán *et al.*, (2013), demuestran que *Ocimum basilicum* “albahaca” presenta principios activos como linalol, (E)-cinamato de metilo y eucaliptol que se caracterizan por presentar actividad antimicrobiana, antibacteriana, antimicótica y antiséptica. Dicha planta contiene gran número de compuestos químicos, por ende, es difícil afirmar que su actividad



antibacteriana está dada por un solo mecanismo. Celis y Rodriguez (2017), proponen diferentes mecanismos antibacterianos tales como daño a la membrana citoplasmática, degradación de la pared celular, daño a las proteínas de la membrana, coagulación del citoplasma y el agotamiento de la fuerza motriz de los protones. Por otro lado, el efecto antimicrobiano también puede atribuirse al tipo de bacteria y con esto a las diferencias en las especies, en términos de naturaleza celular, composición y de la genética.

Cabe resaltar que, los factores ambientales como la duración del día, la intensidad de la luz y la temperatura ambiental influyen en la cantidad y calidad del contenido de aceite esencial, finalmente, afectarían a las propiedades medicinales de las plantas. Se ha demostrado que en la familia Lamiaceae, la duración del día aumenta el contenido de sus extracciones y la duración de la luz diurna aumenta la calidad de sus materias activas (Moghaddam *et al.*, 2011).

La susceptibilidad y respuesta antimicrobiana de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* frente al aceite esencial de albahaca demuestra un efecto inhibitorio y es corroborado por la prueba estadística al poseer diferencia significativa ($p < 0.05$), indicando que la susceptibilidad de *E. coli* y *S. aureus* fue diferente entre las concentraciones de aceite esencial comparados con el tratamiento control (ciprofloxacina), donde a mayor concentración, mayor diámetro de sus halos de inhibición bacteriana.



V. CONCLUSIONES

- El aceite esencial de *Ocimum basilicum* “albahaca”, presenta actividad antimicrobiana frente a los microorganismos evaluados, con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 1.0% frente a *Escherichia coli* y 0.5% para *Staphylococcus aureus*, resultando estadísticamente similares ($P \geq 0.05$).
- La respuesta de susceptibilidad antimicrobiana de las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* frente al aceite esencial de albahaca fueron similares a concentraciones de 20%, 40% y 60%, obteniéndose respuesta resistente, igualmente a la concentración de 80%, ambas bacterias poseen respuesta intermedia. A la concentración de 100%, *Staphylococcus aureus* obtuvo respuesta sensible, a diferencia de la bacteria *Escherichia coli* que obtuvo una respuesta intermedia, en comparación a las respuestas obtenidas del control ciprofloxacino, donde ambas bacterias resultaron ser sensibles. Sin embargo, presentan diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).



VI. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios de la composición fitoquímica del aceite esencial de albahaca, para conocer los principios activos con potencial efecto antibacteriano.
- Ejecutar nuevas investigaciones determinando el efecto antibacteriano del aceite esencial de albahaca en muestras de orina de otros Centros de Salud de la región de Puno.
- Comprobar la efectividad antimicrobiana del aceite esencial de albahaca, frente a otras especies bacterianas y fúngicas de interés clínico que afectan a la población de la ciudad de Puno.



VII. REFERENCIAS

- Agurto, T. (2016). *Temas Básicos en Microbiología*. 1ra Edición. Editorial Wari. Lima - Perú.
- Al Abbasy, D. W., Pathare, N., Al-Sabahi, J. N., and Khan, S. A. (2015). Chemical composition and antibacterial activity of essential oil isolated from Omani basil (*Ocimum basilicum* Linn.). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(8), 645–649.
- Algorta, G., Amorin, B., Arbiza, J., Barrios, P., Betancor, L., Calvelo, E., Chabalgoity, A., Campione, J., Cordeiro, N., Chiparelli, H., Monte, A., Flores, K., Gadea, M., Grotiuz, G., Ingold, E., y Pera, V. (2006). *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. 3ra Edición. Editorial Fefmur. Montevideo - Uruguay.
- Álvarez, J. A., y Rico, H. J. (2018). Respuesta de la albahaca (*Ocimum basilicum* L) variedad genovesa a la propagación con cuatro sustratos en una casa malla en la granja de la universidad de los llanos sede Barcelona. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Universidad de los Llanos. Villavicencio - Barcelona. 93p.
- Anand, A. K., Mohan, M., Zafar Haider, S., and Sharma, A. (2011). Essential oil composition and antimicrobial activity of three *Ocimum* species from Uttarakhand (India). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(3), 223–225.
- Ancalla, E., y Solis, M. (2017). Actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Tesis de Farmacia y Bioquímica. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Privada



- Autonoma del Sur. Arequipa - Perú. 106p.
- Apaza, R. (2016). Resistencia de uropatogenos gramnegativos y grampositivos a los antimicrobianos que se prescriben en el Hospital Regional “Manuel Nuñez Butron”. Tesis de Biología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano. Puno - Perú. 80p.
- Aquino, E. (2017). Actividad antimicrobiana de aceites esenciales de *Chenopodium ambrosioides*, *Artemisia absinthium*, *Caiophora cirsiifolia* sobre bacterias gram negativas *Staphylococcus aureus* y su toxicidad en *Artemia salina*. Tesis de Biología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano. Puno - Perú. 96p.
- Arteaga, E. (2018). Efecto del aceite esencial de *Ocimum basilicum* L. sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. Tesis de Biólogo - Microbiólogo. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Perú. 56p.
- Ávalos, A., and Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal, 2(3), 119–145.
- Baca, C. (2017). Efecto inhibitorio del aceite esencial “muña” *Minthostachys mollis* sobre el género *Proteus*, causantes de infecciones del tracto urinario. Tesis de Biología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano. Puno - Perú. 76p.
- Bailón, L., González, R., y Cervantes, A. (2003). Atlas de pruebas bioquímicas para identificar bacterias. 1ra Edicion. Editorial Universidad Nacional Autonoma de México. México. 175p.



