



# UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

## DIRECCIÓN DE POSGRADO

### MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS

#### MODALIDAD: PROYECTO DE DESARROLLO

**Título:**

---

Eficacia antimicrobiana del aceite esencial de *Ruta graveolens* (Ruda)  
sobre *Staphylococcus aureus* subesp *aureus* ATCC® 25904.

---

Proyecto de Desarrollo previo a la obtención del título de Magíster en Ciencias Veterinarias.

**Autor:**

Mayra Andrea Montero Recalde Mg.

**Tutor:**

Rafael Alfonso Garzón Jarrín PhD.

LATACUNGA –ECUADOR  
2021

## APROBACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de Tutor del Trabajo de Titulación “Eficacia antimicrobiana del aceite esencial de *Ruta graveolens* (Ruda) sobre *Staphylococcus aureus* subesp *aureus* ATCC® 25904” presentado por Montero Recalde Mayra Andrea, para optar por el título magíster en Ciencias Veterinarias.

### CERTIFICO

Que dicho trabajo de investigación ha sido revisado en todas sus partes y se considera que reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación para la valoración por parte del Tribunal de Lectores que se designe y su exposición y defensa pública.

Ambato, mayo, 2021

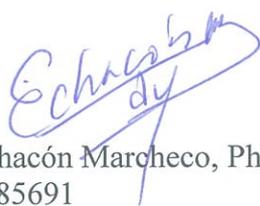


PhD. Rafael Alfonso Garzón Jarrín  
C.C. 0501097224

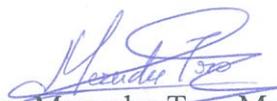
## APROBACIÓN TRIBUNAL

El trabajo de Titulación: Eficacia antimicrobiana del aceite esencial de *Ruta graveolens* (Ruda) sobre *Staphylococcus aureus* subesp *aureus* ATCC® 25904, ha sido revisado, aprobado y autorizada su impresión y empastado, previo a la obtención del título de Magíster en Ciencias Veterinarias; el presente trabajo reúne los requisitos de fondo y forma para que el estudiante pueda presentarse a la exposición y defensa.

Ciudad, mayo,14, 2021



Edilberto Chacón Marcheco, PhD  
C.C. 1756985691  
Presidente del tribunal



Blanca Mercedes Toro Molina, Msc  
C.C. 0501720999  
Lector 2



Lucía Monserrath Silva Deley, Msc  
C.C. 0602933673  
Lector 3

## **DEDICATORIA**

Este esfuerzo se lo dedico a mi hermosa familia, mi esposo que supo ser mi apoyo incondicional en todo momento, por la admiración a la dedicación y me dio las fuerzas para culminar este peldaño más de mi vida académica, y dando gracias a mi Dios y a mi Virgen María lo he logrado, a mi hijita María Victoria, la cual con gracia siempre manifestaba ya acabas esa maestría, pues hoy te digo muñequita mía por fin lo logré. Los amo!

*Mayra Andrea*

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a la Universidad Técnica de Cotopaxi, todo su componente docente, Unidad de posgrado, coordinador de la Maestría y tutor de la investigación PhD Rafael Garzón Jarrín; lectores del estudio, docentes que permitieron que se mantenga el rigor científico del documento; además a todos mis amigos que supieron darme ánimo y fuimos un equipo de trabajo muy colaborador, responsable y de camaradería.

*Mayra Andrea*

## RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Quien suscribe, declara que asume la autoría de los contenidos y los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación.

Ambato, mayo, 2021

  
Mayra Andrea Montero Recalde. Mg  
C.C. 1802517142

## RENUNCIA DE DERECHOS

Quien suscribe, cede los derechos de autoría intelectual total y/o parcial del presente trabajo de titulación a la Universidad Técnica de Cotopaxi.

Ambato, mayo, 2021

  
Mayra Andrea Montero Recalde  
C.C. 802517142

## AVAL DEL VEEDOR

Quien suscribe, declara que el presente Trabajo de Titulación: Eficacia antimicrobiana del aceite esencial de *Ruta graveolens* (Ruda) sobre *Staphylococcus aureus* subesp *aureus* ATCC® 25904 contiene las correcciones a las observaciones realizadas por los lectores en sesión científica del tribunal.

Ambato, mayo, 2021



Edilberto Chacón Marcheco. PhD.  
C.C. 1756985691

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI**  
**DIRECCIÓN DE POSGRADO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**Título:** Eficacia antimicrobiana del aceite esencial de *Ruta graveolens* (Ruda) sobre *Staphylococcus aureus* subesp *aureus* ATCC® 25904

**Autor:** Montero Recalde Mayra Andrea. Mg

**Tutor:** Rafael Alfonso Garzón Jarrín. PhD

**RESUMEN**

La investigación tuvo como objetivo evaluar la eficacia antimicrobiana del aceite esencial de ruda (*Ruta graveolens*) sobre la cepa de *Staphylococcus aureus* subp *aureus* ATCC ®25904, la planta fue recolectada del sector de Inapisi de la parroquia de Constantino Fernández, el aceite obtenido fue a través del método de hidrodestilación, se evaluó 10 concentraciones (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%) en dilución con agua bidestilada, cada dilución se manejó con un total de 5ml y se adicionó Tween 80 como emulsificador al 0,1%, los resultados demostraron que la Concentración Mínima Inhibitoria determinada del aceite esencial se definió en el 30%; y con respecto a la Concentración Mínima Bactericida evidenciada por el cero crecimiento de colonias en placa, la cual se la estableció al 40% de concentración; el estudio de sensibilidad antimicrobiana precisó estadísticamente con la prueba de Tukey al 0.5% diferencias significativas entre tratamientos, siendo el mejor al 90% de concentración con 25,25 mm de formación de halos de inhibición, no obstante los tratamientos a partir del 30% presentaron formación de halos de manera importante, concluyendo que el aceite esencial de *Ruta graveolens* posee eficacia antimicrobiana sobre la cepa evaluada a partir del 30% de concentración.

**PALABRAS CLAVE:** Aceite, cepa, Sensibilidad antimicrobiana, Concentración mínima inhibitoria, Concentración mínima bactericida

**TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI  
DIRECTION OF POSGRADUATE**

**MASTER OF VETERINARY SCIENCE**

**Title:** Antimicrobial efficacy of *Ruta graveolens* (Rue) essential oil on *Staphylococcus aureus* subsp *aureus* ATCC® 25904

**Author:** Mayra Andrea Montero Recalde. Mg

**Tutor:** Rafael Alfonso Garzón Jarrín. PhD

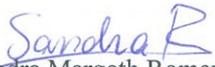
**ABSTRACT**

The objective of the research was to evaluate the antimicrobial efficacy of the essential oil of ruda (*Ruta graveolens*) on the strain of *Staphylococcus aureus* subsp *aureus* ATCC ®25904, the plant was collected from the Inapísí sector of Constantino Fernández, the oil was obtained with the hydrodistillation technician, 10 concentrations were evaluated (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% ) in dilution with double distilled water, each dilution was handled a total of 5 ml and Tween 80 was added as 0.1% as emulsifier, the results showed that the determined Minimum Inhibitory Concentration of the essential oil was defined at 30%; with respect to the Bactericidal Minimum Concentration evidenced by the zero growth of colonies on the plate, which was established at 40% concentration; the antimicrobial sensitivity study statistically show significant differences between treatments with the 0.5% Tukey test, the best being at 90% concentration with 25.25 mm of inhibition halo formation, however the treatments starting at 30% and showed significant halos formation, concluding that *Ruta graveolens* oil has antimicrobial efficacy on the strain evaluate.

**Key words:** oil, strain, antimicrobial sensitivity, minimum inhibitory concentration, minimal bactericidal concentration

Sandra Margoth Romero Peña con cédula de identidad número 1802990430 Licenciada en Ciencias de la Educación mención inglés con número de registro de la SENESCYT 1010-06-726587; **CERTIFICO** haber revisado y aprobado la traducción al idioma inglés del resumen del trabajo de investigación con el título: Antimicrobial efficacy of *Ruta graveolens* (Rue) essential oil on *Staphylococcus aureus* subsp *aureus* ATCC® 25904 de: Mayra Andrea Montero Recalde aspirante a Magíster en Ciencias Veterinarias.

Ambato, mayo, 2021

  
Sandra Margoth Romero Peña  
C.C.1802990430

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

## CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Justificación.....	2
1.2. Planteamiento del problema.....	4
1.3. Hipótesis.....	5
1.4. Objetivos de la investigación .....	5
1.4.2. Objetivo general .....	5
1.4.2. Objetivos específicos .....	5

## CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	7
2.1. La Ruda ( <i>Ruta graveolens</i> ) .....	7
2.2. Taxonomía de la Ruda.....	8
2.4. Principios activos de la Ruda ( <i>Ruta graveolens</i> ) .....	8
2.5. Efectos tóxicos .....	9
2.6. Usos medicinales de la <i>Ruta graveolens</i> (Ruda).....	9
2.3. Aceites esenciales.....	10
2.7. Obtención de aceites esenciales .....	11
2.8. Método de arrastre por vapor .....	11
2.7. <i>Staphylococcus aureus</i> subesp <i>aureus</i> .....	12
2.8. Factores de virulencia y patogenicidad de <i>Staphylococcus aureus</i> subesp <i>aureus</i> .....	13
2.9. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana .....	13
2.10. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	14
2.11. Concentración Mínima Bactericida (CMB) .....	14
2.11. Método de difusión en disco .....	15
2.12. Medios de cultivo .....	15
2.12.1. Agar manitol salado .....	15
2.12.2. Agar Mueller - Hinton.....	16
2.12.3. Caldo cerebro corazón.....	16
2.12.4. Emulsificante Tween 80.....	16

2.12.5. Vancomicina .....	17
---------------------------	----

### **CAPÍTULO III**

MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
3.1. Ubicación Geográfica.....	18
3.2 Equipos y materiales .....	18
3.2.1. Material experimental .....	18
3.2.2. Cepa bacteriana .....	18
3.2.3. Equipos.....	18
3.2.4. Material de laboratorio.....	19
3.2.5. Material y reactivos microbiológicos.....	19
3.2.6. Factores de estudio.....	20
3.2.7. Tratamientos y diseño experimental .....	20
3.2.8. Material vegetal.....	21
3.2.9. Obtención del aceite esencial de Ruda ( <i>Ruta graveolens</i> ).....	21
3.2.10. Rendimiento en la obtención del aceite esencial de Ruda ( <i>Ruta graveolens</i> ).....	22
3.2.11. Preparación de concentraciones del aceite esencial de <i>Ruta graveolens</i> (Ruda).....	22
3.2.12. Cepa bacteriana .....	22
3.2.13. Activación de la cepa bacteriana.....	23
3.2.14. Preparación del inóculo bacteriano .....	23
3.2.15. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) .....	23
3.2.16. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida .....	24
3.2.17. Sensibilidad antimicrobiana .....	24

### **CAPÍTULO IV**

RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	25
------------------------------	----

### **CAPÍTULO V**

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	31
5.1. Conclusiones .....	31

**CAPÍTULO VI**

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....32

**CAPÍTULO VII**

ANEXOS .....44

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de Ruda ( <i>Ruta graveolens</i> ).....	26
<b>Tabla 2.</b> Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del aceite esencial de Ruda ( <i>Ruta graveolens</i> ).....	28
<b>Tabla 3.</b> Sensibilidad antimicrobiana del aceite esencial de Ruda ( <i>Ruta graveolens</i> ) sobre la cepa <i>Staphylococcus aureus</i> subesp <i>aureus</i> ATCC® 25904 .....	28

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

*Ruta graveolens*, conocida como ruda es una planta de tipo perenne, perteneciente a la familia *Rutaceae*, de origen europeo, y cultivado como planta ornamental al poseer sus hojas de colores llamativos azul y amarillo; la utilizan principalmente como hierba medicinal, utilizado en varias culturas ancestrales como emenagogo, efecto abortivo, problemas intestinales, antiparasitario (1), antiinflamatorio y antimicrobiano (2); atribuyéndose éstas características a la presencia de metabolitos secundarios como alcaloides, terpenos, cumarinas y flavonoides (3), varios ensayos del aceite esencial de Ruda han demostrado la actividad antibacteriana sobre bacterias tanto del grupo Gram positivas como Gram negativas (4) y su uso como el de otros componentes de plantas se han convertido como alternativas al abuso de antimicrobianos tradicionales en la búsqueda de controlar infecciones persistentes (3).

