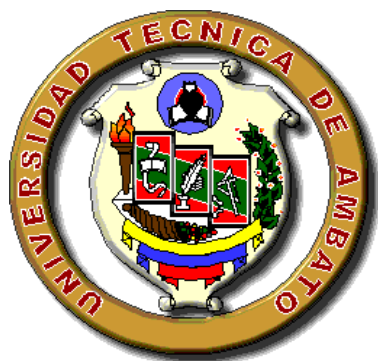


**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**



**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA**

**“Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial  
microencapsulado de Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus*) sobre bacterias Gram  
positivas aisladas de piel de conejo (*Oryctolagus cuniculus*)”**

**AUTORA:**

**KATHERINE SALOMÉ JARAMILLO PANIMBOZA**

**TUTORA:**

**MV. SANDRA MARGARITA CRUZ QUINTANA, PhD**

**Cevallos – Ecuador**

**2024**

**i**

Cevallos, 17 de Enero del 2024

**APROBACIÓN DEL TUTOR**

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE  
ESENCIAL MICROENCAPSULADO DE HIERBA LUISA (*Cymbopogon citratus*)  
SOBRE BACTERIAS GRAM POSITIVAS AISLADAS DE PIEL DE CONEJO  
(*Oryctolagus cuniculus*)”

**REVISADO POR**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Cruz', is positioned above a horizontal dotted line.

MV. Sandra Margarita Cruz Quintana, PhD

**TUTOR**

## AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

El suscrito, KATHERINE SALOMÉ JARAMILLO PANIMBOZA, portador de cédula de identidad número:180546285, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL MICROENCAPSULADO DE HIERBA LUISA (*Cymbopogon citratus*) SOBRE BACTERIAS GRAM POSITIVAS AISLADAS DE PIEL DE CONEJO (*Oryctolagus cuniculus*)” es original, auténtico y personal. En la virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas.



.....

KATHERINE SALOMÉ JARAMILLO PANIMBOZA

## DERECHOS DEL AUTOR

Al presentar este Informe Final del Trabajo de Titulación titulado “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL MICROENCAPSULADO DE HIERBA LUISA (*Cymbopogon citratus*) SOBRE BACTERIAS GRAM POSITIVAS AISLADAS DE PIEL DE CONEJO (*Oryctolagus cuniculus*)” como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Médico Veterinario, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

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

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



.....  
KATHERINE SALOMÉ JARAMILLO PANIMBOZA

## APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE  
ESENCIAL MICROENCAPSULADO DE HIERBA LUISA (*Cymbopogon  
citratius*) SOBRE BACTERIAS GRAM POSITIVAS AISLADAS DE PIEL DE  
CONEJO (*Oryctolagus cuniculus*)

REVISADO POR:



MV. Sandra Margarita Cruz Santana, PhD.

TUTOR




Ing. Patricio Núñez Torres PhD.

RESIDENTE TRIBUNAL

FECHA

07/02/2024



Mvz. Mg. Villavicencio Villavicencio Blanca Jeaneth

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

07/02/2024



BQF. Mg López Villacís Isabel Cristina

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

07/02/2024

## DEDICATORIA

Le dedico este documento que representa el esfuerzo de muchos años en primer lugar a Dios, que me ha dado las fuerzas para vivir un día a la vez pese a todos los obstáculos de la vida.

A mis padres Yolanda y Richar, quienes con paciencia y esmero me han educado para no rendirme, perseguir mis sueños y alcanzar mis metas.

A mi hermano David, mi compañero, amigo y cómplice, que me ha levantado y animado en los peores momentos, y con quien he compartido los momentos más alegres y gratificantes desde mi infancia.

A mi abuelita María, quien me ha brindado todo su respaldo, sabiduría y afecto incondicional siempre.

A mi esposo Iván, mi compañero de vida, con su amor y comprensión, me ha motivado innumerables veces para poder superar cada desafío juntos, como el equipo que somos. Este nuevo logro también es suyo.

A mis amigos Fernanda, Ronaldo y Kleiner, con quienes formamos un gran grupo, compartiendo gratos momentos, apoyándonos e incentivándonos a ser cada vez mejores personas, estudiantes y futuros profesionales.

A todas mis mascotas, en especial a mi fiel Linda, que me ha ayudado tanto en mi soledad como en mis prácticas, siempre paciente y serena compañera.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por brindarme la vida, la oportunidad de disfrutar de mi familia y amigos y por los bellos momentos que nos regala juntos.

Agradezco a mi familia, a mis padres, ejemplo de esfuerzo y dedicación, en mi crianza y educación, incondicionales en mi desarrollo ético y moral, quienes han dedicado toda su vida para encaminarme a ser una persona de bien. A mi hermano que, entre juegos y peleas, me enseñó que puedo contar con su apoyo siempre. A mi abuelita, quien me ha brindado su mano siempre, con su respaldo y apoyo incondicional. A mi esposo, por estar siempre a mi lado en cada paso, hacia esta meta y las que se aproximan.

Un agradecimiento muy profundo a mi tutora, quien me ha brindado su tiempo, paciencia y dedicación, siendo una guía y sin la cual no hubiera podido llegar hasta esta instancia tan anhelada.

A mis profesores y mentores, por compartir con nosotros sus conocimientos, sabiduría y experiencia, por enseñarnos a hacer todo con pasión y por encaminarnos a convertirnos en excelentes profesionales.

A mis amigos, por ser ese apoyo, motivación y compañía que se convirtió en la chispa que impulsó cada paso hacia esta nueva meta.

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

CAPITULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1    Antecedentes investigativos .....	1
Marco teórico.....	4
Hierba Luisa ( <i>Cymbopogon citratus</i> ).....	4
Clasificación taxonómica .....	4
Hidrodestilación .....	4
Actividad biológica y antimicrobiana del aceite esencial de la Hierba Luisa ( <i>Cymbopogon citratus</i> ).....	5
Microencapsulación.....	5
Tinción de Gram.....	6
Identificación molecular de bacterias Gram positivas por amplificación del gen 16s del ARN ribosomal.....	6
Concentración mínima inhibitoria.....	7
Macrodilución en tubo para obtener la CMI .....	7
Método de difusión en agar .....	7
Enfermedades bacterianas de la piel del conejo ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> ).....	8
Pododermatitis .....	8
Clostridiosis .....	8
Dermatitis supurativa.....	8
Mastitis en conejas reproductoras.....	9
1.2    Objetivos.....	9
1.2.1    Objetivo general .....	9
1.2.2    Objetivos específicos.....	9
Hipótesis.....	10
CAPITULO II .....	11
METODOLOGÍA .....	11
Ubicación del experimento.....	11
Características del lugar .....	11



2.1	Materiales .....	11
2.2	Métodos .....	13
	Factores de estudio .....	13
	Cepas bacterianas.....	13
	Tratamientos y diseño experimental.....	13
	Identificación molecular de bacterias Gram positivas aisladas de la piel de conejo ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> ) .....	13
	Preparación de agua peptonada .....	13
	Obtención y recolección de las muestras.....	14
	Incubación de las muestras.....	15
	Preparación de agares.....	15
	Preparación de Agar Manitol Salado TM® .....	15
	Preparación de agar sangre .....	16
	Obtención de la sangre de ovino.....	16
	Preparación del agar Sangre con sangre de ovino al 5% .....	16
	Preparación de agar Trypticasa de soya TM® .....	16
	Siembra en agar sangre y Manitol TM® .....	16
	Siembra en agar Trypticasa de soya TM® .....	17
	Prueba fenotípica.....	17
	Tinción Gram.....	17
	Prueba bioquímica.....	17
	Identificación molecular.....	17
	Preparación del caldo cerebro corazón TM®.....	18
	Preparación de la dilución del caldo cerebro corazón con glicerol al 15% .....	18
	Microencapsulación del aceite esencial de Hierba luisa .....	19
	Dilución del aceite esencial de Hierba luisa microencapsulado.....	19
	Evaluación la actividad antimicrobiana del aceite esencial de Hierba luisa ( <i>Cymbopogon citratus</i> ).....	20
	Preparación del agar Mueller Hinton TM® .....	20
	Método de difusión en agar .....	20
	Elaboración de pocillos en agar.....	20
	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial microencapsulado de Hierba Luisa. ....	20
	Procedimiento.....	21
	Análisis de unidades formadoras de colonias.....	21

CAPÍTULO III.....	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
3.1    Análisis y discusión de los resultados .....	23
Identificación molecular de las bacterias Grampositivas de las muestras aisladas de la piel de los conejos ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> ).....	23
Verificación de la hipótesis .....	35
CAPÍTULO IV.....	36
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	36
Conclusiones.....	36
Recomendaciones .....	36
ANEXOS.....	46

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la hierba luisa ( <i>Cymbopogon citratus</i> ).....	4
Tabla 2. Material animal.....	11
Tabla 3. Material biológico.....	11
Tabla 4. Aceite esencial.....	11
Tabla 5. Materiales de laboratorio y reactivos.....	12
Tabla 6. Equipos y materiales de oficina.....	12
Tabla 7. Conejos muestreados .....	14
Tabla 8. Clasificación taxonómica de <i>Paenibacillus profundus</i> aislado de la piel de conejos ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> ).....	24
Tabla 9. Clasificación taxonómica de <i>Staphylococcus succinus</i> aislado de la piel de conejos ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> ).....	24
Tabla 10. Bacterias Gram positivas aisladas molecularmente de la piel de los conejos ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> ).....	25
Tabla 11. Actividad antimicrobiana por difusión agar de las concentraciones del aceite esencial de Hierba luisa ( <i>Cymbopogon citratus</i> ) microencapsulado sobre <i>Paenibacillus profundus</i> aislado de la piel de conejo ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> ) .....	27
Tabla 12. Actividad antimicrobiana por difusión agar de las concentraciones del aceite esencial de Hierba luisa ( <i>Cymbopogon citratus</i> ) microencapsulado sobre <i>Staphylococcus succinus</i> aislado de la piel de conejo ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> ).....	28
Tabla 13. Efecto del aceite microencapsulado de la Hierba luisa sobre UFC/ml en <i>Paenibacillus</i> versus el control positivo .....	31
Tabla 14. Efecto del aceite microencapsulado de la Hierba luisa sobre UFC/ml en <i>Staphylococcus</i> versus el control positivo.....	31
Tabla 15. Comparación entre concentraciones del aceite de Hierba Luisa frente a las UFC de <i>Paenibacillus profundus</i> .....	32
Tabla 16. Comparación entre concentraciones de aceite de Hierba Luisa frente a las UFC de <i>Staphylococcus succinus</i> .....	33

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Resultados de las UFC de <i>Staphylococcus succinus</i> . Comparación entre control positivo y la concentración al 10% .....	34
Figura 2. Resultados de las UFC de <i>Paenibacillus profundus</i> . Comparación entre control positivo y la concentración al 10% .....	34

## ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1: Transformación del promedio del conteo de UFC a UFC/ml .....	22
--	----

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) en macrodilución en tubo de <i>Paenibacillus profundus</i> .....	29
Gráfico 2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) en macrodilución en tubo de <i>Staphylococcus succinus</i> .....	30

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Fotografías de los conejos y lesiones .....	46
Anexo 2. Colonias y tinción Gram de las muestras sembradas en agar sangre y manitol.....	50
Anexo 3. Placas de difusión en agar con sus réplicas.....	63
Anexo 4 Placas para conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).....	64
Anexo 5. Estadística.....	67

## RESUMEN

La investigación tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial microencapsulado de Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus*) sobre bacterias Gram positivas aisladas de piel de conejo (*Oryctolagus cuniculus*), se identificó molecularmente mediante marcador 16s dos bacterias grampositivas (*Paenibacillus profundus* y *Staphylococcus succinus*), el método de difusión en agar en pocillos para medir actividad antimicrobiana, determinó que las dos cepas bacterianas no formaron halos de inhibición, la concentración mínima inhibitoria (CMI) en medio líquido se determinó al 5% para la cepa *P. profundus* con una densidad óptica de 0,251, con respecto a la cepa *S. succinus* se estableció que al 25% de concentración del aceite hubo crecimiento bacteriano a una densidad óptica de 0.487, las unidades formadoras de colonias (UFC) para la cepa *S. succinus* se determinó al 15% de la concentración del aceite, con un rango promedio de 2.00 UFC, siendo el mejor tratamiento, mientras que para la bacteria *P. profundus* se la estableció desde 15%, 20% y 25%, al no existir en ninguna de ellas el crecimiento de UFC.

**Palabras claves:** Difusión en agar, Concentración mínima inhibitoria, Unidades formadoras de colonias, Aceite esencial microencapsulado, Actividad antimicrobiana.

## ABSTRACT

The objective of the research was to evaluate the antimicrobial activity of the microencapsulated essential oil of Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) on Gram-positive bacteria isolated from rabbit skin (*Oryctolagus cuniculus*), two Gram-positive bacteria (*Paenibacillus profundus* and *Staphylococcus succinus*) were molecularly identified using a 16s marker, the agar diffusion method in wells to measure antimicrobial activity, determined that the two bacterial strains did not form halos of inhibition, the minimum inhibitory concentration (MIC) in liquid medium was determined at 5% for the *P. profundus* strain with an optical density of 0.251, with respect to the *S. succinus* strain it was established that at 25% concentration of the oil there was bacterial growth at an optical density of 0.487, the colony forming units (CFU) for the *S. succinus* strain were determined at 15% of the oil concentration, with an average range of 2.00 CFU, being the best treatment, while for the *P. profundus* bacteria it was established from 15%, 20% and 25%, as it does not exist in any of them. the growth of UFC.

**Keywords:** Agar diffusion, Minimum inhibitory concentration, Colony forming units, Microencapsulated essential oil, antimicrobial activity.



# CAPITULO I

## MARCO TEÓRICO

### 1.1 Antecedentes investigativos

La presente investigación se realizó en el Ecuador y tuvo como objetivo analizar la actividad antimicrobiana de doce especies vegetales, entre las que se demostró que *Cymbopogon citratus* S (nombre científico de la Hierba Luisa) fue recolectada de manera aleatoria en las localidades de Machala y Santa Rosa, sus hojas fueron lavadas, puestas a secar, posteriormente molidas, y extraídas por maceración con etanol, el producto fue filtrado a una presión reducida; para realizar la prueba de actividad antimicrobiana utilizaron la técnica de difusión en agar, contra cepas bacterianas del tipo Gram positivas como: *Staphylococcus aureus*, y Gram negativas: *Escherichia coli* y *P. aeruginosa*, y finalmente una cepa de *Candida albicans*, todos los extractos mostraron actividad antimicrobiana en contra de todas las cepas tanto Gram positivas como Gram negativas, con lo cual concluyen los autores que es un fitofármaco importante a considerar (Azuero et al., 2016).

El estudio tuvo como objetivo microencapsular el aceite esencial de *Cymbopogon citratus*, lo aplicaron sobre recubrimientos de tipo antimicrobainos que son sensibles a la presión realizando dos tipos de técnica: la primera se trató de una coacervación compleja de gelatina con carboximetilcelulosa o con goma arábiga, y la segunda una polimerización in situ de prepolímeros de melamina-formaldehído con un modificador de ácido poliacrílico, una vez realizado éste proceso midieron la concentración mínima inhibitorias (CMI) sobre algunas bacterias: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aureginosa* y *Saccharomyces cerevisiae*, recubrieron en los papeles de embalaje los aceites microencapsulados a una dosis de 2 y 30 g por cada metro cuadrado, procediendo a activarlas con movimiento, es decir, con la tracción, por último, se recubrieron suspensiones de microcápsulas sobre papeles para embalajes flexibles, de 2 y 30 g/metro al cuadrado, y se activaron mecánicamente en la prueba de tracción de peso, por difusión agar demostró actividad antimicrobiana y los aceites microencapsulados mostraron efecto sobre *Bacillus subtilis* y *Pseudomona aureginosa* de manera exitosa (Šumiga et al., 2019).

El presente estudio tuvo como objetivo microencapsular el aceite esencial de Hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) mediante la técnica spray drying, para lo cual utilizaron gelatina y maltodextrina, con una temperatura de entrada de 130-160 °C, y concentraciones del aceite desde el 5% al 15%, de maltodextrina del 10 al 20% concentración de CCEO (5–15%), concentración de maltodextrina (10–20%), los resultados obtenidos mostraron actividad antimicrobiana sobre cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, con la presencia de CMI desde el 10 al 20% (Alencar et al., 2022).

La siguiente investigación tuvo como objetivo encapsular al aceite esencial de (*Cymbopogon citratus*), y determinar su actividad antimicrobiana, el aceite fue obtenido por el método de hidrodestilación, las cepas de *Clostridium perfringens*, *Salmonella Typhimurium* y *L. innocua* se mostraron resistentes al aceite encapsulado con goma arábica; en el caso de los grupos bacterianos Gram negativos: *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, fueron resistentes al aceite microencapsulado en la mezcla de ambos materiales, es decir, goma arábica y maltodextrina, finalmente las cepas *Bacillus cereus* y *Clostridium jejuni* B fueron cepas de alta sensibilidad, mostrando amplias zonas de inhibición por el método de difusión en agar (20 mm), a los cuales se los clasificó como grupos bacterianos susceptibles (de Melo et al., 2022).

