

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK**

**FACULTAD DE CIENCIAS APLICADAS**

**INGENIERIA EN BIOTECNOLOGIA**

Trabajo de Fin de Fin de carrera Titulado:

**Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial  
de pino sobre el crecimiento de comunidades bacterianas  
resistentes a antibióticos aisladas de los ríos de la ciudad de  
Quito.**

Realizado por:

**Carol Viviana Abril Rincon**

Director del proyecto:

**Alberto Aguirre, PhD**

Como requisito para la obtención del título de:

**Ingeniera en Biotecnología**

Quito, marzo del 2023

## **DECLARACIÓN JURAMENTADA**

Yo, CAROL VIVIANA ABRIL RINCÓN , con cédula de identidad # 1721578530, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento. A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Carol Viviana Abril Rincón', written over a horizontal line.

---

Firma

1721578530

## **DECLARATORIA**

El presente trabajo de investigación titulado:

**“Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de pino sobre el crecimiento de comunidades bacterianas resistentes a antibióticos aisladas de los ríos de la ciudad de Quito”**

Realizado por:

**CAROL VIVIANA ABRIL RINCON**

Como Requisito para la Obtención del Título de:

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGIA**

ha sido dirigido por el profesor

**ALBERTO AGUIRRE BRAVO, Ph.D.**

Quien considera que constituye un trabajo original de su autor



---

**FIRMA**

## LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

Msc. Johanna Lucia Medrano Barboza

Ing. MSc. Katty Coral Carrillo

Después de revisar el trabajo presentado,  
lo han calificado como apto para su defensa oral ante  
el tribunal examinador



---

FIRMA



---

FIRMA

Quito, marzo del 2023

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo va dedicado principalmente a toda mi familia.

A mis padres Claudia Rincón y Leonardo Abril quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han enseñado a ser la persona que soy hoy y me han impulsado a cumplir esta meta en mi formación profesional.

También quiero dedicar el presente trabajo a mi hermana Nicole Abril quien ha sido un pilar fundamental en mi vida y una fuente de apoyo incondicional en cada etapa de este proceso.

A mis maestros por su dedicación y pasión por la enseñanza.

Y por último a todas aquellas personas que forman parte de mi vida y me han brindado su apoyo, amor y amistad.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer en primer lugar a mis padres quienes me han brindado su apoyo incondicional en el cumplimiento de mis metas personales y profesionales, por ser los promotores principales en mis sueños, por los consejos, valores y principios con los que me han formado y por que han sabido ser un ejemplo de trabajo y honrradez.

A mi hermana que con sus palabras de aliento me he hecho sentir orgullosa de lo que soy y de lo que puedo llegar a enseñarle, espero seguir siendo una guía en su camino.

A mi tutor de tesis Alberto Aguirre, Ph.D por su paciencia y constancia no solo en la elaboración de este trabajo si no a lo largo de mi formación profesional.

Asi mismo a todos los docentes y personal de la Universidad Internacional SEK por ser la sede de todo el conocimiento adquirido en estos años

## Índice General

|                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. RESUMEN.....                                                                                                                                     | 1  |
| 2. ABSTRACT.....                                                                                                                                    | 2  |
| 3. INTRODUCCIÓN .....                                                                                                                               | 3  |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS .....                                                                                                                       | 7  |
| 4.1 ÁREA DE ESTUDIO .....                                                                                                                           | 7  |
| 4.2 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE AGUA. ....                                                                                                           | 7  |
| 4.3 RECOLECCIÓN DE LA MATERIA VEGETAL <i>PINUS RADIATA</i> . ....                                                                                   | 7  |
| 4.4 OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE PINO .....                                                                                                      | 7  |
| 4.5 AISLAMIENTO DE BACTERIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS.....                                                                                        | 9  |
| 4.5.2 <i>Elaboración del medio de cultivo</i> .....                                                                                                 | 10 |
| 4.5.3 <i>Periodo de aclimatación de los microorganismos</i> .....                                                                                   | 10 |
| 4.5.4 <i>Puesta en marcha del quimiostato simple de una etapa</i> .....                                                                             | 11 |
| 4.6 IDENTIFICACIÓN DE LA EFICIENCIA EN CUANTO A ELIMINACIÓN DE<br>COMUNIDADES BACTERIANAS RESISTENTES QUE PRESENTA EL ACEITE ESENCIAL DE PINO<br>16 |    |
| 5. RESULTADOS .....                                                                                                                                 | 17 |
| 5.1 OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE PINO. ....                                                                                                     | 17 |
| 5.2 PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS .....                                                                                                 | 17 |
| 5.3 ANTIBIOGRAMA POR DIFUSIÓN EN DISCO PARA COMPROBAR LA ACTIVIDAD<br>ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE PINO. ....                              | 17 |
| 6. DISCUSIÓN.....                                                                                                                                   | 19 |
| 7. CONCLUSIONES .....                                                                                                                               | 23 |
| 9. REFERENCIAS .....                                                                                                                                | 25 |

## Índice de tablas

|                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1 Composición del medio de cultivo .....                                        | 10 |
| Tabla 2: Cantidad minima inhibitoria y concentración de antibióticos.....             | 13 |
| Tabla 3 Ensayos de suseptibilidad a antibióticos por parte de los microorganismos.... | 14 |
| Tabla 4. Índice de susceptibilidad a antibióticos.....                                | 17 |

## **Índice de Figuras**

|                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 Montaje del destilador por arrastre de vapor.....            | 8  |
| Figura 2 Montaje del quimiostato simple de una etapa .....            | 10 |
| Figura 3 Pueba susceptibilidad a antibióticos.....                    | 15 |
| Figura 4 Interpretación de un antibiograma por difusión en disco..... | 18 |

## **Índice de Anexos**

|                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| Anexo 1 Localización e imagen de los rios y pino utilizados para el muestreo..... | 29 |
| Anexo 2 Preparación de la materia vegetal .....                                   | 31 |
| Anexo 3 Destilación por arrastre de vapor .....                                   | 32 |
| Anexo 4 Quimiostato simple de una etapa .....                                     | 32 |
| Anexo 5 Medio de cultivo .....                                                    | 33 |
| Anexo 6 Pruebas de susceptibilidad a antibióticos.....                            | 35 |
| Anexo 7 Antibiograma .....                                                        | 36 |
| Anexo 8 Resultados antibiograma .....                                             | 40 |

## 1. Resumen

Las bacterias resistentes y la contaminación hídrica son dos de los problemas más graves que enfrenta la salud pública. En el Ecuador la falta de tratamiento de aguas residuales es una de las principales causas de contaminación, ya que las mismas son dirigidas directamente a los efluentes de agua cercanos. Muchos estudios realizados en los ríos cercanos a la ciudad de Quito muestran altos niveles de contaminación bacteriana resistente a antibióticos, por lo que evaluar nuevas metodologías para la eliminación de este tipo de bacterias presentes en las aguas residuales es de vital importancia para reducir el riesgo tanto a la salud pública como al medio ambiente. Por lo tanto, el propósito del presente trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de pino (*Pinus radiata*), frente a microorganismos resistentes a antibióticos obtenidos de 3 ríos visiblemente contaminados de la ciudad de Quito.

El método por el cual se extrajo el aceite esencial fue la destilación por arrastre de vapor ya que muestra ser una técnica sencilla, confiable y de alta calidad. Se requirió 8 kg de materia vegetal para producir 5 ml de aceite esencial en un periodo de 2 meses.

Se tomaron muestras de 3 ríos de la ciudad de Quito: Río Machangara, Río San Pedro, Río Guayllabamba. Estas muestras fueron inoculadas en un quimiostato simple de una etapa seguido por una etapa de detección de susceptibilidad a antibióticos, del cual pudimos obtener como resultado microorganismos resistentes a la penicilina.

Para comprobar la actividad antimicrobiana del aceite esencial se realizó un protocolo de antibiograma por difusión en disco a 3 dosis distintas: 10ml, 15ml y 20 ml, con un periodo de incubación de 24h a una temperatura de 37°C. Como resultados se obtuvieron 5 ml de aceite esencial de pino, el cual con las dosis utilizadas en el antibiograma no mostró ningún tipo de actividad antimicrobiana notable frente a las bacterias resistentes a la penicilina. A pesar de que no se obtuvo el resultado deseado se espera que este trabajo promueva la investigación de los aceites esenciales como agentes antimicrobianos en otras condiciones.

**Palabras clave:** Bacterias resistentes, aceites esenciales, destilación por arrastre de vapor, *Pinus radiata*, actividad antimicrobiana, antibiograma.

## 2. Abstract

The resistant bacteria and hydric contamination are two of the most serious problems that public health faces. In Ecuador the lack of treatment of sewage waters is one of the principal causes of pollution, since these are directly deposited in the near tributaries of water. Many studies done in the rivers near the city of Quito show high levels of bacterial contamination. That is why the purpose of the present thesis was to evaluate the antimicrobial activity of pine essential oil (*Pinus radiata*), in front of resistant organisms obtained from three rivers visibly polluted in the city of Quito.