La presencia en los últimos años de multirresistencias de diferentes grupos de bacterias a los antibióticos; así las bacterias del género *Staphylococcus* resistentes a la meticilina (SRM), principalmente *S. aureus* y *S. pseudointermedius* (SARM y SPRM), se han convertido un problema en la profesión veterinaria, y la aparición de éstas cepas resistentes a múltiples fármacos (MDR) ha conducido a varias dificultades en el tratamiento de enfermedades infecciosas (5), causante de altos índices de mortalidad y morbilidad en animales de abasto como mascotas, sin dejar a un lado el riesgo zoonótico que éstas representan (6), el uso de varias plantas medicinales en remedios naturales se ha incrementado de manera drástica y por ende la determinación de sus componentes químicos y sus usos posibles usos en la

medicina volviéndose una prioridad para los farmacólogos y una gran parte de la comunidad científica (7).

Los usos de varios aceites esenciales en la inhibición de varios grupos bacterianos gran positivos han sido estudiados de manera extensiva y entre las técnicas mayormente utilizadas en la determinación de la actividad antimicrobiana son la técnica de difusión de discos en agar como dilución en caldo, al ser técnicas sencillas y de alta reproducibilidad (8), ésta prueba de susceptibilidad microbiana se lo ha venido utilizando en la determinación de la concentración mínima bactericida (MBC) conocido como la concentración más baja del agente antimicrobiano indispensable para matar el 99% del inóculo inicial al ser incubado por 24 horas dentro de condiciones estandarizadas y la prueba de determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) la cual es definida como la concentración más baja de sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de ser incubado por 24 horas (9).

### **1.1. Justificación**

Las plantas han sido a través de los tiempos muy útiles para el hombre no solo como fuente de alimento sino como medicina tradicional para controlar varias enfermedades, y se cree que existe por lo menos 35000 especies vegetales y el 80% de la población mundial utilizan como remedios alternativos en la cura de dolencias (10); los saberes ancestrales para muchas personas son parte esencial en la cotidianidad de millones de personas en los países en vías de desarrollo, principalmente los indígenas han transmitido sus conocimientos de generación en generación jugando parte importante en la vida de las comunidades (11).

Existe un gran interés por la medicina tradicional, específicamente la medicina herbaria, que ha producido numerosos estudios, los mismos que han sido divulgados, y a pesar de eso hay poco uso de medicamentos de origen vegetal por parte de los profesionales de la salud (12), los conocimientos ancestrales a través del tiempo, acceso y sus costos bajos han convertido a ésta medicina en una

alternativa de tratamiento que se han mantenido hasta la actualidad (13); las propiedades antimicrobianas del aceite esencial de *Ruta graveolens* han sido investigadas como herramientas a futuro en la solución de los problemas ligados a la resistencia de varios microorganismos que causan enfermedades tanto en plantas como animales (14).

Según SENPLADES en el objetivo 3 del Plan Nacional 2013-2017 en el Ecuador se establece como política de estado el fortalecer y consolidar la salud intercultural, en la cual se incorpora la medicina ancestral y alternativa a todo el Sistema Nacional de Salud, que busca diseñar y aplicar protocolos para facilitar la implementación progresiva de la medicina ancestral con visión holística, tanto en los servicios de salud pública y privada (15), además que al encontrarse en la línea ecuatorial mantiene una de las mayores diversidades del mundo y en donde las poblaciones indígenas y campesina mantienen el uso de los remedios naturales (16).

Perú mantiene una riqueza botánica y por ende un uso variado de plantas como medicina natural, cerca de 5000 especies de plantas son utilizadas por la población para la alimentación, medicina, adornos, construcción, forraje, colorantes y otros usos (11), de manera general en el mundo la etnobotánica posee hoy día un reconocimiento científico y más aún en América Latina, cobrando importancia por la relación de entre los comportamientos sociales y los recursos vegetales, además de sus dinámicas ecológicas locales, las cuales son efectivas dado a la conservación indígena y campesina por su uso local a través del tiempo de plantas medicinales (17).

En el campo de la etnobotánica, el Ecuador es un país de gran interés debido a que en la misma existe una gran diversidad de plantas como 500 especies aproximadamente, de las cuales un total de 228 se registran como las de mayor frecuencia en su uso, y 125 se las comercializa de modo fresco, extractos pulverizados, o aceites esenciales y enviados a países del primer mundo como Alemania, Holanda y Estados Unidos (18); su importancia en los países en vías de desarrollo como el Ecuador radica directamente en la salud de las poblaciones

indígenas y campesinas, los cuales no siempre tienen acceso a la medicina avanzada (19).

## **1.2. Planteamiento del problema**

Al no existir publicaciones en el Ecuador del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Ruta graveolens* (Ruda) sobre *Staphylococcus aureus* subesp *aureus*, se ha visto necesario investigar el efecto antimicrobiano in vitro sobre esta bacteria de alta virulencia y que se ha convertido en una de las especies que ha llamado la atención en el mundo, tanto para humanos como animales, produciendo una gran gama de enfermedades que van desde la afectación de piel, tejidos blandos de manera externa como endógenamente pudiendo atacar a pulmones y endocardio.

Con respecto a la pérdidas económicas que produce en el área de la Medicina Veterinaria encontramos a la mastitis, siendo en los animales de producción una de las enfermedades de mayor prevalencia en el Ecuador como en el mundo; convirtiéndose la mayoría en estados crónicos, siendo inefectivo las medidas curativas y preventivas tradicionalmente utilizadas, ya que *Staphylococcus aureus* presenta varios factores de virulencia siendo la toxina beta la que encontramos mayormente en las mastitis bovinas' generando cronicidad de la enfermedad, además no se puede olvidar que este grupo bacteriano tiene varios mecanismos para producir resistencia bacteriana a varios antibióticos especialmente a la meticilina y vancomicina, siendo penicilinas de gran uso y abuso en el tratamiento de la misma, que podrían inclusive vincularse con problemas de Salud pública relacionados a la resistencia antimicrobiana.

Las plantas medicinales han ido ganando terreno en la industrias de alimentos, cosmética y principalmente farmacéutica, lo que incentiva que el estudio sistemático es necesario de los aceites esenciales ya que existen varias investigaciones que afirman esos efectos antibacterianos, y se ha considerado el estudio de la Ruda, al ser una planta nativa, de crecimiento silvestre, que es utilizada de manera común por parte de nuestros campesinos, en el tratamiento de varias enfermedades de sus animales, debido a sus sustancias bioactivas con efectos

antiinflamatorias, insecticidas, analgésicas y antibacterianas, lo cual impulsa el buscar opciones en el control a este grupo bacteriano *Staphylococcus aureus* subesp *aureus* al ser un patógeno que genera biofilms como mecanismo de resistencia, y que afecta a varios mamíferos con grandes pérdidas económicas por sus altas porcentajes de morbilidad y mortalidad.

¿El aceite esencial de *Ruta graveolens* (Ruda) actúa como antimicrobiano sobre cepas de *Staphylococcus aureus* subesp *aureus* ATCC® 25904?

## **1.2.Hipótesis**

H alternativa: El aceite esencial de Ruda (*Ruta graveolens*) posee eficacia antimicrobiana sobre la cepa de *Staphylococcus aureus* subesp *aureus* ATCC® 25904.

H nula: El aceite esencial de Ruda (*Ruta graveolens*) no posee eficacia antimicrobiana sobre la cepa de *Staphylococcus aureus* subesp *aureus* ATCC® 25904.

## **1.4. Objetivos de la investigación**

### **1.4.2. Objetivo general**

- Evaluar la eficacia antimicrobiana del aceite esencial de Ruda (*Ruta graveolens*) sobre cepa certificada de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25904.

### **1.4.2. Objetivos específicos**

- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria CMI y CMB a partir de las concentraciones del 10% al 100% del extracto de Ruda sobre cepa de *Staphylococcus aureus* subesp *aureus* ATCC® 25904.

- Establecer la sensibilidad antimicrobiana del extracto de Ruda a partir de concentraciones del 10% al 100% sobre cepa certificada de *Staphylococcus aureus* subesp *aureus* ATCC® 25904.

## CAPÍTULO II

### FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

#### 2.1. La Ruda (*Ruta graveolens*)

La familia *Rutaceae*, Ruda, es una planta nativa de origen del sur de Europa y Asia menor (20), es un arbusto de hojas perennes correspondiente al orden Rutales, posee aproximadamente más de 1600 especies con 150 géneros esparcidos principalmente en zonas templadas y tropicales de todo el globo terráqueo, encontrándose en mayor cantidad en Sudáfrica, Australia y América (21), es un arbusto que se lo conoce popularmente como ruda, adquiere una altura de un metro, con un tallo ramificado y hojas verdes de color gris, en el Ecuador la Ruda es una especie introducida y se la encuentra en varias provincias de la Sierra ecuatoriana entre los 2500 y 3000 m.s.n.m, esto en las provincias de Tungurahua, Chimborazo, Bolívar, Pichincha y Azuay (22).

*Ruta graveolens* L se la considera una planta odorífera, denominado Sadab en India; cultivada como hierba ornamental y medicinal (23); las especies de Ruda son fuentes de diferentes clases de productos naturales con actividades biológicas, que incluyen actividades antifúngicas, antioxidantes, fitotóxicas, depresivas, abortivas, antidotas, antiinflamatorias (24) además son conocidas por sus actividades antiparasitarias, estomacales, digestivas, vermífugas, emenagogas y molusquicidas (25), una de las aplicaciones más principales es en infusión de té, el cual permite un alivio de los cólicos menstruales, debido a sus propiedades antiespasmódicas (22).

## 2.2. Taxonomía de la Ruda (26)

<b>Reino:</b>	Plantae
<b>División:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Magnoliopsida
<b>Subclase:</b>	Rosidae
<b>Orden:</b>	Sapindales
<b>Familia:</b>	Rutaceae
<b>Género:</b>	Ruta
<b>Especie:</b>	<i>Ruta graveolens</i>
<b>Nombre binom:</b>	<i>Ruta graveolens</i> L

## 2.4. Principios activos de la Ruda (*Ruta graveolens*)

El carácter lipofílico de la cadena de hidrocarburos e hidrofílico de los grupos funcionales de los aceites esenciales les dan la característica de antimicrobianos y su actividad va disminuyendo de orden decreciente así: fenoles - aldehídos - cetonas - alcoholes - éteres - hidrocarburo (27), el perfil del extracto o aceite de *R. graveolens* desde el aspecto químico está compuesto por 10 componentes aproximadamente, representando del aceite esencial el 97,3 % siendo el de mayor proporción 2-Undecanone y 2-Nonanone en un 55.4 y 21.62% respectivamente) seguido de 1-Nonene y  $\alpha$ -Limonene a 4.35 y 4.26% respectivamente (28) posee también en su composición grupos de alcaloides los cuales tienen varias actividades (29), entre las que se rescata antifúngica (30); estudios realizadas determinaron que la composición química del aceite de *Ruta chalepensis* una especie muy cercana mostró una elevada cantidad de cetonas alifáticas, con un 70% de abundancia y mayoritaria de las cetonas (2-undecanona y la 2-nonanona) representando el 60,11% y esta predominancia es una característica en varios aceites obtenidos a partir de otras plantas del mismo género (31).

## **2.5. Efectos tóxicos**

*Ruta graveolens* posee efectos tóxicos principalmente sobre embriones generando anomalías y disminuyendo la vitalidad de los mismos, dado por un grupo de alcaloides y cumarinas que poseen en su composición, así como reabsorciones fetales(32)(33); se ha presentado también en numerosas publicaciones efectos de fototoxicidad debido a la interacción entre la los rayos UV y la piel con infusiones de *Ruta graveolens*, provocando graves quemaduras (34).