El aceite esencial (AE) de Hierba luisa o del limoncillo (*Cymbopogon citratus*), es bien conocido por su actividad antimicrobiana, el AE encapsulado fue realizado mediante coacervación simple, para lo cual utilizaron alcohol vinílico con un peso de PVA, 78.000 Da y 88% molar de grado de hidrólisis reticulado con glutaraldehído. Se utilizó dodecilsulfato de sodio y polivinilpirrolidona para no permitir la aglomeración de las microcápsulas durante todo el proceso de microencapsulación, la capacidad antimicrobiana funcionó exitosamente sobre las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 (American Type Culture Collection) y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, además las propiedades del producto obtenido no fue afectado por el proceso de microencapsulado sobre el grupo de bacterias mencionadas (Leimann et al., 2019).

En la siguiente investigación realizaron la obtención de un extracto con etanol de la especie vegetal *Cymbopogon citratus*, y las utilizaron sobre varias cepas presentes en heridas por quemaduras: bacterias Gram positivas *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* y también cepas Gram negativas: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella aerogenes*, *Citrobacter freundii*, la investigación tuvo como objetivo medir los halos de inhibición de la actividad antimicrobiana de cada una de ellas, tanto los extractos etanólicos como los acuosos mostraron actividad sobre las siguientes bacterias tanto positivas como negativas, pero no fue efectivo en *E. faecalis* y *S. pyogenes* (Lone, 2017).

El objetivo del trabajo de investigación fue evaluar la actividad antimicrobiana como la caracterización física del aceite de citral (*Cymbopogon citratus*) microencapsulado con dextrina, mediante la técnica de secado por aspersión, la actividad antimicrobiana mostrada ante bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* a través de la técnica de difusión en agar determinaron un efecto inhibitorio de amplio espectro, de los cuales las cepas de *Bacillus cereus* y *Escherichia coli* fueron las de mayor sensibilidad, presentándose en una proporción que fue desde el 55 y 75% (Yoplac et al., 2021).

El estudio realizado en Nigeria utilizó las hojas del *Cymbopogon citratus* por ser una de las especies vegetales de uso más común, con el objetivo de analizar las características y la actividad antimicrobiana mediante la técnica de difusión en agar a partir de aislados de las siguientes bacterias: *S. aureus* y *E. coli*, los resultados establecieron que el aceite mostró los siguientes metabolitos secundarios: taninos, flavonoides, saponinas, glucósidos, alcaloides y esteroides; el efecto antimicrobiano dado por el poder de inhibición a través de la medición de halos fue para la cepa de *Escherichia coli* con la presencia de un halo de 21 mm en una concentración de 300 mg/ml (Hassan et al., 2023).

## Marco teórico

### Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus*)

Existen un total de 140 especies que pertenecen a la especie vegetal *Cymbopogon* (Ganjewala & Luthra, 2010). La Hierba luisa (*C. citratus*), conocida en otros países como la hierba limón o limoncillo, es una especie vegetal de tipo medicinal, con hojas largas y delgadas, que se cultiva en varias zonas ubicadas en continentes como África, Asia y América, luciendo como una planta alta con la presencia de una raíz bien fibrosa y de tipo copetuda (Aćimović et al., 2019).

*C. citratus* forma rizomas, además posee tallos subterráneos, con presencia de hojas verdes ásperas de tipo ligeramente coriáceas, y que se presenta en racimos densos, ésta planta es originaria de la India, pero ahora se encuentra distribuida en zonas tropicales y subtropicales de los continentes en el anterior párrafos mencionados, la presencia del aceite esencial en la planta proviene en sí de su parénquima conformado por células oleosas que suelen encontrarse en tallos (Tajidin et al., 2012)

Así es que el aceite esencial de la planta del limoncillo se la extrae mayormente de sus hojas, en las cuales se encuentra un total del 12% (p/p) del aceite, este aceite se muestra de color jerez, con un aroma parecido a limón y de sabor picante (Skaria et al., 2006).

**Tabla 1. Clasificación taxonómica de la hierba luisa (*Cymbopogon citratus*)**

Clasificación taxonómica	
<b>Reino:</b>	Plantae
<b>Phylum:</b>	Spermatophyta
<b>División:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Liliopsida
<b>Orden:</b>	Poales
<b>Familia:</b>	Poaceae
<b>Género:</b>	<i>Cymbopogon</i>
<b>Especie:</b>	<i>Cymbopogon citratus</i>

(Karunamoorthi et al., 2010)

### **Hidrodestilación**

Es conocido como una metodología que se derivó del arrastre de vapor, ambos métodos mantienen el mismo principio, simplemente que al finalizar el proceso de hidrodestilación en el refrigerante existe una trampa, obteniendo una concentración del 100% de proceso del destilado, el tiempo de extracción suele demorar varias horas, pero su principal ventaja es que es un equipo simple y altamente flexible al momento de obtener aceites con diferentes características de densidad, para esta metodología se suele utilizar un equipo conocido como Clevenger, el cual favorece la optimización del proceso (**Sarmiento, 2016**).

### **Actividad biológica y antimicrobiana del aceite esencial de la Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus*)**

Al estudiar la planta de Hierba luisa, se destaca que es bien reconocida por su efecto antimicrobiano eficaz sobre bacterias Gram negativas y Gram positivas (**Mayaud et al., 2008**). En el caso de la cepa *Escherichia coli*, mantiene un efecto de más del 80% de eficacia, el aceite esencial incluso fue más efectivo que antibióticos como la eritromicina y tetraciclina sobre *E. faecali* y *S. typhimurium* (**De Oliveira et al., 2013**). De manera general todas las actividades antimicrobianas del *C. citratus* se deben a la presencia de los principales metabolitos secundarios geraniol ( $\alpha$ -citral), neral ( $\beta$ -citral), 1, 8-cineol, p-cimeno,  $\alpha$ - y  $\beta$ -pineno, limoneno,  $\alpha$ - terpineol y canfeno (**Cimanga et al., 2002**).

### **Microencapsulación**

Los aceites esenciales provenientes de una infinidad de plantas y de diferentes partes extraídas de las mismas, se comportan como sustancias de alta volatilidad y de cierta complejidad, así es que existen productos como los de la industria médica, textil, agroquímica, alimentaria y de tipo farmacéutica, en las cuales los AE (aceites esenciales) tienen varios usos, sin embargo, los compuestos secundarios volátiles se pierden por su manipulación, a éstos inconvenientes, la técnica de microencapsulado evita esos limitantes de volatilización, los cuales son retenidos y controlados gracias a este proceso (**Sousa et al., 2022**).

La técnica de microencapsulado se basa en el recubrimiento de cualquier sustancia sea esta sólida, líquida o gaseosa, siendo realizada a través de sustancias conocidas como encapsulantes (los cuales existen de varios tipos), actuando como barrera que permite aislar el material existente en el núcleo, del medio exterior (**Dima & Dima, 2015**). Los materiales utilizados en el proceso de microencapsulado suelen ser de polímeros naturales, sintéticos o pueden ser semisintético; de la elección de uno de ellos dependerá de manera directa que el interior del material del núcleo se mantenga estable, de manera general los materiales más utilizados para encapsular son la goma arábica, alginato, agar, dextrinas y ciertos tipos de proteínas (**Ponce Cevallos et al., 2010**).

### **Tinción de Gram**

Esta prueba sigue siendo muy útil en todos los laboratorios donde se trabaja con muestras de tipo microbiológicas, siendo considerada como una tinción diferencial, la cual, para su ejecución utiliza dos tipos de colorantes, los cuales permiten pigmentar a dos grupos grandes de bacterias (Gram positivas y Gram negativas) (**Beveridge, 2001**), la técnica fue desarrollado por el científico danés Hans Christian Gram en el año 1884, hasta hoy en día la tinción Gram sigue siendo de gran utilidad a nivel mundial, además, con beneficios como su bajo costo, así como su efectividad y sencillez al realizarla (**Esaú López-Jácome et al., 2014**).

### **Identificación molecular de bacterias Gram positivas por amplificación del gen 16s del ARN ribosomal**

La metodología determina la secuenciación del ácido nucleico del gen bacteriano 16S rRNA, éste ha sido utilizado durante más de 20 años para identificar filogénicamente a las bacterias presente en muestras clínicas como ambientales, los investigadores Carl Woese y George Fox fueron los pioneros en comparar secuencias de 16s, mucho antes de secuenciar el ADN y lo hicieron para poder dar una clasificación a las bacterias del grupo metanogénicas (**Singer & Crooks, 1983; Fox et al., 1977**).

### **Concentración mínima inhibitoria**

La concentración mínima inhibitoria (CMI) es una medida de la susceptibilidad de una bacteria a un antibiótico específico, verificando la concentración más baja de un antibiótico, que inhibe el crecimiento visible de una bacteria en un medio de cultivo. La CMI se determina mediante pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, que se realiza en laboratorio utilizando diferentes métodos, como la microdilución para el análisis en varias cepas, o por diluciones seriadas en tubos para una menor cantidad de muestras (**Horna Quintana et al., 2012**). Otra manera de evaluar la CMI es mediante el método de placa de gradiente, el cual utiliza medios de caldo Mueller-Hinton (Biokar, Beauvais, Francia) y caldo Sabouraud (Biokar, Beauvais, Francia) para bacterias y levaduras, incubándolos a 37 °C durante 24 h para bacterias, y a 25 °C durante 48 h para levaduras (**Assaggaf et al., 2022**).

### **Macrodilución en tubo para obtener la CMI**

La técnica de macrodilución en espectrofotómetro, es muy utilizada cuando se trata de realizar concentraciones crecientes de un extracto o aceite vegetal, para realizarla, los organismos son inoculados en un tubo de ensayo esterilizado, posterior a la incubación, determinando la concentración mínima inhibitoria (MIC) a través de lectura en nanómetros (nm) (Ahmad et al., 2006). Ésta es una técnica muy útil al momento de considerar estudios de sensibilidad para cantidades pequeñas, especialmente con productos naturales o herbarios, además permite diferenciar de manera clara los efectos bactericidas y bacteriostáticos de los grupos bacterianos en estudio (**Langfield et al., 2004**).

### **Método de difusión en agar**

Este método se basa en la técnica de Kirby-Bauer, existiendo dos tipos diferentes: difusión en disco y difusión en pozos; el método determina de manera cuantitativa el efecto de sustancias sobre grupos bacterianos diagnosticados de muestras o hisopados provenientes de procesos infecciosos, para los cual se siembra en la superficie de la caja petri con agar nutritivo, se ubica 20 µl del microorganismo con la dilución de la sustancia en estudio y se deja incubar por 24 horas a una temperatura de 37°C,

posteriormente se realiza la lectura de los halos de inhibición presentes (**Ramírez & Marin Castaño, 2009**).

### **Enfermedades bacterianas de la piel del conejo (*Oryctolagus cuniculus*)**

#### **Pododermatitis**

Afecta a la parte plantar de las extremidades de los conejos, especialmente las posteriores, al inicio se presentan como un sintomatología de compresión, generando isquemia debido al roce con la jaula, generalmente suelen contaminarse éstas heridas con bacterias como *Staphylococcus aureus* empeorando el cuadro de la enfermedad, el tratamiento se realiza de manera inmediata al aparecer la primeras signologías, a base de antibióticos, pero al deberse a una condición hereditaria la presencia de la enfermedad, los animales tienen que ser eliminados de la granja debido a la reincidencia y la afectación a la canal de los conejos afectados (**Papeschi, 2010**).

#### **Clostridiosis**

Esta enfermedad está producida por el género *Clostridium* sp. y las toxinas que liberan, causando la muerte por enterotoxemia, es un bacilo Gram positivo, anaerobio, está presente en el contenido del intestino de conejos sanos, las especies principales son el *C. spiroforme* y *C. perfringens* cuya toxina iota aporta una mayor virulencia, se presentan con baja mortalidad en gazapos recién destetados, pero el abuso de antibióticos produce una disbiosis intestinal, provocando un crecimiento acelerado de este agente, derivando en la muerte de más de un 50% de conejos (gazapos y adultos), provocado por un mal manejo o de manera iatrogénica, como forma de tratamiento se recomienda el aporte de una dieta rica en fibra, también se puede tratar con antibióticos del grupo de los imidazoles, además, se recomienda el uso de vacunas preventivas que existen de manera comercial (**Sánchez & Selva, 2020**).

#### **Dermatitis supurativa**

El agente causante es el *Staphylococcus aureus*, produce en conejos (principalmente gazapos) dermatitis supurativa, presentándose con abscesos pequeños distribuidos en todo el abdomen, zona interna de las extremidades y la mandíbula, al transcurrir diez días las lesiones toman un color oscuro, la enfermedad puede producir septicemia con



presencia de otros abscesos en pulmones y el corazón, además puede distribuirse en riñón y cerebro, el tratamiento se basa en antibióticos de tipo oral y parenteral, que no sean antibetalactámicos (Corpa et al., 2019).

### **Mastitis en conejas reproductoras**

Se trata de una enfermedad importante en conejas reproductoras adultas, la cual se convierte de manera rápida en un proceso supurativo crónico, es considerada como una patología de pérdidas económicas importantes en las granjas cunícolas, el agente causal principal es *Staphylococcus aureus*, la mastitis se produce en animales en estado de lactancia y el tratamiento es a base de antibióticos como la enrofloxacin o cefalosporinas por vía parenteral, pero a pesar de los tratamientos, existe elevada eliminación de conejas en la granja (González et al., 2019).

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo general**

Evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial microencapsulado de Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus*) sobre bacterias Gram positivas aisladas de piel de conejo (*Oryctolagus cuniculus*).

### **1.2.2 Objetivos específicos**

Identificar molecularmente las bacterias Gram positivas aisladas de la piel de conejo (*Oryctolagus cuniculus*).

Evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de microencapsulado de Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus*) sobre bacterias Gram positivas aisladas de piel de conejo por el método de difusión en agar (Kirby-Bauer).

Determinar la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de microencapsulado de Hierba Luisa.

**Hipótesis**

**H0:** El aceite esencial microencapsulado de Hierba luisa no tiene efecto antimicrobiano sobre las bacterias Gram positivas aisladas de piel de conejo.

**H1:** El aceite esencial microencapsulado de Hierba luisa tiene efecto antimicrobiano sobre las bacterias Gram positivas aisladas de piel de conejo.

## CAPITULO II

### METODOLOGÍA

#### Ubicación del experimento

El trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato (UTA), ubicada en Querochaca del cantón Cevallos, provincia de Tungurahua (GAD-Cevallos, 2024).

#### Características del lugar

El cantón Cevallos mantiene una temperatura aproximada de 19 a 24°C, humedad relativa de 75%, altitud de 2865 msnm, con precipitaciones anuales de 571.2 mm y mantiene una velocidad del viento de 3.0 km/h (GAD-Cevallos, 2024).

#### 2.1 Materiales

**Tabla 2. Material animal**

Material animal
15 conejos ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )

**Tabla 3. Material biológico**

Material biológico
<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Paenibacillus profundus</i></li><li>• <i>Staphylococcus succinus</i></li></ul>

**Tabla 4. Aceite esencial**

Aceite esencial
Aceite microencapsulado de Hierba Luisa ( <i>Cymbopogon citratus</i> )

**Tabla 5. Materiales de laboratorio y reactivos**

<b>Materiales de laboratorio</b>	<b>Reactivos</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Cajas petri desechables</li><li>• Micropipetas</li><li>• Puntas de micropipeta amarillas y azules</li><li>• Tubos de ensayo con tapones de gasa</li><li>• Gradilla</li><li>• Cooler</li><li>• Hisopos estériles</li><li>• Papel aluminio</li><li>• Guantes desechables</li><li>• Film</li><li>• Mascarillas</li><li>• Cofias</li><li>• Mandil</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Cristal violeta</li><li>• Lugol</li><li>• Agua peptonada</li><li>• Alcohol-acetona</li><li>• Agar manitol salado</li><li>• Agar sangre</li><li>• Agar tripticasa soya</li><li>• Agar Mueller Hinton</li><li>• Agar cerebro corazón</li><li>• Agua oxigenada</li><li>• Agua destilada</li><li>• Caldo cerebro corazón</li></ul>

**Tabla 6. Equipos y materiales de oficina**

<b>Equipos</b>	<b>Materiales de oficina</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Autoclave</li><li>• Cámara de flujo laminar</li><li>• Espectrofotómetro de un pocillo</li><li>• Estufa bacteriológica</li><li>• Incubadora bacteriológica</li><li>• Microscopio</li><li>• Nevera/congelador</li><li>• Vórtex</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Laptop</li><li>• Hojas de papel bond</li><li>• Esferos</li><li>• Lápices</li><li>• Marcadores</li><li>• Carpetas</li><li>• Material bibliográfico</li></ul>

En las Tablas 1 a 6 se puede observar la lista de materiales utilizados

## 2.2 Métodos

### Factores de estudio

Aceite esencial microencapsulado de Hierba luisa

- **Control negativo (CN):** Caldo cerebro corazón + dilución del aceite (25%)
- **Control positivo (CP):** Ceba + caldo cerebro corazón
- **T1:** Concentración al 5%
- **T2:** Concentración al 10 %
- **T3:** Concentración al 15%
- **T4:** Concentración al 20 %
- **T5:** Concentración al 25%

### Cepas bacterianas

**B668** *Paenibacillus profundus*

**B672** *Staphylococcus succinus*

### Tratamientos y diseño experimental

Se compuso de 5 tratamientos, T1: Concentración al 5%, T2: Concentración al 10%, T3: Concentración al 15%, T4: Concentración al 20%, T5: Concentración al 25%, Control negativo (CN) Caldo cerebro corazón + dilución del aceite (25%) y Control positivo (CP): cepa + caldo cerebro corazón, los datos fueron tabulados en Microsoft Excel 2016 y se aplicó la prueba de Kruskal Wallis complementada con la prueba U de Mann Whitney para la significancia al 0.5%.