- Balarezo, G. (2018). Plantas medicinales: Una farmacia natural para la salud pública. *Paideia*, 6(7), 159–170.
- Beleño, L., y Sijona, T. (2021). Frecuencia de uropatógenos bacterianos gram positivos y su perfil de susceptibilidad en Institución Prestadora de Servicios de Salud. Tesis de Bacteriólogo, Facultad de Ciencias Médicas y de la Salud. Universidad de Santander. Valledupar - Colombia. 67p.
- Beltrán, M., Cantillo, M., y Vivas, A. (2013). Actividad antibacteriana de los aceites obtenidos de *Ocimum basilicum* L. var. *cinammom*, *O. album*, *O. thrysiflorum*, para uso potencial en fitocosmética. *Investigaciones ANDINA*, 15(27), 798–810.
- Benavides, R. E. (2018). Caracterización de enterobacterias en *Cavia porcellus* en huachi grande. Tesis de médico veterinario y zootecnista. Facultad de Ciencia Agropecuarias, Universidad Técnica de Ambato. Tungurahua - Ecuador. 70p.
- Berdonces, J. (1995). Principios activos y preparaciones farmacéuticas de las plantas medicinales. *Natura Medicatrix*, 37–38(1), 42–48.
- Blanco, C., Olascuaga, K., Rubio, S., y Valdiviezo, J. E. (2020). *Senecio tephrosioides* turcz. (asteraceae): Una revisión de etnobotánica, fitoquímica y farmacología. *Ethnobotany Research and Applications*, 19(14), 1–14.
- Britania. (2021). Mueller Hinton Agar (MHA). In Britania.
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253.
- Calderon, J., y Torres, E. (2014). Efecto del extracto acuoso de la *Ocimum basilicum* L. (albahaca) en el crecimiento bacteriano de *Escherichia coli*. *Revista ECI Perú*, 10(2), 36–44.



- Calsin, Y. M. (2017). Actividad antimicrobiana “In vitro” del aceite esencial y extracto etanólico de *Equisetum arvense* “cola de caballo” frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans* uropatógenas. Tesis de Biología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano. Puno - Perú. 65p.
- Cambie, R., and Ash, J. (1994). FIJIAN medicinal plants. 1ra Edicion. Editorial Csiro. Australia.
- Canales, A. (2016). Metodología de la investigación científica. 1ra Edicion. Editorial Universidad Nacional del Altiplano. Puno - Perú. 159p.
- Canase, A., y Canase, A. (2012). Manual de Microbiología y Parasitología Medica. 7ma Edicion. Editorial Andes Pedro. Uruguay.
- Cano, C. A. (2007). Actividad antimicótica in vitro y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* “Muña”. Tesis de Magister en Recursos Vegetales y Terapeuticos. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima - Perú. 60p.
- Carballo, I., Silvia, A., Rodríguez, J. L., Núñez de Villavicencio, M., y Marante, O. (2014). Actividad Antimicrobiana De Extractos De Albahaca (*Ocimum Sanctum* L.). *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 24(3), 48–52.
- Carrillo, E. B. (2020). Evaluación de la capacidad inhibitoria de mezcla de aceites esenciales de albahaca (*Ocimum basilicum*) y orégano (*Origanum vulgare*) en *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhimurium*. Tesis de Ing. Química. Facultad de Ingeniería Química, Universidad de Guayaquil. Guayaquil - Ecuador. 114p.
- Castro, A. maría. (2014). Bacteriología Medica basada en problemas. 2da Edicion.



Editorial El Manual Moderno. Colombia.

Cavaliere, S., Harbeck, R., McCarter, Y., Ortez, J., Rankin, I., Sautter, R., Sharp, S., and Spiegel, C. (2005). Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. 2da Edición. Editorial American Society for Microbiology. USA - Washington.

Celis, M. F., and Rodriguez, R. A. (2017). Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de las hojas de *Ocimum basilicum* L. "albahaca" en cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario atendidos en consultorio externo de Urología. Tesis de Farmacia y Bioquímica. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo. Cajamarca - Perú. 82p.

Chura, H. B. (2017). Efecto antibacteriano y antifúngico de decocciones de tarwi (*Lupinus mutabilis* sweet) en *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Tesis de Biología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano. Puno - Perú. 61p.

Colegio Medico del Perú. (2018). Vademécum Médico del Perú. 2da Edición. Editorial Pablo Grimberg. Lima - Peru.

Condori, E. (2002). Sistemática de Fanerogamas. 1ra Edición. Editorial Universidad Nacional del Altiplano. Puno - Perú.

Coronado, G., y Cauna, P. (2018). Actividad antibacteriana *in vitro* de extractos hidroalcohólicos de *Plantago major* (llanten) y *Rumex crispus* (lengua de vaca) sobre cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis de Biología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Altiplano. Puno - Perú. 71p.

Corrales, L. C., y Caycedo, L. (2020). Principios físicoquímicos de los colorantes



- utilizados en microbiología. *Nova*, 18(33), 73–100.
- Cunha, B. A. (2000). Antibiotic resistance. *Medical Clinics of North America*, 84(6), 1407–1429.
- Delgado, J. E. (2021). Actividad antibacteriana de las familias vegetales Lamiaceae y Myrtaceae en la cavidad oral. Tesis de Odontología. Universidad Antonio Nariño. Armenia - Quindío. 51p.
- Delgado, P. (2019). Infecciones urinarias. *Medicina*, 22(2), 1–24.
- Dever, L., and Dermody, T. (1991). Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. *Arch Intern Med*, 151(2), 886–895.
- Expósito, L., Bermellón, S., Lescaille, L., Delgado, N., y Aliaga, I. (2019). Resistencia antimicrobiana de la *Escherichia coli* en pacientes con infección del tracto urinario. *Revista Información Científica*, 98(6), 755–764.
- Férrandez, F., López, J., Ponce, L., and Machada, C. (2003). Resistencia bacteriana. *Revista Cubana Medicina Militar*, 32(1), 44–48.
- Fernandez, L. (2019). Principios activos del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) a. gray “Arrayan” y evaluación de su actividad antibacteriana. Tesis Doctoral de Ciencias y Tecnologías Medioambientales. Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Naturales y Formales. Universidad Nacional de San Agustín. Arequipa - Perú. 130p.
- Fernández, V. (2012). Fichas de cultivo de especies aromáticas tradicionales. In *Estudios en domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas* (pp. 205–225).
- Flores, L. J. (2020). Efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Ocimum basilicum*



- “albahaca” sobre *Escherichia coli* ATCC 27923 comparado con ciprofloxacino. Tesis de Médico Cirujano, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad César Vallejo. Trujillo - Peru. 50p.
- Foxman, B., and Brown, P. (2003). Epidemiology of urinary tract infections: Transmission and risk factors, incidence, and costs. *Infectious Disease Clinics of North America*, 17(2), 227–241.
- Franco, L., Matiz, G., y Pájaro, I. (2012). Estudio biofarmacéutico comparativo de tabletas de ácido acetilsalicílico disponibles en el mercado colombiano. *Revista de Salud Publica*, 14(4), 695–709.
- Garay, H. E. (2015). Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. “orégano” sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, *in vitro*. Cajamarca - 2015. Tesis para obtener el Grado Academico de Maestro en Ciencias. Escuela de Postgrado, Universidad Nacional de Cajamarca. Cajamarca - Perú. 103p.
- Garcia, C. (2012). Resistencia antibiótica en el Perú y América Latina. *Acta Medica Peruana*, 29(2), 99–103.
- Garín, N., Delmiro, A., García, J., y Jaqueti, J. (2012). Estudio de sensibilidad a los agentes antimicrobianos. In Asociación Española de Biopatología Médica (AEBM). 2da Edicion. Editorial AEBM. Madrid.
- Gonzalez, A. (2004). Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del amazonas. Tesis de Tecnologia en Alimentos. Departamento de Ingenieria Quimica, Universidad Nacional de Colombia. Colombia. 100p.
- González, R., Elizalde, B., Cortés, M., y Orduña, M. (2020). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiologia. 1ra Edicion. Editorial Universidad Nacional