Las investigaciones también detallan que la Ruda puede producir cambios durante el desarrollo embrionario de la *Drosophila melanogaster* provocando malformaciones, por lo tanto los autores concluyen que existe elevada probabilidad de producir efectos teratogénicos en otras especies como el ser humano (35).

Las plantas medicinales y sus derivados pueden presentar dos tipos de toxicidad: toxicidad intrínseca, producen metabolitos tóxicos para el ser humano y la sintomatología está directamente relacionada con la dosis, a lo cual se la conoce como intoxicación aguda, y una intoxicación crónica dependerá del tiempo de consumo, mientras que la toxicidad extrínseca, la planta no produce sustancias tóxicas sino a partir de contaminantes como pesticidas y micotoxinas (36).

## **2.6. Usos medicinales de la *Ruta graveolens* (Ruda)**

La Ruda es una de las plantas más populares por su olor desagradable característico el cual le ha atribuido sus varios usos, sus efectos medicinales son utilizados como calmantes, cólicos menstruales, amenorrea, las propiedades medicinales de varias plantas medicinales se deben al alto contenido de esteroides, flavonoides, fenoles, taninos, terpenoides y saponinas (37), la actividad biológica de la planta de *Ruta graveolens* dependerá de varios factores así: parte de la planta tomada para la obtención del aceite, fuente geográfica, las condiciones del suelo; además de los métodos al momento de la recolección o cosecha (38).

En Ecuador la presencia de las plantas medicinales sean de venta en mercados locales u obtenidas en el campo, es decir las de tipo silvestre, la gente que vive en sitios urbanos como rurales la utilizan para afectaciones o dolencias relacionadas con la inflamación, problemas circulatorios, estomacales, en la menstruación, afectaciones de hígado, resfrío y riñones, además utilizadas para prácticas rituales (37), también posee efectos antiespasmódicos, antihelmínticos, antimicrobianos, y hasta abortivos (33):

Sus usos veterinarios están enfocados a su principios en el uso medicinal de los seres humanos, pero la mayoría de criadores de animales de granja lo usan al momento de partos difíciles, la eliminación de placentas retenidas, además lo utilizan en animales de tiro para aliviar el dolor y en el caso de conejos, cobayos y gallinas para el control de insectos parásitos como los piojos, para lo cual la ruda lo ubican en el suelo o lo cuelgan en lugares visibles (39).

### **2.3. Aceites esenciales**

Los aceites esenciales son sustancias de origen vegetal, compuestos metabolitos secundarios volátiles, los cuales son insolubles en agua y que les brindan características particulares según la proporción en que se les encuentren (40); los aceites esenciales se los puede obtener a partir de un vegetal cuando se lo somete a un proceso de destilación por arrastre de vapor (41); los aceites esenciales son considerados líquidos aromáticos, compuestos por terpenos, terpenoides, fenilpropanoides, estudiadas como que moléculas bioactivas de tipo natural que aportan como una opción en el tratamiento de varias enfermedades infecciosas y su efecto antimicrobiano es conocido desde hace mucho tiempo y científicamente comprobado y aplicado en varios campos de la industria y de la salud (42).

Varios estudios han determinado que los compuestos químicos del aceite esencial de Ruda especialmente las cetonas (2-undecanona) producen un efecto antimicrobiano sobre bacterias como: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* (37), investigaciones sobre cepas de *Streptococcus suis*

muestran también efectos antimicrobianos muy elevados, convirtiéndose en alternativas de tratamiento en la medicina veterinaria (14), el estudio realizado por Delgadillo determinó que la actividad antibacteriana sobre la bacteria *Staphylococcus aureus* fue la de mayor efecto inhibidor (43), existen también estudios sobre los efectos antimicrobianos de cepas de *Listeria monocitogenes* y *Staphylococcus epidermidis* (4).

## **2.7. Obtención de aceites esenciales**

Los aceites esenciales pueden ser extraídos mediante varios métodos muy conocidos y convencionales como destilación por arrastre de vapor, hidrodestilación (44), pero en la actualidad existen otros métodos entre los que se recalca a los obtenidos mediante extracción con fluidos críticos utilizando el dióxido de carbono y mediante radiación por microondas, y el costo reducido de estos procesos de extracción son sumamente ventajosos y económicos en términos de tiempo y energía (45) y los más utilizados en para la extracción de aceites esenciales a partir de plantas por ser rápida, eficaz y evitan el uso de solventes orgánicos nocivos (46).

## **2.8. Método de Hidrodestilación**

El método de hidrodestilación es el uso de vapor saturado, en la cual la materia prima está en contacto con el agua generadora del vapor (22); el término hidrodestilación, obtiene el aceite esencial de una planta aromática gracias al uso del vapor saturado a presión atmosférica, la materia prima forma un lecho compacto y se desprecia el reflujo interno de agua debido a la condensación del vapor circundante (4), los aceites esenciales poseen un punto de ebullición superior al del agua, pero en la mezcla de aceite esencial más agua presenta un punto de ebullición inferior y por esto puede ser destilada, una vez que pasan por el condensador los vapores se enfrían, se condensan y se transforman en un líquido formado por dos fases inmiscibles, la una llamada fase orgánica que contiene el aceite esencial y finalmente la fase acuosa compuesta por la fracción de componentes solubles en el

agua, la separación de estas dos fases se debe a la diferencia de densidades, esto es son inmiscibles debido a que la fase orgánica es la fase menos densa y flota sobre la fase acuosa (47).

Este método es muy utilizado por sus varias ventajas como le recalca varias investigaciones, por ser fáciles de instalar, seguros, económicos, buen rendimiento de los aceites extraídos y libres de solvente, siendo su principal desventaja la alta temperatura de acción y la afectación en ciertos componentes de aceites esenciales sensibles al calor (47), los aceites esenciales obtenidos son diferentes al aceite original del material vegetal, y algunos compuestos químicos no volátiles se quedan en el destilador; estos compuestos son responsables del sabor y no del olor (48).

### **2.7. *Staphylococcus aureus subesp aureus***

Los estafilococos forman agrupaciones en forma de uvas y cuyo diámetro va desde 0.5 y 1.5 micras, se compone de 35 especies y 17 subespecies del género *Staphylococcus* (49) mantiene una gran adaptación por lo tanto afecta a un sinnúmero de mamíferos, considerada como zoonótica y de fácil propagación de una especie a otra (50), responsable en diferentes áreas geográficas de bacteriemias y un incremento de las tasas de resistencia a los antibióticos, y como antes se creía ya no solo está limitado a los centros hospitalarios sino también a la comunidad en general con la presencia de *Staphylococcus* meticilino-resistentes (6).

Las especies de éste género son coagulasa positivos, ésta sustancia considerada enzima genera que el plasma se coagule convirtiendo el fibrinógeno en fibrina, mientras que las especies coagulasa negativa están presentes en infecciones secundarias por inmunosupresión, actuando como agentes oportunistas (51), el descubrimiento de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina con sus siglas (SARM) en la medicina de pequeñas especies (6), y al convertirse el de mayor prevalencia al momento de causar mastitis bovina en el mundo y la falta de efectividad por parte de tradicionales técnicas de control como la higiene y terapia antibiótica, se comienza a buscar alternativas investigativas en el control de ésta enfermedad (51).

El abuso de antibióticos y quimioterapéuticos en la producción animal ha sido una práctica no regularizada en países en vías de desarrollo que al carecer de control y supervisión han generado en el transcurso de los años de cepas resistentes a los antibióticos (52), la bacteria *S. aureus* es la bacteria patógena grampositiva más relevante al que los médicos clínicos como veterinarios observan de mayor presentación en las enfermedades infecciosas (53); la mastitis bovina es una de las enfermedades en donde su agente bacteriano es considerado como el principal agente infeccioso de alta patogenicidad y siendo el origen de más del 80% de enfermedades intramamarias que producen grandes pérdidas en todo el mundo (54).

## **2.8. Factores de virulencia y patogenicidad de *Staphylococcus aureus* subesp *aureus***

*Staphylococcus aureus* produce varios grupos de toxinas fatales de alto riesgo como la Leucocidina Pantone Valentine, además de otras toxinas clasificadas según su actividad biológica como: adhesión de la bacteria al hospedador, diseminación y daño celular, y finalmente mecanismos que permiten a la bacteria una evasión inmunitaria (49); el agente infeccioso además tiene la capacidad de formar biopelículas o films formando una barrera física frente a células inmunes como antibióticos provocado por sus moléculas de Quorum sensing (55); el mecanismo de resistencia a la meticilina por parte de esta bacteria grampositiva esta mediada por vía cromosomal, esto dado por un gen de resistencia, produciendo la falta de unión del antibiótico además posee la capacidad de adquirir genes produciendo capacidades de sobrevivencia (56).

## **2.9. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana**

Las pruebas de sensibilidad bacteriana son consideradas como ensayos de tamizaje, como metodología previa a la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), con el motivo de establecer si cualquier sustancia sometida a procesos de evaluación antimicrobiana y tiene por objeto disminuir tiempo y varios recursos y se realiza mediante la exposición de cepas frente a varias sustancia como extractos y aceites (57); las metodologías aplicadas están regidas por el el Subcomité de

Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana con sus siglas en inglés CLSI en Estados Unidos liderada por representantes de profesiones, gobierno, industria, laboratorios de microbiología, agencias gubernamentales, salud, proveedores de atención, educadores, e industrias de microbiología farmacéutica y de diagnóstico (58).

El subcomité ha desarrollado estándares que promueven antimicrobianos precisos para varias cepas bacterianas Gram positivas como el *Staphylococo aureus subp aureus* , establece pruebas de susceptibilidad mediante el uso de métodos como macro dilución, micro dilución y proporciona parámetros de control de calidad para todos estos métodos estableciendo criterios interpretativos para los resultados de susceptibilidad por parte de cualquier sustancia a los antimicrobianos (59).

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

Es la concentración mínima capaz de inhibir el crecimiento de microorganismos, cuando la CMI sea menor, la susceptibilidad del microorganismo será mayor al aceite o extracto utilizado (60), la determinación de la concentración se realiza mediante el uso del método macro dilución en caldo para lo cual se necesita de la preparación del inculo bacteriano de la cepa en estudio obtenida de su crecimiento en agar nutritivo y estandarizada a la escala 0,5 MacFarland ( $1,5 \times 10^8$  ufc/ml ), la preparación de los tubos lleva 1 ml de cada concentración analizada de la sustancia y el caldo de crecimiento nutritivo bacteriano, y su valoración es la concentración más baja sin un crecimiento visible de bacterias (61).

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

Corresponde a la mínima concentración de aceite que elimina el 99,9 % del número original de bacterias, refleja la capacidad de un extracto o aceite de disminuir de forma sustancial o total el número de bacterias (60), una vez confirmado la CMI los tubos que presentaron inhibición microbiana son llevados a crecimiento de placa y después de 24 horas en incubación se determinan el número de colonias

sobrevivientes y la determinación de la CMB se la detalla como la concentración más baja que no se observa el crecimiento de bacterias (59).

### **2.11. Método de difusión en disco**

Es un método estandarizado por la CLSI en el cual se coloca en la superficie de un agar previamente sembrada por el agente en estudio mediante estriación múltiple, los discos de papel secante son impregnados por las concentraciones de las sustancias como pueden ser antibióticos, extractos o aceites esenciales a evaluar, mediante la ayuda de una pinza anatómica se colocan sobre la superficie húmeda del agar y el disco una cantidad de agua y la sustancia se difunde al agar, de manera radial formándose un gradiente de concentración que transcurridas 24 horas de incubación (59) y de esta manera los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición, los cuales se las mide con la ayuda de una regleta milimétrica (62), es la metodología más utilizada para la evaluación de la sensibilidad antimicrobiana, la cual permite valorar los efectos de las sustancias sobre agentes microbianos en estudio.