### Identificación molecular de bacterias Gram positivas aisladas de la piel de conejo (*Oryctolagus cuniculus*)

#### Preparación de agua peptonada

Se preparó 15 gramos en un litro (1000 ml) de agua peptonada TM® según lo que muestra la etiqueta, se colocó en un frasco de vidrio, y se autoclavó a 121°C a una presión de 15 PSI durante 15 minutos; una vez enfriado se puso en refrigeración, para posteriormente colocar 3 ml en 15 tubos de ensayo (con tapones de gasa) previamente

esterilizados, ubicados en una gradilla y cubiertos con papel aluminio, los cuales llevaron cada una de las muestras tomadas (Zárate et al., 2020).

### Obtención y recolección de las muestras

Las muestras fueron tomadas de 15 conejos (*Oryctolagus cuniculus*) a partir de lesiones dérmicas, criados en granjas traspatio de la parroquia de Huachi-Grande, Mercado América y Letamendi. Se tomó muestras de las lesiones con hisopos previamente esterilizados y se realizó dos rotaciones en cada lesión de 360 grados, a continuación, en la Tabla 7 se detalla las afecciones de cada animal muestreado (fotografías de las lesiones en Anexo 1).

**Tabla 7. Conejos muestreados**

<b>Conejo No.</b>	<b>Afección</b>	<b>Procedencia</b>
1	Absceso ubicado a nivel torácico, lado derecho (tumoración con una costra). Se retiró la costra y se tomó la muestra con un hisopo estéril, al presionar la herida, se evidencio contenido purulento, se drenó y se tomó la muestra de la cavidad formada.	Mercado América
2	Descamaciones en la parte dorsal de las orejas. Se tomó la muestra frotando la superficie de la lesión con un hisopo estéril.	Mercado América
3	Descamaciones en la parte dorsal de las orejas. Se tomó la muestra frotando la superficie de la lesión con un hisopo estéril.	Mercado América
4	Descamaciones en la parte dorsal de las orejas. Se tomó la muestra frotando la superficie de la lesión con un hisopo estéril.	Mercado América
5	Descamaciones en la parte dorsal de las orejas. Se tomó la muestra frotando la superficie de la lesión con un hisopo estéril.	Mercado América
6	Herida en la región rostral, próxima a la nariz, se retiró la costra y se tomó la muestra frotando la superficie de la lesión con un hisopo estéril.	Mercado América

---

7	Descamaciones en la parte dorsal de las orejas. Se tomó la muestra frotando la superficie de la lesión con un hisopo estéril.	Letamendi
8	Lesión en la región dorso lumbar de gran extensión. Se retiró la costra y se tomó la muestra frotando la superficie de la lesión con un hisopo estéril.	Letamendi
9	Absceso cicatrizado en la región rostral lateral izquierda. Se tomó la muestra introduciendo el hisopo en la cavidad del absceso después de haber drenado su contenido.	Huachi Grande
10	Lesión en la región dorsal posterior izquierda (a nivel sacro). Se tomó la muestra frotando la superficie de la lesión con un hisopo estéril.	Huachi Grande
11	Absceso en la región rostral lateral izquierda. Se tomo la muestra introduciendo el hisopo en la cavidad del absceso después de haber drenado su contenido.	Huachi Grande
12	Laceración en la región costal derecha (pulicosis y presencia de ácaros). Se tomó la muestra frotando la superficie de la lesión con un hisopo estéril.	Letamendi
13	Lesiones en el área auricular interna. Se tomó la muestra frotando la superficie de la lesión con un hisopo estéril.	Letamendi
14	Lesión en la región proximal de la oreja izquierda. Se tomó la muestra frotando la superficie de la lesión con un hisopo estéril.	Letamendi
15	Lesión en la región ocular. Se tomó la muestra frotando la superficie de la lesión con un hisopo estéril.	Letamendi

---

### **Incubación de las muestras**

Las muestras fueron llevadas al laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, en donde se incubaron en una estufa bacteriológica a 37 °C durante 24 horas.

### **Preparación de agares**

#### **Preparación de Agar Manitol Salado TM®**

Se disolvió 111 gramos en 1000 ml de agua destilada, se autoclavó en frascos de vidrio a 121°C a 15 PSI por 15 minutos y se dosificó 30 ml en cada caja Petri, siendo un total

de 30 placas, se esperó 2-4 horas en reposo para que solidificaran y se los dio la vuelta, finalmente se los reservó en grupos de 5 cajas Petri cubiertas con papel aluminio en la refrigeradora (TM MEDIA, 2022).

### **Preparación de agar sangre**

#### **Obtención de la sangre de ovino**

Se tomó una pinta de sangre de ovino macho entero en una bolsa de flebotomía.

#### **Preparación del agar Sangre con sangre de ovino al 5%**

Se disolvió 16 gramos de agar tripticasa soya® en 400 ml de agua destilada en un matraz Erlenmeyer, de esta preparación se tomó 20 ml con una jeringuilla estéril y se llevó a autoclavar, previamente colocado con tapón de gasa cubierto por papel aluminio, una vez esterilizado se esperó a que enfríe, no en su totalidad, sino hasta cuando el calor sea soportable al tacto, y en ese momento se añadió 20 ml de la sangre de ovino de manera lenta, agitando constantemente hasta que se homogenice, y se dosificó 30 ml en cada caja Petri, siendo un total de 30 placas, se esperó 30 minutos en reposo para que solidificaran, se los dio la vuelta y finalmente se los reservó en grupos de 5 cajas cubiertas con papel aluminio en refrigeración (TM MEDIA, 2019).

#### **Preparación de agar Tripticasa de soya TM®**

Por cada 1000 ml de agua destilada se disolvieron 111 g de Tripticasa de soya TM® sólido en un frasco de vidrio autocloavable por 15 minutos, se distribuyeron 30 ml por cada caja Petri, se esperó un tiempo de 30 minutos a que se solidifiquen, se las dio la vuelta y se dejó reposar, finalmente se las reservó en la refrigeradora en grupos de 5 cajas Petri envueltas por papel aluminio (TM MEDIA, 2019).

#### **Siembra en agar sangre y Manitol TM®**

Una vez transcurridas 24 horas de la incubación de las muestras, se colocó 1000 µl de muestra en el agar, y se esperó dos horas hasta completar la absorción del líquido, luego, ayudados de un asa bacteriológica, se realizó un estriamiento escocés para facilitar el aislamiento de colonias, posteriormente y se ubicó en la estufa bacteriológica por 24 horas a 37 °C (Montero-Recalde et al., 2018).



### **Siembra en agar Tripticasa de soya TM®**

Las colonias obtenidas de la siembra en agar sal manitol y sangre, fueron sembradas nuevamente en agar tripticasa soya TM®, para lo cual se dividió la placa según las colonias diferentes obtenidas y se las incubó nuevamente (**Sirvas-Cornejo et al., 2011**). Además, se realizaron pruebas de catalasa y tinción Gram (Anexo 2)

### **Prueba fenotípica**

#### **Tinción Gram**

En un portaobjetos se colocó una gota de agua estéril y se mezcló con la ayuda de un asa bacteriológica una muestra de cada colonia aislada del agar tripticasa TM®, se dejó secar al ambiente por 30 minutos y se colocó el reactivo violeta de genciana en toda la muestra durante 60 segundos (1 minuto), inmediatamente se lavó con agua destilada de manera indirecta en la placa, se añadió inmediatamente Lugol y se la cubrió totalmente durante otro minuto más, se lavó con agua destilada nuevamente, posteriormente se añadió alcohol cetona durante 10 segundos y se lavó, finalmente se colocó reactivo safranina durante un minuto y se lavó nuevamente, una vez que se secó la muestra se procedió a observar al microscopio con la lente 100X de inmersión (**Rodríguez & Arenas, 2018**).

### **Prueba bioquímica**

#### **Catalasa**

Para la prueba de catalasa se utilizó peróxido de hidrógeno, de la misma manera se tomó una colonia bien definida del agar tripticasa TM® y una gota del reactivo, se mezcló con la ayuda de un asa bacteriológica, los resultados se observaron de manera inmediata (**Soto et al., 2015**).

### **Identificación molecular**

Para el envío de las cepas a identificación se refrescaron las colonias en agar Tripticasa TM® mediante siembra por técnica de agotamiento y se las incubó a 37 °C durante 24 horas, las muestras fueron llevadas al laboratorio de biotecnología en Quito-Ecuador

con el nombre de IDgen, la empresa entregó los resultados a la tercera semana de haber sido enviadas (IDgen, 2023).

### **Procedimiento**

El método de identificación molecular se basó en la secuenciación por Sanger según **Sting et al. (2019)**.

- El método de determinación fue realizado por identificación molecular por secuenciación Sanger, la extracción de ADN se realizó por métodos convencionales, y para la obtención de este se utilizó una biomasa de 100 mg de muestra, mediante el uso de espectrofotometría de microvolúmenes se evaluó la calidad y la integridad del ADN de las muestras, y la observación se la hizo en gel de agarosa.
- Posteriormente se diluyó el ADN hasta lograr una concentración de 20 ng/μL, y se procedió a la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para lo cual se utilizó primers universales 16S: 27F/1492R, los productos de PCR fueron purificados previo a la secuenciación por el método SANGER.
- Las secuencias obtenidas fueron limpiadas y ensambladas usando programas bioinformáticos.
- Finalmente se compararon las secuencias ensambladas de las muestras con la base de datos de nucleótidos de GenBank del NCBI para su identificación taxonómica.

### **Preparación del caldo cerebro corazón TM®**

Se disolvieron 52 gramos en 100 ml de agua destilada y se autoclavó durante 15 minutos, se reservó en refrigeración.

### **Preparación de la dilución del caldo cerebro corazón con glicerol al 15%**

Se diluyó 15 ml de glicerol en 85 ml de caldo cerebro corazón, se autoclavó y se dejó reposar por 4 horas, finalmente se reservó 1 ml de esta preparación por cada tubo de 1 ml (microtubos), por cada microtubo se tomaron varias colonias de cada bacteria seleccionada del agar Trypticase y con ayuda del Vortex se mezcló cada tubo, y se

reservó a -4 °C para posterior análisis de la actividad antimicrobiana (**Belmonte et al., 2008**).

### **Microencapsulación del aceite esencial de Hierba luisa**

La empresa SANPI fue la proveedora del aceite esencial de Hierba luisa al 100%, posteriormente se realizó el proceso de microencapsulación con el propósito de proteger de la volatilidad a los componentes secundarios de este aceite obtenido. Para la microencapsulación se utilizó dos materiales de pared: goma arábica y maltodextrina con agua destilada, con la ayuda de una plancha de calentado permanente (45°C) y estable se agitó de manera continua con el aceite esencial homogenizando a 20 000 min<sup>-1</sup> durante 5 min, el resultado dio lugar a una emulsión que se ubicó en un mini Spray Dryer BUCHI-B290, en una carga de 20:80 aceite esencial: polímeros, con una temperatura de entrada de 150 °C y de salida de 90 °C, con un flujo de aire de atomización de 500 L/h, flujo de secado de 60 m<sup>3</sup>/h y flujo de alimentación (**Alencar et al., 2022**).

### **Dilución del aceite esencial de Hierba luisa microencapsulado**

Se diluyó 2 gramos del aceite esencial microencapsulado en 100 ml de agua destilada, esta dilución representó la solución madre, enseguida se procedió a la filtración por succión en Kitasato con un filtro de 0,22 micrómetros, en una cámara de flujo laminar previamente esterilizada, usando una bomba al vacío, posteriormente se reservó el contenido en un frasco de vidrio esterilizado y cubierto con papel aluminio, finalmente se obtuvieron las siguientes soluciones (v/v), las concentraciones a utilizar para la investigación fueron (5%, 10%, 15%, 20% y 25%), por cada concentración se colocó 3 ml de caldo cerebro corazón, de este volumen se eliminó 150 µl y se reemplazó con 150 µl (0.15 ml) de solución madre, convirtiéndose esta mezcla en el 5%, y así sucesivamente se trabajó con las concentraciones resultantes para el estudio (**Núñez, 2023**).

## **Evaluación la actividad antimicrobiana del aceite esencial de Hierba luisa (*Cymbopogon citratus*)**

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se utilizó el método de difusión en agar (Kirby-Bauer modificado) en agar Mueller Hinton.

### **Preparación del agar Mueller Hinton TM®**

Se diluyó 38 gramos de Agar Mueller Hinton en 1000 ml de agua destilada, se autoclavó por 15 minutos en 121 °C a 15 PSI. Se distribuyó 30 ml por cada caja Petri, se las dejó solidificar por 20 minutos, se las volteó y finalmente se las reservó en grupos de 5 cajas cubiertas por papel aluminio (TM MEDIA, 2023).

### **Método de difusión en agar**

Se estandarizó el inóculo de cada cepa identificada (*P. profundus* y *S. succinus*) a 0,5 de absorbancia (600 nm), y se dejó incubar a 37 °C, por 48 horas para el *P. profundus* y 24 horas para *S. succinus*, posteriormente con la ayuda de un hisopo estéril se cubrió en la totalidad el agar Mueller Hinton con los inóculos y se dejó reposar por 15 minutos (Cruz et al., 2020).

### **Elaboración de pocillos en agar**

En el agar Mueller Hinton ya seco, se marcó cada tratamiento más los controles positivos y negativos, con la ayuda de una punta azul de micropipeta se realizó una marca lo suficientemente profunda para realizar el pocillo, con la ayuda de una aguja hipodérmica estéril de 20 G se eliminó el exceso de agar de cada pocillo, y en cada espacio libre se ubicó 100 µl de cada tratamiento (5%, 10%, 15%, 20%, 25%, CN, CP), se incubó durante 24 horas a 37 °C y finalmente se midieron los halos de inhibición de cada placa Petri. Se realizó tres réplicas por cada placa analizada (Núñez, 2023).

### **Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial microencapsulado de Hierba Luisa.**

Se realizó un CMI en líquido, midiendo la densidad óptica en espectrofotometría por macrodilución en tubos.

### **Procedimiento**

Se preparó un inóculo estandarizado a 0.5 de absorbancia de cada cepa analizada, en 7 tubos de ensayo se colocaron 2 ml de infusión cerebro corazón con las distintas diluciones del aceite esencial microencapsulado de Hierba luisa (5%, 10%, 15%, 20% y 25%) junto con un control positivo (el medio con la bacteria) y un control negativo (el medio con el aceite), se los incubó por 24 horas a 37 °C y se analizó en espectrofotometría, aplicando tres repeticiones para cada tratamiento (**Montero-Recalde et al., 2018**).

### **Análisis de unidades formadoras de colonias**

Se preparó un inóculo estandarizado al 0.5 de absorbancia, se colocaron 4,5 ml de solución salina (Cloruro de sodio al 0.9%) en tubos de ensayo con tapón de gasa estériles, a razón de 5 tubos por cada disolución, incluyendo los controles positivo y negativo, posteriormente se preparó 7 tubos de ensayo con tapón de gasa estériles, se colocaron 2 ml de infusión cerebro corazón con las distintas diluciones del aceite esencial de Hierba luisa (5%, 10%, 15%, 20% y 25%) junto con un control positivo y el control negativo, se ordenaron los tubos en una gradilla con las distintas diluciones y los 5 tubos con solución salina, con la ayuda de una micropipeta equipada con una punta desechable, se tomaron 100 µl de caldo cerebro corazón preparado con la bacteria seleccionada, y se colocaron en cada concentración incluyendo el control positivo, posteriormente, con una micropipeta se tomaron 0.5 ml (500 microlitros) de una dilución y se transportó al primer tubo con solución salina, se agitó, y se tomaron otros 0.5 ml de la misma solución para transportarla al siguiente tubo, procediendo en modo escalera hasta el quinto tubo, se cambió cada punta en cada concentración a seriar, en total se obtuvo 35 tubos para cada bacteria y un total de 70 tubos por las dos bacterias, se procedió de la misma manera para cada concentración; de los últimos tubos (4to y 5to) de cada concentración se tomó la muestra de 1000 µl y se replicó tres veces (42 placas), resultando 84 placas por las dos bacterias. Éstas fueron sembrada en los agares cerebro corazón, distribuyéndolos uniformemente con la ayuda de perlas de laboratorio estériles, se dejó reposar por 30 minutos y después se voltearon y se dejaron incubar por 24 horas para *S. succinus* y 48 horas *P. profundus*, finalmente se

realizó el conteo de las colonias en cada placa por cuadrantes, marcando cada colonia con rotulador de punta fina para evitar errores en el conteo (Sánchez et al., 2017).