- Autónoma de México. Ciudad de México. 238p.
- Grosvenor, P. W., Supriono, A., and Gray, D. O. (1995). Medicinal plants from Riau Province, Sumatra, Indonesia. Part 2: antibacterial and antifungal activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 45(2), 97–111.
- Hernández, L., y Rodríguez, M. (2001). Actividad antimicrobiana de plantas que crecen en Cuba. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 6(2), 44–47.
- Herrera, C. del R. (2020). Principios activos de plantas medicinales con actividad antimicrobiana contra microorganismos de interés estomatológico: Una revisión. Tesis de Licenciatura para Cirujano Dentista. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad César Vallejo. Piura - Perú. 105p.
- Horna, G., Silva, M., Vicente, W., y Tamariz, J. (2012). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Revista Medica Herediana*, 16(1), 39.
- Huanca, A. (2021). Tamizaje fitoquímico cualitativo de los extractos alcohólicos de *Ephedra americana* h&b ex will y *Chuquiraga rotundifolia* wedd. y actividad antibacteriana en el crecimiento de *Escherichia coli* y *Klebsiella* sp. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano. Puno - Perú. 62p.
- Huerta, S. (2015). Secado. web:
<http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/sho/Secado.pdf>
- Illanes, A. N. (2018). Efecto antimicrobiano del aceite de *Rosmarinus officinalis* “romero” frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Tesis de Biología. Facultad



- de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano. Puno - Perú. 70p.
- INS. (2002). Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. 1ra Edición. Editorial Leonid Lecca. Lima - Perú.
- INS. (2014). Plantas Medicinales. web: <https://web.ins.gob.pe/es/salud-intercultural/medicina-tradicional/plantas-medicinales>
- Jawetz, C. (2011). Microbiología Médica. 25a Edición. Editorial Mc Gram Hill Lange. Argentina.
- Kaya, I., Yigit, N., and Benli, M. (2008). Antimicrobial activity of various extracts of *Ocimum basilicum* L. and observation of the inhibition effect on bacterial cells by use of scanning electron microscopy. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 5(4), 363–369.
- Kazanjan, A., y Fariñas, M. (2006). Actividades biológicas del extracto acuoso de la esponja *Aplysina lacunosa* (Porifera: Aplysinidae). Rev. Biol. Trop, 54(3), 189–200.
- Koneman, E., Winn, W., Procop, G., Allen, S., Schreckenberger, P., Janda, W., y Woods, G. (2006). Diagnóstico Microbiológico. 6ta Edición. Editorial Médica Paramericana. Buenos Aires - Argentina.
- Kumar, A., and Schweizer, H. P. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. Advanced Drug Delivery Reviews, 57(10), 1486–1513.
- Lamont, R. J., Hajishengallis, G. N., y Jenkinson, H. F. (2015). Microbiología e inmunología oral. 1ra Edición. Editorial El Manual Moderno. Colombia.
- Landa, C. A. (2017). Estudio comparativo de plantas hepatoprotectoras de origen chino y peruano. Tesis de Químico Farmacéutico y Bioquímico. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica, Universidad Inca Garcilaso de la Vega. Lima - Perú.



139p.

- Lechevallier, M., Seidler, R., and Evans, T. (1980). Enumeration and characterization of standard plate count bacteria in chlorinated and raw water supplies. *Applied and Environmental Microbiology*, 40(5), 922–930.
- Lima, E. M., Calvo, J. M., y Maynar, M. A. (2002). Reacciones adversas neurológicas asociadas a ciprofloxacino. *MEDIFAM - Revista de Medicina Familiar y Comunitaria*, 12(8), 523–525.
- Macfaddin, J. F. (1990). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 2da Edición. Editorial Medica Panamericana. Buenos Aires - Argentina. 184p.
- Macfaddin, J. F. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ra Edición. Editorial Medica Panamericana. Buenos Aires - Argentina. 846p.
- Macri, M., Rubinstein, A., Kaler, M., y De la Mota, L. (2017). Guía de Medicamentos Esenciales para el PNA.
- Malbran, C. (2012). Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución. *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*, 32(2), 53–62.
- Malbrán, C. (2001). Manual de procedimientos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas de humanos. In Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. (pp. 3–69). 1ra Edición. Editorial Departamento de Bacteriología. Buenos Aires - Argentina.
- Malca, A. H., and Osoreo, J. V. (2021). Efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Ocimum basilicum* (albahaca) sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Tesis



- de Licenciatura de Químico Farmacéutico. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Roosevelt. Huancayo - Peru. 69p.
- Mamani, L. (2017). Actividad antibacteriana de los extractos alcohólicos de *Senecio* spp (chachacoma) en el crecimiento de *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus* sp. Tesis de Biología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano. Puno - Perú. 48p.
- Mamani, Y. (2022). Efecto antibacteriano “in vitro” del extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* “isaño” sobre *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp y *Staphylococcus aureus* de gestantes con infección del tracto urinario. Tesis de Biología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano. Puno - Perú. 93p.
- May, A., Bovi, O. A., Maia, N. B., Barata, L. E. S., Zacardi De Souza, R. D. C., Ramos De Souza, E. M., Almeida De Moraes, A. R., and Quaglia, M. (2008). Basil plants growth and essential oil yield in a production system with successive cuts. *Bragantia*, 67(2), 385–389.
- Mena, C. (2012). Aislamiento y caracterización del aceite esencial de albahaca, *Ocimum basilicum* L. *Revista PUCE*, 94(3), 1–16.
- Mendo, M. (2003). Medios de cultivo en microbiología. 1ra Edición. Editorial Laborales SRL. Lima Perú.
- Ministerio de Salud Chile. (2018). Albahaca. In *Medicamentos Herbarios Tradicionales* (pp. 13–14).
- Miranda, M. G. (2011). Resistencia antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* en México. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México (Ed. Española)*, 68(4), 262–270.