The method used to extract the pine essential oil was steam distillation since it shows to be an easy technique, reliable and high quality. It was required 8kg of vegetal matter to produce 5ml of pine essential oil in a period of two months.

The samples were taken from three rivers in the city of Quito: Río Machángara, Río San Pedro, Río Guayllabamba. These samples were inoculated in a simple one cap chemostat followed by a susceptibility to antibiotics protocol with a treatment of 24 hours, from which we obtained as a result microorganisms resistant to penicillin.

To prove the antimicrobial activity from the essential oil a disk diffusion antibiogram protocol was performed in three different concentrations: 10ml, 15ml and 20ml, with a period of incubation of 24 hours, at a temperature of 37°C.

As a result 5ml of pine essential oil were obtained, which with the dosage used in the antibiogram it didn't showed any type of antimicrobial activity in front of the bacteria resistant to penicillin. Even though the desired result was not obtained it is expected that this thesis promotes the investigation of the essential oils as antimicrobial agents in different conditions.

**Key words:** bacteria, essential oil, steam distillation, *Pinus radiata*, antimicrobial activity, antibiogram

### 3. Introducción

Las bacterias son organismos procariotas unicelulares que se encuentran en casi todas las partes de la Tierra, de hecho están presentes en el 90 por ciento del cuerpo humano y se estima que contiene más bacterias que células humanas. (*Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Argentina) & Migliorati, 2017*). La mayoría de bacterias que se encuentran en el organismo no producen ningún daño, al contrario, algunas son beneficiosas. Solo una cantidad relativamente pequeña de especies son las que causan enfermedades. (NIH, 2022)

Y para esta pequeña, pero peligrosa cantidad de bacterias que causan enfermedades el tratamiento son los antibióticos; los cuales fueron el gran descubrimiento del siglo XX, ya que solucionaron una innumerable cantidad de enfermedades y problemas sanitarios. El inconveniente surgió cuando su uso descontrolado provocó que las bacterias se adaptaran y mutaran a lo largo del tiempo generando una resistencia a estos antimicrobianos. (OMS, 2020)

La resistencia a antibióticos se puede dar de dos formas, la primera que se da por mutaciones al azar en cepas de una misma especie y la adquirida en la cual adquieren genes de otros microorganismos a su alrededor, lo que conocemos como transferencia horizontal la cual puede darse entre cepas de la misma o diferente especie. (Godziszewska et al., 2018); (Pérez y Contreras, 2013).

Las bacterias resistentes a antibióticos son un problema muy grave no solo de salud pública sino también ambiental, social y económico. Estas bacterias producen infecciones y enfermedades que son difíciles de controlar y tratar. Las soluciones, tratamientos y farmacoterapia para este tipo de infecciones suele resultar bastante costosa. (*Calderón & Ulate, 2016*)

En la actualidad las bacterias resistentes se pueden encontrar en cualquier ambiente desde fuentes de agua, comida, superficies y animales; lo que las hace sumamente peligrosas, mortales y fáciles de contraer. (Yuan et al., 2021)

Como se mencionó anteriormente uno de los lugares donde se encuentran las bacterias resistentes son las fuentes de agua y más en aquellas que se encuentran contaminadas con una alta carga orgánica. Podemos definir las aguas residuales como aquel líquido residual de actividades domésticas y agroindustriales las cuales debido a su origen y propiedades contienen una alta concentración de materia orgánica, es por esto que es el nicho perfecto para la reproducción y difusión de bacterias. (Gross et al., 2007).

La organización mundial de la salud afirma que las enfermedades transmitidas por agua pueden llegar a afectar a 1 de cada 3 personas al año, por lo que es un problema creciente y generalizado a nivel mundial. (Día Mundial de La Inocuidad de Los Alimentos | Naciones Unidas, 2015). Las aguas residuales sirven como medio de difusión para las bacterias resistentes, esto debido a las malas prácticas en la disposición y tratamiento de las mismas. Se han elegido 3 ríos de la ciudad de Quito: el río Guayllabamba, el río San Pedro, y el río Machángara, que basados en estudios ambientales se sabe que están contaminados, como la fuente para la obtención de bacterias resistentes a antibióticos (Campaña et al., 2017).

La primera parte de este proyecto consistió en la inoculación de los microorganismos obtenidos de las fuentes de agua. Se utilizó un quimiostato simple de una sola etapa, el cual se puede decir que es básicamente un reactor continuo de tanque agitado. Una de las ventajas del quimiostato es que nos permite controlar la velocidad específica de crecimiento de los microorganismos mediante ajustes en la tasa de dilución ( $D$ ), manteniendo un crecimiento constante e indefinido de los microorganismos en el reactor. (Acevedo et al., 2002b).

Para la segunda parte de este proyecto y en la que se basó la hipótesis del mismo, se intentó buscar una solución orgánica económicamente viable y sobre todo factible al problema creciente de microorganismos resistentes en fuentes de agua. Una de las alternativas encontradas fue el uso de aceites esenciales como agentes antimicrobianos.

Los aceites esenciales se pueden definir como mezclas complejas de compuestos volátiles de apariencia líquida, aceitosa y muy aromáticos, que se obtienen por diferentes métodos como destilación, presión, extracción con solventes volátiles, a partir de materia vegetal. En los últimos años se han vuelto un tema de investigación, ya que han demostrado una fuerte actividad antimicrobiana en organismos Gram positivos y Gram negativos. (Prakash et al., 2015) (Perdones et al., 2016).

El pino es utilizado ancestralmente por sus propiedades antiinflamatorias, antiinfecciosas y analgésicas. Por otra parte, se sabe que los metabolitos secundarios del aceite y extracto de las hojas de pino le confiere actividad antibacteriana debido a la presencia de: triterpenoides, flavonoides, fenoles, alcaloides, cumarinas, taninos y esteroides cuyo efecto antimicrobiano sobre cepas patógenas es reconocido.(Bedón, 2019)

La especie de pino elegida para el presente trabajo fue *Pinus radiata*, es un árbol que puede llegar a medir hasta 30 m de altura y 70 cm de DAP (diámetro altura pecho). El pino fue introducido en el Ecuador en 1925, después del eucalipto es la especie más plantada en la sierra. Se seleccionó la especie *Pinus radiata* ya que en específico esta especie posee cualidades que lo hacen altamente cotizado para la industria, tiene una alta adaptabilidad y un rápido crecimiento; es de gran uso industrial para la producción de papel, muebles, cortinas rompevientos entre otras. La industria que utiliza el pino como materia prima genera una alta cantidad de residuos que pueden ser aprovechados para la obtención del aceite esencial a gran escala.(Ecuador Forestal, 2012)

Tomando en cuenta todo lo anterior la hipótesis de este trabajo fue: La actividad antimicrobiana del aceite esencial de pino ayuda a controlar eficientemente las poblaciones bacterianas resistentes a antibióticos encontradas en las aguas residuales.

El objetivo general de este proyecto fue evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de pino frente a comunidades bacterianas resistentes a antibióticos. Como objetivos específicos se planteó: La obtención de aceite esencial de pino proveniente de residuos industriales, el aislamiento de bacterias resistentes a antibióticos provenientes de los ríos de la ciudad de Quito, y por último analizar las interacciones que puedan generarse entre el aceite esencial de pino y el crecimiento de comunidades bacterianas resistentes a antibióticos.

## **4. Materiales y métodos**

### **4.1 Área de estudio**

Área general: Distrito Metropolitano de Quito

Área específica:

- Pino: Calle Alberto Einstein y 5ta Transversal. Carcelén, Quito – Ecuador.
- Agua:
  - Río Machángara - Sector Nayón
  - Río San Pedro – Sector Cumbayá
  - Río Guayllabamba – Puente de Guayllabamba

### **4.2 Recolección de Muestras de agua.**

Una vez seleccionados los ríos se buscaron los puntos de acceso más sencillos para la recolección de agua. Con la ayuda de una soga, un balde y extensor metálico se recolectaron las muestras de agua. Se tomaron botellas de plástico de 400 ml, se etiquetaron y llenaron con las muestras recolectadas.

### **4.3 Recolección de la materia vegetal *Pinus radiata*.**

Para la recolección de la materia vegetal se eligió un pino de la especie *Pinus radiata* que se encontraba en las inmediaciones de la Universidad Internacional SEK, sede Carcelén. Se procedió a recolectar la materia vegetal con unas tijeras de jardín cortando las ramas más cercanas del tronco. Las recolecciones se realizaron periódicamente hasta lograr extraer la cantidad de aceite fijada que fue de 5 ml.

Posterior a la recolección se procedió a lavar la materia vegetal únicamente con agua para retirar cualquier contaminante o residuo de tierra y se procedió a secar a la sombra por un periodo de 3 horas.