Una vez realizado el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC), se utilizó la siguiente fórmula para transformar a UFC/ml (Sánchez et al., 2017).

**Ecuación 1: Transformación del promedio del conteo de UFC a UFC/ml**

$$UFC/ml = \frac{\text{número de colonias} \times \text{factor de dilución}}{\text{ml de muestra sembrada}}$$

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

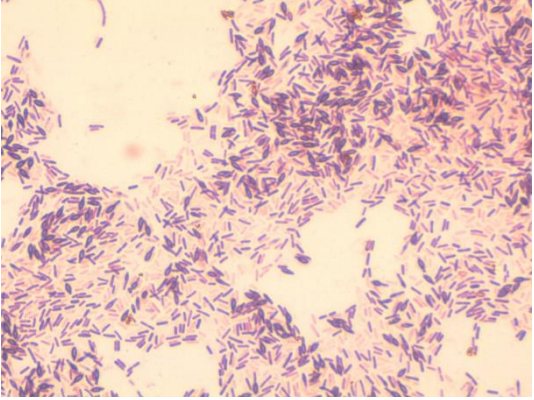
#### 3.1 Análisis y discusión de los resultados

##### **Identificación molecular de las bacterias Grampositivas de las muestras aisladas de la piel de los conejos (*Oryctolagus cuniculus*)**

Se recolectaron 15 muestras de la piel de los conejos afectados, de las cuales se obtuvieron 53 bacterias (39 cocos y 14 bacilos) que presentaron a la tinción una pared Gram positiva. Por la predominancia morfológica de los cocos en las cepas aisladas, se decidió enviar a identificación molecular 5 colonias: 3 bacterias con características de cocos y 2 con características de bacilos. La identificación molecular dio como resultado las siguientes bacterias: *Paenibacillus profundus*, *Staphylococcus succinus*, *Bacillus sp*, *Bacillus australimaris* y *Bacillus safensis*, se tomó en consideración dos cepas del grupo para la investigación *P. profundus* y *S. succinus*, lo cual se fundamentó en que los géneros *Bacillus australimaris* y *Bacillus safensis* son especies que no tienen importancia patológica en seres vivos (Lateef et al., 2015), y el género *Bacillus sp* al no poseer clasificación de especie, no se lo consideró para análisis microbiológico en la investigación.

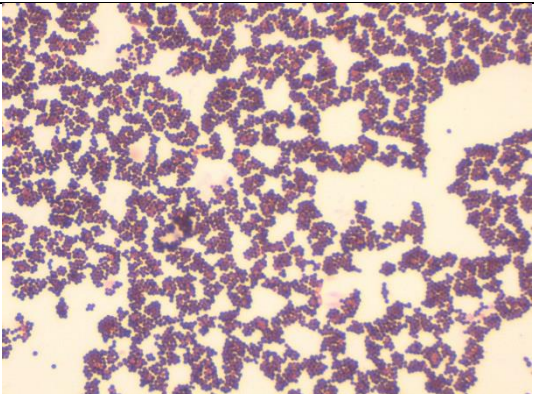
Finalmente, la identificación molecular permitió obtener un material genómico suficiente y de excelente calidad, seguido de un proceso de amplificación adecuado, resultando en la observación de bandas definidas de 1500 pb, correspondientes al marcador 16s, y con ayuda de la secuenciación SANGER se pudo tener las secuencias ensambladas, que permitieron determinar la identidad de los aislados al compararlas con la base de datos del GenBank del NCBI.

**Tabla 8. Clasificación taxonómica de *Paenibacillus profundus* aislado de la piel de conejos (*Oryctolagus cuniculus*)**

<i>Reino</i>	Bacteria	
<i>Filo</i>	Bacillota	
<i>Clase</i>	Bacilli	
<i>Orden</i>	Bacillales	
<i>Familia</i>	Paenibacillaceae	
<i>Género</i>	<i>Paenibacillus</i>	
<i>Especie</i>	<i>Paenibacillus profundus</i>	

La Tabla 8 contiene los datos de la bacteria aislada representada de manera taxonómica. Tanto el género como la especie de *Paenibacillus profundus* es de poca presencia en animales y humanos (**Romanenko et al., 2019**), pero esta estudiado que en el intestino de los conejos, existe una variedad de microflora, tanto de bacterias Gram positivas como Gram negativas (**Simonová et al., 2018**), la presencia de esta bacteria en la piel de los conejos supone que existió una contaminación a partir de heces fecales, en donde la permanencia en lugares contaminados (**Walsh et al., 2023**), favorece la virulencia de la bacteria en estas producciones animales.

**Tabla 9. Clasificación taxonómica de *Staphylococcus succinus* aislado de la piel de conejos (*Oryctolagus cuniculus*)**

<i>Reino</i>	Bacteria	
<i>Filo</i>	Bacillota	
<i>Clase</i>	Bacilli	
<i>Orden</i>	Bacillales	
<i>Familia</i>	Staphylococcaceae	
<i>Género</i>	<i>Staphylococcus</i>	
<i>Especies</i>	<i>Staphylococcus succinus</i>	



La Tabla 9 muestra la bacteria *Staphylococcus succinus* aislada y representada de manera taxonómica, se la considera una bacteria Gram positiva, coagulasa negativa, que es aislada de manera normal de la microflora de la piel, glándulas y mucosa de animales mamíferos y aves, se las considera de baja virulencia, pero en los últimos años se presenta produciendo enfermedad en humanos y animales, con una importante tendencia a presentar resistencia a antibióticos (Nováková et al., 2018), por lo tanto hoy este grupo de bacteria coagulasa negativa se ha convertido en uno de los agentes de mayor aislamiento en muestra clínicas, y que a través de los años desde 1970, muestra patogenicidad en pacientes predisponentes (Gherardi et al., 2018).

**Tabla 10. Bacterias Gram positivas aisladas molecularmente de la piel de los conejos (*Oryctolagus cuniculus*)**

Código IDgen	Tamaño del genoma	% guaninas y citosinas	Muestra	Calidad	Organismo	Fragmento	% de identidad
B668	6.9 Mb	48.5	10aS1	98.9	<i>Paenibacillus profundus</i>	16s	99.71
B672	2.7 Mb	33.0	26M	96.5	<i>Staphylococcus succinus</i>	16s	99.93

La Tabla 10 muestra las bacterias aisladas molecularmente de las afectaciones de la piel de los conejos así: *Paenibacillus profundus* y *Staphylococcus succinus*; el género *Paenibacillus sp* el cual pertenecía al género *Bacillus* y fue reclasificado en el año 1993 (Ash et al., 1993), es una bacteria Gram-positiva, formadora de esporas, de tipo anaeróbicas facultativas. Así lo demuestra la investigación (Simonová et al., 2018) que determinó la presencia del género *Paenibacillus* en heces de conejos (1.33 a 3.74 UFC), y de esta forma se distribuye en aguas, suelos, contamina larvas de insectos, y de poca afectación a animales domésticos, también fue aislada y secuenciada de la cueva del conejo blanco de Canadá (Walsh et al., 2023), en sedimentos de calcio y otros detritus presentes en el lugar, probablemente por la presencia de altos contenidos de heces fecales existentes en el lugar por décadas, el género *P. profundus* ha sido determinado en aguas profundas de mar y sus metabolitos han servido en grandes

aportaciones biotecnológicas (**Romanenko et al., 2019**), la secuencia genómica del género, (**Ash et al., 1993**) muestra que a pesar de haber tenido similitudes con el género *Bacillus* se comporta bioquímicamente y patogénicamente diferente, siendo utilizado como insecticida, antimicrobiano, en aplicaciones médicas y en la biorremediación (**Grady et al., 2019**), no existen investigaciones que demuestren la patogenicidad en animales, pero sí en insectos como la Abeja (*Apis mellifera*) (**Sklenárova et al., 2021; Krongdang et al., 2019**).

El género *Staphylococcus succinus* se presenta como una bacteria de baja presencia clínica en conejos, así lo detalla **Sousa et al. (2020)**, quien determinó a *S. succinus* como una bacteria Gram positiva coagulasa negativa en muestras nasales de conejos salvajes en Europa, de la misma manera lo manifiesta **Fernández et al. (2023)**, el género *Staphylococcus* fue el de mayor prevalencia proveniente de estudios microbiológicos en muestras de conejos mascota en España, el género y especie *S. succinus* posee una baja presencia en muestra clínicas tanto en humanos como en animales (**Nováková et al., 2018**). En muestras clínicas se la puede encontrar de manera rara, y el diagnóstico microbiológico es dificultoso y ambiguo (**Gherardi et al., 2018**), los conejos son hospedadores temporales del género *Staphylococcus*, tanto coagulasa positivos y coagulasa negativos (**Sousa et al., 2020**), el género bacteriano de mayor frecuencia que afecta a los conejos es el *Staphylococcus* y está directamente relacionado a abscesos, problemas dentales, problemas de piel, conjuntivitis y otitis, difíciles de tratar por las resistencias a una gran variedad de antimicrobianos (**Fernández et al., 2023**).

**Tabla 11. Actividad antimicrobiana por difusión agar de las concentraciones del aceite esencial de Hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) microencapsulado sobre *Paenibacillus profundus* aislado de la piel de conejo (*Oryctolagus cuniculus*)**

Tratamientos	Rangos promedios
Hierba Luisa microencapsulada 5%	8,00 <sup>a</sup>
Hierba Luisa microencapsulada 10%	8,00 <sup>a</sup>
Hierba Luisa microencapsulada 15%	8,00 <sup>a</sup>
Hierba Luisa microencapsulada 20%	8,00 <sup>a</sup>
Hierba Luisa microencapsulada 25%	8,00 <sup>a</sup>

En una misma columna rangos promedios que no compartan letras comunes son diferentes según la prueba de Kruskal Wallis complementada con la prueba U de Mann Whitney para  $p < 0,05$ . En la Tabla 11 se observan los resultados de la prueba de difusión en agar por pocillos para medir sensibilidad antimicrobiana del género *Paenibacillus profundus*, en la cual no se observó la formación de halos de sensibilidad (Anexo 3). En general los aceites esenciales se comportan como sustancias amigables con el planeta, la encapsulación reduce su estados de volatilidad y permite su liberación de manera controlada, existen varias formas de hacerlo entre las que se nombran microesferas, microcápsulas, liposomas, microemulsiones, las cuales evitan la degradación del aceite bajo las influencias del medio ambiente (Šumiga et al., 2019), la capacidad antimicrobiana del aceite está relacionada de manera directa a la presencia de los componentes  $\alpha$ -citral (Geranial) y  $\beta$ -citral (Neral), el encapsulado utilizado fue la goma arábica, conocida como uno de los materiales de pared más estables para encapsular, que permite la mejor retención del aceite y su liberación (de Melo et al., 2022), el proceso de encapsulado podría mejorar el efecto antimicrobiano, con el uso de otros materiales en la encapsulación, por ejemplo, el uso de la maltodextrina adicionada a la goma arábica permite que incremente la eficacia de los productos o sustancias microencapsuladas y por tanto sus efectos antimicrobianos

(Patrycky et al., 2017), se conoce el efecto antimicrobiano del aceite esencial microencapsulado de Hierba Luisa sobre bacterias Gram positivas (Alencar et al., 2022), no obstante la solución madre en la presente investigación tuvo una concentración de 20 mg/ml, al contrario de otras investigaciones que partieron de solución madre de 80 mg/ml como lo manifiesta Yoplac et al. (2021).

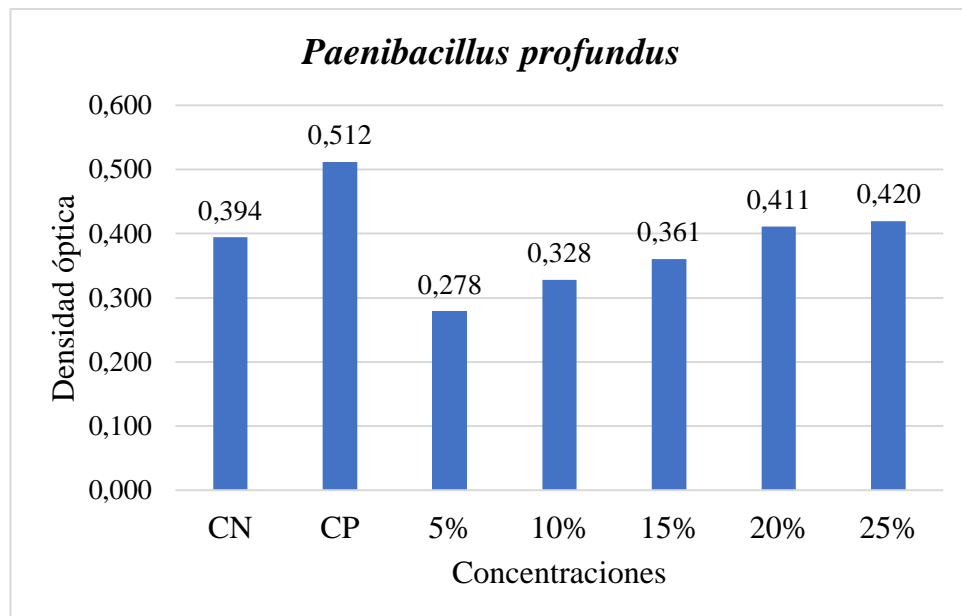
**Tabla 12. Actividad antimicrobiana por difusión agar de las concentraciones del aceite esencial de Hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) microencapsulado sobre *Staphylococcus succinus* aislado de la piel de conejo (*Oryctolagus cuniculus*)**

Tratamientos	Rangos promedios
Hierba Luisa 5%	8,00 <sup>a</sup>
Hierba Luisa 10%	8,00 <sup>a</sup>
Hierba Luisa 15%	8,00 <sup>a</sup>
Hierba Luisa 20%	8,00 <sup>a</sup>
Hierba Luisa 25%	8,00 <sup>a</sup>

En una misma columna rangos promedios que no compartan letras comunes son diferentes según la prueba de Kruskal Wallis complementada con la prueba U de Mann Whitney para  $p < 0,05$ . En la Tabla 12 se observa la prueba de difusión en agar por pocillos para medir sensibilidad antimicrobiana del género *Staphylococcus succinus* no se observó la formación de halos de sensibilidad (Anexo 3), lo cual no coincide con la investigación de Leimann et al. (2019) en la que se observa que el microencapsulado tuvo actividad antimicrobiana sobre bacterias del grupo Gram negativas como *Escherichia coli* con 22.32 mm y Gram positivas como el género *S. aureus* con 2.79 mm, la ausencia de halos de inhibición en la cepa *S. succinus* en la presente investigación, podría ser que la solución madre mantuvo una concentración de apenas 20 mg/ml a diferencia de otras investigaciones en las que las solución

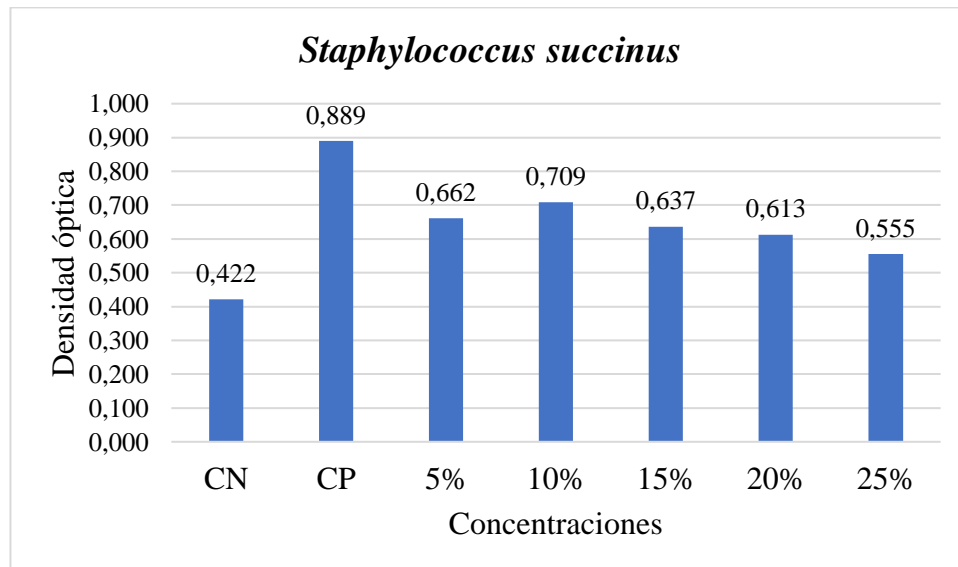
primaria fueron más concentradas de 80 mg/ml (Yoplac et al., 2021) así como de 60 mg/ml (de Melo et al., 2022).

