



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

“SENSIBILIDAD MICROBIANA Y PODER INSECTICIDA DE
LOS ACEITES ESENCIALES DE *Clinopodium nubigenum* Y
Ambrosia arborescens.”

TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORA

Gómez Benalcázar Evelyn Valeria

DIRECTORA

Ing. Echeverría María Cristina, PhD.

Ibarra, abril del 2017

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
AMBIENTALES
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

“SENSIBILIDAD MICROBIANA Y PODER INSECTICIDA DE LOS
ACEITES ESENCIALES DE *Clinopodium nubigenum* Y *Ambrosia
arborescens*.”

Trabajo de titulación revisado por la Directora y Comité Asesor, por lo cual se autoriza su
presentación como requisito parcial para obtener el Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

APROBADA:

MARÍA CRISTINA ECHEVERRÍA, PhD.



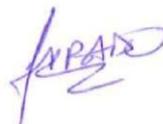
Directora

LENYS BERUTTI, MsC.



Asesora

JULIA PRADO, PhD.



Asesora

SANIA ORTEGA, MsC.



Asesora

Ibarra – Ecuador

2017



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN
A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

La Universidad Técnica del Norte dentro del proyecto Repositorio Digital Institucional, determinó la necesidad de disponer de textos completos en formato digital con la finalidad de apoyar los procesos de investigación, docencia y extensión de la Universidad.

Por medio del presente documento dejo sentada mi voluntad de participar en este proyecto, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	DE	172224994-1	
APELLIDOS Y NOMBRES:	Y	GÓMEZ BENALCÁZAR EVELYN VALERIA	
DIRECCIÓN:		SANCHEZ Y CIFUENTES 9-35 Y OVIEDO	
EMAIL:		evegomez_13@hotmail.com	
TELÉFONO FIJO:		TELÉFONO MÓVIL:	0997670361

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	“SENSIBILIDAD MICROBIANA Y PODER INSECTICIDA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE <i>Clinopodium nubigenum</i> Y <i>Ambrosia arborescens</i> .”
AUTOR (ES):	GÓMEZ BENALCÁZAR EVELYN VALERIA
FECHA:	27 de abril de 2017
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/> PREGRADO <input type="checkbox"/> POSGRADO
TITULO POR EL QUE OPTA:	INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA
ASESOR/DIRECTOR:	MARÍA CRISTINA ECHEVERRÍA, PhD.

2. AUTORIZACIÓN DE USO A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD

Yo, EVELYN VALERIA GÓMEZ BENALCÁZAR, con cédula de identidad Nro. 172224994-1, en calidad de autora y titular de los derechos patrimoniales de la obra o trabajo de grado descrito anteriormente, hago entrega del ejemplar respectivo en formato digital y autorizo a la Universidad Técnica del Norte, la publicación de la obra en el Repositorio Digital Institucional y uso del archivo digital en la Biblioteca de la Universidad con fines académicos, para ampliar la disponibilidad del material y como apoyo a la educación, investigación y extensión; en concordancia con la Ley de Educación Superior Artículo 144.

3. CONSTANCIAS

La autora manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto, la obra es original y soy el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asumo la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldré en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 27 días del mes de abril de 2017.

EL AUTOR:



EVELYN VALERIA GÓMEZ BENALCÁZAR



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

**CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE GRADO
A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

Yo, EVELYN VALERIA GÓMEZ BENALCÁZAR, con cédula de identidad Nro. 172224994-1, manifiesto mi voluntad de ceder a la Universidad Técnica del Norte los derechos patrimoniales consagrados en la Ley de Propiedad Intelectual del Ecuador, artículos 4, 5 y 6, en calidad de autora de la obra o trabajo de grado denominado: "SENSIBILIDAD MICROBIANA Y PODER INSECTICIDA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Clinopodium nubigenum* Y *Ambrosia arborescens*.", que ha sido desarrollado para optar por el título de: INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA en la Universidad Técnica del Norte, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente. En mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Técnica del Norte.

Ibarra, a los 27 días del mes de abril de 2017.

EVELYN VALERIA GÓMEZ BENALCÁZAR
172224994-1

DEDICATORIA

A Dios, el dueño de mi vida, mi fe, mi fuerza y mi sabiduría, por darme el regalo de la vida y permitirme cumplir mis sueños.

A mis padres Gerardo y Charito, por todo su amor y confianza, por estar conmigo en cada instante de mi vida, siendo mis consejeros y haciendo posible el cumplimiento de mis metas.

A mis hermanos Jorge, Jimmy y Leo, por creer en mí y por el gran sacrificio que han hecho para apoyarme.

A Pablo, por su cariño y comprensión, por ser mi fuerza, mi respaldo y mi felicidad en todo este tiempo.

A Jessica y Belén, mis amigas incondicionales, mi apoyo y compañía en los mejores y peores momentos.

A mis compañeros, por los momentos compartidos durante la carrera.