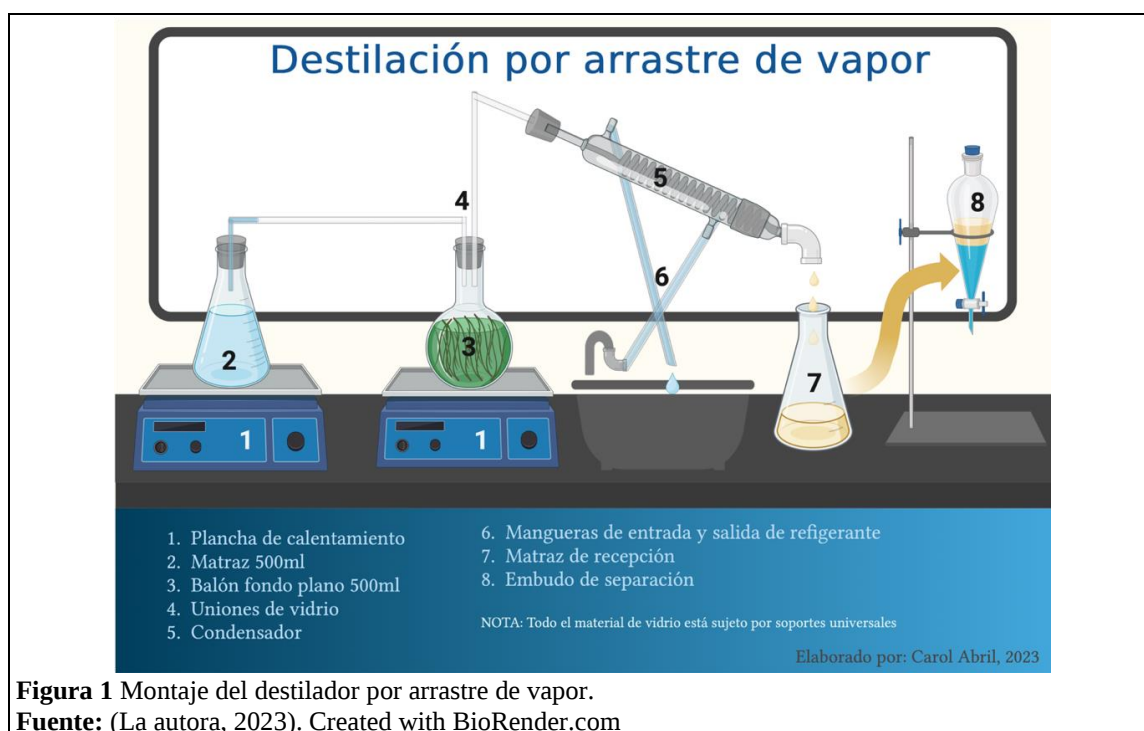
### **4.4 Obtención de aceite esencial de pino**

#### **4.4.1 Preparación de la materia vegetal**

Se tomó la materia vegetal seca y se procedió a separar las acículas de las ramas. Se colocaron en una bandeja forrada en papel aluminio precautelando que las acículas no se encimen entre sí. Se colocó la bandeja en una estufa de laboratorio a una temperatura de 50 °C por 48 horas. Cumpliendo el tiempo estipulado se trituró la materia vegetal con ayuda de un procesador de alimentos.

#### 4.4.2 Montaje y puesta en marcha del destilador por arrastre de vapor

Para el montaje del destilador por arrastre de vapor se requirió un matraz de 500ml el cual se colocó sobre una plancha de calentamiento, en el cual se introdujo un corcho de plástico con un agujero en la parte superior, se utilizó un balón de 500ml que se puso sobre una segunda plancha de calentamiento junto al primer matraz conectados entre sí con un tubo de vidrio hecho a la medida, se le colocó un corcho de plástico con 2 agujeros en la parte superior, en el segundo agujero se introdujo otro tubo de vidrio que se acopló al corcho del condensador el cual se conectó a un flujo de agua constante, al final del condensador se insertó un terminal acodado, y se utilizó un matraz de 500ml el cual recolectó los residuos de la destilación. Ver Figura 1 y Anexo 3



**Figura 1** Montaje del destilador por arrastre de vapor.

**Fuente:** (La autora, 2023). Created with BioRender.com

Después de realizado el montaje se colocó 450 ml de agua destilada en el primer matraz, por su parte en el balón se colocaron aproximadamente 300 g de materia vegetal seca y se encendió la plancha del primer matraz a 300°C, posteriormente se abrió el grifo para el ingreso del refrigerante al condensador. El destilador se mantuvo encendido aproximadamente 6 a 8 horas diarias.

El matraz en el que se colocó agua destilada se rellenó cada 3-4 horas aproximadamente y la plancha que se encontraba bajo el balón se encendió a 250 °C al cabo de un día, esto debido a que empezó a llenarse de agua. El contenido que se recolectó del matraz que se encontraba al final del montaje fue depositado en un decantador para separar los compuestos inmiscibles (agua y aceite) que salieron del condensador, el procedimiento se realizó aproximadamente por dos meses y la materia vegetal se cambió cada semana por lo que se utilizó 8 kg de acículas aproximadamente.

#### **4.5 Aislamiento de bacterias resistentes a antibióticos**

##### **4.5.1 Montaje del quimiostato simple de una etapa.**

Los materiales necesarios para el montaje se prepararon con antelación, ya que el material de vidrio se autoclavó previamente y el material de plástico se dejó en cloro por un periodo de 2 horas, posterior a esto se lavó con agua, jabón y abundante agua para retirar cualquier residuo. El montaje se realizó siguiendo el siguiente esquema: Ver Figura 2 y Anexo 4.



con el medio de cultivo mencionado anteriormente. Una vez realizado esto se procedió a colocarlo en una incubadora a una temperatura de 37°C por un periodo de 120 horas ( 5 días) sin agitación, esto debido a que no se evidenció un crecimiento significativo en las primeras 72 horas.

**Nota:** se autoclavó tanto el material de vidrio a utilizar como el medio de cultivo. Se utilizaron mecheros de alcohol en cada parte del proceso.

#### **4.5.4 Puesta en marcha del quimiostato simple de una etapa**

Una vez realizado el montaje indicado en la figura 2 se procedió a preparar una solución saturada de Sulfato de cobre, en la cual se colaron 39,15 g de sulfato de cobre en 250ml de agua destilada sobre una plancha a 100°C hasta que se homogenizó completamente. Esta solución se colocó en la conexión de la oliva superior del matraz de 500ml, con el propósito de capturar y eliminar cualquier agente patógeno producido por la emisión de gases del quimiostato.

Posteriormente, se procedió a introducir 450 ml de medio de cultivo en el matraz de 500 ml y 50 ml del inóculo que se encontraba en periodo de aclimatación. Adicionalmente, se agregó un agitador magnético y se colocó sobre una plancha a 30°C y 150 rpm. Cuando se puso en marcha el quimiostato se procedió a tomar una muestra a la cual se le midió la densidad óptica a una longitud de onda de 600nm utilizando agua destilada como blanco.

El biorreactor empezó operando en modalidad batch sin ninguna entrada o salida de fluidos y cuando se llegó a fase de crecimiento exponencial se operó en modalidad continua en el que se fijó un flujo de entrada ya que se trabajó a una sola tasa de dilución ( $0,24 h^{-1}$ ) la cual se obtuvo de la siguiente fórmula:

$$D = \frac{F}{V} \quad (1)$$

$$F = \text{Flujo de entrada } (l * h^{-1})$$

$$D = (\text{tasa de dilución})h^{-1}$$

$$V = \text{Volumen del líquido dentro del quimiostato}$$

(Acevedo et al., 2002c)

Con esta tasa de dilución se calculó el tiempo de residencia ( $\tau$ ), esto ya que se esperó 3 tiempos de residencia para que el cultivo bacteriano llegue a estado estacionario, en el cual se realizó las pruebas de susceptibilidad a antibióticos. El tiempo de residencia se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\tau (\text{tiempo de residencia}) = \frac{\text{Volumen del líquido en el quimiostato (l)}}{\text{Flujo de entrada (l * h}^{-1}\text{)}} \quad (2)$$

(Acevedo et al., 2002d)

#### 4.5.5 Cálculo de la tasa de dilución y tiempo de residencia

Se estableció una tasa de dilución correspondiente a  $0,24 \text{ h}^{-1}$ . Los cálculos realizados se presentan a continuación.