**Gráfico 1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) en macrodilución en tubo de *Paenibacillus profundus***



El gráfico 1 muestra la observación de la CMI en espectrofotometría en macrodilución en tubo de todos los tratamientos: CN, CP y concentraciones al 5%, 10%, 15%, 20% y 25%, con 0,512 nm, 0,278 nm, 0,328, 0,361 nm, 0,411 y 0,420 nm respectivamente, mostró eficacia antimicrobiana sobre *Paenibacillus profundus*, siendo el mejor tratamiento al 5%, con una absorbancia de 0,278 de concentración, tomando en cuenta que el control positivo (CP) mostró una absorbancia de 0,512, demostrándose que existió disminución de crecimiento de la bacteria. La actividad antimicrobiana sobre las bacterias Gram positivas del aceite esencial de la Hierba luisa reside en la presencia fitoquímica en su composición de terpenos (Khashan et al., 2023), exactamente hidrocarburos de monoterpenos, causantes directos del efecto antimicrobiano sobre las bacterias Gram positiva, y de menos actividad sobre las Gram negativas, este componente actúa sobre las enzimas proteolíticas, produciendo precipitación de las mismas e impidiendo que la pared de peptidoglucano, se siga sintetizando, logrando inhibición y muerte de las mismas (Ewansiha et al., 2012).

**Gráfico 2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) en macrodilución en tubo de *Staphylococcus succinus***



El gráfico 2 muestra la observación de la CMI en espectrofotometría en macrodilución en tubo de todos los tratamientos: CN, CP y concentraciones al 5%, 10%, 15%, 20% y 25%, con 0,422 nm, 0,889 nm, 0,662 nm, 0,709 nm, 0,637 nm, 0,613 nm y 0,555 nm mostró eficacia antimicrobiana sobre *Staphylococcus succinus*, siendo el mejor tratamiento al 25%, con una absorbancia de 0,555 de concentración, tomando en cuenta que el control positivo (CP) mostró una absorbancia de 0,889, demostrándose que existió disminución de crecimiento de la bacteria, así lo corrobora **Yoplac et al. (2021)**, quien indica que a mayor concentración del aceite es mejor la respuesta antimicrobiana del género *Staphylococcus*, la investigación realizada por **(Alencar et al., 2022)** también corrobora los resultados de la presente investigación, la cual determinó que el aceite esencial de Hierba luisa microencapsulado funcionó a partir del 10% con 0,117  $\mu\text{l/ml}$  de CMI de manera eficaz sobre *Staphylococcus aureus*.

**Tabla 13. Efecto del aceite microencapsulado de la Hierba luisa sobre UFC/ml en *Paenibacillus* versus el control positivo**

Tratamientos	$\bar{x}$ UFC/ml	Rangos promedios
<i>Paenibacillus profundus</i>	0,67x10 <sup>6</sup>	165,00 b
Control positivo (CP)	1x10 <sup>6</sup>	300,00 a

CP: (caldo cerebro corazón + bacteria) control positivo, *Paenibacillus profundus* (bacteria + promedio de concentraciones del aceite)

En la Tabla 13 se observa que el género bacteriano *P. profundus* adicionado el aceite esencial microencapsulado madre de Hierba Luisa fue efectivo con un rango promedio de 165,00b con respecto al control positivo (*P. profundus* sin adición del aceite), lo cual corrobora la actividad antimicrobiana de las concentraciones del aceite encapsulado de Hierba luisa en bacterias Gram positivas (Yoplac et al., 2021), además se sustenta la investigación con la presencia del control positivo de rango promedio de 300a, lo cual significa que la cepa creció libremente, comparado con la cepa (*Paenibacillus* + promedio de las concentraciones del aceite esencial microencapsulado) con un rango promedio de 165 UFC/ml, existiendo diferencia significativa  $p < 0.001$  entre ambas, demostrándose en éste último la evidencia del efecto antimicrobiano (Anexo 4).

**Tabla 14. Efecto del aceite microencapsulado de la Hierba luisa sobre UFC/ml en *Staphylococcus* versus el control positivo**

Tratamientos	$\bar{x}$ UFC/ml	Rangos promedios
<i>Staphylococcus</i>	24,00x10 <sup>6</sup>	165,00 b
Control positivo	34,20x10 <sup>6</sup>	300,00 a

En el Tabla 14 se observa que el género bacteriano *S. succinus* adicionado el aceite esencial microencapsulado de Hierba Luisa fue efectivo con un rango promedio de 165,00b con respecto al control positivo (*S. succinus* sin adición del aceite), lo cual corrobora la actividad antimicrobiana de las concentraciones del aceite encapsulado

de Hierba luisa en esta cepa Gram positiva (de Melo et al., 2022), además se sustenta la investigación con la presencia del control positivo de rango promedio de 300,00 a, lo cual significa que la cepa creció libremente, comparado con la cepa (*Staphylococcus* + promedio de las concentraciones del aceite esencial microencapsulado) con un rango promedio de 165,00 b, existiendo diferencia significativa  $p < 0.001$  entre ambas, demostrándose en éste último la evidencia del efecto antimicrobiano.

**Tabla 15. Comparación entre concentraciones del aceite de Hierba Luisa frente a las UFC de *Paenibacillus profundus***

Tratamientos	$\bar{x}$ UFC/ml	Rangos promedios
Hierba Luisa 5%	$20,50 \times 10^5$	13,00 a
Hierba Luisa 10%	$13,00 \times 10^5$	12,00 a
Hierba Luisa 15%	0	5,00 b
Hierba Luisa 20%	0	5,00 b
Hierba Luisa 25%	0	5,00 b

La Tabla 15 muestra que el aceite esencial microencapsulado de Hierba luisa en crecimiento en placa (UFC), al aplicar la prueba de Kruskal Wallis complementada con la prueba U de Mann Whitney determinó que no existió significancia  $p < 0,05$  entre tratamientos del 15%, 20% y 25%, con rangos promedios de 5,00 b, pero si existió diferencia significativa  $p < 0,01$  entre la concentración del 5% con un rango promedio de 13,00a y la concentración del 10% con un rango promedio de 12,00 a, con respecto al 15%, 20% y 25% con promedios de 5,00 b respectivamente, ya que en estos últimos la bacteria no formo colonias. No existe investigaciones sobre Unidades Formadoras de Colonias o del uso del aceite esencial de Hierba Luisa sobre el género *Paenibacillus*, ya que no está tomado en cuenta como patógeno real en conejos.



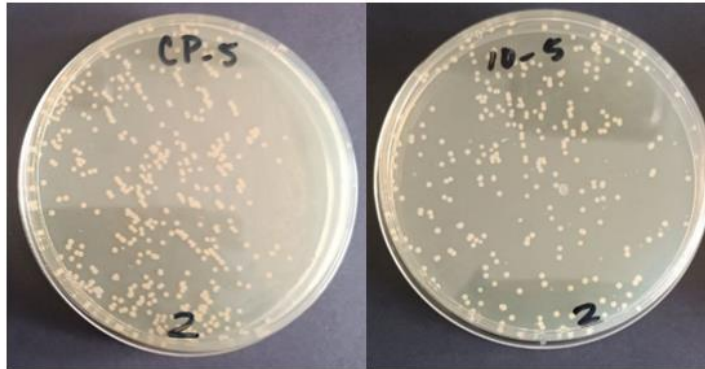
**Tabla 16. Comparación entre concentraciones de aceite de Hierba Luisa frente a las UFC de *Staphylococcus succinus***

Tratamientos	$\bar{x}$ UFC/ml	Rangos promedios
Hierba Luisa 5%	40,80x10 <sup>6</sup>	14,00 a
Hierba Luisa 10%	29,90 x10 <sup>6</sup>	11,00 a
Hierba Luisa 15%	15,80 x10 <sup>6</sup>	2,00 c
Hierba Luisa 20%	19,80 x10 <sup>6</sup>	8,00 a
Hierba Luisa 25%	19,30 x10 <sup>6</sup>	5,00 b

La Tabla 16 muestra que el aceite esencial microencapsulado de Hierba luisa en crecimiento en placa (UFC) al aplicar la prueba de Kruskal Wallis complementada con la prueba U de Mann Whitney determinó que no existió significancia  $p < 0,05$  entre las concentraciones 5%, 10% y 20%, con rangos promedios de 14,00 a, 11,00 b y 8,00 a UFC/ml respectivamente, mientras que las concentraciones al 15% y 20% si mostraron diferencia significativa  $p < 0,01$  con rangos promedios de 2,00 b y 5,00 b respectivamente, demostrando que el 15% de concentración del aceite esencial es el mejor tratamiento, al haber actuado con mejor actividad antimicrobiana de manera significativa con respecto a los demás tratamientos al haber demostrado la formación de un menor número de colonias, y aunque no existen investigaciones sobre la formación de UFC del *S. succinus* por efecto del aceite, la investigación de **Shendurse et al., (2021)**, corrobora que funciona de manera efectiva sobre el género *Staphylococcus sp.* formando zonas de inhibición importantes de 32 mm al estudio antimicrobiano.

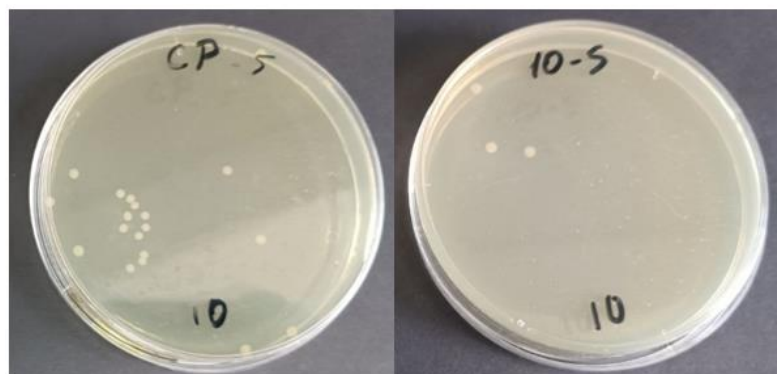
Todos los resultados estadísticos se pueden observar en el anexo 5.

**Figura 1. Resultados de las UFC de *Staphylococcus succinus*. Comparación entre control positivo y la concentración al 10%**



En la figura 1 se muestra la siembra en placa de la cepa de *S. succinus* del control positivo (quinta dilución seriada) con respecto al 10% de la concentración del aceite microencapsulado de Hierba luisa (quinta dilución seriada).

**Figura 2. Resultados de las UFC de *Paenibacillus profundus*. Comparación entre control positivo y la concentración al 10%**



En la figura 2 se muestra la siembra en placa de la cepa de *P. profundus* del control positivo (quinta dilución seriada) con respecto al 10% de la concentración del aceite microencapsulado de Hierba luisa (quinta dilución seriada).

## **Verificación de la hipótesis**

La presente investigación verifica su hipótesis H1, afirmando que el aceite esencial microencapsulado de Hierba luisa tiene efecto antimicrobiano sobre las bacterias Gram positivas aisladas de piel de conejo.

## CAPÍTULO IV

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### Conclusiones

- Se identificó molecularmente mediante marcador 16s, a partir de muestras tomadas de la piel afectada de conejos, dos especies Gram positivas: *Paenibacillus profundus* y *Staphylococcus succinus*, la primera cepa mostró un genoma de 6.9 Mb y un porcentaje del 48.5% de citosinas y guaninas, mientras que la segunda cepa, un genoma de 2.7 Mb y un 33.0% de citosinas y guaninas.
- El método de difusión en agar por pocillos para medir actividad antimicrobiana determinó que las dos cepas bacterianas (*P. profundus* y *S. succinus*) no formaron halos de inhibición, lo cual significa que el aceite esencial microencapsulado de Hierba luisa no mostró actividad antimicrobiana sobre estos microorganismos.
- La concentración mínima inhibitoria (CMI) en macrodilución en tubo se determinó al 5% para la cepa *P. profundus*, a diferencia de la cepa *S. succinus* en la que se determinó al 25%, mientras que en las unidades formadoras de colonias (UFC), para la cepa *S. succinus* al 15% fue la mejor concentración, siendo el mejor tratamiento, por otro lado, en el caso de la cepa *P. profundus*, funcionó desde la concentración al 15%, 20% y 25%, sin presencia de crecimiento de colonias en ninguna de ellas.
- El aceite esencial microencapsulado de Hierba luisa sobre las cepas Gram positivas aisladas de la piel de los conejos *P. profundus* y *S. succinus*, demostró actividad antimicrobiana en medio líquido y en el conteo de UFC, a diferencia del medio sólido, en el que no se evidenció halos.

#### Recomendaciones

- El método de identificación molecular fue realizado para las cepas bacterianas mediante empresas que realizan el proceso, se recomienda que los análisis sean enviados a verificar con otras empresas que también puedan identificarlas.

- El método antimicrobiano en placa con respecto al método antimicrobiano en medio líquido mostró un comportamiento diferente debido a la dilución madre, pues el aceite esencial microencapsulado de Hierba luisa tuvo una concentración de 20 mg/ml. Se debería considerar para próximas investigaciones que la solución primaria sea más concentrada, y así aprovechar todo el potencial de los metabolitos secundarios de los aceites microencapsulados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aćimović, M., Cvetković, M., Puvača, N., Kiproovski, B., Gvozdenac, S., Čabarkapa, I., & Stanković, J. (2019). *Cymbopogon citratus* (DC.) Staph: chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities, use in medicinal and cosmetic purpose. *Journal of Agronomy, Technology and Engineering Management (JATEM)*, 2(6), 344–360. [http://www.fimek.edu.rs/images/naucni-rad/jatem/issue/v2\\_6/02-\(2\)\\_Acimovic\\_et\\_al.\\_2019.\\_Vol.\\_2\(6\)\\_344-360.pdf](http://www.fimek.edu.rs/images/naucni-rad/jatem/issue/v2_6/02-(2)_Acimovic_et_al._2019._Vol._2(6)_344-360.pdf)
- Ahmad, I., Aqil, F., & Owais, M. (2006). *Modern Phytomedicine*. WILEY-VCH.
- Alencar, D., de Souza, E., Almeida, E., da Silva, A., Oliveira, H., & Cavalcanti, M. (2022). Microencapsulation of *Cymbopogon citratus* D.C. Stapf Essential Oil with Spray Drying: Development, Characterization, and Antioxidant and Antibacterial Activities. *Foods*, 11(8), 8–17. <https://doi.org/10.3390/foods11081111>
- Ash, C., Priest, F., & Collins, M. (1993). Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test - Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 64(3–4), 253–260. <https://doi.org/10.1007/BF00873085>
- Azuero, A., Jaramillo, C., San Martin, D., & D'Armas, H. (2016). Analysis of antimicrobial effect of twelve medicinal plants of ancient use in Ecuador. *Ciencia Unemi*, 9(20), 11–18.
- Belmonte, A., Contigiani, M., Gandini, M., & Sutich, V. (2008). Estudio de métodos por congelación para la conservación y mantenimiento de cepas de *Gardnerella vaginalis*. *Bioquímica y Patología Clínica*, 72(2), 15–18. <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=65112134003>
- Beveridge, T. J. (2001). Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic and Histochemistry*, 76(3), 111–118. <https://doi.org/10.1080/bih.76.3.111.118>
- Cimanga, K., Apers, S., De Bruyne, T., Van Miert, S., Hermans, N., Totté, J., Pieters, L., Vlietinck, A. J., Kambu, K., & Tona, L. (2002). Chemical composition and antifungal activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing

in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Essential Oil Research*, 14(5), 382–387. <https://doi.org/10.1080/10412905.2002.9699894>

Corpa, J., Selva, L., Viana, D., & Corpa, J. (2019). Infecciones provocadas por *Staphylococcus aureus*: principales formas de presentación. *XLII Symposium de Cunicultura*, 17, 1–20.