### **2.12. Medios de cultivo**

#### **2.12.1. Agar manitol salado**

Es un medio selectivo con recomendaciones según Chapman para aislamiento de estafilococos patógenos, la mayoría de las otras bacterias son inhibidas por la alta concentración de sal con la excepción de algunos organismos marinos halófilos. Los presuntos estafilococos coagulasa positivos producen colonias rodeadas de zonas de color amarillo brillante, mientras que los estafilococos no patógenos producen colonias con zonas de color púrpura rojizo, es un medio de cultivo que se utiliza normalmente en microbiología (63) Permite el crecimiento de un determinado grupo de bacterias mientras que inhibe el crecimiento de otras (64), medio muy utilizado en el diagnóstico clínico y de laboratorio ya que determina a microorganismos patógenos en cortos períodos de tiempo, este agar posee una alta concentración de sal (NaCl 10%), convirtiéndole selectivo para el crecimiento del

género *Staphylococcus aureus*, inhibiendo a la mayoría de bacterias y evitando diagnósticos errados (61).

### **2.12.2. Agar Mueller - Hinton**

El uso principal del agar Mueller-Hinton es para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana. Se ha convertido en el medio estándar para el método Kirby-Bauer y está especificado por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (NCCLS) y el Comité Europeo de Antimicrobianos Pruebas de susceptibilidad (EUCAST) (65).

De los medios disponibles el subcomité considera que Mueller Hinton (MHA) es el más adecuado para el uso en las pruebas de susceptibilidad de rutina de todas las bacterias no fastidiosas, posee una reproducibilidad aceptable en los diferentes lotes, tiene un bajo contenido de inhibidores que afectan los resultados de las pruebas de susceptibilidad a las sulfonamidas, trimetoprim y tetraciclina, y uno de los más importantes colabora el crecimiento satisfactorio de la mayoría de patógenos (59).

### **2.12.3. Caldo cerebro corazón**

Es especialmente útil como medio de crecimiento y suspensión para estafilococos que deben ser probados para la producción de coagulasa. El caldo de infusión de corazón y corazón marca OXOID se usó en una prueba para determinar la patogenicidad del estreptococo (66).

### **2.12.4. Emulsificante Tween 80**

Los efectos de Tween 80 sobre las superficies de manera activa se debe a sus restos hidrófobos e hidrófilos; glicerol o sorbitol, en combinación con un solvente, estas moléculas tienden a autoagregarse, se forman partículas que varían de 5 a 25 nm de tamaño, dependiendo de las características específicas de cada medio, el resultado

a la final es reducir la tensión superficial de los sistemas solventes generando que las sustancias se dispersen en una gran variedad de materiales inmiscibles (67).

#### **2.12.5. Vancomicina**

El *Staphylococcus aureus* presenta una sensibilidad de un 100% a la vancomicina, una resistencia del 90% y sensibilidad del 10% a la amoxicilina, resistencia del 40% y sensibilidad del 60% a la oxacilina, resistencia del 20%, sensibilidad del 40% e intermedio de 40% a la ceftriaxona, convirtiéndose a la vancomicina con una efectividad antibacteriana superior a otros antimicrobianos betalactámicos, por tanto siendo el más útil en el tratamiento de infecciones por *Staphylococcus aureus* subesp *aureus* (68).

## **CAPÍTULO III**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Ubicación Geográfica**

La investigación se realizó en el laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato de la provincia de Tungurahua, ubicado a 1Km de la vía Cevallos-Quero, y se la efectuó desde el 5 al 22 del mes de febrero del año 2019.

#### **3.2 Equipos y materiales**

##### **3.2.1. Material experimental**

- ✓ Hojas y flores de planta de ruda
- ✓ Aceite esencial de ruda (*Ruta graveolens*)

##### **3.2.2. Cepa bacteriana**

- ✓ *Staphylococcus aureus* subesp *aureus* ATCC® 25904

##### **3.2.3. Equipos**

- ✓ Incubadora bacteriológica
- ✓ Refrigeradora
- ✓ Vórtex
- ✓ Espectrofotómetro de un solo pocillo
- ✓ Cámara de flujo laminar

- ✓ Agitador magnético con calentador
- ✓ Autoclave vertical

#### **3.2.4. Material de laboratorio**

- ✓ Frasco color ámbar 200 ml
- ✓ Vasos de precipitación de 100 y 200 ml
- ✓ Pipetas volumétricas tamaños 10, 5 y 1 ml
- ✓ Cajas Petri 100 x15 mm desechables
- ✓ Tubos de ensayo con rosca y sin rosca de 5 y 10 ml
- ✓ Agitadores de vidrio
- ✓ Espátula
- ✓ Soportes metálicos de tubos
- ✓ Cepillos para limpieza de materiales
- ✓ Mascarillas
- ✓ Cofias
- ✓ Mandil
- ✓ Lámparas de alcohol
- ✓ Algodón
- ✓ Gasas
- ✓ Lápiz de cera

#### **3.2.5. Material y reactivos microbiológicos**

- ✓ Discos en blanco OXOID
- ✓ Tubo N 5 de la escala de MacFarland
- ✓ Agua bidestilada
- ✓ Tween 80
- ✓ Agar Mueller-Hinton
- ✓ Caldo cerebro-corazón
- ✓ Agar Sal Manitol
- ✓ Discos de vancomicina 16 ug

### **3.2.6. Factores de estudio**

✓ **Aceite esencial de ruda (*Ruta graveolens*)**

**T1.** Tween 80

**T2.** Agua bidestilada

**T3.** Vancomicina

**A1.** 10 %

**A2.** 20 %

**A3.** 30 %

**A4.** 40%

**A5.** 50%

**A6.** 60%

**A7.** 70%

**A8.** 80%

**A9.** 90%

**A10.** 100%

✓ **Cepa bacteriana**

*Staphylococcus aureus subesp aureus* ATCC® 25904

### **3.2.7. Tratamientos y diseño experimental**

La investigación manejó dos objetivos específicos, el primero con respecto a la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria y la Concentración Mínima Bactericida fueron de tipo cualitativo con el manejo de 10 tratamientos correspondientes a las concentraciones del aceite esencial de ruda (*Ruta graveolens*), tres testigos de los cuales dos negativos ( Tween 80 y agua bidestilada) y un testigo positivo (Vancomicina), el segundo objetivo correspondió a la determinación de la sensibilidad antibacteriana, el cual manejó un diseño completamente al azar con 10 tratamientos (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 100%) tres testigos y cuatro repeticiones por cada concentración y se

realizó el análisis de significancia de la prueba de Tukey al 5% para comparar entre los tratamientos.

### **3.2.8. Material vegetal**

En febrero 4 del 2020 en el sector de Inapisi de la parroquia Constantino Fernández a 2600 m.s.n.m. del Cantón Ambato, provincia de Tungurahua, se recolectó la planta de ruda macho (*Ruda graveolens*) en floración, la muestra botánica fue valorada e identificada por el PhD Carlos Vásquez docente investigador de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la UTA, el material fue puesto a secar bajo sombra durante 5 días y reservada para su posterior procesamiento.

### **3.2.9. Obtención del aceite esencial de Ruda (*Ruta graveolens*)**

Se tomaron las hojas, tallos y flores, las cuales fueron lavadas, troceadas y pesadas debidamente (69) , sumando un total de 10 libras y posteriormente se las ubicó en la olla, con un total de 200 ml de agua destilada y se obtuvo el aceite mediante el método de hidrodestilación, el proceso tomó 4 horas aproximadamente (70), se obtuvieron finalmente 35 ml de aceite esencial de *Ruta graveolens*, el proceso fue realizado de la siguiente manera: la generación del vapor fue obtenida a partir de una cocineta a gas de una hornilla grande, mientras que el vapor ingresó en contacto con el lecho de la materia prima, ésta se calentó y fue liberando el aceite esencial contenido y a su vez, debido a su alta volatilidad se fue evaporando, siendo arrastrado corriente arriba hacia el tope del hidrodestilador (47) , la mezcla, es decir el vapor saturado y aceite esencial, fluyó hacia un condensador, mediante una prolongación curvada del conducto de salida; en el condensador la mezcla se condensó y enfrió hasta la temperatura ambiental, a la salida del condensador, se obtuvo una emulsión líquida inestable, y fue separada en un decantador tipo florentino, el proceso concluyó cuando el volumen del aceite esencial del florentino no varió en el transcurso del tiempo, se lo retiró y reservó en un frasco color ámbar y fuera de la luz solar (48).

### 3.2.10. Rendimiento en la obtención del aceite esencial de Ruda (*Ruta graveolens*)

El rendimiento del aceite esencial fue evaluado a través de la siguiente fórmula (44):

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{W_{AE}}{W_{MV}}$$

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{35 \text{ gr}}{4540 \text{ gr}}$$

$$\% \text{ Rendimiento} = 0,007\%$$

Donde:  $W_{AE}$  fue el peso en gramos obtenido del aceite esencial y  $W_{MV}$  correspondió al peso en gramos del material vegetal fresco, teniendo un rendimiento porcentual del 0,007

### 3.2.11. Preparación de concentraciones del aceite esencial de *Ruta graveolens* (Ruda)

Las concentraciones del aceite esencial de Ruda utilizadas a partir del 10% (v/v), 20% (v/v), 30% (v/v), 40% (v/v), 50% (v/v), 60% (v/v), 70% (v/v), 80% (v/v), 90% (v/v) y 100% (v/v), utilizando como solvente al agua bidestilada, a lo cual se añadió Tween 80 como emulsificante en porcentaje del 0,1% (71), éstas diluciones fueron calculadas de manera porcentual (v/v), en 5 ml de volumen total para cada concentración.

### 3.2.12. Cepa bacteriana

Se utilizó la cepa bacteriana certificada *Staphylococcus aureus* subesp *aureus aureus* ATCC® 25904 la cual se adquirió al distribuidor en Ecuador Medibac

(Corporate Headquarters, Minnesota, EEUU), la cual se la utilizó para la evaluación de los efectos antimicrobianos del aceite esencial de ruda (*Ruta graveolens*), el microorganismo fue sembrado en agar Sal Manitol así como lo refiere la NCCLS (59).

### **3.2.13. Activación de la cepa bacteriana**

La cepa certificada *Staphylococcus aureus* subesp *aureus* fue activada según las indicaciones de la casa comercial, colocando una alícuota previamente hidratada en 5 mililitros de infusión cerebro – corazón, una vez activada la cepa, mediante la técnica de estriación por el método escocés (31), en agar sal manitol en placa a incubar a 37° se llevó a incubar por 24 horas en la incubadora bacteriológica de forma invertida y debidamente rotulada (59).

### **3.2.14. Preparación del inóculo bacteriano**

Una vez obtenidas las colonias de la cepa en estudio, posteriormente se tomó con el asa bacteriológica cuatro colonias pequeñas bien definidas de la cepa y se las transfirió a 5 ml de infusión cerebro corazón y fueron llevadas a incubar a 37 °C por 2 horas (72), el inóculo se estandarizó en el espectrofotómetro de un pocillo al 0.5 de absorbancia, logrando una concentración de  $1.5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias (59).

### **3.2.15. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

La CMI del aceite esencial de ruda (*Ruta graveolens*) se lo determinó mediante el método de macro dilución en caldo según la NCCLS (59), los inóculos utilizados para la preparación de la técnica se la estandarizó con una turbidez equivalente a 0.5 McFarland ( $1 \times 10^8$  ufc / mL), la cual se la preparó haciendo una suspensión de caldo directo de colonias aisladas y seleccionadas de la cepa bacteriana en estudio cultivadas durante 24 h en placa sal manitol (59) , a las 10 concentraciones en tubo del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y finalmente 100%) del aceite esencial de Ruda se le adicionó el agua bidestilada como solvente y el emulsificante Tween 80 en un porcentaje del 0,1%, sumando un total de 10 tubos y

una vez que se diluyó y emulsificó ayudados de un vórtex utilizando un tiempo de 5 minutos por tubo, se los incubó a 37 °C por 24 horas (31), y la concentración más baja sin crecimiento visible de la cepa bacteriana se la consideró como la CMI del aceite esencial (61).