**Flujo:**

$$F(\text{flujo}) = \frac{V(\text{Volumen})}{T(\text{tiempo})}$$

$$F = \frac{2\text{ml}}{\text{min}} = \frac{120\text{ml}}{\text{h}}$$

**Tasa de dilución:**

$$D(\text{tasa de dilución}) = \frac{F(\text{Flujo})}{V(\text{volumen del reactor})}$$

$$D = \frac{\frac{120\text{ml}}{\text{h}}}{500\text{ml}}$$

$$D = 0,24 \text{ h}^{-1}$$

**Tiempo de residencia**

$$\tau(\text{tiempo de residencia}) = \frac{\text{Volumen del líquido en el quimiostato (l)}}{\text{Flujo de entrada (l * h}^{-1}\text{)}}$$

$$T = \frac{500ml}{120ml/h} = 4,16h$$

#### 4.5.6 Pruebas de susceptibilidad a antibióticos

Una vez llegado a estado estacionario se procedió a iniciar los ensayos para la detección de susceptibilidad a antibióticos de los microorganismos. Se tomaron 150 ml de caldo de cultivo proveniente del quimiostato y se colocó en un matraz para su uso en los ensayos de susceptibilidad a antibióticos descrito a continuación. La primera parte de este protocolo se realizó en una cámara de flujo laminar y con el material previamente autoclavado, en esta parte se agregó las cantidades correspondientes de antibiótico y medio de cultivo a cada tubo (tubos para blanco y tubos con antibiótico). La cantidad de antibiótico que se utilizó en este trabajo se determinó por la CMI (concentración mínima inhibitoria) la cual se obtuvo bibliográficamente de los manuales MSD, las cantidades y concentraciones de los antibióticos se encuentran en la Tabla 3. Los manuales MSD son suministrados por la compañía farmacéutica Merck Sharp & Dohme y son la guía de información médica más consultada a nivel mundial.(Vazquez, 2022)

La segunda parte en la que se colocó la cantidad correspondiente de bacterias se realizó en la mesa de trabajo con un mechero de bunsen. El procedimiento se realizó en tubos de ensayo siguiendo el esquema indicado en la Tabla 2 y Figura 3:

**Tabla 2: Cantidad minima inhibitoria de antibióticos**

| Antibiótico        | CIM       |
|--------------------|-----------|
| <b>GENTAMICINA</b> | 3 µg /ml  |
| <b>CEFTRIAXONA</b> | 8 µg/ml   |
| <b>AMIKACINA</b>   | 128 µg/ml |
| <b>AMPICILINA</b>  | 256 µg/ml |
| <b>PENICILINA</b>  | 24 µg/ml  |

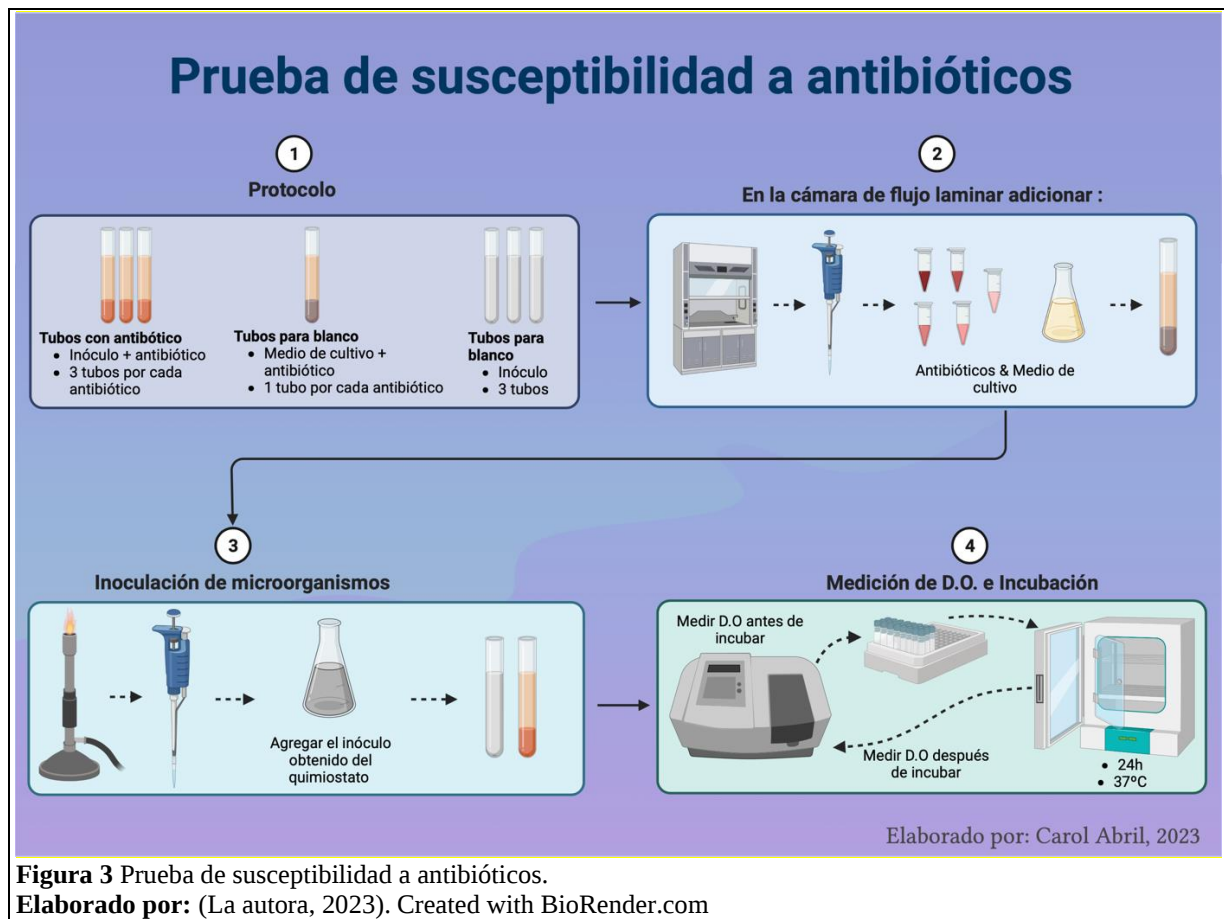
Elaborado por: (La autora, 2023).

**Tabla 3 Ensayos de susceptibilidad a antibióticos por parte de los microorganismos**

| <b>TUBOS CON ANTIBIÓTICO (por triplicado)</b> |                              |                         |                        |
|-----------------------------------------------|------------------------------|-------------------------|------------------------|
| <b>Antibiótico</b>                            | <b>Inóculo (μL)</b>          | <b>Antibiótico (μL)</b> | <b>Total tubo (μL)</b> |
| <b>GENTAMICINA</b>                            | 5775                         | 225                     | 6000                   |
| <b>CEFTRIAXONA</b>                            | 5520                         | 480                     | 6000                   |
| <b>AMIKACINA</b>                              | 5997                         | 3                       | 6000                   |
| <b>AMPICILINA</b>                             | 5994                         | 6                       | 6000                   |
| <b>PENICILINA</b>                             | 5993                         | 7                       | 6000                   |
| <b>TUBOS PARA BLANCO</b>                      |                              |                         |                        |
| <b>Antibiótico</b>                            | <b>Medio de cultivo (μL)</b> | <b>Antibiótico (μL)</b> | <b>Total tubo (μL)</b> |
| <b>GENTAMICINA</b>                            | 5775                         | 225                     | 6000                   |
| <b>CEFTRIAXONA</b>                            | 5520                         | 480                     | 6000                   |
| <b>AMIKACINA</b>                              | 5997                         | 3                       | 6000                   |
| <b>AMPICILINA</b>                             | 5994                         | 6                       | 6000                   |
| <b>PENICILINA</b>                             | 5993                         | 7                       | 6000                   |
| <b>TUBOS PARA CONTROL ( por triplicado)</b>   |                              |                         |                        |
| <b>BACTERIA (μL)</b>                          |                              |                         | <b>Total tubo (μL)</b> |
| 6000                                          |                              |                         | 6000                   |

**Nota:** Valores en μL para cada tubo de ensayo. Los tubos con antibiótico y tubos para control se realizaron por triplicado

**Elaborado por:** (La autora, 2023).



Los tubos fueron incubados por un periodo de 24 horas a 37°C, se midió la densidad óptica a 600 nm antes y después del tiempo de incubación. Con los datos obtenidos de estas mediciones y la ecuación 3 se logró establecer si existió crecimiento después de incubar, se utilizó la ecuación 4 para determinar si existió sensibilidad a los antibióticos elegidos.

$$\text{Razón OD} = \frac{\text{OD después de incubar}}{\text{OD antes de incubar}} \quad (3)$$

$$\text{Índice de susceptibilidad} = \frac{\text{Razón OD de cada antibiótico}}{\text{Razón OD del control}} \quad (4)$$

Se estableció un índice para determinar la susceptibilidad de las bacterias a los antibióticos: si el índice es mayor o igual a 1 las bacterias presentan resistencia a los antibióticos y en caso de que sea menor a 1 presentan susceptibilidad a los mismos.

## **4.6 Identificación de la eficiencia en cuanto a eliminación de comunidades bacterianas resistentes que presenta el aceite esencial de pino**

### **4.6.1 Antibiograma por difusión en disco**

Para la elaboración de los antibiogramas se utilizó medio de cultivo Mueller-Hinton-agar, se utilizó 37g de polvo en un 1 litro de agua destilada, se calentó y agitó constantemente para diluirlo completamente. Posterior a esto se esterilizó en el autoclave, se esperó a que estuviera en una temperatura manejable para colocar 10 ml aproximadamente en cada placa petri, esto se realizó en la mesa de trabajo con un mechero bunsen.

Para la elaboración de los discos se utilizó cartulina blanca y algodón, los cuales se cortaron con una perforadora para obtener círculos del mismo diámetro. Se colocó el algodón en medio de dos círculos de cartulina y se unieron con hilo para asegurarlo.