Cruz, R., Vieille, P., & Stojanova, J. (2020). Sensibilidad in vitro de cepas chilenas de *Cryptococcus neoformans* de origen clínico. *Corci Microbiología*, 37(2), 124–128.

de Melo, A., Turola, B., Chaves, F., de Souza, W., de Melo, A., de Souza, J., Alvarenga, D., Vilela, S., Germano, R., Quirino, M., & de Sousa, S. (2022). Effect of Microencapsulation on Chemical Composition and Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Properties of Lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) Essential Oil. *Food Technology and Biotechnology*, 60(3), 386–395. <https://doi.org/10.17113/ftb.60.03.22.7470>

De Oliveira, T. L. C., Soares, R. de A., & Piccoli, R. H. (2013). A Weibull model to describe antimicrobial kinetics of oregano and lemongrass essential oils against *Salmonella Enteritidis* in ground beef during refrigerated storage. *Meat Science*, 93(3), 645–651. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.11.004>

Dima, C., & Dima, S. (2015). Essential oils in foods: Extraction, stabilization, and toxicity. *Current Opinion in Food Science*, 5, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.07.003>

Esaú López-Jácome, L., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., & Franco-Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación En Discapacidad*, 3(1), 10–18. [www.medigraphic.org.mx](http://www.medigraphic.org.mx)

Ewansiha, J., Garba, S., Mawak, J., & Oyewole, O. (2012). Antimicrobial Activity of *Cymbopogon Citratus* (Lemon Grass) and It's Phytochemical Properties. *Frontiers in Science*, 2(6), 214–220. [http://irepos.unijos.edu.ng/jspui/bitstream/123456789/439/1/ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF \*CYMBOPOGON CITRATUS\* LEMON GRASS AND ITS](http://irepos.unijos.edu.ng/jspui/bitstream/123456789/439/1/ANTIMICROBIAL%20ACTIVITY%20OF%20CYMBOPOGON%20CITRATUS%20LEMON%20GRASS%20AND%20ITS)

PHYTOCHEMICAL PROPERTIES.pdf

- Fernández, M., Garcias, B., Duran, I., Molina-López, R., & Darwich, L. (2023). Current Situation of Bacterial Infections and Antimicrobial Resistance Profiles in Pet Rabbits in Spain. *Veterinary Sciences*, *10*(5), 1–13.  
<https://doi.org/10.3390/vetsci10050352>
- Fox, G., Magrum, L., & Balch, W. (1977). Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *74*(10), 4537–4541.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.74.10.4537>
- GAD-Cevallos, M. del C. C. (2024). *Red Hidrometeorológica de Tungurahua* (p. 1).  
<https://rrnn.tungurahua.gob.ec/red/estaciones/estacion/530b84ed74daaf23bce53ced>
- Ganjewala, D., & Luthra, R. (2010). Essential Oil Biosynthesis and Regulation in the Genus *Cymbopogon*. *NPC*, *5*(1), 163–172.
- Gherardi, G., Di Bonaventura, G., & Savini, V. (2018). Staphylococcal Taxonomy. In *Pet-to-Man Travelling Staphylococci: A World in Progress*.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813547-1.00001-7>
- González, P., García, J., Torres, C., & Montero, L. (2019). Cómo varía la respuesta inmune del conejo en función de la cepa de *Staphylococcus aureus*. *XLI SYMPOSIUM DE CUNICULTURA*, 196.
- Grady, E. N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A., & Yuan, Z. C. (2019). Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: A review. *Microbial Cell Factories*, *15*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0603-7>
- Hassan, M., Lawal, A., & Shehu, A. (2023). Phytochemical screening, antimicrobial activity and TLC profiling of Lemon Grass (*Cymbopogon citratus*). *FUDMA Journal of Sciences (FJS)*, *7*(3), 122–126.
- Karunamoorthi, K., Ilango, K., & Murugan, K. (2010). Laboratory evaluation of traditionally used plant-based insect repellent against the malaria vector *Anopheles arabiensis* patton (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*,



106(5), 1217–1223. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1797-y>

- Khashan, A. A., Taha, S. Q., & Saad, M. J. (2023). GC-MS Analysis and Antimicrobial Activity of Essential Oil from (*Cymbopogon citratus*) against Pathogenic Bacteria. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 90(1), 971–976. <https://doi.org/10.21608/ejhm.2023.280192>
- Krongdang, S., Evans, J. D., Chen, Y., Mookhploy, W., & Chantawannakul, P. (2019). Comparative susceptibility and immune responses of Asian and European honey bees to the American foulbrood pathogen, *Paenibacillus larvae*. *Insect Science*, 26(5), 831–842. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12593>
- Langfield, R. D., Scarano, F. J., Heitzman, M. E., Kondo, M., Hammond, G. B., & Neto, C. C. (2004). Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galioides*. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(2–3), 279–281. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.06.013>
- Lateef, A., Adelere, I. A., & Gueguim-Kana, E. B. (2015). The biology and potential biotechnological applications of *Bacillus safensis*. *Biologia (Poland)*, 70(4), 411–419. <https://doi.org/10.1515/biolog-2015-0062>
- Leimann, F. V., Gonçalves, O. H., Machado, R. A. F., & Bolzan, A. (2019). Antimicrobial activity of microencapsulated lemongrass essential oil and the effect of experimental parameters on microcapsules size and morphology. *Materials Science and Engineering C*, 29(2), 430–436. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.08.025>
- Lone, T. A. (2017). Evaluation of Antimicrobial Activity of *Cymbopogon Citratus* Against Clinically Burn Wound Associated Selected Gram Positive and Gram Negative Bacteria. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 4(10), 710–714. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.19432.96002>
- Mayaud, L., Carricajo, A., Zhiri, A., & Aubert, G. (2008). Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. *Letters in Applied Microbiology*, 47(3), 167–

173. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02406.x>

MEDIA, T. (2019). *TM 557 – ANAEROBIC TRYPTONE SOYA AGAR*.

Montero-Recalde, M., Mira, J., Avilés-Esquivel, D., Pazmiño-Miranda, P., & Erazo-Gutiérrez, R. (2018). Eficacia antimicrobiana del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre una cepa de *Staphylococcus aureus*. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 29(2), 588–593.  
<https://doi.org/10.15381/rivep.v29i2.14520>

Nováková, D., Sedláček, I., Pantůček, R., Štětina, V., Švec, P., & Petráš, P. (2018). *Staphylococcus equorum* and *Staphylococcus succinus* isolated from human clinical specimens. *Journal of Medical Microbiology*, 55(5), 523–528.  
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.46246-0>

Núñez, R. (2023). *Evaluación in vitro del efecto antifúngico del aceite de hierba Luisa (Cymbopogon citratus) microencapsulado frente a Cladosporium fulvum Cooke Trabajo*. Universidad Técnica de Ambato.

Papeschi, C. (2010). Las enfermedades más importantes de la piel de los conejos. In *Cunicultura*. <https://cunicultura.com/pdf-files/2010/10/013-020-Patologia-Enfermedades-piel-conejos-Papeschi-CU20101015.pdf>

Patrycky, Y., Souza, A., De, A., Lima, W., De, C., Ferreira, S., Gomes, F., Ferreira, V., & Ronie, E. (2017). Antibacterial activity and stability of microencapsulated lemon grass essential oil in feeds for broiler chickens. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, 18(4), 587–593.

Ponce Cevallos, P. A., Buera, M. P., & Elizalde, B. E. (2010). Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and thymol) in  $\beta$ -cyclodextrin: Effect of interactions with water on complex stability. *Journal of Food Engineering*, 99(1), 70–75.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.039>

Rodríguez, P., & Arenas, R. (2018). Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Medica y Quirúrgica*, 16(2), 166–167.  
<https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf>

- Romanenko, L., Tanaka, N., Svetashev, V., & Kalinovskaya, N. (2019). *Paenibacillus profundus* sp. nov., a deep sediment bacterium that produces isocoumarin and peptide antibiotics. *Archives of Microbiology*, 195(4), 247–254. <https://doi.org/10.1007/s00203-013-0873-y>
- Sánchez, E., Núñez, D., Cruz, R., Torres, M., & Herrera, E. (2017). Simulación y Conteo de Unidades Formadoras de Colonias. *Revista Electrónica de Computación, Informática, Biomédica y Electrónica*, 6(1), 97–111. <https://www.redalyc.org/journal/5122/512253717006/html/>
- Sánchez, E., & Selva, L. (2020). Patologías digestivas del conejo. In *Boletín de Cunicultura n° 195*.
- Sarmiento, O. (2016). *Evaluación de la cinética de extracción del aceite esencial de Calendula officinalis L. mediante hidroddestilación y calentamiento óhmico asistido por hidroddestilación* [Universidad Nacional abierta y a distancia UNAD]. <https://medium.com/@arifwicaksanaa/pengertian-use-case-a7e576e1b6bf>
- Shendurse, A., Sangwan, R., Amit, K., Ramesh, V., Patel, A., Gopikrishna, G., & Roy, S. (2021). Phytochemical screening and antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) leaves essential oil. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 10(2), 445–449. <https://www.phytojournal.com/archives/2021.v10.i2.13838/phytochemical-screening-and-antibacterial-activity-of-lemongrass-cymbopogon-citratus-leaves-essential-oil>
- Simonová, M., Kmeť, V., & Lauková, A. (2018). Occurrence and characterization of *Paenibacillus* sp. isolated from rabbits. *Folia Microbiologica*, 60(2), 97–101. <https://doi.org/10.1007/s12223-014-0345-z>
- Singer, J., & Crooks, L. (1983). Sequence of the 16S Ribosomal RNA from *Halobacterium volcanii*, an Archaeobacterium. *Science*, 221, 656–659.
- Sirvas-Cornejo, S., Sánchez-Robinet, C., & Peña-Domínguez, C. (2011). Diagnóstico e identificación rápidos por PCR de *Yersinia ruckeri* aislada de *Oncorhynchus mykiss* procedentes de Canta, Lima, Perú. *Revista Peruana de Biología*, 18(3),

349–353. <https://doi.org/10.15381/rpb.v18i3.451>

Skaria, B., Joy, P., Mathew, S., & Mathew, G. (2006). *Lemongrass . Handbook of Spices*.

Sklenárova, D., Odstřilíková, E., Pastucha, M., Skladal, P., & Farka, Z. (2021). *Workshop of biophysical chemists and electrochemists*.

Soto, I., Meléndez, L., & Jiménez, A. (2015). El tema de la catalasa en los diferentes niveles de enseñanza aprendizaje. *Revista Iberoamericana de Producción Académica y Gestión Educativa*, 2(1), 1–15.

<file:///C:/Users/user/Downloads/265-Texto del artículo-1108-1-10-20150116.pdf>

Sousa, M., Silva, V., Silva, A., Silva, N., Ribeiro, J., Tejedor-Junco, M., Capita, R., Chenouf, N., Alonso-Calleja, C., Rodrigues, T., Leitão, M., Gonçalves, D., Caniça, M., Torres, C., Igrejas, G., & Poeta, P. (2020). Staphylococci among wild european rabbits from the azores: A potential zoonotic issue? *Journal of Food Protection*, 83(7), 1110–1114. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-423>

Sousa, V. I., Parente, J. F., Marques, J. F., Forte, M. A., & Tavares, C. J. (2022). Microencapsulation of Essential Oils: A Review. *Polymers*, 14(9), 1–42. <https://doi.org/10.3390/polym14091730>

Sting, R., Eisenberg, T., & Hrubenja, M. (2019). Rapid and reasonable molecular identification of bacteria and fungi in microbiological diagnostics using rapid real-time PCR and Sanger sequencing. *Journal of Microbiological Methods*, 159, 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.03.005>

Šumiga, B., Šumiga, B., & Podgornik, D. R. and B. B. (2019). Microencapsulated *Cymbopogon citratus* Oil. *Coatings*, 9(470), 1–21.

Tajidin, N., Ahmad, S., Rosemani, A., Azimah, H., & Munirah, M. (2012). Chemical composition and citral content in lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil at three maturity stages. *African Journal of Biotechnology*, 11(11), 2685–2693. <https://doi.org/10.5897/ajb11.2939>

TM MEDIA. (2022). *TRM 206 – MANNITOL SALT AGAR*.

TM MEDIA. (2023). *TM 339 -MUELLER HINTON AGAR*.

Walsh, M., Ghosh, S., Ponce, A., James, C., Kam, G., Lauriente, T., Yu, V., Safford, K., & Cheeptham, N. (2023). Bacteria Isolated from Canada's White Rabbit Cave Revealed Antimicrobial Activities. *Fine Focus*, 9(1), 66–83.  
<https://doi.org/10.33043/ff.9.1.66-83>

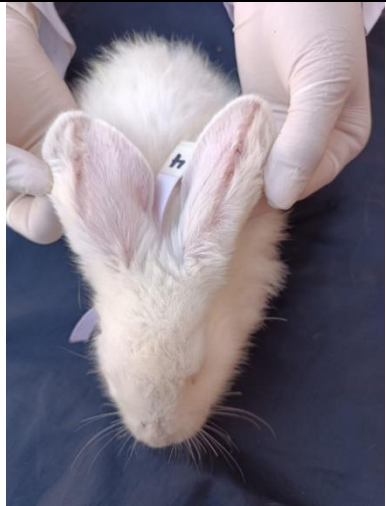
Yoplac, I., Vargas, L., Robert, P., & Hidalgo, A. (2021). Characterization and antimicrobial activity of microencapsulated citral with dextrin by spray drying. *Heliyon*, 7(4), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06737>

Zárate, N., Cowan, C., Román, C., & Lombardo, G. (2020). Contaminación bacteriana de esponja de lavado y bachas de cocina de cantinas de escuelas de Asunción y Gran Asunción. *Pediatría (Asunción)*, 47(2), 94–99.  
<https://doi.org/10.31698/ped.47022020010>

## ANEXOS

### Anexo 1. Fotografías de los conejos y lesiones

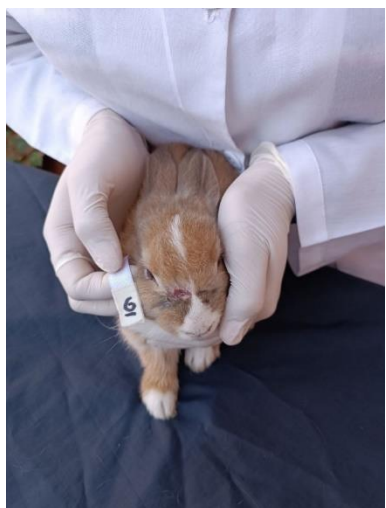
Conejo	Lesión	Descripción de la lesión
		Absceso ubicado a nivel torácico, lado derecho (tumoración con una costra).
		Descamaciones en la parte dorsal de las orejas.
		Descamaciones en la parte dorsal de las orejas.



Descamaciones en la parte dorsal de las orejas.



Descamaciones en la parte dorsal de las orejas.



Lesión en la región rostral, próxima a la nariz.





Descamaciones en la parte dorsal de las orejas.



Lesión en la región dorso lumbar de gran extensión.

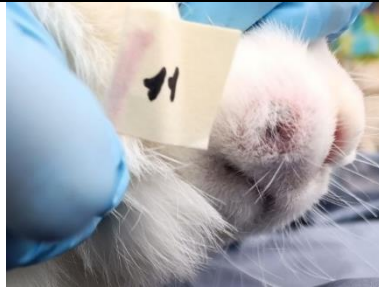


Absceso cicatrizado en la región rostral lateral izquierda.

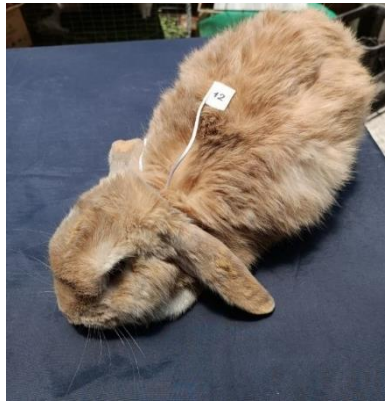


Lesión en la región dorsal posterior izquierda (a nivel sacro).





Absceso en la  
región rostral  
lateral izquierda.



Laceración en la  
región costal  
derecha (pulicosis  
y presencia de  
ácaros).



Lesiones en el área  
auricular interna.

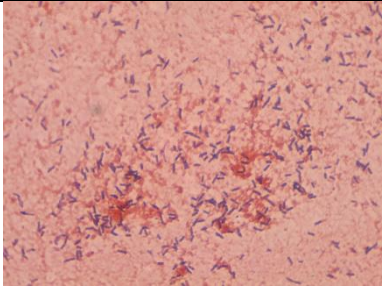
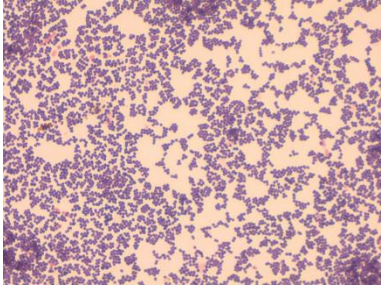
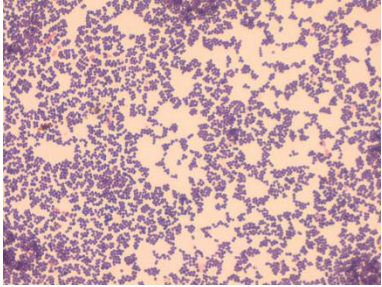
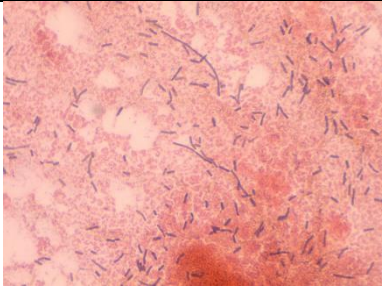
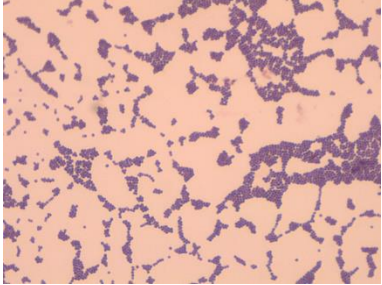
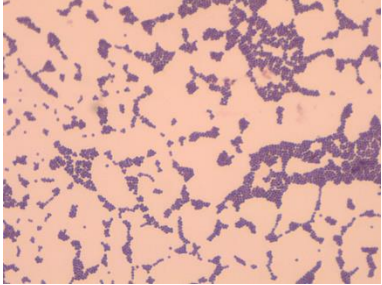


Lesión en la región  
proximal de la  
oreja izquierda.

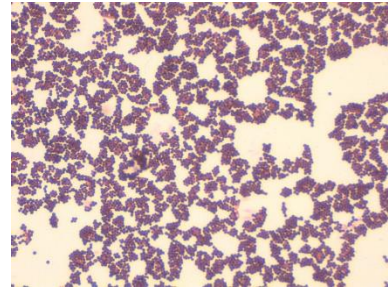


Lesión en la parte  
ocular, alrededor  
del borde de los  
párpados.