A todos mis maestros por su valioso aporte en mi formación académica y personal.

Evelyn

AGRADECIMIENTO

Mi más sincero agradecimiento a la Universidad Técnica del Norte y la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, que fueron mi segundo hogar, donde conocí personas que aportaron en mi formación tanto profesional como personal.

A mi directora, doctora Cristina Echeverría, por compartirme sus conocimientos, por permitirme asistir sus clases de fitoquímica para enriquecer mis conocimientos, por el interés mostrado en mi superación personal y profesional y por el gran apoyo brindado en todo el tiempo de realización del proyecto.

A mis asesores, magister Sania Ortega, doctora Julia Prado y Magister Lennys Berutti porque sus conocimientos fueron de gran ayuda para el desarrollo del proyecto de titulación.

A la doctora Blanquita Naranjo, por todo el apoyo técnico brindado para hacer posible la realización del proyecto.

Al doctor Vinicio Armijos y la doctora Daniela Santander por la ayuda prestada en todo el proceso de realización del proyecto de titulación.

A todos quienes conforman el Laboratorio de Investigaciones Ambientales de la Universidad Técnica del Norte por la colaboración prestada.

Evelyn

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT	xvii
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II	4
OBJETIVOS	4
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
2.3 HIPÓTESIS	5
CAPÍTULO III.....	6
REVISIÓN LITERARIA	6
3.1 <i>Clinopodium nubigenum</i> . Kunth. 1891.....	6
3.2 <i>Ambrosia arborescens</i> . Mill. 1984	7
3.3 ACEITES ESENCIALES	8
3.3.1 ACEITE ESENCIAL DE <i>C. nubigenum</i>	9
3.3.2 ACEITE ESENCIAL DE <i>A. arborescens</i>	9
3.3.3 EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES	10
3.4 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	10
3.4.1 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	11
3.4.1.1 Método de difusión en agar	11
3.4.1.2 Método de dilución en caldo	11
3.4.1.3 Microorganismos usados para la determinación de actividad antimicrobiana.....	12
3.4.1.4 Medios de cultivo usados para la determinación de actividad antimicrobiana.....	14
3.5 ACTIVIDAD INSECTICIDA	15
3.5.1 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD INSECTICIDA	15
3.5.1.1 Contacto directo	15
3.5.1.2 Actividad fumigante	16
3.5.1.3 Actividad Repelente	16
3.5.1.4 Insectos utilizados para la determinación de actividad insecticida	16
CAPÍTULO IV.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS	18
4.1 CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO	18

4.2	EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES	19
4.2.1	RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	19
4.2.2	SECADO DE LAS MUESTRAS	19
4.2.3	EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES	19
4.3	ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	20
4.4	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA LETAL	21
4.5	ANÁLISIS DE ACTIVIDAD INSECTICIDA	22
4.5.1	EFFECTO TÓXICO POR CONTACTO CON EL ALIMENTO	23
4.5.2	EFFECTO TÓXICO POR CONTACTO CON EL INSECTO	24
4.5.3	ACTIVIDAD FUMIGANTE	24
4.5.4	ACTIVIDAD REPELENTE	25
4.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	26
4.6.1	EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES	26
4.6.2	ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	27
4.6.3	DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN LA MÍNIMA INHIBITORIA Y LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA LETAL	27
4.6.4	ANÁLISIS DE ACTIVIDAD INSECTICIDA	27
	CAPÍTULO V	29
	RESULTADOS	29
5.1	EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES	29
5.2	ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	30
5.3	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA LETAL	38
5.3.1	DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA 38	
5.3.2	DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA LETAL	45
5.4	ANÁLISIS DE ACTIVIDAD INSECTICIDA	46
5.4.1	EFFECTO TÓXICO POR CONTACTO CON ALIMENTO	46
5.4.2	EFFECTO TÓXICO POR CONTACTO CON INSECTO	48
5.4.3	ACTIVIDAD FUMIGANTE	51
5.4.4	ACTIVIDAD REPELENTE	54
	CAPÍTULO VI	56
	DISCUSIÓN	56
	CAPÍTULO VII	61
	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	61
	CAPÍTULO VIII	64

BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS	64
BIBLIOGRAFÍA	64
ANEXOS	76
ANEXO 1. Curvas de calibración UFC/ml vs absorbancia	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Flores y hojas de <i>C. nubigenum</i>	7
Figura 2: Hoja de <i>A. arborescens</i>	8
Figura 3. Adulto de <i>Pagiocerus frontalis</i>	17
Figura 4. Esquema del proceso de extracción de aceite esencial.....	20
Figura 5. Esquema del proceso de análisis de actividad antimicrobiana	21
Figura 6. Esquema de determinación de CMI y CML.	22
Figura 7. Esquema de ensayo de efecto tóxico por contacto con alimento.....	23
Figura 8. Esquema de ensayo de efecto tóxico por contacto con el insecto.	24
Figura 9. Esquema de ensayo de actividad fumigante.	25
Figura 10. Esquema de ensayo de actividad repelente.....	26
Figura 11. Mayores halos de inhibición de <i>C. albicans</i> con aceite esencial de <i>C. nubigenum</i>	32
Figura 12. Mayores halos de inhibición de <i>P. aeruginosa</i> con aceite esencial de <i>C. nubigenum</i>	32
Figura 13. Mayores halos de inhibición de <i>B. subtilis</i> y <i>S. aureus</i> con aceite esencial de <i>C. nubigenum</i>	33
Figura 14. Mayores halos de inhibición de <i>E. coli</i> y <i>S. Abaetetuba</i> con aceite esencial de <i>C. nubigenum</i>	33
Figura 15. Diámetro de los halos de inhibición con el aceite esencial de <i>C. nubigenum</i>	34