- Moghaddam, A. M. D., Shayegh, J., Mikaili, P., and Sharaf, J. D. (2011). Antimicrobial activity of essential oil extract of *Ocimum basilicum* L. leaves on a variety of pathogenic bacteria. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(15), 3453–3456.
- Montañez, R., Montenegro, J., Arenas, F., y Vásquez, R. (2015). Infección urinaria alta comunitaria por *E. coli* resistente a ciprofloxacino: características asociadas en pacientes de un hospital nacional en Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 76(4), 385–391.
- Montoya, G. de J. (2010). Aceites esenciales: Una alternativa de diversificación para el eje cafetero. In Universidad Nacional de Colombia (pp. 17–18).
- Mosquito, S., Ruiz, J., y Ochoa, T. J. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 28(4), 648–656.
- Murray, P., Roshenthal, K., y Pfaller, M. (2014). *Microbiología Medica*. 7ma Edición. Editorial Elsevier. Barcelona - España.
- Nau, C., and Metzgar, M. (2019). *Microbiología*. 4ta Edición. Editorial Wolters Kluwer. Barcelona - España.
- Obregon, E. (2018). Análisis comparativo de la hidrodestilación con el arrastre de vapor para la extracción de aceites esenciales de la cascara de naranja. Tesis de Ingeniero Químico, Facultad de Ingeniería Química y Metalúrgica, Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión. Huacho - Perú. 75p.
- Olano, D., y Frias, M. (2022). Determinar la actividad antimicrobiana *In vitro* del extracto etanólico de *Ocimum basilicum* (albahaca) frente *Staphylococcus aureus*. Tesis de Químico Farmacéutico. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Roosevelt.



Huancayo - Perú. 60p.

Olivares, E. (2012). Manual de practicas. In Laboratorio de Biología. 2da edición. Editorial Universidad Autónoma de Ciudad de Juaréz. 64p.

Olivares, F. (2018). Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de las hojas de *Ocimum basilicum* L. “albahaca” frente a *Staphylococcus aureus*. Tesis de Químico Farmacéutico. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote. Trujillo - Perú. 47p.

OMS. (2020). Resistencia a los antimicrobianos. web: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

Padalia, R. C., Verma, R. S., Chauhan, A., Goswami, P., Singh, V. R., Verma, S. K., Darokar, M. P., Kurmi, A., Singh, N., Saikia, D., and Chanotiya, C. S. (2017). Essential oil composition and antimicrobial activity of methyl cinnamate-linalool chemovariant of *Ocimum basilicum* L. from India. *Records of Natural Products*, 11(2), 193–204.

Palacios, M. (2008). Metabolitos primarios y secundarios. In *Farmacognosia y Fitoquímica*. (pp. 1–10).

Pantalón, P., y Saboya, J. (2015). Aislamiento del aceite esencial de *Xylopia frutescens* (Espintana de varilla). Determinación de sus componentes por el sistema de cromatografía de gases-espectrometría de masas acoplado. Tesis de Químico Farmacéutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Iquitos - Perú. 73p.

Patiño, D. (2003). Por qué las bacterias se hacen resistentes a la acción de los antibióticos. *Red de Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España y Portugal*, 3(1),



48–56.

- Pérez, A., Vitola, D., y Chamorro, L. (2018). Actividad del aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum*) contra *Colletotrichum gloeosporioides* de ñame (*Dioscorea alata*). *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 21(1), 99–108.
- Pérez, E., Caparo, I., y Bastidas, G. (2021). Factores de riesgo para infección del tracto urinario por microorganismos productores de betalactamasas de espectro extendido en niños en Huancayo, Perú. *Revista Cubana de Pediatría*, 93(1), 1–13.
- Pérez, M. (2021). Evaluación de la actividad antimicrobiana de entidades químicas no convencionales para su uso en dermatología veterinaria. Tesis de Doctorado en Farmacia. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. España. 213p.
- Pérez, N., and Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Biotecnología Vegetal*, 11(4), 195–211.
- Picazo, J. (2000). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. In *Procedimientos en Microbiología Clínica* (pp. 1–54).
- Ponce, E. (2019). Mapa microbiológico en urocultivo realizado en el Hospital III Daniel Alcides Carrión - Essalud Tacna. Tesis de Tecnología Médica, Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Tecnología Médica. Tacna - Perú. 109p.
- Prieto, S., Garrido, G., González, J., y Molina, J. (2004). Actualidad de la Medicina Tradicional Herbolaria Actualidad de la Medicina Tradicional Herbolaria. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 35(1), 19–36.
- Puelles, F. (2018). Efecto antibacteriano de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum* y *Cúrcuma longa* sobre *Staphylococcus aureus* atcc25923 comparado con oxacilina. Tesis de Médico Cirujano. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad César



- Vallejo. Trujillo - Perú. 37p.
- Puig, Y., Espino, M., y Leyva, V. (2011). Resistencia antimicrobiana en *Salmonella* y *E. coli* aisladas de alimentos:: revisión de la literatura. *Panorama Cuba y Salud*, 6(1), 30–38.
- Ramírez, J., Parra, J., and Alvarez, A. (2017). Análisis de técnicas de recuento de microorganismos. *Mente Joven*, 6(1), 01–08.
- Ramirez, L., y Marin, D. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 15(42), 263–268.
- Ramírez, R., Angulo, A., Olivero, J., y Santafé, G. (2013). Relación entre la composición química y la actividad antioxidante del aceite esencial de *Ocimum basilicum* L. cultivado bajo diferentes tratamientos de fertilizante. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(1), 47–56.
- Ríos, A. (2019). Estudio *in vitro* del efecto inhibitorio del aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum*) sobre cepas de *Prevotella intermedia*. Tesis de Odontología. Facultad de Odontología. Universidad Central de Ecuador. Quito. 78p.
- Rivas, K., Rivas, C., y Gamboa, L. (2015). Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum* L.). *Multiciencias*, 15(3), 281–289.
- Rojas, L., Jaramillo, C., y Lemus, M. (2015). Métodos analíticos para la determinación de metabolitos secundarios de plantas. 1ra Edición. Editorial UTMACH. Ecuador.
- Rojas, M., Sánchez, Y., Abreu, Y., Espinosa, I., Correa, T., y Pino, O. (2012). Caracterización química y actividad antibacteriana de aceites esenciales de *Ocimum*



- basilicum* L. y *Ocimum basilicum* var. *genovese* L. *Revista de Protección Vegetal*, 27(2), 130–134.
- Rojas, N., Chaves, E., y Garcia, F. (2006). *Bacteriología Diagnóstica*. 1ra Edición. Editorial Universidad de Costa Rica. Costa Rica.
- Rojas, O. (2018). Efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de las hojas de *Ocimum basilicum* L. (albahaca) frente a cepas de *Escherichia coli*. Tesis de Químico Farmacéutico. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote. Trujillo - Perú. 55p.
- Sánchez, E., Leal, I., Fuentes, L., y Rodríguez, C. A. (2000). Estudio farmacognóstico de *Ocimum basilicum* L. (albahaca blanca). *Rev Cubana Farm*, 34(3), 187–195.
- Sepúlveda, G., Porta, H., y Rocha, M. (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), 355–363.
- Shahrajabian, M. H., Sun, W., and Cheng, Q. (2020). Chemical components and pharmacological benefits of Basil (*Ocimum basilicum*): a review. *International Journal of Food Properties*, 23(1), 1961–1970. <https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1828456>
- Sisa, J. (2004). *Recolección de Plantas Medicinales. La Medicina Natural Al Alcance de Todos*. web: <https://www.ecoaldea.com/>
- Smith, A., Stewart, J., and Fyfe, L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 26(2), 118–122. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1998.00303.x>
- Tigasi, J. (2017). Efecto antimicrobiano del aceite esencial, extracto de albahaca