Una vez que el medio solidificó se procedió a inocular 200  $\mu$ L de caldo de cultivo con bacterias extraídas del tubo que mostró resistencia a antibióticos en el medio con un asa de siembra Digrafsky (Anexo 7). Se debe tomar en cuenta que todo el proceso se llevó a cabo con la mayor asepsia posible por lo que se utilizó alcohol, mecheros y material autoclavado. Una vez que se absorbieron los microorganismos se procedió a colocar los discos de difusión.

Se utilizaron 3 diferentes dosis de aceite para verificar su efectividad bactericida: 10ml, 15ml y 20 ml y se realizaron por triplicado. Se colocaron 5 discos en cada placa: 3 para la cantidad correspondiente de aceite esencial, uno para el control negativo en el que se utilizó agua destilada y el último para el control positivo donde se utilizó sulfato de cobre, se colocó la misma cantidad en todos los discos correspondiente a la cantidad asignada a cada placa. Finalmente, las placas petri se sellaron e incubaron a una temperatura de 37°C por un periodo de 24 horas.

## 5. Resultados

### 5.1 Obtención del aceite esencial de pino.

#### 5.1.1 Destilación por arrastre de vapor

El proceso de destilación por arrastre de vapor para la obtención de aceite esencial de pino se realizó satisfactoriamente, fue necesaria una gran cantidad de materia vegetal (8 kg aproximadamente) y ciclos prolongados de destilación (6-8 horas diarias) por un periodo de 2 meses. Bajo estas condiciones se logró obtener 5 ml de aceite esencial.

### 5.2 Pruebas de susceptibilidad a antibióticos

Con las mediciones de densidad óptica que se realizaron después de realizar el protocolo de susceptibilidad a antibióticos y al pasar 24 h de incubación a 37°C se pudo determinar la susceptibilidad de los microorganismos a los antibióticos elegidos. Los resultados se muestran en la tabla 4. Como se puede observar el único antibiótico al cual la comunidad bacteriana demostró susceptibilidad fue la penicilina. Una vez que se determinó la resistencia de los microorganismos a la penicilina se realizó el antibiograma.

**Tabla 4. Índice de susceptibilidad a antibióticos**

| Antibiótico       | Índice   | Desviación Estandar |
|-------------------|----------|---------------------|
| Ceftriaxona       | 0,6      | 0,035               |
| Gentamicina       | 0,7      | 0,025               |
| Amikacina         | 0,7      | 0,042               |
| Ampicilina        | 0,7      | 0,018               |
| <b>Penicilina</b> | <b>1</b> | <b>0,025</b>        |

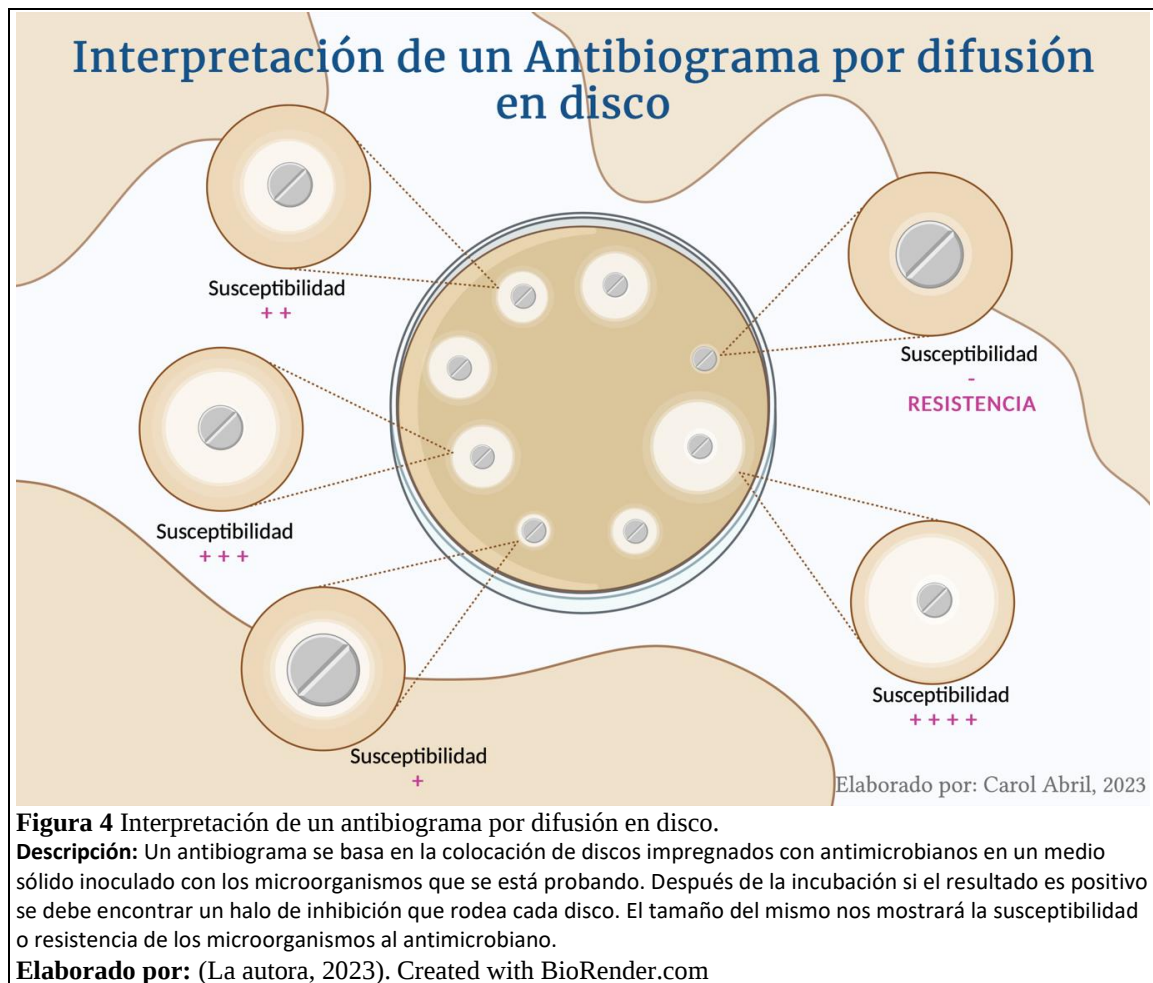
**Nota:** Índice:  $\geq 1$  resistente ;  $< 1$  susceptible.

**Elaborado por:** (La autora, 2023).

### 5.3 Antibiograma por difusión en disco para comprobar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de pino.

Una vez que se determinó la resistencia de los microorganismos a la penicilina se realizó el antibiograma por difusión en disco, en cual no se observó ninguna reacción inhibitoria

por parte del aceite esencial, es decir no se observó un halo de inhibición, por lo que se puede decir que el aceite esencial de pino no tuvo ningún signo de actividad antimicrobiana frente a los microorganismos resistentes aislados del agua residual. Los resultados se pueden observar en el anexo 8 y en la figura 4 se puede apreciar cómo interpretar los resultados de un antibiograma.



## 6. Discusión

Como se evidenció en este proyecto se requirieron de 8 kg de acículas de pino para obtener 5 ml de aceite esencial, lo que evidentemente refleja un rendimiento bajo con respecto a la cantidad de materia vegetal utilizada. En promedio se registra un rendimiento de 0,2 ml de aceite esencial por cada kilogramo de materia vegetal en un protocolo de destilación por arraste de vapor durante un periodo de 2 horas (M. Jiménez, 2019). En comparación a este hecho el rendimiento obtenido en este proyecto fue de 0.6 ml de aceite/kg en protocolos de 6 a 8 horas diarias, por lo que esta dentro del promedio de rendimiento habitual.

Según la bibliografía encontrada existen varios motivos que minimizan el rendimiento del aceite esencial; por ejemplo, Álvarez et al., (2001) asegura que el follaje expuesto a la sombra contiene un mayor porcentaje de aceite esencial que el follaje expuesto al sol. Por otro lado Jiménez, (2019) realizó un estudio en el cual se demostró que la edad y la altura de la que se obtienen las acículas también son relevantes al momento de obtener el aceite esencial de pino. Este estudio concluyó que el mejor rendimiento se evidenció a los 10 años de edad del pino y con muestras obtenidas de la copa del árbol. Todos estos estudios se tuvieron en cuenta al momento de realizar la extracción del aceite esencial de pino; se utilizó un árbol de una edad y características similares a las mencionadas anteriormente, de igual manera se procedió al secado de las acículas de pino en la sombra por un periodo de 3 horas para lograr la mejor extracción de aceite esencial posible.

Los antibióticos elegidos en este proyecto son los más utilizados y recetados comúnmente por los profesionales de la salud, por lo que es necesario un monitoreo en su comercialización, administración y resistencia dentro de la población (OMS, 2020). La penicilina, uno de los antibióticos que se utilizó en este proyecto y al que fueron

resistentes los microorganismos aislados pertenece a la familia de antibióticos beta-lactámicos los cuales actúan inhibiendo la última fase de la síntesis de la pared celular, tiene gran actividad antimicrobiana frente a microorganismos gram positivos, gram negativos, treponemas y anaerobios (Lopardo, 2016). Una de las causas de la resistencia a este antibiótico es la producción de las beta-lactamasas la cuales rompen el anillo beta-lactámico y como consecuencia producen la inactivación del antibiótico (Werth, 2022).