### **3.2.16. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida**

Para establecer la CMB se eligió los tubos que presentaron menor turbidez en la determinación de la CMI y se sembraron en placa, específicamente en agar sal manitol y se los incubó a 37 °C por 24 horas (71), determinándose a la CMB como la concentración más baja que mata al 99,9% de bacterias (31).

### **3.2.17. Sensibilidad antimicrobiana**

Se utilizó el método de difusión en agar para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana, en la cual se sembró la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* subesp *aureus* ATCC® 25904 por estriación múltiple en placa (agar Mueller Hinton), de manera primaria se empapó cada disco en blanco marca OXOID con cada una de las concentraciones del aceite esencial de ruda (*Ruta graveolens*), se utilizó cuatro discos por cada tratamiento así: 10 concentraciones y uno por cada testigo, así 2 testigos negativos (Tween 80 y agua bidestilada) y 1 positivo (vancomicina); se los dejó reposar por 12 horas en la cámara de flujo laminar, después de este tiempo fueron ubicados en las cajas petri ayudados mediante una pinza anatómica previamente esterilizada, en total se procesaron 10 cajas Petri y cada una llevó siete discos, de los cuales 4 fueron las repeticiones de cada concentración, un disco de Tween 80, uno de agua bidestilada correspondiente a los testigos negativos y un disco de vancomicina de 16 ug como testigo positivo, cada uno ubicados a una distancia prudente y así se evitó la interposición de los halos de inhibición por parte del aceite y se los llevó a incubar por 24 horas a 37°C, finalmente se midió los halos de inhibición formados a partir del efecto antimicrobiano del aceite sobre la cepa con la ayuda de un regleta milimétrica Hiantibiotic ZoneScale.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Tabla 1** se presentan los resultados obtenidos de la actividad de las 10 concentraciones del aceite esencial de Ruda (*Ruta graveolens*) sobre la cepa certificada de *Staphylococcus aureus* subesp *aureus* ATCC® 25904, con los respectivos controles negativos como positivo, la metodología realizada valoró de manera cualitativa por la turbidez presente en cada tubo, las concentraciones al 10% y 20% presentaron positivo turbidez (+), se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) al 30% de la concentración del aceite esencial, considerada como la concentración menor que permitió el decrecimiento visible (+/-) de la bacteria Gram positiva evaluada, así como lo detalla (73) en el cual en la investigación que realizó estableció una mejor actitud sobre bacterias de pared celular positiva que del grupo de Gram negativas, de manera similar lo refiere (74) que al determinar en su estudio la CMI de la cepa de *Staphylococcus aureus* subesp *aureus* ATCC 25932® fue la que mostró la menor CMI (285  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) evaluada entre grupos de bacterias en estudio.

**Tabla 1.** Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Ruta graveolens*

Cepa	Diluciones aceite esencial (%)										Control negativo Tween 80	Control negativo Agua Bidestilada	Control positivo Vancomicina	
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100				
	<b>Turbidez</b>													
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp <i>aureus</i> ATCC® 25904	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-

Turbidez positiva (+), Decrecimiento bacteriano +/-, Turbidez negativa (-)

De igual manera en la investigación (7) establecen una CMI de (1.0  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) siendo baja en comparación con otras bacterias gram negativas importantes como *Pseudomona aeruginosa* (75.0  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ), recalando que estas dos últimas metodologías utilizadas fueron en micro dilución y la resultados de esta investigación se lo realizó por método de macro dilución, destacando no obstante que la capacidad antimicrobiana por parte del aceite esencial de Ruda (*Ruta graveolens*) logra efectos desde concentraciones pequeñas para varios grupos de microorganismos como bacterias, hongos y parásitos como lo precisa (27), existen muchas investigaciones las cuales concuerdan con los efectos del aceite sobre *Staphylococcus aureus subsp aureus* ATCC 25904® que abarcan desde 100 a 200  $\mu\text{g/mL}$  de determinación de la CMI como lo concluye (4), o de 31  $\text{mg/mL}$  como lo constata (75) en su investigación más actualizada sobre el tema. El mecanismo de efecto antibacteriano del aceite esencial de Ruda (*Ruta graveolens*) se debe a la prevalencia de compuestos oxigenados como la 2-undecanona como lo detalla (76), éste compuesto permite un mayor efecto inhibidor sobre la bacteria *Staphylococcus aureus subsp aureus* que sobre las bacterias Gram negativas como lo explica (43), manifestándose este efecto específico sobre este grupo bacteriano por sus componentes alcohólicos y aldehídicas como lo recalca (37), además la actividad biológica antimicrobiana de la Ruda dependerá de varios factores así: parte de la planta recolectada, fuente geográfica, las condiciones de suelo así como también cuando fue cosechada, como dependerá también de los métodos de extracción (77).

Según manifiesta (77) los metabolitos obtenidos de plantas silvestres son consideradas hoy en día como los nuevos antibióticos, además que los estudios de Ruda sobre las bacterias Gram positivas según lo manifiesta (78) presenta una amplia actividad bacteriana que se mantiene en diferentes concentraciones estudiadas tanto en macrodilución como microdilución, y según lo precisa (4), la actividad antibacteriana de los aceites esenciales siempre será difícil de acotar a uno solo de sus componentes por la variabilidad y complejidad de los mismos, sin embargo según lo manifiesta el autor está documentado que la presencia de compuestos con funciones cetónicas pueden colaborar con este efecto antimicrobiano importante.

En la **Tabla 2** se presentan los resultados de los tubos que mostraron menor turbidez o ausencia, los cuales al ser llevados a siembra en placa, con sus respectivos controles negativos y positivo, se obtuvo que la Concentración Mínima Bactericida (CMB), considerada como la menor concentración que permite la muerte del 99,9% de bacterias, se la estableció al 40% de concentración del aceite esencial de Ruda (*Ruta graveolens*), lo cual está en concordancia con investigaciones como (78), en la cual los datos de determinación se acercan mucho entre CMI y CMB de  $240 \mu\text{l ml}^{-1}$  a  $465 \mu\text{l ml}^{-1}$ , concluyendo que se trata de un aceite de alta potencia antimicrobiana sobre varios grupos bacterianos que favorecerían como medicamentos para la cura de enfermedades infecciosas como lo señala (79) en el cual su investigación estableció que la CMB de  $500 \mu\text{l ml}^{-1}$  con respecto a la CMI de  $285 \mu\text{l ml}^{-1}$  mantienen valores no muy alejados entre sí, lo que nos refiere que los demás estudios con respecto a la presente investigación aunque mantienen métodos diferentes de determinación nos indican que las dos determinaciones de valoración antimicrobiana esto es CMI y CMB se encuentran no muy alejadas entre sí como en la presente de investigación del 30% para CMI y de 40% para la CMB.

**Tabla 2.** Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del aceite esencial de *Ruta graveolens*

Cepa	Siembra en placa Concentraciones del aceite										Control negativo Tween 80	Control negativo Agua bidestilada	Control positivo Vancomicina
	10 %	20 %	30 %	40 %	50 %	60 %	70 %	80 %	90 %	100 %			
	Turbidez												
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp <i>aureus</i> ATCC® 25904	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-

Crecimiento de colonias (+), Decrecimiento de colonias (+/-), Cero colonias en placa (-)

Según la investigación realizada por (80) la CMB sobre las bacterias gran positivas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus flavus* y *Micrococcus luteus* se presentan en menores concentraciones que las bacterias gran negativas como *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella typhi* y *Enterobacter aerogenes*, lo cual se corrobora en la presente investigación, en la cual ya en la concentración al 40% se determinó la muerte del 99,9% de bacterias en siembra en placa, en la siguiente investigación mencionada por (81) en la cual se detalla la amplia actividad sobre varias cepas de *Staphylococcus aureus* a partir del 4%, lo cual difiere de la investigación, lo cual podría explicarse por la metodología utilizada, el tipo de extracto y su forma de obtención, la investigación realizada (82) determinó que los aceites esenciales mantienen concentraciones mínima inhibitorias como bactericidas más bajas que los extractos alcohólicos sobre todas las cepas analizadas de *Staphylococcus aureus* de tipo hospitalarias y de resistencia múltiple, lo cual demuestra según (28) que la ruda manifiesta elevados efectos antimicrobianos hacia este grupo bacteriano.

En la **Tabla 3** se presentan los resultados de la prueba de Sensibilidad antimicrobiana, mediante el método de difusión en agar, de todas las concentraciones del 10% al 100% del aceite esencial de Ruda (*Ruta graveolens*), con los respectivos controles, determinándose eficacia antimicrobiana a partir del

30% de concentración en adelante, con la presencia de halos de inhibición bacteriana desde 5,75 mm correspondientes al 30% hasta 25,25 mm al 90% de concentración, estableciendo que existe diferencia significativa entre los tratamientos de mayor y menor concentración, los resultados se asemejan a los obtenidos (73), el cual determinó para *Staphylococcus aureus* subp *aureus* 20 mm de inhibición en placa, 22 mm especificados (80) para el mismo género bacteriano, 23,40 mm establecido por (7) siendo uno de los más altos alcanzados en investigaciones desarrolladas por el autor; en contraposición con el estudio (74) el cual estableció 6,0 mm para la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, así también de 15,15 mm detallado por (81) debido a que se trata de un extracto.

**Tabla 3.** Sensibilidad antimicrobiana del aceite esencial en mm de Ruda (*Ruta graveolens*) sobre la cepa *Staphylococcus aureus* subesp *aureus* ATCC® 25904

CEPA	CONCENTRACIONES					E. E	Valor de P
	10%	20%	30%	40%	50%		
<i>S. aureus</i>	1,00 <sup>f</sup>	1,00 <sup>f</sup>	5,75 <sup>e</sup>	8,25 <sup>de</sup>	11,00 <sup>d</sup>	0,86	<0,001
<i>S. aureus</i>	60%	70%	80%	90%	100%	E. E	Valor de P
	15,50 <sup>c</sup>	17,25 <sup>c</sup>	20,50 <sup>b</sup>	25, 25 <sup>a</sup>	21,00 <sup>b</sup>	0,86	<0,001

abcdef= Medias con una letra común entre columnas no son significativamente diferentes, E.E error estándar

La investigación realizada (80) mostró igualmente una elevada actividad antimicrobiana sobre la cepa de *S aureus* con una zona de inhibición de 25,60 mm, comparada con la presente investigación de 25,25 mm teniendo el efecto antimicrobiano superior a todas las bacterias gram positivas y gram negativas analizadas (*Micrococcus*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Pseudomona*, *Salmonella* y *Enterobacter*), las diferencias en la susceptibilidad se debe principalmente a las características de la planta al momento de realizar la obtención del aceite, método de extracción, fecha de recolección, que pueden modificar las características de los componentes como lo detalla (83), el ejemplo más claro lo especifica el autor (4), en el cual la actividad antimicrobiana de la ruda como aceite obtenidos de diferentes zonas de una misma provincia, determinaron diferentes efectos de susceptibilidad antimicrobiana, de la misma manera la investigación realizada por (37) obtuvieron

inhibiciones antimicrobianas de 13 mm y 14 mm del extracto con cloroformo y extracto metanólico de la Ruda respectivamente.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones

- El aceite esencial de *Ruta graveolens* conocida como Ruda, demostró eficacia antimicrobiana in vitro sobre la cepa de *Staphylococcus aureus* subesp *aureus* ATCC® 25904, la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se la estableció al 30% y la Concentración del aceite al 40% se la determinó como la Concentración Mínima Bactericida (CMB), correspondiente a la concentración mínima que produjo la muerte del 99,9% de bacterias en placa.
- La sensibilidad antimicrobiana de la cepa *Staphylococcus aureus* subesp *aureus* ATCC® 25904 al aceite esencial de Ruda (*Ruta graveolens*) demostró importantes halos de inhibición desde el 30% al 100% de concentración, determinando al 90% como el mejor tratamiento, al formar halos de 25,25 mm, demostrando su elevada susceptibilidad antimicrobiana.