Figura 16. Mayores halos de inhibición de <i>P. aeruginosa</i> con aceite esencial de <i>A. arborescens</i>	36
Figura 17. Mayores halos de inhibición de <i>B. subtilis</i> y <i>S. aureus</i> con aceite esencial de <i>A. arborescens</i>	36
Figura 18. Mayores halos de inhibición de <i>C. albicans</i> con aceite esencial de <i>A. arborescens</i>	37
Figura 19. Mayores halos de inhibición de <i>E. coli</i> y <i>S. Abaetetuba</i> con aceite esencial de <i>A. arborescens</i>	37
Figura 20. Diámetro de los halos de inhibición con el aceite esencial de <i>A.arborescens</i>	38
Figura 21. Inhibición del crecimiento de <i>C. albicans</i> con aceite esencial de <i>C. nubigenum</i>	40
Figura 22. Inhibición del crecimiento de <i>E. coli</i> y <i>P. aeruginosa</i> con aceite esencial de <i>C. nubigenum</i>	40
Figura 23. Inhibición del crecimiento de <i>S. aureus</i> con aceite esencial de <i>C. nubigenum</i>	41
Figura 24. Inhibición del crecimiento de <i>S. Abaetetuba</i> y <i>B. subtilis</i> con aceite esencial de <i>C. nubigenum</i>	42
Figura 25. Inhibición del crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> con el aceite esencial de <i>A. arborescens</i>	44
Figura 26. Inhibición del crecimiento de <i>E. coli</i> , <i>S. Abaetetuba</i> , <i>S. aureus</i> y <i>C. albicans</i> con aceite esencial de <i>C. nubigenum</i>	44
Figura 27. Inhibición de <i>B. subtilis</i> con aceite esencial de <i>C. nubigenum</i>	45
Figura 28. Mortalidad de <i>P. frontalis</i> por el método de contacto con el alimento.	48
Figura 29. Mortalidad de <i>P. frontalis</i> por el método de contacto con el insecto. ..	51

Figura 30. Mortalidad de *P. frontalis* por actividad fumigante.....54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Rendimiento de aceite esencial de <i>Clinopodium nubigenum</i>	29
Tabla 2. Rendimiento de aceite esencial de <i>Ambrosia arborescens</i>	30
Tabla 3. Diámetro (mm) del halo de inhibición en el crecimiento de microorganismos tratados con aceite esencial de <i>C. nubigenum</i>	31
Tabla 4. Diámetro (mm) de las zonas de inhibición en el crecimiento de microorganismos tratados con aceite esencial de <i>A. arborescens</i>	35
Tabla 5. Aumento del crecimiento microbiano (UFC/ml) después de la incubación con aceite esencial de <i>C. nubigenum</i>	39
Tabla 6. Aumento del crecimiento microbiano (UFC/ml) después de la incubación con aceite esencial de <i>A. arborescens</i>	43
Tabla 7. Concentraciones mínimas inhibitorias y letales de los aceites esenciales.....	45
Tabla 8. Mortalidad (número de insectos muertos) de <i>P. frontalis</i> por contacto de <i>C. nubigenum</i> con el alimento.....	46
Tabla 9. Mortalidad de <i>P. frontalis</i> por contacto de <i>A. arborescens</i> con el alimento.....	47
Tabla 10. Mortalidad de <i>P. frontalis</i> por contacto directo con <i>C. nubigenum</i>	49
Tabla 11. Mortalidad de <i>P. frontalis</i> por contacto de <i>A. arborescens</i> con el insecto	50
Tabla 12. Mortalidad de <i>P. frontalis</i> por actividad fumigante de <i>C. nubigenum</i> ...	52
Tabla 13. Mortalidad de <i>P. frontalis</i> por actividad fumigante de <i>A. arborescens</i> .	53
Tabla 14. Actividad repelente del aceite esencial de <i>C. nubigenum</i> a diferentes concentraciones.	55

Tabla 15. Actividad repelente del aceite esencial de *A. arborescens* a diferentes concentraciones55