- (*Ocimum basilicum*) y el hipoclorito de sodio al 2.5% sobre cepas de *Enterococcus faecalis*. Tesis de Odontología. Facultad de Odontología, Universidad Central del Ecuador. Quito - Ecuador. 90p.
- Todar, K. (2014). Bacterial Resistance to Antibiotics. Bacterial Resistance to Antibiotics. web: <http://www.textbookofbacteriology.net/>
- Torrigo, E., y Trigoso, C. (2003). Manual De Procedimiento Y Control De Calidad Interno Metodo Bauer Kirby. In Organizacion Panamericana de la Salud. 1ra Edicion. Editorial INLASA. Bolivia.
- Tortora, G., Funke, B., y Case, C. (2007). Introduccion a la Microbiologia. 9na Edicion. Editorial Medica Panamericana. Buenos Aires - Argentina.
- Tovar, J. C. (2007). Composición química, actividad Antibacteriana y tóxica de aceites esenciales de seis especies medicinales de lamiaceae en el estado de Hidalgo. Tesis de Biología. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Mexico. 105p.
- Vásquez, E. E., y Chuquilin, A. (2021). Efecto antimicrobiano del extracto etanólico de las hojas *Ocimum basilicum* “albahaca” sobre *Cándida albicans* y *Escherichia coli*. Tesis de Químico Farmaceutico. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Roosevelt. Huancayo - Perú. 58p.
- Vila, J., Sáez, E., Johnson, J. R., Römling, U., Dobrindt, U., Cantón, R., Giske, C. G., Naas, T., Carattoli, A., Martínez, M., Bosch, J., Retamar, P., Rodríguez, J., Baquero, F., and Soto, S. M. (2016). *Escherichia coli*: An old friend with new tidings. FEMS Microbiology Reviews, 40(4), 437–463. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw005>
- Wright, G. D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and



modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), 1451–1470.

- Yáñez, G. I. (2014). Investigación de la Actividad Antimicrobiana y Fitoquímica de Extractos de Plantas Medicinales frente a los Microorganismos Patógenos *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Tesis de Ing. Bioquímica. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Universidad Técnica de Ambato. Ecuador. 277p.
- Zea, Y. (2013). Efecto antibacteriano de *Xenophyllum dactylophyllum* (pupusa) y *Werneria* sp (pura pura) sobre *Escherichia coli* en condiciones de laboratorio. Tesis de Biología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano. Puno - Perú. 84p.
- Zuni, J. (2017). Actividad antibacteriana “in vitro” del aceite esencial de menta (*Mentha piperita* L.) frente a *Escherichia coli* enteropatógena (epec). Tesis de Biología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano. Puno - Perú. 72p.

ANEXOS

Tablas de contingencia

Frecuencias: CÓDIGOS

Frecuencias absolutas
En columnas: BACTERIAS

TRATAMIENTOS	E. coli	S. aureus	Total
T-1	2	2	4
T-2	2	2	4
T-3	2	1	3
T-4	1	1	2
T-5	1	1	2
T-6	1	1	2
Tc	2	2	4
Total	11	10	21

	Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	0.29	6	0.9996	
Chi Cuadrado MV-G2	0.29	6	0.9995	
Coef. Conting. Cramer	0.08			
Coef. Conting. Pearson	0.12			

Figura 7. Resultado del análisis de Chi – cuadrado para la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca) frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, realizado en el promagra estadístico infoStat versión libre.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
En E. coli	18	0.98	0.97	5.33

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	377.11	5	75.42	109.93	<0.0001
TRATAMIENTOS	377.11	5	75.42	109.93	<0.0001
Error	8.23	12	0.69		
Total	385.34	17			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=2.27170

Error: 0.6861 gl: 12

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	
Ciprofloxacina	23.17	3	0.48	A
100%	17.93	3	0.48	B
80%	16.83	3	0.48	B C
60%	14.83	3	0.48	C
40%	11.43	3	0.48	D
20%	9.00	3	0.48	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Figura 8. Resultado del análisis de varianza (anova) y Tukey para la susceptibilidad del aceite esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca) frente a *Escherichia coli*, realizado en el promagra estadístico infoStat versión libre

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
En <i>S. aureus</i>	18	0.97	0.96	5.44

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	409.97	5	81.99	88.43	<0.0001
TRATAMIENTOS	409.97	5	81.99	88.43	<0.0001
Error	11.13	12	0.93		
Total	421.10	17			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=2.64086

Error: 0.9272 gl: 12

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	
Ciprofloxacina	25.20	3	0.56	A
100%	22.50	3	0.56	B
80%	17.63	3	0.56	C
60%	15.53	3	0.56	C D
40%	13.67	3	0.56	D E
20%	11.67	3	0.56	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Figura 9. Resultado del análisis de varianza (anova) y Tukey para la susceptibilidad del aceite esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca) frente a *Staphylococcus aureus*, realizado en el promagra estadístico infoStat versión libre.



Figura 10. a) *Ocimum basilicum* (albahaca), b) albahaca luego del proceso de secado; Laboratorio, Laboratorio/ Taller de frutas y hortalizas, Escuela profesional de Ingeniería Agroindustrial – UNA Puno, marzo 2021.

Fuente: Elaboración Propia



Figura 11. Adición de hojas secas de *Ocimum basilicum* (albahaca) en el extractor de aceites esenciales; Laboratorio/ Taller de frutas y hortalizas, Escuela profesional de Ingeniería Agroindustrial – UNA Puno, marzo 2021.

Fuente: Elaboración Propia



Figura 12. Proceso final de la obtención del aceite esencial de albahaca, a la izquierda inicio de la obtención, a la derecha producto final obtenido (aceite esencial); Laboratorio Microbiología de Alimentos, FCCBB – UNA Puno, marzo 2021.

Fuente: Elaboración Propia.



Figura 13. Preparación de medios de cultivo enriquecidos para la obtención e identificación de microorganismos (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*); Laboratorio Microbiología de Alimentos, FCCBB – UNA Puno, marzo – mayo 2021.

Fuente: Elaboración propia.



Figura 14. Inoculación de bacterias uropatógenas en los medios de cultivo preparados; Laboratorio Microbiología de Alimentos, FCCBB – UNA Puno, marzo – mayo 2021.