## CAPÍTULO VI

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Conway G, Slocumb J. Plants used as abortifacients and emmenagogues by Spanish New Mexicans. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 1979 marz [citado 30 ene 2020]; 1(3):241– 261. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(79\)80014-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(79)80014-8)
2. Mejri J, Abderrabba M, Mejri M. Chemical composition of the essential oil of *Ruta chalepensis* L: Influence of drying, hydro-distillation duration and plant parts. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2010 may [citado 31 ene 2020]; 32(3): 671–673. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.05.002>
3. Zekry E, Mahmoud R, El-Baky A, Yehia S, Abd M, Hakeem E, et al. Chemical composition and antimicrobial activities of essential oils of *Ruta graveolens* plants treated with salicylic acid under drought stress conditions. *Futur J Pharm Sci* [Internet]. 2018 agost [citado 19 sept 2019]; 4(2):254–264. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.fjps.2018.09.001>
4. Rojas J, Mender T, Rojas L, Gullien E, Buitrago A, Lucena M, et al. Estudio comparativo de la composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ruta graveolens* L. recolectada en los estados Mérida y Miranda, Venezuela. Vol. 6, *Avances en Química*. 2011. p. 89–93.
5. Jeyachandran S, Oyyappan D, Baskaralingam V. Discrete Nanoparticles of *Ruta Graveolens* Induces the Bacterial and Fungal Biofilm Inhibition. *Cell Comun Adhes* [Internet]. 2014 may [citado 19 sept 2019]; 21:229–238. Disponible en: <https://doi.org/10.3109/15419061.2014.926476>.
6. Ríos A, Barquero M, Ortiz G, Ayllón T, Smit L, Rodríguez-Dominguez M, et al. *Staphylococcus* multirresistentes a los antibióticos y su importancia

- en medicina veterinaria. *ClinVet Peq Anima* [Internet]. 2015 diciem [citado 25 abr 2020]; 35(3):149–61. Disponible en:  
<https://www.clinvetpeqanim.com/img/pdf/223473834.pdf>
7. Reddy D, Al-Rajab A. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of *Ruta graveolens* L . volatile oils. *Cogent Chem* [Internet]. 2016 jul [citado 19 sept 2019]; 2:1–11. Disponible en:  
<http://dx.doi.org/10.1080/23312009.2016.1220055>
  8. Usano-Aleman J, Palá-Paúl J, Díaz S. Aceites esenciales : conceptos básicos y actividad antibacteriana. *Reduca (Biología) Ser Botánica* [Internet]. 2014 diciem [citado 19 sept 2019]; 7(2):60–70. Disponible en:  
<http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/1553/1747>
  9. Ramírez L, Marin D. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Sci Tech* [Internet] 2009 jul [citado 20 sept 2019]; 15(42):263–268. Disponible en:  
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84916714049>
  10. Sotero-García A, Arteaga-Reyes T, Campos-Martínez A, Bunge-Vivier V. Conocimiento local del género *arceuthobium* en un área natural protegida del centro de México. *Bol Latinoam y del Caribe Plantas Med y Aromat* [Internet]. 2018 nov [citado 20 diciem 2020]; 17(2):120–129. Disponible en:  
<http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/79924/2018%20Alma%20BLACCPMA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
  11. Rengifo-Salgado E, Rios-Torres S, Malaverri L, Vargas-Arana G. Saberes ancestrales sobre el uso de flora y fauna en la comunidad indígena Tikuna de Cushillo Cocha, zona fronteriza Perú-Colombia-Brasil. *Rev Peru Biol* [Internet]. 2017 noviem [citado 20 diciem 2021]; 24(1):67–78. Disponible en: doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v24i1.13108>
  12. Martínez Y, Gómez L. Social impact of an intervention strategy for the rational prescription of natural medicines implemented in Céspedes during 2011. *Rev Cuba Plantas Med* [Internet]. 2013 jun [citado 2 ener 2021]; 18(4):609–618. Disponible en:  
<http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v18n4/pla12413.pdf>

13. Gallegos M. Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *An la Fac Med* [Internet] 2016 sept [citado 2 ener 2021]; 77(4):327- 332. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15381/anales.v77i4.12647>
14. Pino-Pérez O, Rojas-Fernández M, Sánchez-Pérez y, Espinosa-Castaño I. Actividad antibacteriana de aceites esenciales obtenidos de plantas de origen cubano sobre *Streptococcus suis*. *Rev Salud Anim* [Internet]. 2018 abril [citado 01 febr 2020]; 40(3):1–5. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v40n3/2224-4700-rsa-40-03-e03.pdf>
15. Ecuador, Ecuador. Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo. Buen vivir : plan nacional 2013-2017 : todo el mundo mejor. Quito-Ecuador; 2017. p. 594.
16. Tene V, Malagón O, Finzi P, Vidari G, Armijos C, Zaragoza T. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipe, Ecuador. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2007 octob [citado 2 ener 2021]; 111(1):63–81. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2006.10.032>
17. Valdés Cobos A. Conservación y uso de plantas medicinales el caso de la región de la Mixteca Alta Oaxaqueña, México. *Ambient y Desarro* [Internet]. 2013 diciem [citado 20 diciem 2020]; 17(33):87–99. Disponible en: <https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/ambienteydesarrollo/article/view/7044>
18. Jiménez-Romero E, Moreno-Vera A, Villacís-Calderón A, Rosado-Sabando J, Moreira D, Bravo A. Ethnobotanical study and commercialization of medicinal plants in the Murocomba protected forest and its influence area in the Valencia Canton, Ecuador. *Cienc Tecnol Agropecu* [Internet]. 2019 jun [citado 2 ene 2021]; 20(3):491–506. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v20n3/en\\_0122-8706-ccta-20-03-00491.pdf](http://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v20n3/en_0122-8706-ccta-20-03-00491.pdf)
19. Vera-Marín B, Sánchez-Sáenz M. Registro de algunas plantas medicinales cultivadas en San Cristóbal, municipio de Medellín (Antioquia -

- Colombia). Rev Fac Nac Agron Medellín [Internet]. 2015 ener [citado 2 ener 2021]; 68(2):7647–7658. Disponible en:  
<http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v68n2/v68n2a06.pdf>
20. Castro A, Juárez J, Ramos N, Suárez S, Retuerto F, Gonzales S. Elucidación estructural del aceite esencial de *Ruta graveolens* L. ruda, actividad antioxidante y bioensayo de citotoxicidad. Cienc Invest [Internet]. 2011 may [citado 01 febr 2020]; 14(1):25–28. Disponible en:  
<https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/3234/2701>
  21. Albarici TR, Vieira PC, Batista J, das Gracias M. Cumarinas e Alcaloides de *Rauia resinosa* (Rutaceae). Quim Nov [Internet]. 2010 sept [citado 19 sept 2019]; 33(10):2130–2140. Disponible en:  
[https://www.researchgate.net/publication/267414815\\_Cumarinas\\_e\\_alcaloides\\_de\\_Rauia\\_resinosa\\_rutaceae#fullTextFileContent](https://www.researchgate.net/publication/267414815_Cumarinas_e_alcaloides_de_Rauia_resinosa_rutaceae#fullTextFileContent)
  22. Soto-Domínguez A, Serrano-Gallardo L, García-Garza R, Ruíz-Flores P, Morán-Martínez J, Nava-Hernández M, et al. El extracto acuoso de *Ruta graveolens* del norte de México causa apoptosis y muestra efecto antiproliferativo sobre el hígado de rata Wistar: Evidencia morfológica. Int J Morphol [Internet]. 2013 may [citado 2 ener 2021]; 31(4):1340–1348. Disponible en:  
[https://www.researchgate.net/publication/262744035\\_Efecto\\_Toxico\\_del\\_Extracto\\_Acuoso\\_de\\_Ruta\\_graveolens\\_del\\_Norte\\_de\\_Mexico\\_sobre\\_el\\_Higado\\_de\\_Rata\\_Wistar](https://www.researchgate.net/publication/262744035_Efecto_Toxico_del_Extracto_Acuoso_de_Ruta_graveolens_del_Norte_de_Mexico_sobre_el_Higado_de_Rata_Wistar)
  23. Kannan R, Babu U. Identity and pharmacognosy of *Ruta graveolens* Linn. Anc Sci Life [Internet]. 2012 jun [citado 10 ene 2021]; 32(1):16–19. Disponible en: <https://www.ancientscienceoflife.org/article.asp?issn=0257-7941;year=2012;volume=32;issue=1;spage=16;epage=19;aulast=Kannan>
  24. Raghav S, Gupta B, Agrawal C, Goswami K, Das H. Anti-inflammatory effect of *Ruta graveolens* L. in murine macrophage cells. J Ethnopharmacol [Internet]. 2006 sept [citado 13 diciem 2020]; 104(1–2):234–239. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2005.09.008>.
  25. Zeichen de Sa R, Rey A, Argañaraz E, Bindstein E. Perinatal toxicology of

- Ruta chalepensis (Rutaceae) in mice. J Ethnopharmacol [Internet]. 2000 jun [citado 13 diciembre 2020]; 69(2):93–98. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-8741\(98\)00232-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-8741(98)00232-3).
26. Garden B. Missouri Botanical Garden. Missouri, EEUU; 2009.
  27. Luján C, Martínez A, Ortega J, Castro F. Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. Química Viva [Internet]. 2010 agos [citado 01 febr 2020]; 9(2):86–96. Disponible en: <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v9n2/garcia.pdf>
  28. Haddouchi F, Mohammed T, Zaouali Y, Ksouri R, Attou A, Benmansour A. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four Ruta species growing in Algeria. Food Chem [Internet]. 2013 marz [citado 02 ene 2021]; 141:253–258. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.007>
  29. Meepagala K, Schrader K, Wedge D, Duke S. Algicidal and antifungal compounds from the roots of Ruta graveolens and synthesis of their analogs. Phytochemistry [Internet]. 2005 noviem [citado 19 sept 2019]; 66:2689–2695. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.09.019>
  30. Oliva A, Meepagala K, Wedge D, Harries D, Hale A, Aliota G, et al. Natural Fungicides from Ruta graveolens L . Leaves , Including a New Quinolone Alkaloid. J Agric Food Chem [Internet]. 2003 diciem [citado 19 sept 2019]; 51:890–896. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/jf0259361>.
  31. Haddouchi F, Chaouche T, Zaouali Y, Ksouri R, Attou A, Benmansour A. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four Ruta species growing in Algeria. Food Chem [Internet]. 2013 marz [citado 19 sept 2019]; 141(1):253–258. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.007>
  32. Benavides V, Trujillo G, D Arrigo G, Paredes U, Pino J. Evaluación Toxicológica preliminar de Ruta graveolens, Origanum vulgare y Persea americana sobre embriones preimplantacionales de ratón. Rev peru biol [Internet]. 2000 jul [citado 19 sept 2019]; 7(1):86–88. Disponible en: <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/rpb/article/view/6734>

/5978

33. Gonzales J, Benavides V, Rojas R, Pino J. Efecto embriotóxico y teratogénico de *Ruta chalepensis* L . « ruda », en ratón ( *Mus musculus* ). *Rev peru biol* [Internet]. 2007 jul [citado 19 sep 2019]; 13(3):223–225. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v13n3/v13n03a13.pdf>
34. Zayas-Pinedo P, Gabilondo-Zubizarreta F, Torrero-López V. Fototoxicidad tras exposición a *Ruta graveolens*. *Cirugía Plástica Ibero-Latinoamericana* [Internet]. 2014 diciem [citado 20 sept 2019]; 40(4):455–458. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=365537885013>
35. Torres-Villaseñor C, Oria-Martínez B, Espinoza-Cabrera C. Teratogenic effect of Zoapatle (*Montanoa tomentosa*). *Investig Multidiscip Univ* [Internet]. 2014 ene [citado 02 ene 2021]; 13(January):68–76. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/280735003>
36. Marinoff M, Martínez J, Urbina M. Precauciones en el empleo de plantas medicinales. *Boletín Latinoam y del caribe Plantas Medicinales y Aromáticas* [Internet]. 2009 may [citado 05 ene 2021]; 8(3):184–187. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85611774014>
37. Gebregiorgis A, Mahamadail T. Phytochemical Screening and Evaluation of Antibacterial Activity of *Ruta Natural graveolens* L, - A Medicinal Plant Grown around Mekelle, Tigray, Ethiopia. *Nat Prod Chem Res* [Internet]. 2017 ene [citado 20 sept 2019]; 3(6):1–4. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/290213657>
38. Moraes M, Ollgaard B, Peter L, Borchsenius F, Balslev H. *Botánica Económica de los Andes centrales*. 2006. 573 p.
39. Fajardo J, Verde A. Catálogo, ecología y usos populares de las rutáceas presentes en la provincia de Albacete. *Sabuco* [Internet]. 2000 ene [citado 05 ene 2021]; 1:163–179. Disponible: <https://www.researchgate.net/publication/28167968>
40. Castillo S, Pérez-Alfonso C, Martínez-Romero D, Guillén F, Serrano M, Valero D. The essential oils thymol and carvacrol applied in the packing lines avoid lemon spoilage and maintain quality during storage. *Food Control* [Internet]. 2014 jun [citado 13 diciem 2020]; 35(1):132–136.

- Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.052>
41. Pitarch C. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales. *Nat Medicat* [Internet]. 2000 may [citado 19 sept 2019]; (58):26–31. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4989220.pdf>
  42. Saad N, Muller C, Lobstein A. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour Fragr J* [Internet]. 2013 marz [citado 13 diciem 2020]; 28(5):269–729. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/ffj.3165>
  43. Delgadillo L, Bañuelos R, Delgadillo O, Silva M, Gallegos P. Composición química y efecto antibacteriano in vitro de extractos de *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* y *Ruta graveolens*. *Nov Sci* [Internet]. 2017 jul [citado 20 diciem 2020]; 9(19):273-290. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=203353519016>
  44. León G, Osorio M, Useche R. Comparación de dos métodos de extracción del aceite esencial de *Citrus sinensis* L. *Rev Cuba Farm* [Internet]. 2015 marz [citado 17 ene 2021]; 49(4):742–750. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/far/v49n4/far14415.pdf>
  45. Chemat F, Lucchesi M, Smadja J, Favretto L, Colnaghi G, Visinoni F. Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2006 agos [citado 17 ener 2021]; 555(1):157–160. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.08.071>
  46. Yousefi M, Rahimi-Nasrabadi M, Pourmortazavi S, Wysokowski M, Jesionowski T, Ehrlich H, et al. Supercritical fluid extraction of essential oils. *TrAC - Trends Anal Chem* [Internet]. 2019 may [citado 17 ener 2021]; 118:182–193. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.038>
  47. Véliz-Jaime M, González-Díaz Y, Martínez-Despaigne Y. Technical and economic evaluation of the project to obtain essential oils. *Tecnol Química* [Internet]. 2019 may [citado 02 ener 2021]; 39(1):207–220. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rtq/v39n1/2224-6185-rtq-39-01-207.pdf>
  48. Cerutti M, Neumayer F. Introducción a la obtención de aceite esencial de

- limón. Invenio [Internet]. 2004 jun [citado 02 ener 2021]; 149–155. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/877/87701214.pdf>
49. Zendejas-Manzo G, Avalos-Flores H, Soto-Padilla M. Microbiología general de *Staphylococcus aureus* : Generalidades , patogenicidad y métodos de identificación. Rev Biomed [Internet]. 2014 jun [citado 19 sep 2019]; 25(3):129–143. Disponible en: <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb142534.pdf>
50. Sergio A, Atehortúa D, Jaimes F. Actualización en Bacteriemia por *Staphylococcus Aureus*. Med UPB [Internet]. 2014 jul [citado 19 sept 2019]; 33(1):48–55. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=159043438006>
51. Camussone C, Calvino L. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con infecciones mamarias en bovinos: relevancia y rol como agentes inmunógenos. Rev Argent Microbiol [Internet]. 2013 abr [citado 14 sept 2019]; 45(2):119–130. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=159043438006>
52. Cota-Rubio E, Hurtado-Ayala L, Pérez-Morales E, Alcántara-Jurado L. Resistencia a antibióticos de cepas bacterianas aisladas de animales destinados al consumo humano. Rev Iberoam Ciencias [Internet]. 2014 may [citado 17 ener 2021]; 1(1):75–85. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/264702807>
53. Aguayo-Reyes A, Quezada-Aguiluz M, Mella S, Riedel G, Opazo-Capurro A, Bello-Toledo H, et al. Bases moleculares de la resistencia a metilicina en. Rev Chil Infectol [Internet]. 2018 diciem [citado 17 enero 2021]; 35(1):7–14. Disponible en: <https://www.revinf.cl/index.php/revinf/article/view/16/15>
54. Pellegrino M, Frola I, Odierno L, Bogni C. Mastitis Bovina: Resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* asiladas de leche. Redvet [Internet]. 2011 may [citado 17 ener 2021]; 12(7):1–14. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63622567006>
55. Pacha P, Lecheras O. Caracterización molecular, evaluación de factores de virulencia y habilid de adherencia de *Staphylococcus aureus* aislados desde

- leche de estanque y superficies del equipo de ordeño en operaciones lecheras. Universidad de Concepción; 2020.
56. García, C. *Staphylococcus aureus* meticilino resistente adquirido en la comunidad. *Rev Gastrohnutp* [Internet]. 2012 jul [citado 17 ener 2021]; 14(2):46–57. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/amp/v28n3/a07v28n3.pdf>
  57. Matiz G, León G, Osorio M. Actividad antibacteriana in vitro de diecinueve aceites esenciales frente a bacterias asociadas al acné. *Rev Cuba Farm* [Internet]. 2015 abr [citado 23 sept 2019]; 49(1):103–16. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/far/v49n1/far11115.pdf>
  58. Montero-Recalde M, Vayas L, Avilés-Esquivel D, Pazmiño P, Erazo-Gutierrez V. Evaluación de dos métodos para medir la sensibilidad de inhibición de crecimiento de la cepa certificada de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*. *Rev Investig Vet del Perú* [Internet]. 2018 jul [citado 24 sept 2019]; 29(4):1543-1547. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i4.15185>
  59. Cockerill F, Wikler M, Alder J, Dudley M, Eliopoulos G, Ferraro MJ, et al. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition*. 2012.
  60. Botana L. *Farmacología Veterinaria*. 2010. 1 ra ed. 634 p.
  61. Hafezian M, Asgarpanah J, Rahimifard N. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from the endemic species *pyncocycla bashagardiana* Mozaff. *Lat Am J Pharm* [Internet]. 2016 ener [citado 17 ener 2021]; 35(7):1634–1639. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/307439988>
  62. Cockerill FR, Wikler MA, Alder J, Dudley M, Eliopoulos GM, Ferraro MJ, et al. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard*. 11va edic. 2012.
  63. Ryan K, Schoenknecht Fritz D, Kirby W. *Disck Sensitivity Testing*. *Hosp Pract* [Internet]. 2016 may [citado 25 sep 2019]; 5(2):91–100. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/21548331.1970.11705817>

64. Chapman G. The Significance of sodium chloride in studies of Staphylococci. *Cinical Res Lab* [Internet]. 1945 abr [citado 19 sept 2019]; 201–203. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/BF03003570>
65. Kenneth R, Fritz S, Kirby W. Disc Sensitivity Testing. *Hosp Pract* [Internet]. 2016 may [citado 30 sept 2019]; 5(2):91–100. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/21548331.1970.11705817>
66. Chapman G. The Isolation and Testing of Fecal Streptococci. *Am J Dig Dis* [Internet]. 1946 abr [citado 19 sept 2019]; 13(4):105–106. Disponible en: <https://doi.org/10.1056/NEJM194712252372606>
67. Weiszhár Z, Czúcz J, Révész C, Rosivall L, Szebeni J, Rozsnyay Z. Complement activation by polyethoxylated pharmaceutical surfactants: Cremophor-EL, tween-80 and tween-20. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2012 sept [citado 24 sept 2019]; 45(4):492–498. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.09.016>
68. Lazo Arispe G, Mamani Flores E, Vargas Loroño E, Camacho Aguilar J, Sahonero Ampuero Ó. Sensibilidad y resistencia en el antibiograma del *Staphylococcus aureus* en pacientes del Hospital Clínico Viedma. *Rev Científica Cienc Médica* [Internet]. 2013 noviem [citado 24 sept 2019]; 16(2):15–17. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=426041227005>
69. Torrenegra-Alarcón M, Granados-Conde C, Durán-Lengua M, León-Méndez G, Yáñez-Rueda X, Martínez C, et al. Composición Química y Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de *Minthostachys mollis*. *Orinoquia* [Internet]. 2016 jun [citado 24 abr 2021]; 20(1):69–74. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/896/89647074008.pdf>
70. Ferhat M, Kabouche A, Kabouche Z. Comparative compositions of essential oils of three ruta species growing in different soils. *J Mater Environ Sci* [Internet]. 2014 diciem [citado 01 febr 2020]; 5(3):735–738. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/267028520>
71. Valles M, Alvarado P, Rodríguez I, Saldaña W, Reyes W, Vargas A. Efecto del aceite esencial de *Origanum vulgare* en la supervivencia de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thypi*, *Salmonella parathypi* y

- Salmonella enteritidis en carne de cerdo pasteurizada y refrigerada. Rev Rebiol [Internet]. 2014 jun [citado 24 sept 2019]; 34(1):57–68. Disponible en: <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/faccbiol/article/view/589>
72. López-Rivera R, Espinosa-Andrews H, García-Márquez E, Herrera-Rodríguez S. Efecto antifúngico de emulsiones a base de aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens*), contra *Candida albicans*. Rev Salud Jalisco [Internet]. 2018 abr [citado 25 ener 2020]; (1):42–45. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/saljalisco/sj-2018/sj181g.pdf>
  73. Al-Shuneigat J, Al-Tarawneh I, Al-Qudah M, Al-Sarayreh S, Al-Saraireh Y, Alsharafa K. The chemical composition and the antibacterial properties of *Ruta graveolens* L. Essential Oil Grown in Northern Jordan. Jordan J Biol Sci [Internet]. 2015 jun [citado 29 enero 2021]; 8(2):139–143. Disponible en: <https://doi.org/10.12816/0027560>
  74. Fredj M, Marzouk B, Chraief I, Boukef K, Marzouk Z. Analysis of Tunisian *Ruta graveolens* L. oils from Jemmel. J Food, Agric Environ [Internet]. 2007 ener [citado 09 ener 2021]; 5(1):52–55. Disponible <https://www.researchgate.net/publication/266485310>
  75. Elansary H, Szopa A, Kubica P, Ekiert H, El-Ansary D, Al-Mana F, et al. Polyphenol content and biological activities of *Ruta graveolens* L. and *Artemisia abrotanum* L. in northern Saudi Arabia. Processes [Internet]. 2020 abr [citado 09 ene 2021]; 8(5):1–18. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/pr8050531>
  76. Pino O, Sánchez Y, Roja M, Abreu Y, Correa T, Martínez D, et al. Composición Química y Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de *Ruta Chalepensis* L. Rev Protección Veg [Internet]. 2014 noviem [citado 01 febr 2020]; 29(3):220–225. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v29n3/rpv11314.pdf>
  77. Ojala T, Remes S, Haansuu P, Vuorela H, Hiltunen R, Haahtela K, et al. Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. J Ethnopharmacol [Internet]. 2000 may [citado 19 sept 2019]; 73:299–305. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(00\)00279-](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(00)00279-8)