RESUMEN

En la Región Interandina, la planta *Clinopodium nubigenum*, conocida como Sunfo es utilizada para prevenir o curar enfermedades intestinales e infecciones de la piel. Otra planta muy popular es *Ambrosia arborescens*, comúnmente llamada Marco, ésta se utiliza tradicionalmente en jardines para ahuyentar insectos como la mosca blanca y el zancudo. Estas propiedades están presentes en los vegetales gracias a compuestos químicos, entre ellos los aceites esenciales, producidos naturalmente como mecanismos de defensa o atracción. Mediante el estudio de estos aceites esenciales como antimicrobianos e insecticidas se busca rescatar los usos tradicionales de estas especies, promoviendo su aplicación biotecnológica. Los aceites esenciales se extrajeron mediante hidrodestilación simple y fueron utilizados para realizar análisis de actividad antimicrobiana mediante la técnica de difusión en disco. Se determinó una mayor actividad antimicrobiana de *C. nubigenum* frente a la levadura *C. albicans* con un halo de 45,0 mm y de *A. arborescens* frente a la bacteria patógena *P. aeruginosa* con un halo de 27,3 (\pm 2,5) mm. Además, mediante la técnica de dilución en caldo, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima letal (CML) sobre un amplio número de microorganismos, incluyendo bacterias Gram positivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*), bacterias Gram negativas (*Salmonella* Abaetetuba, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*) y levaduras (*Candida albicans*). La toxicidad en insectos se determinó utilizando diferentes concentraciones de los aceites esenciales. Se evaluó su poder insecticida por actividad fumigante, contacto directo, alimento con el aceite y su capacidad de repelencia sobre *Pagiocerus frontalis*, un insecto plaga que ataca el grano de maíz. Los aceites esenciales de *C. nubigenum* y *A. arborescens* demostraron actividad insecticida, presentando mortalidades hasta de 80% y 58,8% respectivamente. *C. nubigenum* fue repelente en todas sus concentraciones, mientras que *A. arborescens* presentó menor repelencia e incluso neutralidad en concentraciones de 1 y 2 μ l/ml. Los resultados obtenidos en esta investigación abren la posibilidad de utilizar estos aceites en la formulación de bioplaguicidas para el sector agropecuario, con el fin de reducir el uso de agroquímicos y contribuir con el cuidado del medio ambiente.

PALABRAS CLAVES

Aceites esenciales, Actividad antimicrobiana, Actividad insecticida, Repelencia.

ABSTRACT

In the Inter Andean Region, *Clinopodium nubigenum* (Lamiaceae), known as Sunfo is used to prevent or cure intestinal diseases and skin infections. Another popular plant is *Ambrosia arborescens* (Asteraceae), commonly known as Marco, used traditionally in gardens to keep away pest insects like the white fly and mosquito. These properties are due to the presence of essential oils produced by the plants as mechanisms of defense or for attraction of pollinators. The study of the antimicrobials and insecticides properties of these essential oils can scientifically confirm the traditional uses of these species, promoting their biotechnological application. Plant essential oils were extracted by hydrodistillation and were used to perform analysis of antimicrobial activity by the disc diffusion technique. *C. nubigenum* showed strongest antimicrobial activity against yeast *C. albicans* with inhibition halo of 45.0 mm and *A. arborescens* against *P. aeruginosa* with a halo of 27.3 (\pm 2.5) mm. In addition, by the broth dilution method, was determined the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal lethal concentration (MLC) against several microorganisms, including Gram positive bacteria (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*), Gram negative bacteria (*Salmonella* Abaetetuba, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*) and yeasts (*Candida albicans*). The insecticidal activity of the essential oils, was evaluated by fumigation, direct contact, and food whit essential oil. Repellency activity of the essential oils was evaluated on *Pagiocerus frontalis*, a pest insect that attacks maize. *C. nubigenum* and *A. arborescens* essential oils showed a good insecticidal activity, with a mortality of 80% and 58.8%, respectively. *C. nubigenum* was repellent in all its concentrations, whereas *A. arborescens* presented low or no repellency at the concentrations of 1 and 2 μ l / ml. The results obtained in this research open the possibility of using *C. nubigenum* and *A. arborescens* essential oils in the formulation of biopesticides to be used in agriculture, in order to reduce the use of agrochemicals and contribute to the care of the environment.

KEYWORDS

Essential oils, Antimicrobial activity, Insecticidal activity, Repellency.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El Ecuador es un país de gran diversidad cultural y natural, rico en especies vegetales que han sido usadas ancestralmente. Las cuatro regiones naturales, hacen del Ecuador un país megadiverso por sus diferentes climas. La región Interandina posee gran cantidad de especies vegetales, especialmente en los páramos. Ésta es un área que apenas está siendo explorada con fines científicos, sin embargo, los habitantes de esta región, a través de conocimientos ancestrales han otorgado un uso a las plantas tanto como medicinales como para protección de pequeños huertos familiares (Aguilar, Hidalgo, y Ulloa, 2009; Mena y Hofstede, 2006).