Un estudio realizado por la Universidad Central del Ecuador en los hospitales de la ciudad de Quito reveló que una alta cantidad de las bacterias *E. coli* y *K. pneumoniae* estudiadas fueron resistentes por mecanismos asociados a la betalactamasa correspondientes a resistencia a la penicilina (Tusa et al., 2021). La penicilina fue uno de los primeros antibióticos introducidos en el área de la salud, el uso excesivo de este antibiótico, no tomar los antibióticos como fueron recetados y la exposición en fuentes alimentarias, han provocado una creciente resistencia a este antibiótico en los últimos 40 años, por lo que la presencia de microorganismos resistentes a la penicilina es consistente con la bibliografía mencionada.

Un muestreo en las fuentes de agua cercanas a las grandes ciudades como el realizado en este proyecto puede darnos una una visión general de la salud de los ciudadanos, ya que si las aguas residuales de la ciudadanía son descargadas directamente o pasan por un proceso deficiente de tratamiento, como en el caso de Quito, esto servirá como un muestreo general de la población (Martínez-Orgániz et al., 2020)

Según Longaray Delamare et al., (2007) los aceites esenciales son compuestos formados por una mezcla de muchas sustancias, y poseen una composición química complicada. Los aceites esenciales son lípidos simples sin ácidos grasos y están compuestos por sustancias volátiles, la mayoría de las cuales derivan de tres clases principales de

compuestos: terpenoides, fenilpropanoides/bencenoides y derivados de ácidos grasos (Viuda-Martos et al., 2008). Aunque no se sabe concretamente el mecanismo de acción de los aceites esenciales frente a las bacterias, varios estudios mencionan que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se debe a su propiedad hidrofóbica; los componentes de los aceites esenciales se distribuyen en la bicapa lipídica de la membrana celular haciendola más permeable, ocasionando la pérdida del contenido celular vital y posterior muerte (B & R.M, 2011), (Burt, 2004). En otros estudios se menciona que los componentes de los aceites esenciales pueden desencadenar la formación de radicales libres dentro de las células bacterianas, lo que eventualmente causará un daño en la membrana celular. (Li et al., 2014)

Basado en la bibliografía encontrada el aceite esencial de pino resulta tener actividad antimicrobiana en cepas específicas de bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella Enteritidis*, *Candida albicans* (Amaya, 2011), al igual que muchos otros aceites esenciales que han resultado efectivos contra microorganismos resistentes: (Celina Luján-hidalgo et al., 1970; Longaray Delamare et al., 2007; Viuda-Martos et al., 2008; Albado et al., 2010; Boire et al., 2013). En todos estos estudios se ha identificado inhibición en el crecimiento de bacterias por parte de aceites esenciales, pero solo en cepas específicas, se debe considerar que todos estos estudios han sido efectivos en porcentajes variables entre 10 y 70% dependiendo la cepa, también se debe considerar que la cantidad de aceite esencial usada en estos estudios fue mucho mayor a la utilizada en este proyecto, en estos estudios se usaron entre 200 a 900  $\mu\text{L}$  mientras que en este proyecto se utilizaron cantidades mínimas (10, 15 y 20  $\mu\text{L}$ ), cabe recalcar que las pruebas para la evaluación del efecto antimicrobiano del aceite esencial se realizaron en medios líquidos por emulsión y no en medios sólidos como el protocolo utilizado en este proyecto.

En un estudio realizado por Núñez (2011) en el cual se evaluó la actividad antimicrobiana del aceite esencial en poblaciones bacterianas se pudo observar una disminución notable en el crecimiento de ciertas cepas mientras que otras mantuvieron un crecimiento exponencial, estos mismos resultados de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales en comunidades bacterianas se pueden ver en el estudio realizado por Garcia et al.(2012). La diferencia entre estos estudios y el presente proyecto es que se realizaron pruebas moleculares como extracción de ADN y cuantificación de las poblaciones bacterianas por qPCR para determinar el porcentaje exacto de efectividad del aceite esencial en cada una de las cepas de la comunidad bacteriana. Al obtener una alta variabilidad en la inhibición de cada cepa bacteriana y al no existir una inhibición uniforme de la comunidad compleja es necesario realizar estos estudios más detallados para conocer la efectividad del aceite esencial como antimicrobiano en comunidades bacterianas complejas , ya que al realizar un estudio tan general y poco específico como el antibiograma realizado en este proyecto podemos obtener resultados poco confiables, ya que por la variabilidad de la inhibición no se podrá formar el halo esperado comúnmente en este tipo de estudios y tampoco se podrá determinar con exactitud el porcentaje de efectividad antimicrobiano del aceite esencial en cada cepa que conforma la comunidad bacteriana.

## 7. Conclusiones

- La destilación por arrastre de vapor mostró ser un método sencillo para la obtención de aceite esencial de pino aunque la extracción fue lenta y con rendimiento bajo ya que se requirió una gran cantidad de acículas, agua destilada y un periodo de tiempo prolongado.
- En este trabajo fue posible aislar y detectar la presencia de comunidades bacterianas resistentes a la penicilina y que son originarias de aguas de ríos de Quito
- El aceite esencial de pino no mostró ninguna actividad antimicrobiana notable frente a las comunidades bacterianas resistentes a la penicilina encontradas en los ríos de la ciudad de Quito, por lo que la hipótesis del presente trabajo no se cumplió.

## **8. Recomendaciones**

- Se recomienda utilizar material vegetal fresco y realizar recolecciones semanales para evitar la descomposición del mismo.
- Se debe tener especial cuidado con bloquear la salida de presión en el proceso de destilación por arrastre de vapor ya que al acumularse presión se podrían generar accidentes.
- Es importante mantener un ambiente estéril y aseado en cada etapa del proceso, ya que al ser un proceso largo y con mucha manipulación se podría generar contaminación.
- Se recomienda utilizar una cantidad mayor de aceite esencial en las pruebas para la determinación del efecto antimicrobiano, así como realizarlas por emulsión y no en un medio sólido.
- Se sugiere realizar estudios de identificación y cuantificación molecular a los microorganismos, ya que utilizando el antibiograma como método de evaluación no se puede determinar eficientemente la actividad antimicrobiana del aceite esencial.

## 9. Referencias

- Acevedo, F., Gentina, J., & Illanes, A. (2002a). ARCHIVOS DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA. Ediciones Universitarias de Valparaíso. [www.euv.cl](http://www.euv.cl)
- Acevedo, F., Gentina, J., & Illanes, A. (2002b). *Fundamentos de Ingeniería Bioquímica* (Ediciones).
- Albado, E., Saez, G., & Grabiell, S. (2010). *Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del Origanum vulgare (orégano)*. Revista Medica Herediana .  
[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1018-130X2001000100004&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1018-130X2001000100004&script=sci_arttext)
- Álvarez, R., Martínez, M., Córdova, B., Corrales Humberto, & Ayón, F. (2001). Rendimiento de aceite esencial en Pinus caribaea MorElet según el secado al sol y a la sombra. III. *Revista Cubana de Farmacia* .  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75152001000100008](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152001000100008)
- Amaya, M. (2011). *EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES OBTENIDOS DE ACICULAS DE DOS ESPECIES DE PINOS* [Universidad de Guadalajara ].  
[http://repositorio.cucba.udg.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/5535/Amaya\\_Gutierrez\\_Maritza\\_Nataly.pdf?sequence=1](http://repositorio.cucba.udg.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/5535/Amaya_Gutierrez_Maritza_Nataly.pdf?sequence=1)
- B, J., & R.M, P. (2011). Phytochemical and Biopharmaceutical Aspects of Psidium guajava (L.) Essential Oil: A Review. *Research Journal of Medicinal Plants*, 5. <https://scialert.net/abstract/?doi=rjmp.2011.432.442>
- Bedón, E. (2019). *EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO Pinus radiata ANTE CEPAS DE Cándida albicans IN VITRO*. *EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO Pinus Radiata ANTE CEPAS DE Cándida Albicans IN VITRO*.  
<https://dspace.uniandes.edu.ec/bitstream/123456789/10052/1/PIUAMFC H002-2019.pdf>
- Boire, N., Riedel, S., & Parrish, N. (2013). *Essential Oils and Future Antibiotics: New Weapons against Emerging 'Superbugs'?*  
<https://doi.org/10.4172/2329-8731.1000105>
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253.  
<https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2004.03.022>