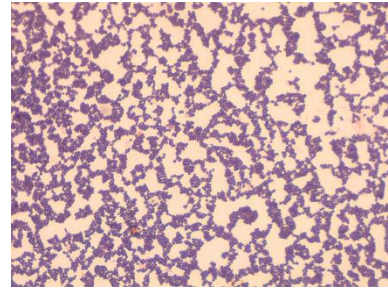
**Anexo 2. Colonias y tinción Gram de las muestras sembradas en agar sangre y manitol**

<b>Muestra número</b>	<b>Agar, número de colonia</b>	<b>Catalasa</b>	<b>Tinción Gram</b>	<b>Foto</b>
1a	Manitol	+	Bacilo G+	
	Sangre 1	+	Bacilo G-	
	Sangre 2	-	Cocos G+	
1b	Manitol	+	Bacilo G+	
	Sangre 1	+	Cocos G+	
	Sangre 2	+	Bacilo G-	

2a      Manitol      +      Cocos G+

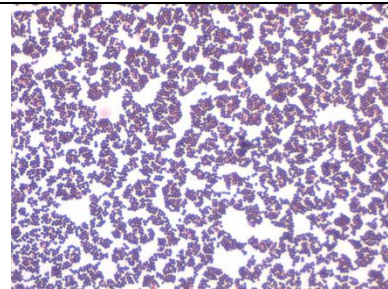


        Sangre      +      Cocos G+

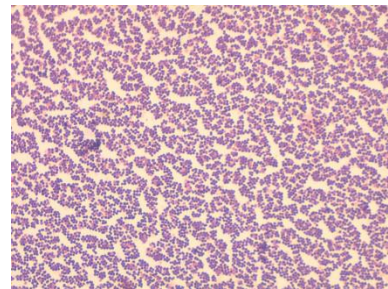


---

2b      Manitol      +      Cocos G+

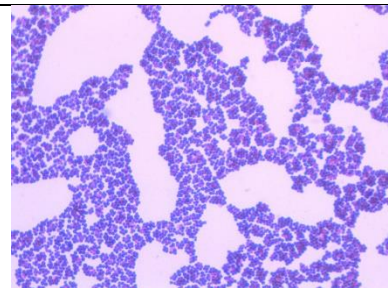


        Sangre      +      Cocos G+

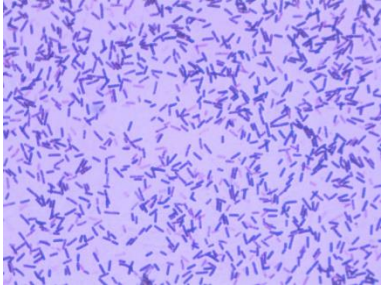
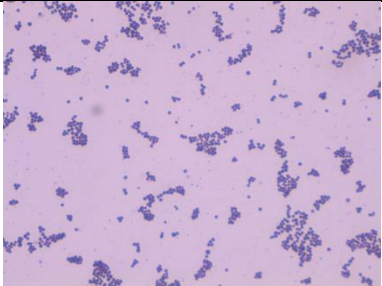
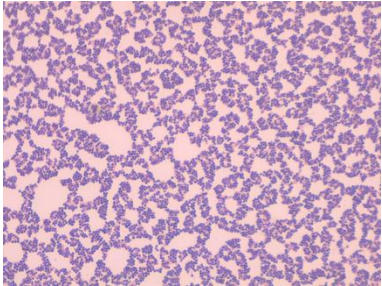
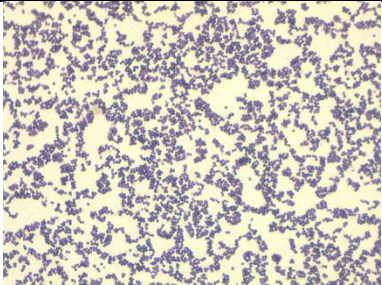
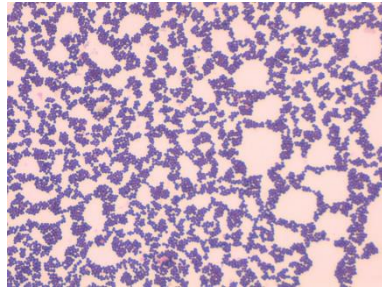


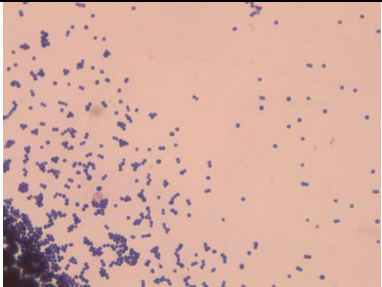
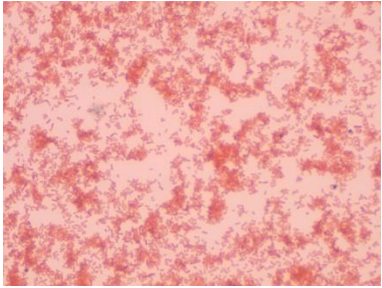
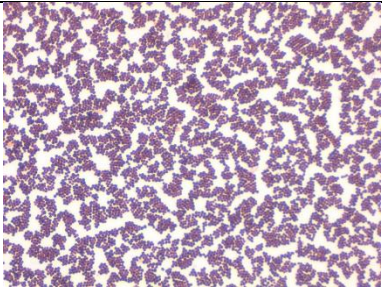
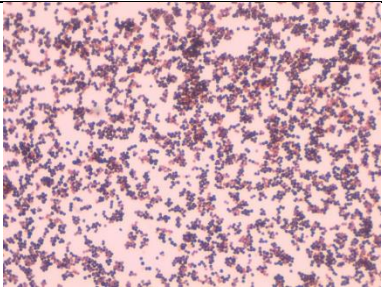
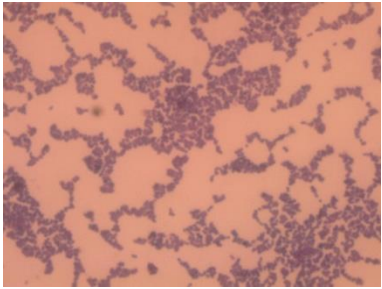
---

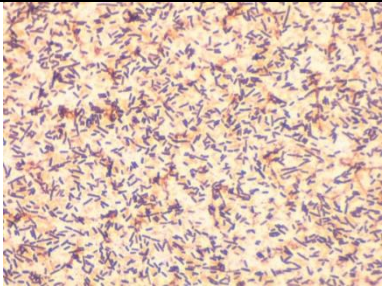
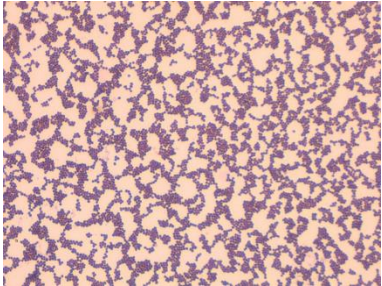
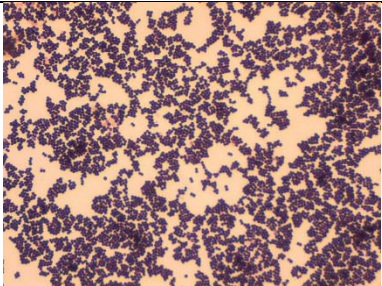
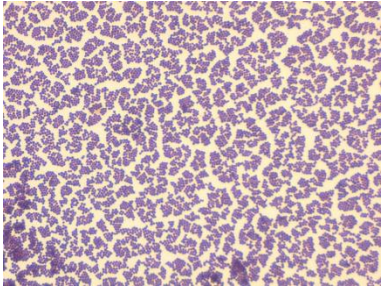
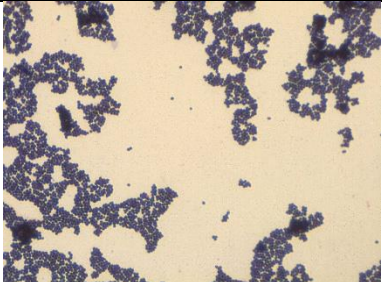
3a      Manitol      +      Cocos G+





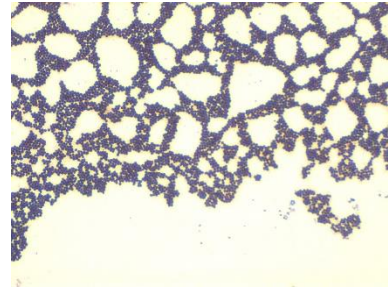
	Sangre	-	Bacilo G+	
3b	Manitol	+	Cocos G+	
	Sangre	+	Cocos G+	
4a	Manitol	-	Cocos G+	
	Sangre	-	Cocos G+	

4b	Manitol	+	Cocos G+	
	Sangre	-	Bacilo G-	
5a	Manitol	+	Cocos G+	
	Sangre	+	Mezcla	descartado
5b	Manitol	+	Cocos G+	
	Sangre	-	Cocos G+	

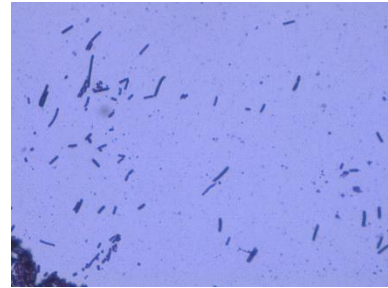
6a	Manitol	+	Bacilo G+	
	Sangre	+	Cocos G+	
6b	Manitol	+	Cocos G+	
	Sangre	+	Cocos G+	
7a	Manitol 1	+	Cocos G+	



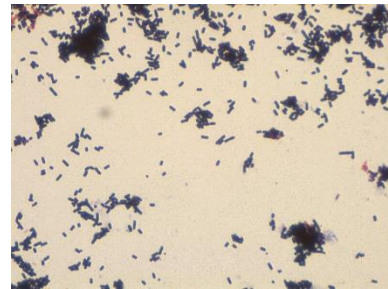
Manitol 2 + Cocos G+



Sangre 1 + Bacilo G+



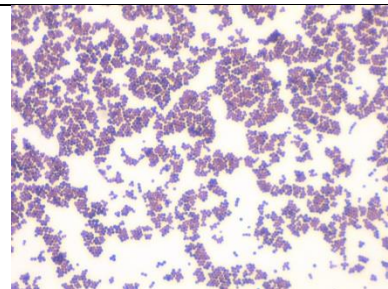
Sangre 2 + Bacilo G+



---

7b

Manitol + Cocos G+

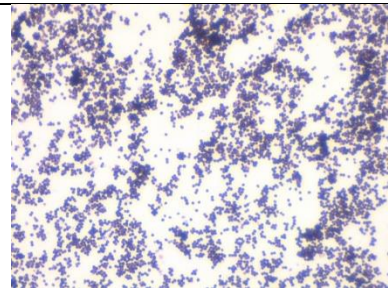


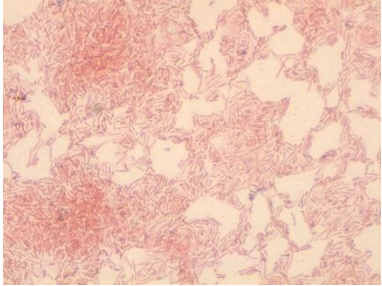
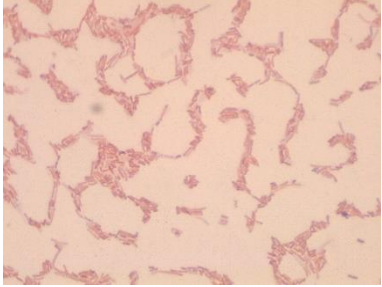
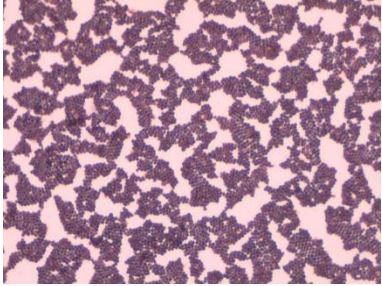
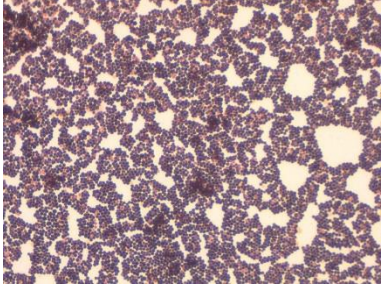
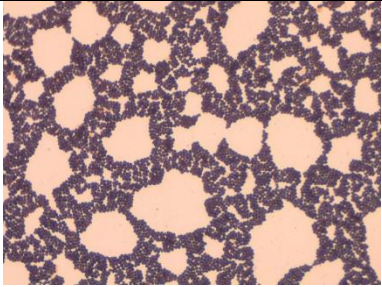
Sangre + Mezcla

---

8a

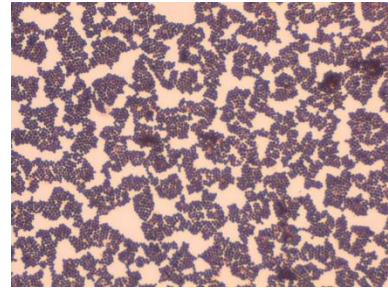
Manitol + Cocos G+



	Sangre	-	Bacilo G-	
	Manitol	No creció		
8b	Sangre 1	-	Bacilo G-	
	Manitol	+	Cocos G+	
9a	Sangre	+	Cocos G+	
9b	Manitol	+	Cocos G+	

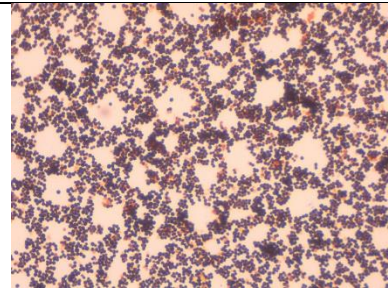


Sangre 1 + Cocos G+

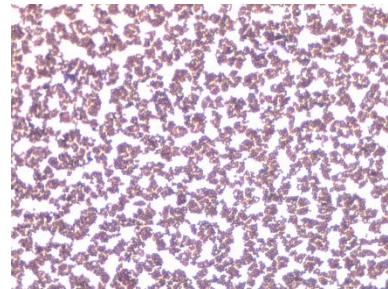


---

Manitol 1 + Cocos G+

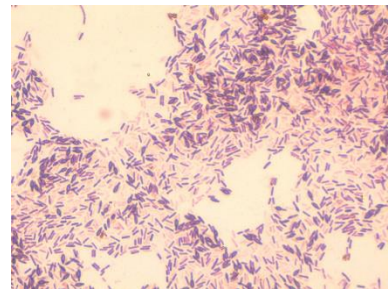


Manitol 2 + Cocos G+

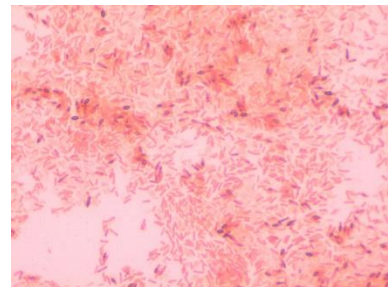


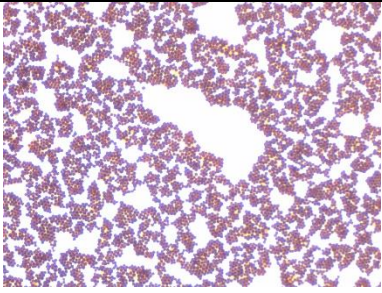
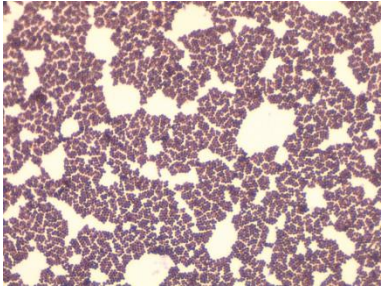
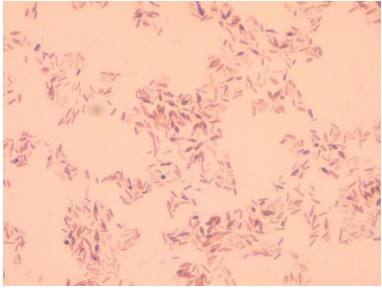
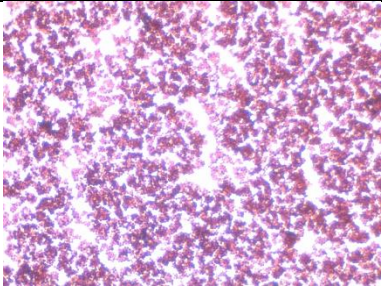
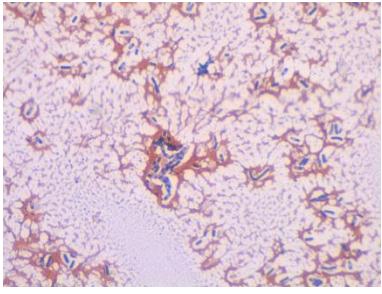
10a