Adicionalmente, el sector agropecuario es de gran importancia, ya que, según el Instituto Ecuatoriano de Estadística y Censo ocupa el cuarto lugar en las actividades realizadas por la Población Económicamente Activa del país (INEC, 2015), y además es la fuente principal de ingresos de pequeños y grandes productores. Sin embargo, las pérdidas económicas por plagas y enfermedades constituyen un gran inconveniente para los agricultores ecuatorianos, generando pérdidas que según el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca alcanzan el 18% en cultivos solos y el 15% en cultivos asociados (MAGAP, 2012).

Para la erradicación de plagas se ha adoptado el uso de agroquímicos, los cuales han demostrado ser efectivos para controlar plagas y enfermedades, pero también poseen grandes efectos sistemáticos que causan daños a los seres humanos y a los procesos naturales de control de plagas. Además implican costos elevados para los agricultores, ya que se requiere de aplicaciones continuas (Jacobsen y Sherwood, 2002). Estos productos, son una fuente potencial de contaminación ambiental, con mayor impacto en países tropicales. Causan daño al suelo, animales, plantas e incluso a los seres humanos, pues solo el 0.1% de la aplicación del agroquímico llega a la plaga, el resto se dispersa en el ambiente (D. Torres y Capote, 2004). Rogg (2001) menciona que al evaluar el costo de los agroquímicos, se debería tomar en cuenta el gasto que implica la descontaminación del ambiente.

Existen alternativas de manejo y control de plagas y enfermedades que se han desarrollado basadas en conocimientos ancestrales sobre plantas con la capacidad de erradicar insectos, ácaros, nematodos, hongos, bacterias, virus, tanto de plantas como de animales (Celis et al., 2010); con el fin de sustituir a los agroquímicos y buscando un equilibrio entre el ambiente, la producción y el hombre. Para diseñar estos productos alternativos se consideran parámetros que garanticen su eficiencia, como la especificidad sobre el objetivo, bajo o nulo impacto frente al medio ambiente, organismos circundantes y el cultivo. Se han desarrollado productos a base de extractos vegetales, ya sea, de las semillas o partes aéreas de las plantas; para prevenir o contrarrestar plagas insectiles e infecciones bacterianas y fúngicas (Molina, 2001).

La posibilidad de usar aceites esenciales como ingredientes activos de productos orgánicos, es inminente ya que presentan actividad antibacterial y antifúngica (Sánchez, Pino, Correa, Naranjo, e Iglesia, 2009), además de propiedades repelentes e insecticidas. Esto constituiría un método de control alternativo ante plagas y enfermedades en cultivos, tanto en campo como en post cosecha y en general en el sector agropecuario (Ballesta, Pascual, y Soler, 2004).

Los aceites presentan una actividad residual corta, por lo que son eliminados sin causar daños o producir efectos secundarios en plantas o ambiente (Castresan, Rosenbaum, y González, 2013). Su uso como compuestos principales de productos orgánicos, es una alternativa pertinente en nuestro país, que se enmarca en los objetivos del Plan Nacional del Buen Vivir desarrollado por la Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo, en lo relativo al aprovechamiento de saberes ancestrales, el uso de los recursos naturales y protección del medio ambiente (SENPLADES, 2013).

El objetivo de la presente investigación fue determinar la actividad antimicrobiana, poder insecticida y de repelencia de los aceites esenciales de *C. nubigenum* y *A. arborescens*, frente a microorganismos patógenos y un insecto plaga para el sector agropecuario. Determinando las mínimas concentraciones en las que los aceites esenciales poseen efecto antimicrobiano y el método de aplicación del aceite esencial para una mejor actividad insecticida.

El estudio de los efectos de estos aceites tanto en organismos benéficos como en patógenos, permitirá la formulación de plaguicidas específicos dirigidos a determinadas plagas evitando perjudicar a otros organismos considerados benéficos por su rol ecológico. Esta información será útil para evaluar un posible uso integrado de los aceites esenciales con organismos de biocontrol, incrementando la eficiencia en el manejo de plagas y como consecuencia la disminución del uso de pesticidas de síntesis química.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la sensibilidad microbiana y poder insecticida de los aceites esenciales de *C. nubigenum* y *A. arborescens*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el rendimiento del aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* y *Ambrosia arborescens*, mediante el método de extracción por hidrodestilación simple.
- Examinar la biosensibilidad de *Bacillus subtilis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella entérica* subsp *Abacetuba*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* al aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* y *Ambrosia arborescens* mediante la técnica de difusión por disco.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Letal (CML) de los aceites de *Clinopodium nubigenum* y *Ambrosia arborescens* para microorganismos patógenos.

- Estudiar la toxicidad del aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* y *Ambrosia arborescens* en el insecto *Pagiocerus frontalis*.

2.3 HIPÓTESIS

El aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* y *Ambrosia arborescens* presenta actividad antimicrobiana e insecticida a diferentes concentraciones. }

CAPÍTULO III

REVISIÓN LITERARIA

3.1 *Clinopodium nubigenum*. Kunth. 1891.