78. Chaftar N, Girardot M, Labanowski J, Ghrairi T, Khaled H, Frere J, et al. Comparative evaluation of the antimicrobial activity of 19 essential oils. *Adv Microbiol Infect Dis Public Heal* [Internet]. 2015 noviem [citado 19 sept 2019]; 1–15. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/5584\\_2015\\_5011](https://doi.org/10.1007/5584_2015_5011)
79. Azalework H, Sahabjada, Jafri A, Arshad M, Malik T. Phytochemical Investigation, Gc-MS Profile and Antimicrobial Activity of a Medicinal Plant *Ruta Graveolens L.* From Ethiopia. *Int J Pharm Pharm Sci* [Internet]. 2017 abr [citado 03 ener 2021]; 9(6):29–34. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/317345812>
80. Franca J, Nascimento A. Composition and antibacterial activity of *Ruta graveolens L.* ( Rutaceae ) volatile oils , from São Luís , Maranhão , Brazil. *South African J Bot* [Internet]. 2015 marz [citado 19 sept 2019]; 199:103–106. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2015.03.198>
81. Rodrigues J, Melo M, Lima E. In vitro antimicrobial activity of plants in Acute Otitis Externa. *Rev Bras Otorrinolaringol* [Internet]. 2008 febre [citado 19 sept 2019]; 74(1):118–124. Disponible en: [https://www.scielo.br/pdf/rboto/v74n1/en\\_a19v74n1.pdf](https://www.scielo.br/pdf/rboto/v74n1/en_a19v74n1.pdf)
82. García-Luján C, Alonso-Rojo S, Rodríguez-Martínez R, Martínez-Romero A, Ramírez-Baca P, Torres-Muñoz J. Actividad antimicrobiana de extractos vegetales en cepas hospitalarias de *Staphylococcus aureus* con resistencia múltiple. *RESPYN* [Internet]. 2008 agost [citado 24 abr 2021]; 1(1):1–4. Disponible en: [http://respyn2.uanl.mx/especiales/2008/ee-01-2008/documentos/carteles/17\\_garcia-lujan.pdf](http://respyn2.uanl.mx/especiales/2008/ee-01-2008/documentos/carteles/17_garcia-lujan.pdf)
83. Amabye T, Mahamadail T. Phytochemical Screening and Evaluation of Antibacterial Activity of *Ruta graveolens L.* - A Medicinal Plant Grown around Mekelle, Tigray, Ethiopia. *Nat Prod Chem Res* [Internet]. 2015 ener [citado 24 abr 2021]; 03(06):3–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4172/2329-6836.1000195>

## CAPÍTULO VII

### ANEXOS

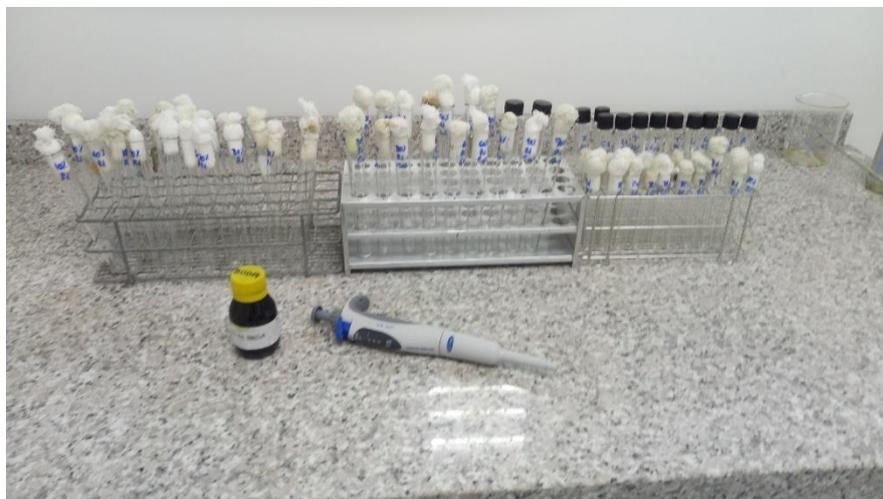
#### ANEXO 1

Equipo de Hidrodestilación convencional



#### ANEXO 2

Material para preparación de inóculo



### ANEXO 3

#### Preparación de inóculo



### ANEXO 4

#### Siembra en cámara de flujo laminar



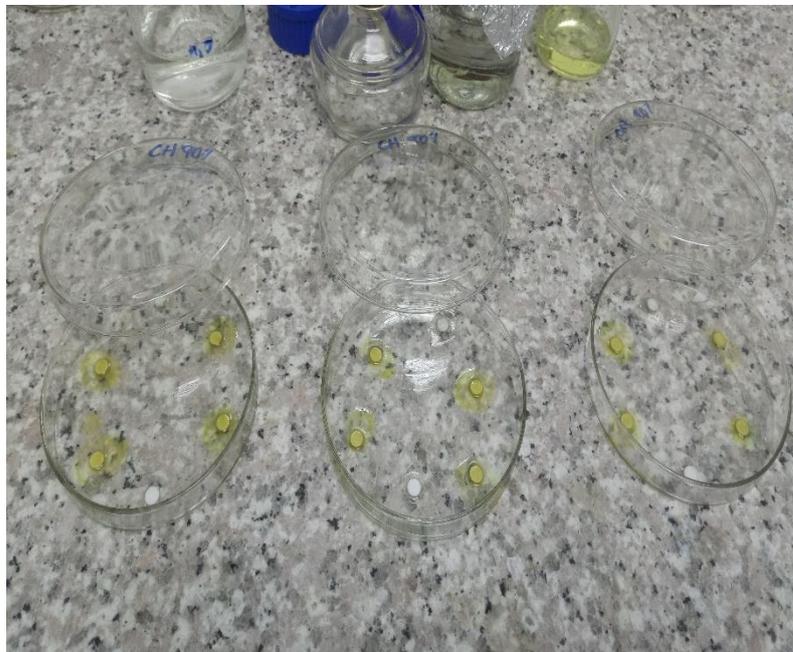
## Anexo 5

### Discos en blanco OXOID



## Anexo 6

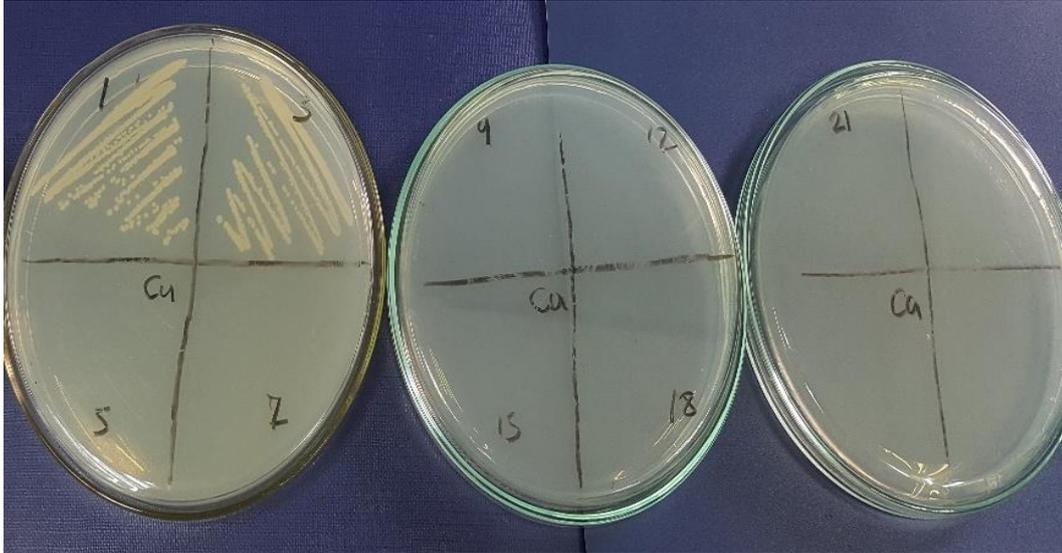
### Discos en blanco OXOID con los tratamientos y testigos



### Anexo 7

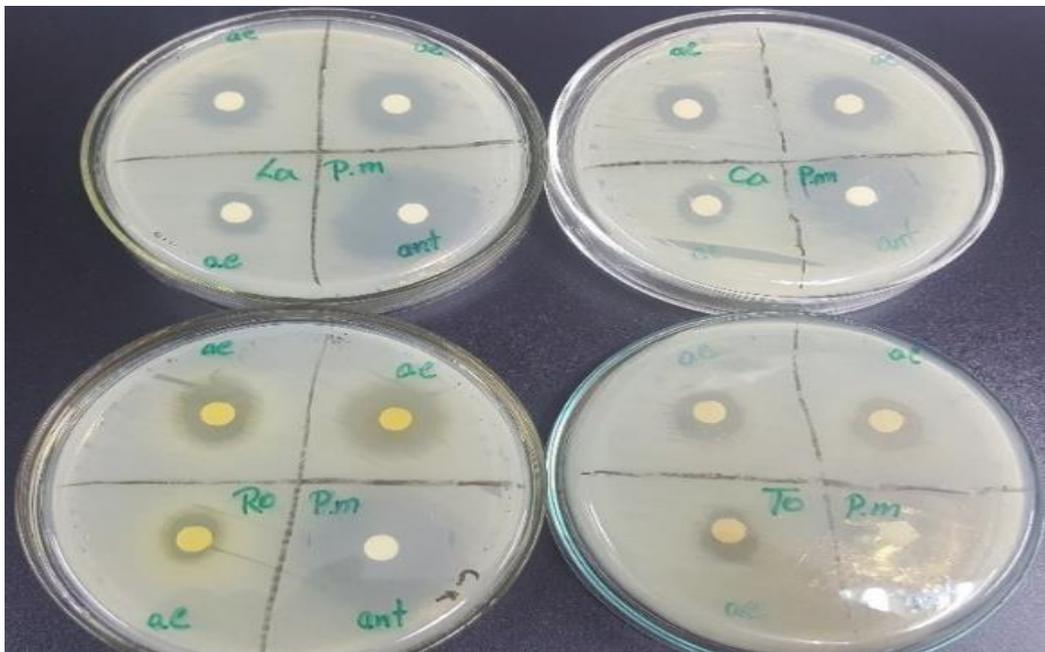
Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB)

Determinada al 30% para CMI y 40% con ausencia total de colonias para CMB



### Anexo 8

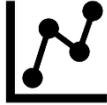
Sensibilidad antimicrobiana



## Anexo 8

### Análisis estadístico

#### DISEÑO EXPERIMENTAL:



Probar la eficacia antimicrobiana del aceite esencial de ruda sobre cepa certificada *Staphylococcus aureus subsp aureus* ATCC® 25904

#### Detalles Prueba Experimental

- *Número de concentraciones: 10*
- *Repeticiones: 4*

Se realizó un total diez concentraciones para cuatro repeticiones respectivamente, en placa Petri, y dos testigos y se valoró halos de inhibición del aceite sobre la bacteria certificada medida en milímetros.

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

##### ► Prueba de Normalidad:

##### Hipótesis:

- $H_0$  = Los datos para concentración en prueba siguen una distribución normal
- $H_1$  = Los datos para concentración en prueba no siguen una distribución normal

Nivel de significancia: 0.05

*Tabla 4 Prueba de Normalidad*

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
prueba 1	,159	10	,200 <sup>*</sup>	,926	10	,410
prueba 2	,149	10	,200 <sup>*</sup>	,918	10	,339
prueba 3	,119	10	,200 <sup>*</sup>	,959	10	,770
prueba 4	,143	10	,200 <sup>*</sup>	,943	10	,591

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Al analizar los resultados en la Tabla 1 y considerando que el número de concentraciones es 10, tomamos el estadístico de **Kolmogorov** para analizar la normalidad.

El p valor(significancia), para cada prueba es mayor a 0.05, por lo tanto, aceptamos la hipótesis nula. Con ello podemos concluir que nuestros datos siguen una distribución normal.

### ► Prueba de Tukey:

Para realizar la prueba de Tukey se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Factor	Niveles	Valores
Concentración S. aureus	10	10,00%; 20,00%; 30,00%; 40,00%; 50,00%; 60,00%; 70,00%; 80,00%; 90,00%; 100,00%

### Hipótesis:

- $H_0$  = Las medias para los niveles de concentración son iguales
  - $H_1$  = Las medias para los niveles de concentración no son iguales.
- Nivel de significancia: 0.05