Fuentes: Elaboración Propia

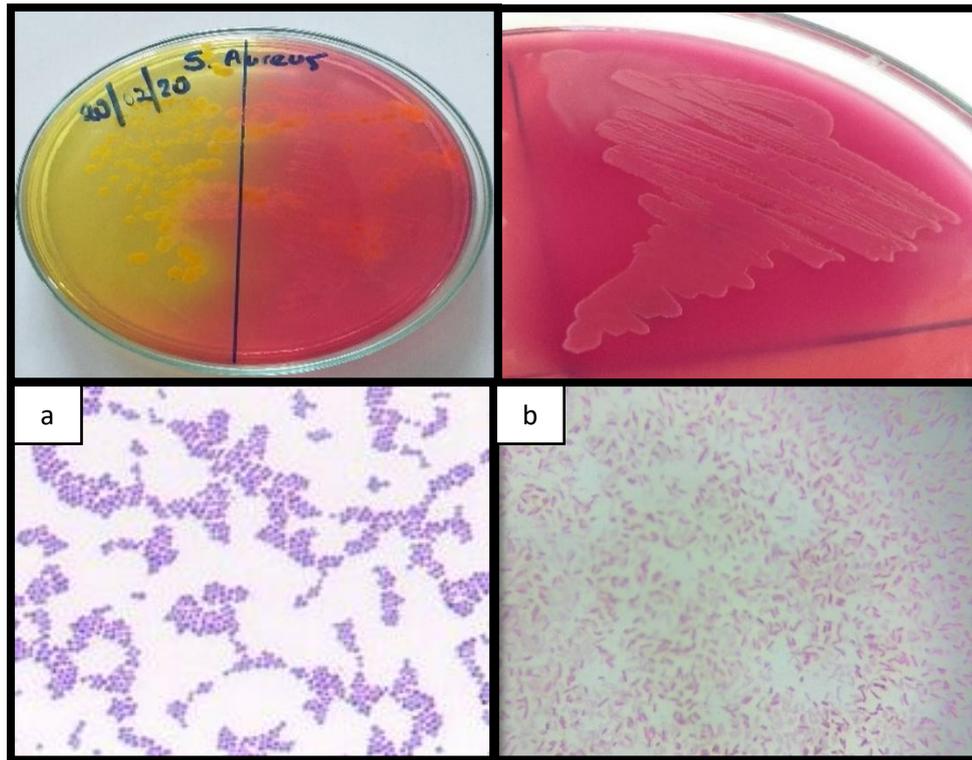


Figura 15. Aislamientos de bacterias uropatógenas a partir de muestras de orina con infección urinaria, *Staphylococcus aureus* (izquierda), *Escherichia coli* (derecha); observación de bacterias gram positivas (a) y gram negativas (b) en el microscopio; Laboratorio Microbiología de Alimentos, FCCBB – UNA Puno, marzo – mayo 2021.

Fuente: Elaboración propia.

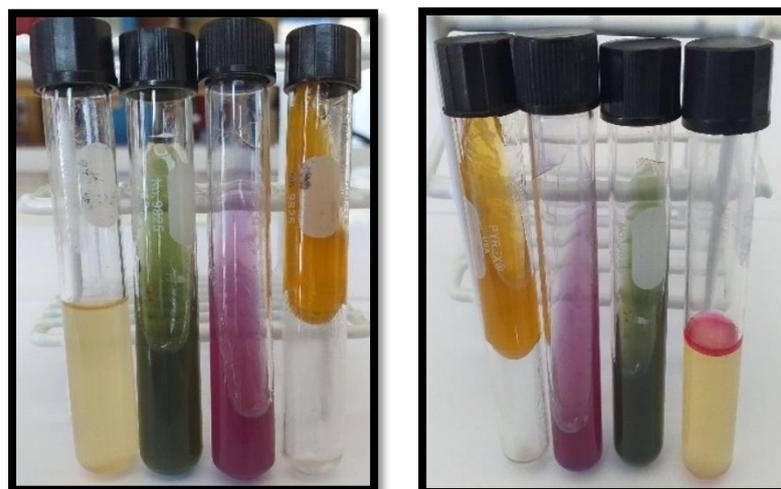


Figura 16. Pruebas bioquímicas para la identificación de *Escherichia coli*, Laboratorio Microbiología de Alimentos, FCCBB – UNA Puno, marzo – mayo 2021.

Fuente: elaboración propia.



Figura 17. Elaboracion de concentraciones al 20%, 40%, 60%, 80% y 100% del aceite esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca); Laboratorio Microbiología de Alimentos, FCCBB – UNA Puno, marzo – mayo 2021.

Fuente: Elaboración propia



Figura 18. Preparación de los discos de sensibilidad a base del aceite esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca); Laboratorio Microbiología de Alimentos, FCCBB – UNA Puno, marzo – mayo 2021.

Fuente: Elaboración propia.