Clinopodium nubigenum o tradicionalmente llamado “Sunfo” es una planta herbácea perteneciente a la familia Lamiaceae que crece sobre la tierra formando tapetes. Sus tallos son de color café rojizo y sus hojas verdes, de forma ovalada, conglomeradas a lo largo del tallo y cubiertas de vellosidades. Las flores son pequeñas y solitarias y se encuentran en las axilas de las hojas, las cuales son de color morado pálido, como se presenta en la figura 1.

C. nubigenum se encuentra en zonas de clima frío, con una altura entre 3000 y 4500 msnm. En el Ecuador está presente en los páramos de Zuleta- Imbabura, así como en las provincias de la Región Interandina. Es ancestralmente conocida por sus propiedades medicinales, se usa en infusión para eliminar el dolor de estómago, dolores menstruales, incontinencia urinaria y gripe. Además en la Zonas Andinas del país es común la mezcla del té con aguardiente para tratar el frío (Aguilar, Hidalgo, y Ulloa, 2009).



Figura 1: Flores y hojas de *C. nubigenum*

Fuente: Aguilar et al., 2009

3.2 *Ambrosia arborescens*. Mill. 1984

Ambrosia arborescens o comúnmente denominado “Marco” es un subarbusto, que pertenece a la familia Asteraceae, presenta un tallo fuerte que puede llegar a medir hasta 3m de longitud, hojas compuestas, de color verde oscuro con margen sectado (Figura 2), haz glabrascente y envés albescente. Su inflorescencia se distribuye en panícula y toma un color verde rojizo (Ayala y Vásquez, 2014).

El “Marco” es una planta nativa de América del Sur, en el Ecuador crece en la Región Interandina entre 2500 y 3000 msnm. La población propia de la región aprovecha las propiedades aromáticas y curativas de la planta, dándole usos en el tratamiento de la migraña, reumatismo, infecciones, estreñimiento, fiebre, desórdenes prostáticos, lesiones y fracturas, además se la utiliza para combatir insectos plaga como pulgas y garrapatas (Ayala y Vásquez, 2014; Vera, 2008).



Figura 2: Hoja de *A. arborescens*

Fuente: La autora.

3.3 ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales son sustancias producidas naturalmente por las plantas, ya sea como mecanismo de defensa contra depredadores o como atractivos de insectos beneficiosos. Estas sustancias son metabolitos secundarios (Ortuño, 2006), que se producen en cantidades pequeñas, su rendimiento se encuentra entre <1% y 3% dependiendo de la planta, de las condiciones climáticas donde se encuentra, el lugar geográfico, el método de recolección y extracción (Yáñez Rueda, Parada, & Lugo Mancilla, 2011). Contienen diferentes compuestos químicos responsables de las propiedades antimicrobianas, antioxidantes, saborizantes y aromáticas de aceite esencial (Reyes, Palou, y López, 2014).

En los últimos años los aceites esenciales de raíces, hojas, tallo, flores y frutos de distintas plantas se han investigado para el control de plagas insectiles e infecciones microbianas. En recientes estudios se ha detectado la actividad antibacteriana y antifúngica de varios aceites de plantas como cilantro, canela, orégano, romero, salvia, clavo, tomillo, entre otras (Reyes, Palou, y López, 2012), y se ha determinado que dependiendo de la composición química y la concentración de los aceites esenciales, estos actúan sobre enzimas relacionadas con la

producción de energía y desnaturalizan las proteínas bacterianas (Nazzaro, Fratianni, De Martino, Coppola, y De Feo, 2013).

Además, se ha investigado la actividad insecticida, y larvicida de los aceites esenciales de plantas de olor penetrante como eucalipto, romero, ajo, cilantro, etc (Murillo y Salazar, 2011), determinando que es neurotóxico, ya que actúan en el transporte de acetil colina esterasa, alterando el sistema nervioso del insecto (Tripathi, Upadhyay, Bhuiyan, y Bhattacharya, 2009). Estas razones abren las posibilidades del uso de estos aceites en el manejo sustentable de plagas para la protección de cultivos de importancia económica (M. M. Rojas et al., 2014).

3.3.1 ACEITE ESENCIAL DE *C. nubigenum*.

El aceite esencial de *C. nubigenum* está compuesto principalmente de monoterpenos y sesquiterpenos (Gilardoni et al., 2011).

Según estudios realizados, el aceite esencial de *C. nubigenum* presenta propiedades antibacteriales y antifúngicas. Se ha reportado su bioactividad contra *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, (Gilardoni et al., 2011) y aunque no se han reportado estudios extensos sobre la actividad insecticida de *C. nubigenum*, investigaciones entomológicas determinaron actividad insecticida en plantas del género *Clinopodium* frente a *Liposcelis bostrychophila*, la cual es una plaga de productos en almacenamiento (Li, Liu, Chen, Liu, y Liu, 2015).