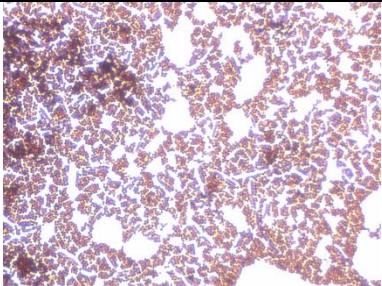
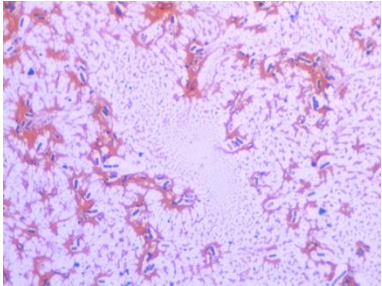
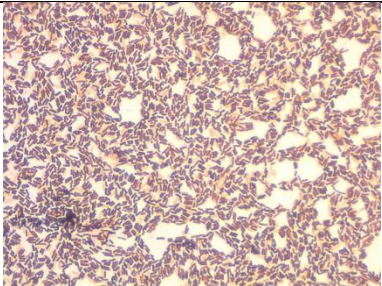
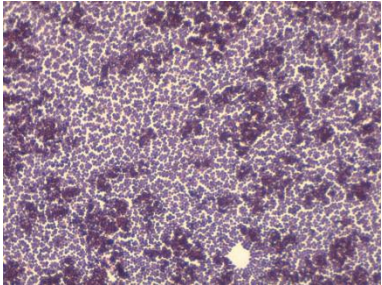
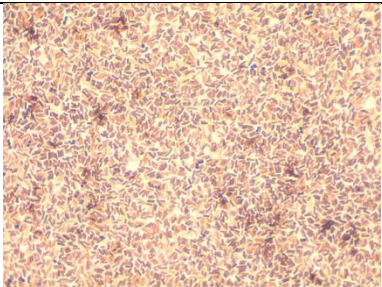
Sangre 1 + Bacilo G+



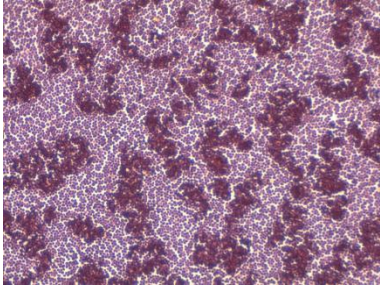
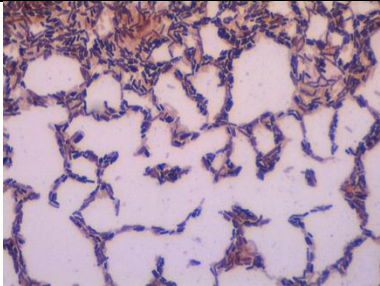
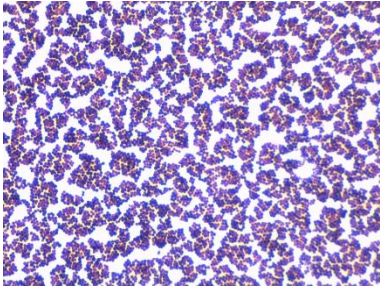
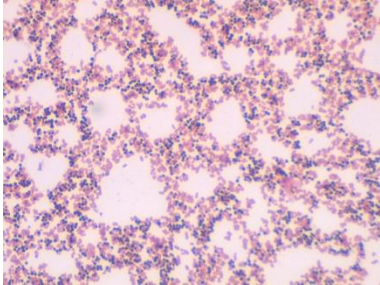
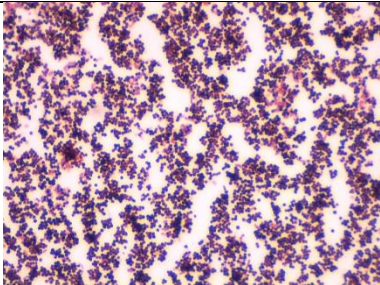
Sangre 2 - Bacilo G-



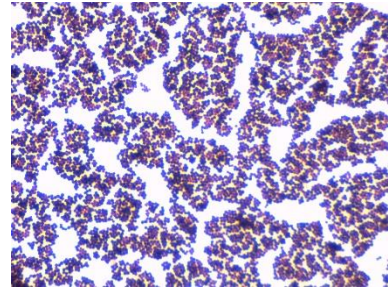
	Manitol	+	Cocos G+	
10b	Sangre 1	+	Cocos G+	
	Sangre 2	+	Bacilo G+	
11a	Manitol	+	Cocos G+	
	Sangre	+	Bacilo descartado	

11b	Manitol	+	Cocos G+	
	Sangre	+	Bacilo G+ descartado	
12a	Manitol	+	Bacilo G+	
	Sangre	-	Cocos G+	
12b	Manitol	+	Bacilo G+	

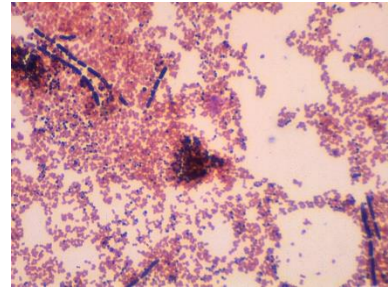


	Sangre	-	Cocos G+	
	Manitol 1	+	Bacilo G+	
13a	Manitol 2	+	Cocos G+	
	Sangre	+	Mezcla	
13b	Manitol 1	+	Cocos G+	

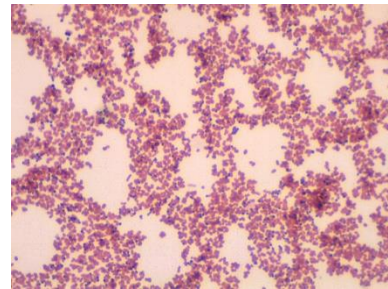
Manitol 2 + Cocos G+



Sangre 1 + Mezcla

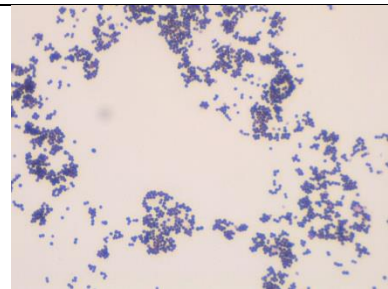


Sangre 2 + Mezcla



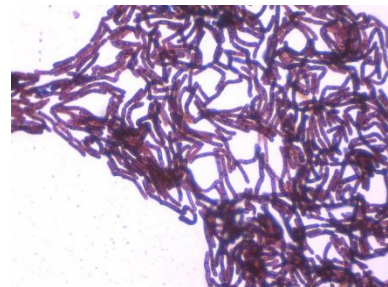
---

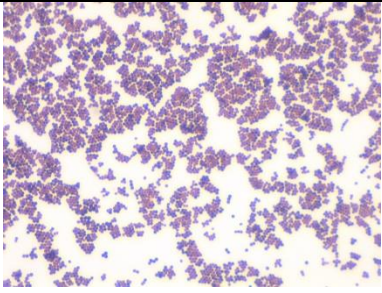
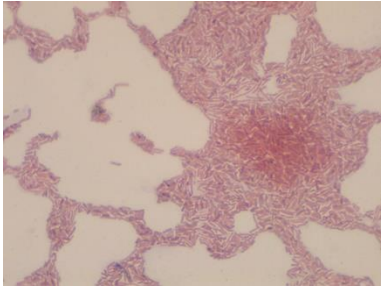
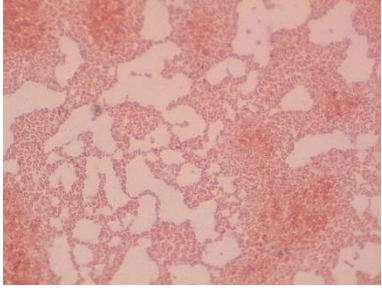
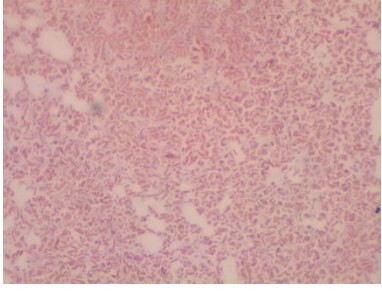
Manitol + Cocos G+



14a

Sangre - Bacilo G+



14b	Manitol	+	Cocos G+	
	Sangre	-	Bacilo G-	
15a	Manitol	No creció		
	Sangre	-	Bacilo G-	
15b	Manitol	No creció		
	Sangre	-	Bacilo G-	

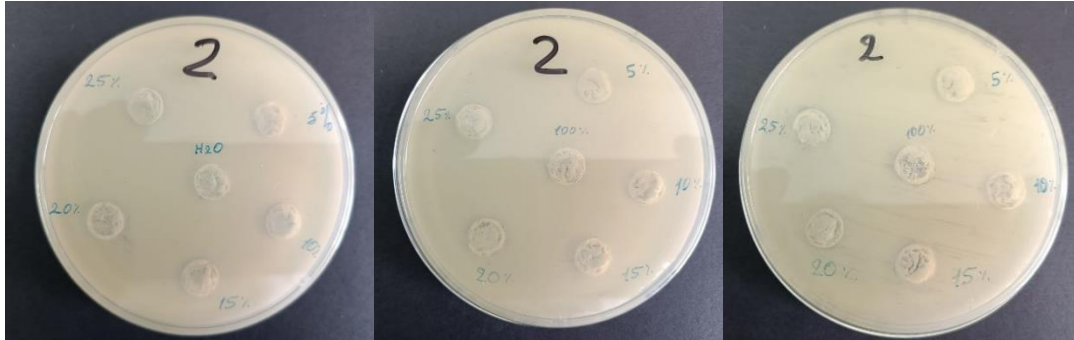
G+: Gram positivas

G-: Gram negativas

Se omitieron algunas fotos de las bacterias Gram negativas por su irrelevancia dentro de este estudio.

**Anexo 3. Placas de difusión en agar con sus réplicas.**

**Antibiograma de *Staphylococcus succinus*.**



**Antibiograma de *Paenibacillus profundus*.**





Anexo 4 Placas para conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).

Colonias de *Staphylococcus succinus* en la cuarta y quinta dilución seriada.

<i>Concentración de aceite esencial microencapsulado de hierba luisa</i>	<i>Fotografía</i>
5%	
10%	
15%	
20%	
25%	



Control Positivo



Control Negativo

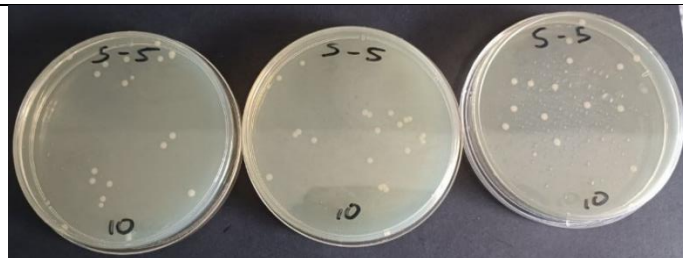


**Colonias de *Paenibacillus profundus* en la cuarta y quinta dilución seriada.**

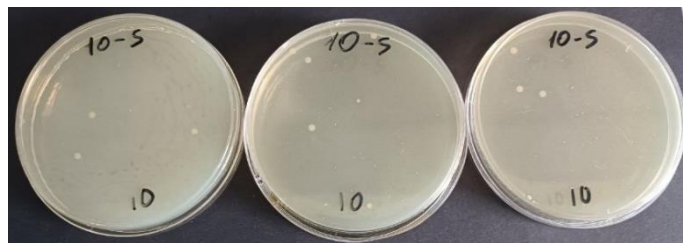
**Concentración de  
aceite esencial  
microencapsulado  
de hierba luisa**

**Fotografía**

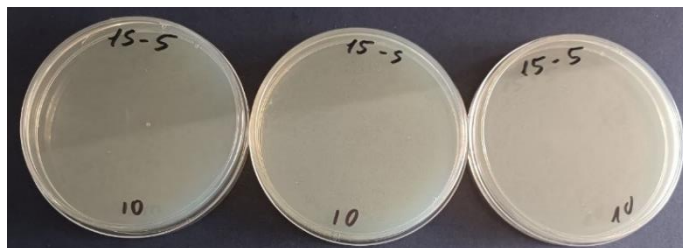
5%



10%

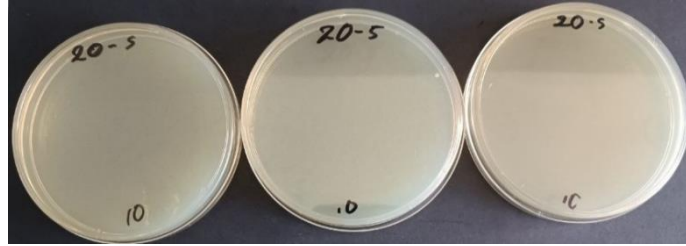


15%

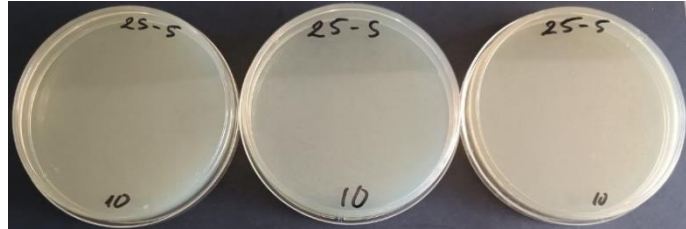


---

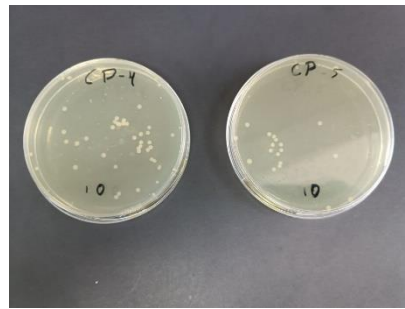
20%



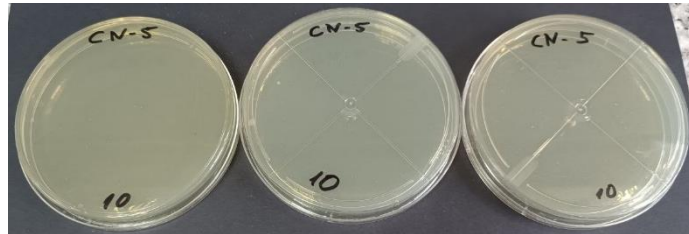
25%



Control positivo  
(comparación  
entre colonias en  
la cuarta y quinta  
dilución seriada)



Control Negativo



## Anexo 5. Estadística

**Comparación entre concentraciones de aceite de hierba Luisa frente a *Staphylococcus sp* según escala de sensibilidad.**

<b>Rangos</b>			
	VAR00001	N	Rango promedio
VAR00003	1,00	3	8,00
	2,00	3	8,00
	3,00	3	8,00
	4,00	3	8,00
	5,00	3	8,00
	Total	15	

### **Estadísticos de prueba<sup>a,b</sup>**

VAR00003	
H de Kruskal-Wallis	,000
gl	4
Sig. asintótica	1,000

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación:

VAR00001

**Comparación entre concentraciones de aceite de hierba Luisa frente a *Paenibacillus profundus* según escala de sensibilidad**

**Rangos**

	VAR00001	N	Rango promedio
3	1,00	3	8,00
	2,00	3	8,00
	3,00	3	8,00
	4,00	3	8,00
	5,00	3	8,00
	Total	15	

Para *Staphylococcus* vs control positivo

**Rangos**

	VAR00001	N	Rango promedio	Suma de rangos
VAR00003	1,00	15	11,00	165,00
	2,00	15	20,00	300,00
	Total	30		

**Estadísticos de prueba<sup>a</sup>**

VAR00003

U de Mann-Whitney	45,000
W de Wilcoxon	165,000
Z	-3,000
Sig. asintótica(bilateral)	,003
Significación exacta [2*(sig. unilateral)]	,004 <sup>b</sup>

a. Variable de agrupación: VAR00001

b. No corregido para empates.

**Paenibacillus vs Control Positivo**

**Rangos**

	VAR00001	N	Rango promedio
VAR00003	3,00	15	12,33
	4,00	15	18,67
	Total	30	

**Estadísticos de prueba<sup>a,b</sup>**

VAR00003

H de Kruskal-Wallis	4,045
gl	1
Sig. asintótica	,044

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación:

VAR00001

**UFC Comparación entre concentraciones de aceite de hierba Luisa frente a *Staphylococcus*.**

**Rangos**

	VAR00001	N	Rango promedio
VAR00003	1,00	3	14,00
	2,00	3	11,00
	3,00	3	2,00
	4,00	3	8,00
	5,00	3	5,00
	Total	15	

**Comparación entre concentraciones de aceite de hierba Luisa frente a *Paenibacillus profundus* UFC**

**Rangos**

	VAR00001	N	Rango promedio
VAR00003	1,00	3	13,00
	2,00	3	12,00
	3,00	3	5,00
	4,00	3	5,00
	5,00	3	5,00
	Total	15	

**Estadísticos de prueba<sup>a,b</sup>**

VAR00003

H de Kruskal-Wallis	13,011
gl	4
Sig. asintótica	,011

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación:

VAR00001