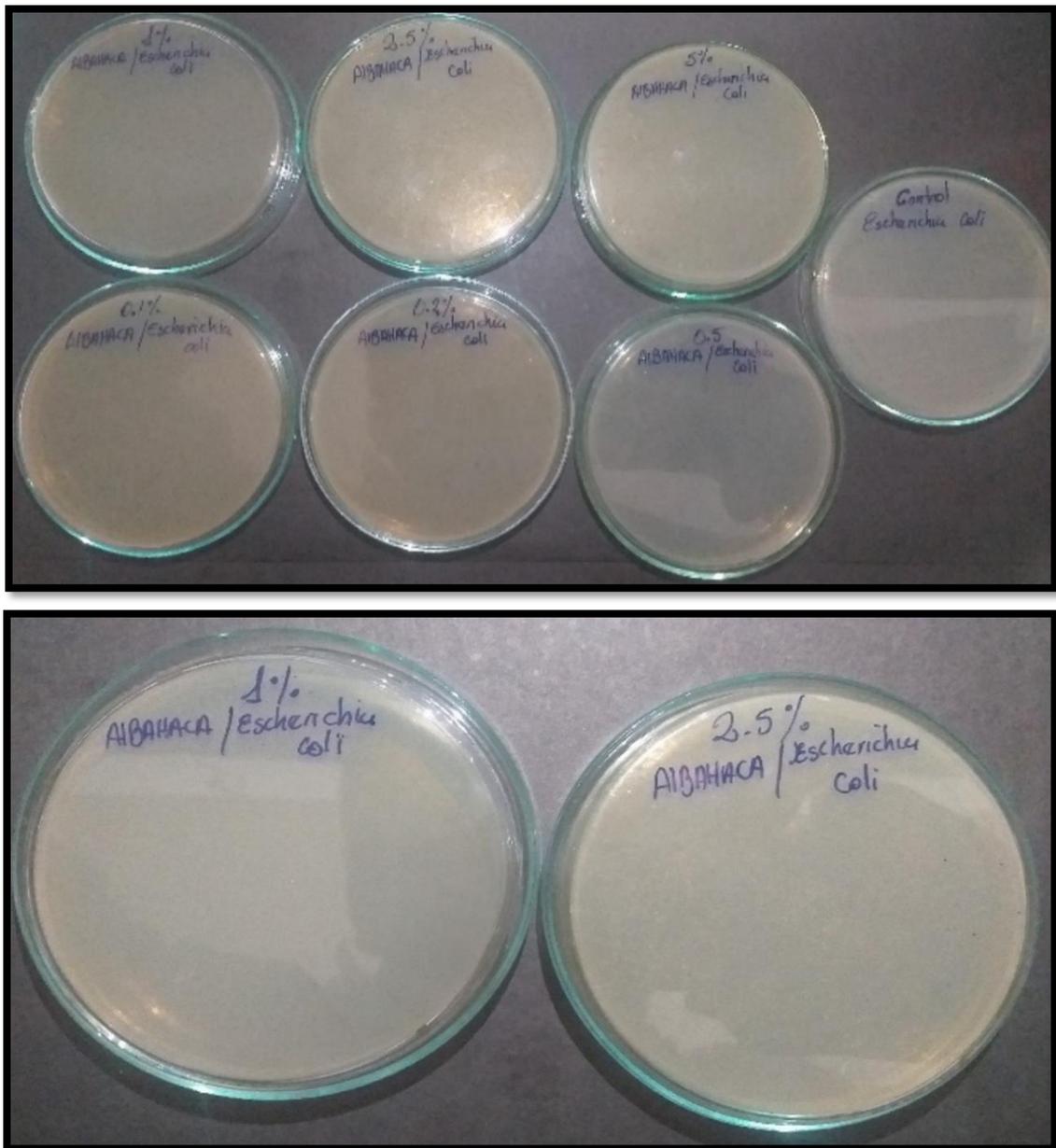


Figura 19. Evaluacion de los resultados obtenidos para determinar la concentracion minima inhibitoria del aceite esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca) frente a *Escherichia coli*; Laboratorio Microbiología de Alimentos, FCCBB – UNA Puno, marzo – mayo 2021.

Fuente: Elaboración propia.

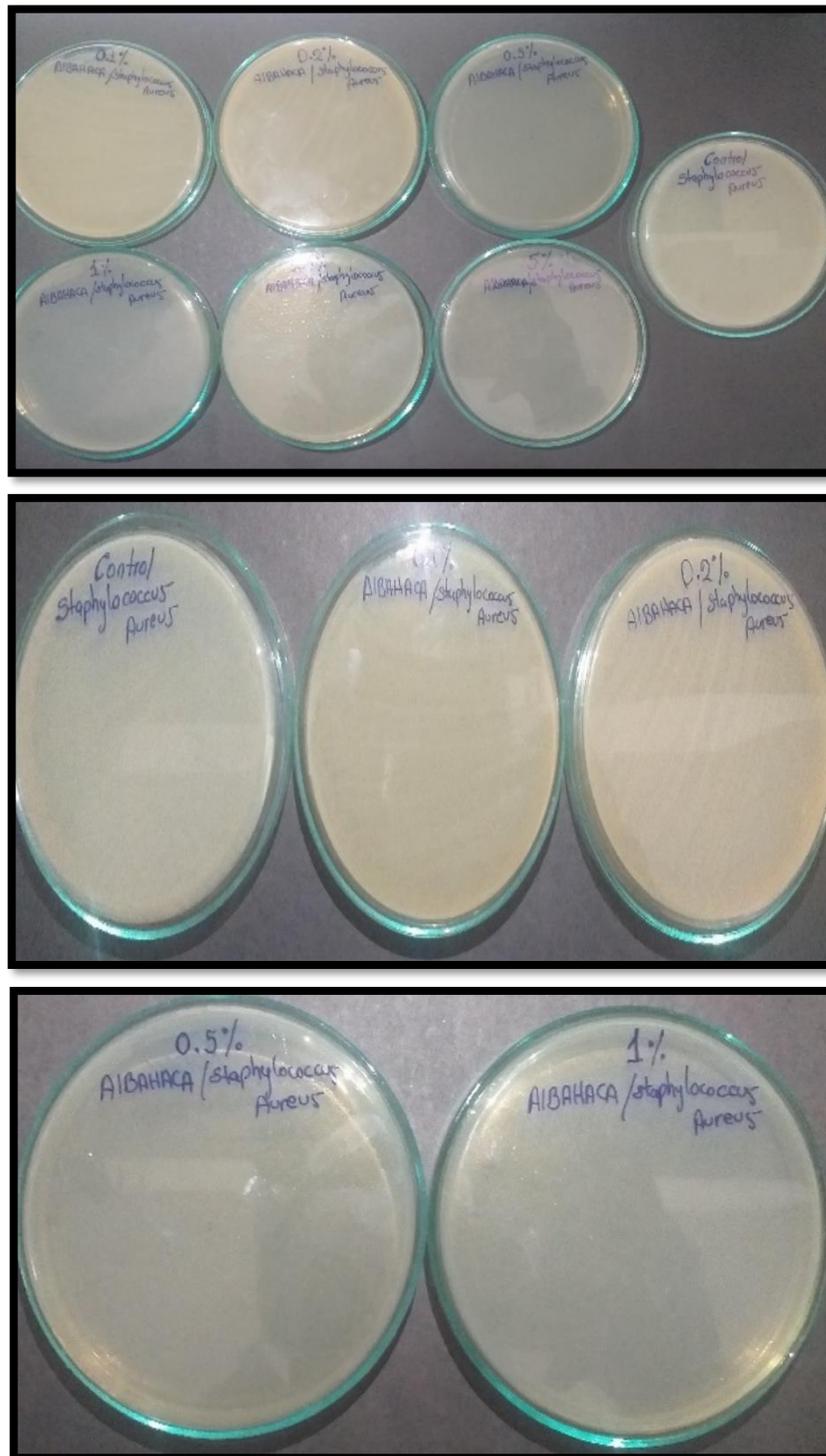


Figura 20. Evaluación de los resultados obtenidos para determinar la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca) frente a *Staphylococcus aureus*; Laboratorio Microbiología de Alimentos, FCCBB – UNA Puno, marzo – mayo 2021.

Fuente: Elaboración propia.