3.3.2 ACEITE ESENCIAL DE *A. arborescens*.

El aceite esencial de *A. arborescens* contiene principalmente flavonoides, monoterpenos, diterpenos, sesquiterpenos y triterpenos (Vera, 2008).

Este aceite esencial presenta actividad antifúngica frente a *Trychophyton mentagrophytes*, *Trychophyton rumbrum*, *Microsporum canis* y *C. albicans* (Ayala y Vásquez, 2014), y actividad antimicrobiana contra *E. coli*, *S. aureus*, y *S. epidermidis* (Ibarra y Paredes, 2013). En cuanto a la toxicidad del aceite frente a insectos, se ha descrito su efecto en *Ropalosiphum maidis* (Chávez, 2013). Además se han realizado investigaciones que determinan la actividad larvicida

del aceite de plantas del género *Ambrosia* frente a *Aedes aegypti* (Vásquez, Mejía, Mesa, y Arboleda, 2014) y frente a escarabajos (Granados, 2012).

3.3.3 EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

Para la obtención de aceites esenciales de plantas existen diferentes metodologías. Entre ellas se encuentran la hidrodestilación simple, extracción por arrastre de vapor de agua, extracción con disolventes, con fluidos supercríticos, extracción por microondas, por ultrasonido (Peredo, Palou, y López, 2009). La más utilizada es la hidrodestilación simple, que consiste en llevar la muestra vegetal a ebullición con agua para que el aceite esencial sea arrastrado por el vapor, condensado y separado por inmiscibilidad. Ha sido utilizada en varias investigaciones, ya que al usarse solo agua implica costos bajos en relación a los otros métodos de extracción, además posee facilidad de instalación y operación y bajo consumo energético (A. Torres, 2012).

3.4 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Los compuestos antimicrobianos son aquellos que poseen la capacidad de inhibir el crecimiento o destruir microorganismos, actuando de diferentes maneras según su composición. Estos compuestos pueden ser de origen natural, sintético o semisintético (Sulca, 2010).

Los aceites esenciales actúan de diferente manera, según el tipo de microorganismo. Frente a bacterias Gram positivas penetran la pared celular hasta el citoplasma e interfieren en las enzimas relacionadas a la producción de energía y en concentraciones altas son capaces de desnaturalizar proteínas. Las bacterias Gram negativas son más resistentes, ya que la presencia de una pared celular casi impermeable dificulta el ingreso del aceite esencial, de modo que solo pequeñas moléculas son capaces de atravesar la pared (Nazzaro et al., 2013). Contra hongos, el mecanismo de acción de los aceites esenciales consiste en la inhibición de la esporulación o en la producción de toxinas (Reyes et al., 2014).

3.4.1 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

En su mayoría, los métodos para determinar la actividad antimicrobiana consisten en la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), que es la menor concentración del aceite que inhibe el crecimiento del microorganismo o la Concentración Mínima Letal (CML), que es la más baja concentración del compuesto para impedir por completo el crecimiento del microorganismo en medio sólido.

La volatilidad del aceite esencial, y su insolubilidad en agua hacen que los métodos de determinación de actividad antimicrobiana sean limitados. Por ello es común la utilización de diferentes métodos, entre ellos se encuentran: la difusión en agar, dilución en caldo, dilución en agar, caja Petri invertida, sembrado en espiral, cámara hermética (Reyes et al., 2014).

3.4.1.1 Método de difusión en agar

La difusión en agar es de los métodos mayormente utilizados en la determinación de actividad antimicrobiana, por ser una técnica sencilla que permite identificar la difusión y la efectividad del aceite esencial; aunque se ve limitada por la hidrofobicidad, pues algunos compuestos no se difunden totalmente en el agar. Existen dos maneras de llevar a cabo ésta técnica, la primera es usando un disco impregnado del aceite que se coloca sobre el agar inoculado con el microorganismo, y la segunda perforando el agar inoculado y colocando el aceite en el pocillo. En ambos casos el aceite esencial se difunde por el agar y después de la incubación da origen a un halo de inhibición del crecimiento bacteriano, el cual está relacionado directamente con la capacidad antimicrobiana el aceite (Reyes et al., 2014).

3.4.1.2 Método de dilución en caldo

El método de dilución en caldo consiste en colocar en tubos de ensayo una suspensión microbiana de concentración conocida y diluciones crecientes de aceite esencial, llevar a incubación a temperatura y tiempo óptimos y posteriormente evaluar el crecimiento del microorganismo mediante la presencia de turbidez.

De esta forma el método de dilución en caldo permite determinar la CMI, además se pueden tomar alícuotas de los cultivos líquidos y sembrarlos en agar para determinar la CML (Reyes et al., 2014).