- Calderón, G., & Ulate, L. (2016). Resistencia Antimicrobiana. *REVISTA MEDICA DE COSTA RICA Y CENTROAMERICA LXXIII* , 621.
- Campaña, A., Gualoto, E., & Chiluisa-Utreras, V. (2017). Evaluación físico-química y microbiológica de la calidad del agua de los ríos Machángara y Monjas de la red hídrica del distrito metropolitano de Quito. Physic chemical and microbiological assessment of water quality in Machán-gara and Monjas rivers from Quito's metropolitan district. *Bionatura* , 2. <https://doi.org/10.21931/RB/2017.02.02.6>
- Celina Luján-hidalgo, M., Antonio Gutiérrez-miceli, F., María Cristina Ventura-canseco, L., Dendooven, L., Remedios Mendoza-lópez, M., Cruz-sánchez, S., García-barradas, O., & Abud-archila, M. (1970). *Composición química y actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de hojas de Bursera graveolens y Taxodium mucronatum de Chiapas, México Chemical composition and antimicrobial activity of Bursera graveolens and Taxodium mucronatum essential oils from Chiapas, México*. 69.
- Día Mundial de la Inocuidad de los Alimentos | Naciones Unidas. (2015). Inocuidad de Los Alimentos . <https://www.un.org/es/observances/food-safety-day>
- Ecuador Forestal. (2012). *Ficha Técnica No. 13 Pino (Pinus radiata)*. Ficha Técnica No. 13 (Pinus Radiata). <https://ecuadorforestal.org/fichas-tecnicas-de-especies-forestales/ficha-tecnica-no-13-pino-pinus-radiata/>
- Garcia, M., Orozco, C., & Molina, C. (2012). Efecto antibacteriano del aceite esencial de orégano (Lippia berlandieri) en bacterias patógenas de camarón Litopenaeus vannamei. *Hidrobiológica*, 3. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0188-88972012000300002](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-88972012000300002)
- Godziszewska, J., Pogorzelska-Nowicka, E., Brodowska, M., Jagura-Burdzy, G., & Wierzbicka, A. (2018). Detection in raw cow's milk of coliform bacteria - reservoir of antibiotic resistance. *Lwt-Food Science and Technology*, 93(April), 634–640. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.019>
- Gross, A., Kaplan, D., & Baker, K. (2007). Removal of chemical and microbiological contaminants from domestic greywater using a recycled vertical flow bioreactor (RVFB). *Ecological Engineering*, 31(2), 107–114. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLENG.2007.06.006>
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Argentina), C., & Migliorati, M. (2017). Revista de investigaciones agropecuarias. In *RIA. Revista de investigaciones agropecuarias* (Vol. 43, Issue 1). Instituto Nacional de

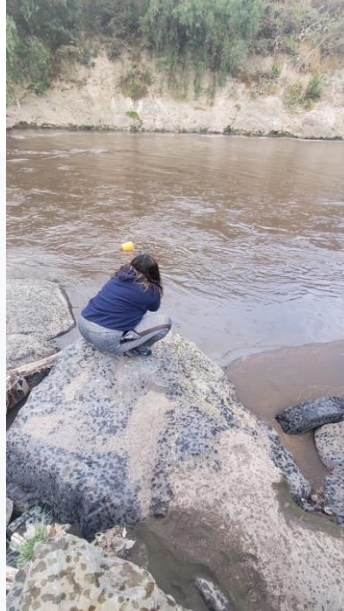
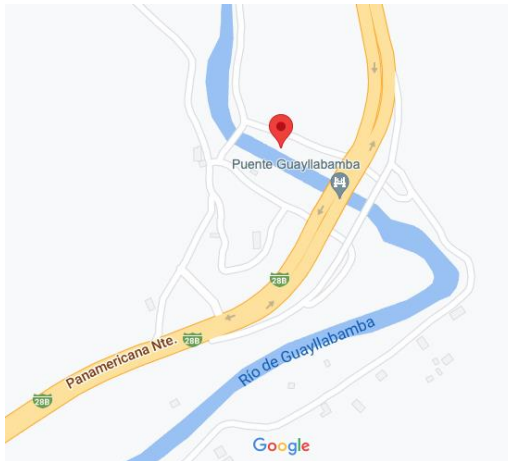
[http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1669-23142017000100002&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1669-23142017000100002&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

- Jiménez, J. (2019). *OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE Pinus patula Schl.et Chan EN LA COMUNIDAD DE ZULETA, PARROQUIA ANGOCHAGUA, PROVINCIA DE IMBABURA*. UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE.
- Jiménez, M. (2019). *OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE Pinus patula Schl.et Chan EN LA COMUNIDAD DE ZULETA, PARROQUIA ANGOCHAGUA, PROVINCIA DE IMBABURA*. Universidad técnica del norte .
- Li, H., Yang, T., Li, F. Y., Yao, Y., & Sun, Z. M. (2014). Antibacterial activity and mechanism of action of Monarda punctata essential oil and its main components against common bacterial pathogens in respiratory tract. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(11), 7389. /pmc/articles/PMC4270556/
- Longaray Delamare, A. P., Moschen-Pistorello, I. T., Artico, L., Atti-Serafini, L., & Echeverrigaray, S. (2007). Antibacterial activity of the essential oils of Salvia officinalis L. and Salvia triloba L. cultivated in South Brazil. *Food Chemistry*, 100(2), 603–608. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2005.09.078>
- Lopardo, A. (2016). *Antibióticos Clasificación, estructura, mecanismos de acción y resistencia Libros de Cátedra*. Editorial de la UNLP.
- Martínez-Orgániz, Á., Garza-Ramos, U., Sampedro-Rosas, M. L., González-González, J., Nava-Faustino, G., Toribio-Jiménez, J., Martínez-Orgániz, Á., Garza-Ramos, U., Sampedro-Rosas, M. L., González-González, J., Nava-Faustino, G., & Toribio-Jiménez, J. (2020). PATOTIPOS Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE Escherichia coli EN AGUA RESIDUAL. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 36(4), 957–966. <https://doi.org/10.20937/RICA.53711>
- NIH. (2022). *Bacteria | NHGRI*. NIH. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Bacteria>
- Núñez, M. (2011). *Evaluación preliminar de las poblaciones bacterianas asociadas al tracto intestinal de la tilapia (Oreochromis niloticus) expuesta a aceites esenciales de orégano en la dieta*. Universidad Nacional de Colombia.

- OMS. (2020). *Resistencia a los antibióticos*. Resistencia a Los Antibióticos. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>
- Perdones, A., Escriche, I., Chiralt, A., & Vargas, M. (2016). Effect of chitosan-lemon essential oil coatings on volatile profile of strawberries during storage. *Food Chemistry*, 197(Pt A), 979–986. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.11.054>
- Pérez, H., & Contreras, A. (2013). Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista Médica MD*, 4.5(3), 186–191.
- Prakash, B., Kedia, A., Mishra, P. K., & Dubey, N. K. (2015). Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities – Potentials and challenges. *Food Control*, 47, 381–391. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2014.07.023>
- Tusa, D., Gualpa, G., & Echeverria, I. (2021). Indicadores-de-resistencia-antimicrobiana. *Revista Ecuatoriana de Ciencia, Tecnología e Innovación*, 2.
- Vazquez, M. (2022). *Pruebas de sensibilidad o antibiogramas - Enfermedades infecciosas - Manual MSD*. Pruebas de Sensibilidad o Antibiogramas20. <https://www.msmanuals.com/es-ec/professional/enfermedades-infecciosas/diagn%C3%B3stico-de-laboratorio-de-las-enfermedades-infecciosas/pruebas-de-sensibilidad-o-antibiogramas>
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., & Perez-Álvarez, J. (2008). ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF LEMON (CITRUS LEMON L.), MANDARIN (CITRUS RETICULATA L.), GRAPEFRUIT (CITRUS PARADISI L.) AND ORANGE (CITRUS SINENSIS L.) ESSENTIAL OILS. *Journal of Food Safety*, 28(4), 567–576. <https://doi.org/10.1111/J.1745-4565.2008.00131.X>
- Werth, B. (2022). *Penicilinas - Enfermedades infecciosas - Manual MSD versión para profesionales*. Penicilinas. <https://www.msmanuals.com/es-ec/professional/enfermedades-infecciosas/bacterias-y-f%C3%A1rmacos-antibacterianos/penicilinas>
- Yuan, W., Zhang, Y., Riaz, L., Yang, Q., & Du, B. (2021). Multiple antibiotic resistance and DNA methylation in Enterobacteriaceae isolates from different environments. *Journal of Hazardous Materials*, 402(September 2020), 123822. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123822>

## ANEXOS

### Anexo 1 Localización e imagen de los ríos y pino utilizados para el muestreo.



**Nota:** Río Guayllabamba  
Coordenadas : 0.067999, -78.373544

**Nota:** Río Guayllabamba, Puente de Guayllabamba

**Elaborado por:** (La autora, 2023).

**Elaborado por:** (La autora, 2023).



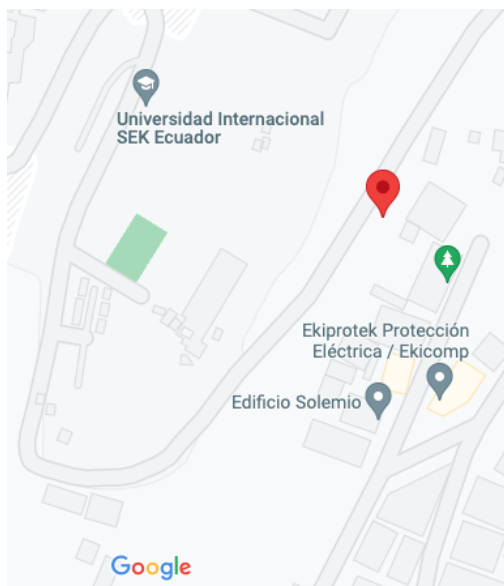
**Nota:** Río San Pedro, Cumbayá  
Coordenadas: -0.207399, -78.418898  
**Elaborado por:** (La autora, 2023).