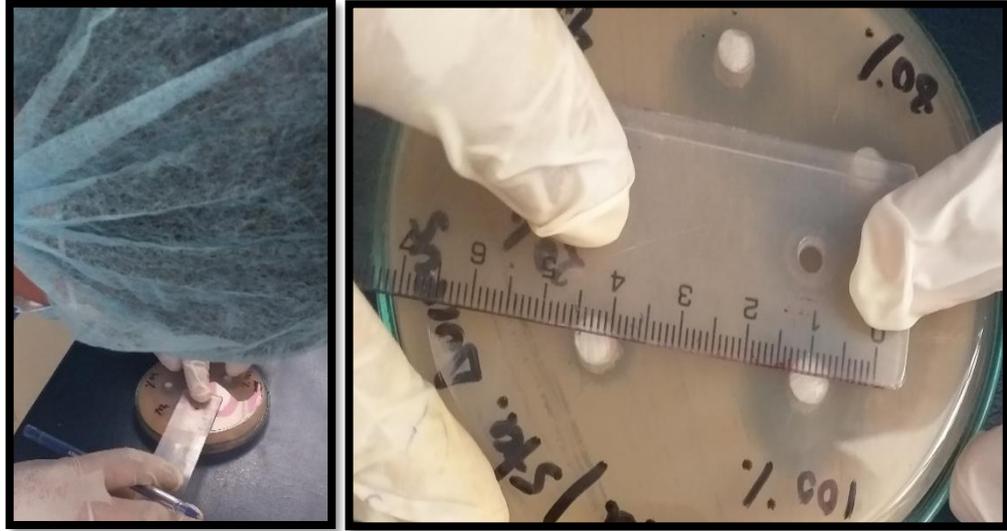


Figura 21. Medicion de los halos de inhibicion obtenidos luego del periodo de incubacion de 24 horas; Laboratorio Microbiología de Alimentos, FCCBB – UNA Puno, marzo – mayo 2021.

Fuente: Elaboración propia.



Figura 22. Susceptibilidad antimicrobiana del aceite esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca) frente a *Escherichia coli*; Laboratorio Microbiología de Alimentos, FCCBB – UNA Puno, marzo – mayo 2021.

Fuente: Elaboración propia.

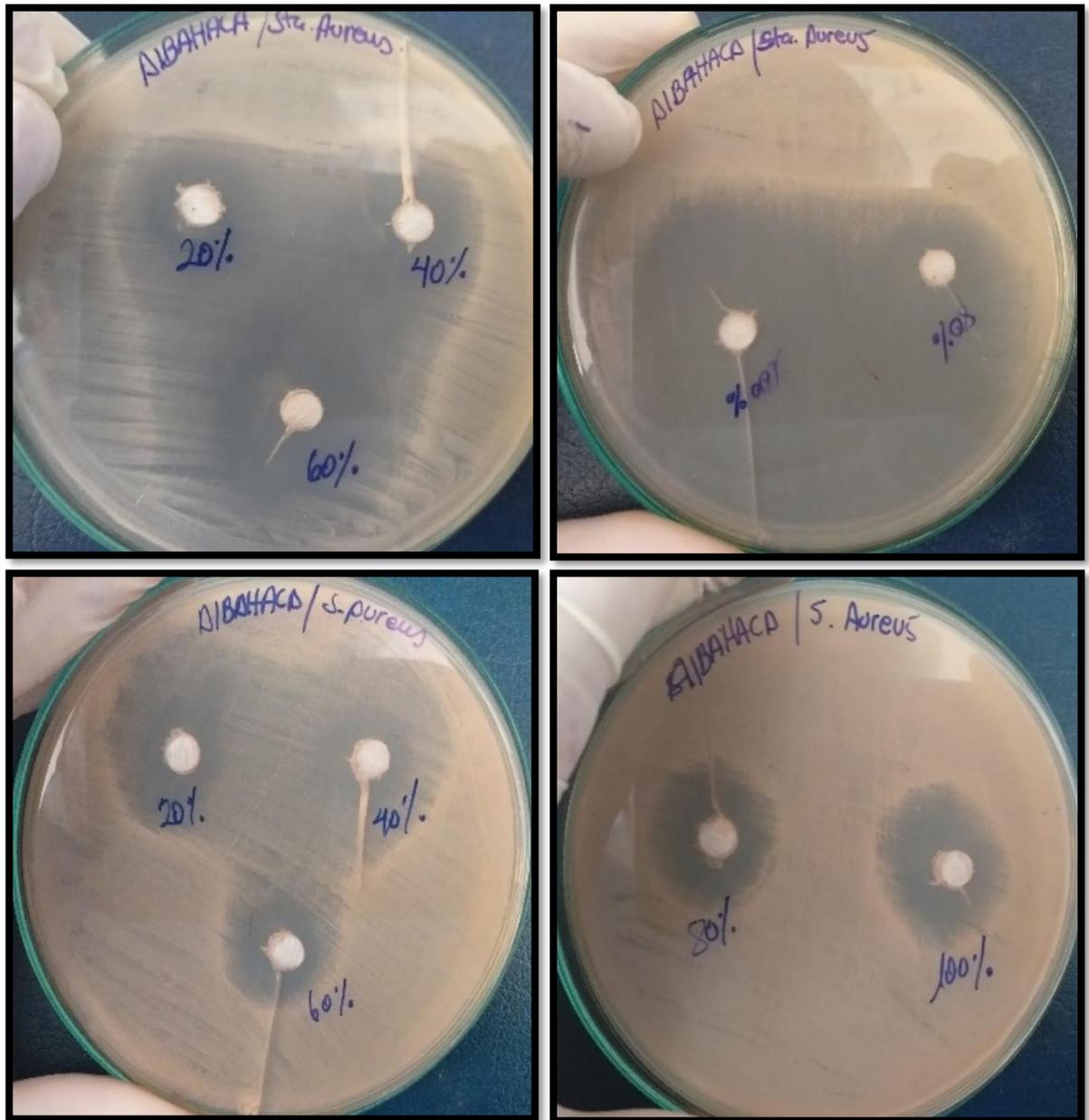


Figura 23. Susceptibilidad antimicrobiana del aceite esencial de *Ocimum basilicum* (albahaca) frente a *Staphylococcus aureus*; Laboratorio Microbiología de Alimentos, FCCBB – UNA Puno, marzo – mayo 2021.

Fuente: Elaboración propia.



CONSTANCIA

LA JEFE DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS, PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNA-PUNO

HACE CONSTAR:

Que el señor **Br. CESAR ALFREDO HUAYLLAPUMA CALLA**, egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas, Especialidad de Microbiología y Laboratorio Clínico, ha realizado la parte experimental de su tesis intitulada “ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA “In Vitro” DEL ACEITE ESCENCIAL DE *Ocimum basilicum* (ALBAHACA) FRENTE A *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* UROPATÓGENOS” en el laboratorio de Microbiología de los Alimentos y Control de Calidad de la Facultad de Ciencias Biológicas, durante el tiempo; 01 de marzo al 31 de mayo del año 2021 ejecutando su trabajo con responsabilidad, dedicación y puntualidad.

Se expide el presente a solicitud del interesado y para los fines convenientes.

Puno, 31 de mayo del 2021.


Bto. M.Sc. Ewa Laura Chauca
DOCENTE PRINCIPAL DE EDUCACIÓN
COLBIOP N° 107
JEFE DE LABORATORIO