**Nota:** Río San Pedro, Cumbayá  
**Elaborado por:** (La autora, 2023).



**Nota:** Río Machángara, Nayón  
 Coordenadas: -0.185340, -78.415035  
**Elaborado por:** (La autora, 2023).

**Nota:** Río Machángara, Nayón  
**Elaborado por:** (La autora, 2023).



**Nota:** Ubicación *Pinus radiata*  
 Coordenadas: -0.091368, -78.483226  
**Elaborado por:** (La autora, 2023).

**Nota:** Ubicación *Pinus radiata*  
**Elaborado por:** (La autora, 2023).

**Elaborado por:** (La autora, 2023).

## Anexo 2 Preparación de la materia vegetal



**Elaborado por:** (La autora, 2023).



**Elaborado por:** (La autora, 2023)

### Anexo 3 Destilación por arrastre de vapor



Elaborado por: (La autora, 2023)

### Anexo 4 Quimiostato simple de una etapa

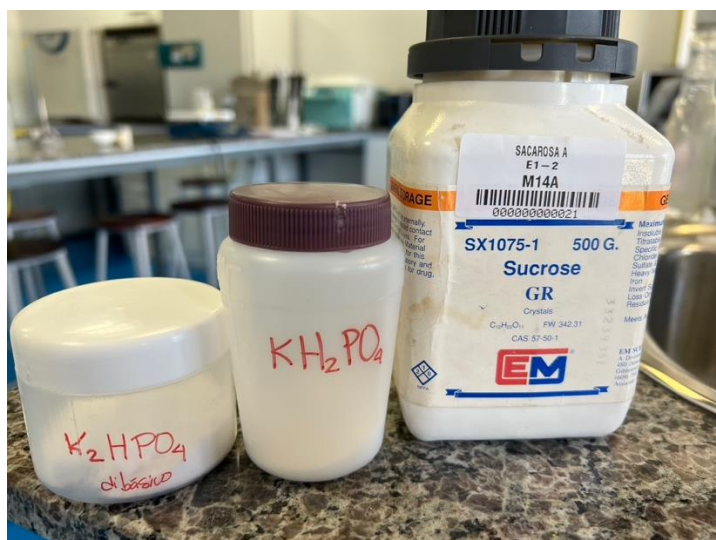


**Nota:** Montaje quimiostato simple de una etapa.  
**Elaborado por:** (La autora, 2023).



**Nota:** Solución de sulfato de cobre  
**Elaborado por:** (La autora, 2023).

### Anexo 5 Medio de cultivo



**Elaborado por:** (La autora, 2023)



**Nota:** Preparación de la quinoa (hervir)  
**Elaborado por:** (La autora, 2023).



**Nota:** Preparación de la quinoa (triturar)  
**Elaborado por:** (La autora, 2023).



**Nota:** Preparación de la quinoa (tamizar)  
**Elaborado por:** (La autora, 2023).

#### **Anexo 6** Pruebas de susceptibilidad a antibióticos.

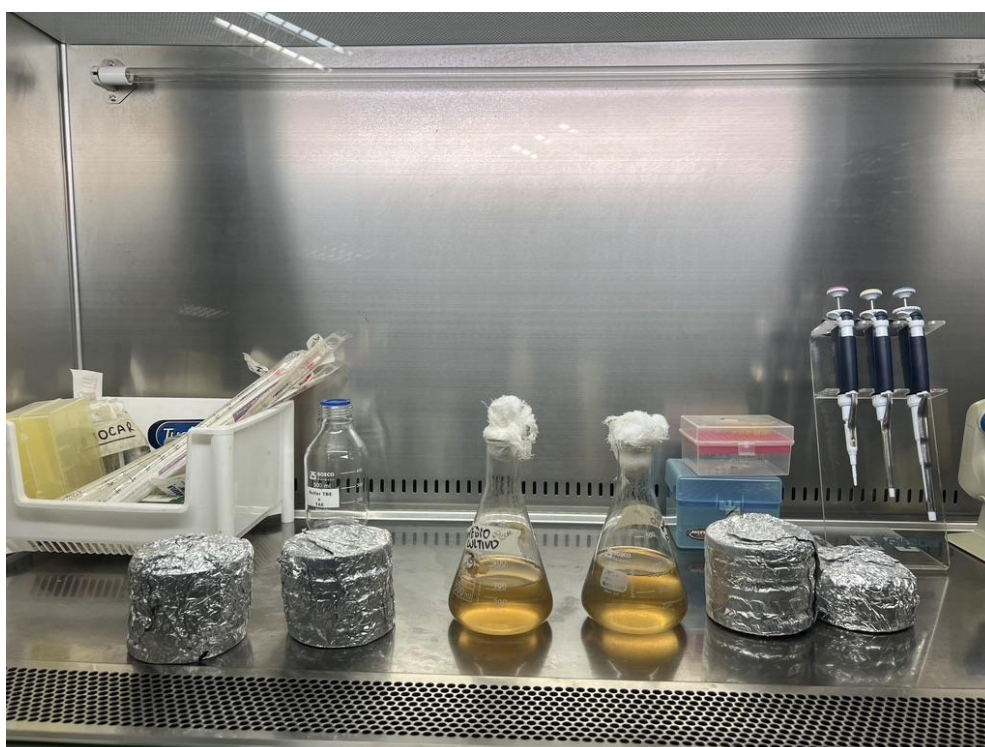


**Nota:** Preparación de los tubos según el protocolo. Antibióticos y medio de cultivo en cámara de flujo laminar  
**Elaborado por:** (La autora, 2023).



**Nota:** Preparación de los tubos según el protocolo. Inóculo cerca del mechero.  
**Elaborado por:** (La autora, 2023).

## Anexo 7 Antibiógrama



**Nota:** Preparación de las placas petri en cámara de flujo laminar  
**Elaborado por:** (La autora, 2023).



**Nota:** Preparación de los tubos según el protocolo. Inóculo cerca del mechero.  
**Elaborado por:** (La autora, 2023).

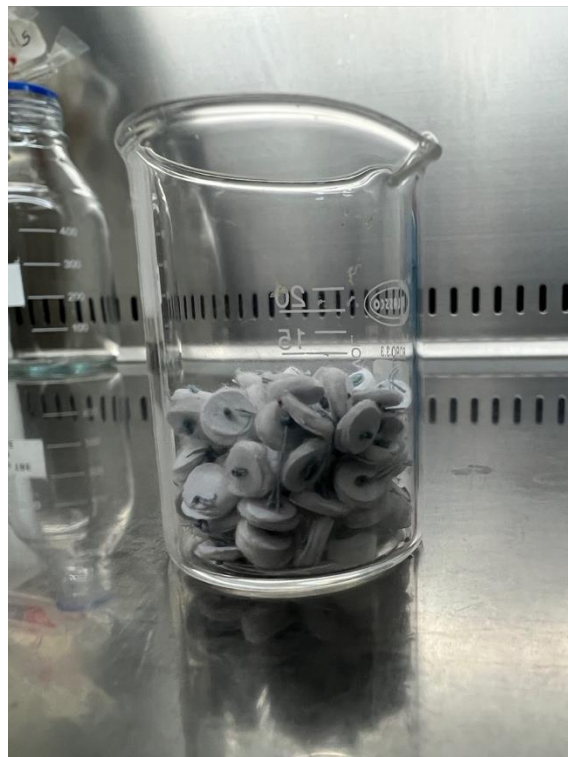
**Nota:** Inoculación de las placas.  
**Elaborado por:** (La autora, 2023).



**Nota:** Inoculación de las placas.  
**Elaborado por:** (La autora, 2023).



**Nota:** Inoculación de las placas.  
**Elaborado por:** (La autora, 2023).



**Nota:** Discos de difusión  
**Elaborado por:** (La autora, 2023).



**Nota:** Discos de difusión  
**Elaborado por:** (La autora, 2023).



**Nota:** Placas petri con los ml correspondientes de aceite, control positivo y control negativo. Posterior a eso se procedió a incubar por 24h.  
**Elaborado por:** (La autora, 2023).

## Anexo 8 Resultados antibiograma



**Nota:** Placa 10 ml se evidencia el halo en el control positivo. En los discos del aceite no se percibe ningún tipo de inhibición.

**Elaborado por:** (La autora, 2023).



**Nota:** Placa 15 ml se evidencia el halo en el control positivo. En los discos del aceite no se percibe ningún tipo de inhibición.

**Elaborado por:** (La autora, 2023).



**Nota:** Placa 20 ml se evidencia el halo en el control positivo. En los discos del aceite no se persibe ningún tipo de inhibición.

**Elaborado por:** (La autora, 2023).