3.4.1.3 Microorganismos usados para la determinación de actividad antimicrobiana.

***Escherichia coli*. Castellani & Chalmers. 1919:** Esta bacteria es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo y anaerogénico. Bioquímicamente es catalasa- positivo, oxidasa- negativo, rojo de metilo- positivo, Voges-Proskauer negativo y productora de indol. La mayoría de las cepas de *E. coli* son fermentadoras de lactosa (Rodríguez, Serrano, Marfil, y Jodral, 2009) (Breed, Murray, y Smith, 1957).

Las condiciones óptimas para el crecimiento de *E. coli* son temperatura de 37 °C y pH entre 3,0 y 7,0. Por lo que este microorganismo está presente en el intestino de animales de sangre caliente, así como en sus heces fecales. Además, se asocia a diversas enfermedades en animales y humanos, entre ellas se encuentran la diarrea (Rodríguez et al., 2009), infección de vías urinarias, sepsis y meningitis (Delgado y Ullauri, 2012).

***Salmonella entérica*. Lignieres. 1900:** Es una bacteria Gram negativa, en forma de bacilo, aerobia facultativa, catalasa- positiva, oxidasa- negativa, fermentador de glucosa. Las bacterias de este tipo suelen ser móviles (Breed et al., 1957; López y Salazar, 2014).

Salmonella habita en el sistema gastrointestinal de los animales, ya que la temperatura óptima para su desarrollo está entre 35°C y 37°C y el pH entre 4,0 y 7,5. Al ser un parásito intracelular y poseer supervivencia intrafagocítica es responsable de problemas gastrointestinales, septicémicos y abortos (Adelantado et al., 2008).

***Pseudomona aeruginosa*. Migula. 1894:** Es un bacilo muy versátil, Gram negativo, aerobio, oxidasa positivo. Las colonias de esta bacteria suelen tener colores brillantes, lo cual se debe a la producción de pigmentos. *P. aeruginosa* es capaz de crecer a temperaturas de hasta 42°C,

aunque la temperatura óptima es 37°C (American Type Culture Collection, n.d.; Breed et al., 1957; Roca, 2014).

P. aeruginosa está presente en diferentes hábitats como agua, suelo y plantas. Sin embargo, es un patógeno oportunista que provoca infecciones en animales y humanos. Aprovecha heridas, quemaduras, o enfermedades pulmonares para llevar a cabo la infección (Roca, 2014).

***Bacillus subtilis*. Cohn. 1872:** es una bacteria de gran tamaño en forma de bacilo, móvil, Gram positiva, aerobia, productora de endosporas resistentes a altas temperaturas, catalasa-positiva (Silva, García, Caballero, Fernández, y Silva, 2006), Voges- Proskauer positiva, citrato positiva, fermentador de manitol y xilosa (Breed et al., 1957; Forbes, 2009).

Esta bacteria se encuentra en el agua, polvo, materia animal y vegetal, por lo que es capaz de contaminar diferentes medios, sin embargo, no presenta patogenicidad (Silva et al., 2006). Ha sido utilizada en biocontrol por su actividad antifúngica natural.

***Staphylococcus aureus* Rosenbach. 1894:** Es un coco Gram positivo, no móvil, anaerobio facultativo, no esporulado, catalasa positivo, coagulasa positivo, fermentador de glucosa, productor de caroteno, razón por la cual las colonias se observan amarillentas o doradas (Breed et al., 1957).

Staphylococcus aureus se encuentra en la microbiota de la piel y mucosas de animales y humanos. Son patógenos en huéspedes inmunodeprimidos, siendo los responsables de infecciones y supuraciones. En los bovinos, por ejemplo, provoca mastitis (Cervantes, García, y Salazar, 2014).

***Candida albicans*. (Robin. 1853) Berhkout. 1923:** Es una levadura de forma oval, que mide entre 2 a 4 micras, se reproduce asexualmente por gemación, es Gram positiva al igual que todas las levaduras. Posee un pseudomicelio en cuyo extremo se producen clamidosporas de gran tamaño. Las colonias de esta levadura aparecen entre las 24 y 48 horas de incubación, son blancas y se van tornando crema con la maduración.

Las condiciones para el crecimiento de esta levadura son temperatura de 25°C a 38°C y pH de 2,5 a 7,5, lo que favorece su patogenicidad oportunista. Se encuentra como comensal en

cavidades bucales, intestinos, vagina, secreción bronquial y piel del hombre y animales. Por lo que es responsable de la enfermedad infecciosa conocida como candidiasis (Modrzewska y Kurnatowska, 2010; Pardi y Cardozo, 2002; Prasad, 2012).

3.4.1.4 Medios de cultivo usados para la determinación de actividad antimicrobiana.

Agar Nutritivo: Es un medio de cultivo no selectivo, utilizado para el aislamiento y recuento de microorganismos no exigentes en requerimientos nutricionales. El Agar Nutritivo está constituido por pluripectona y extracto de carne, que conforman la fuente de carbono, nitrógeno y nutrientes que facilitan el desarrollo de la bacteria; cloruro de sodio que mantiene el balance osmótico y agar que es el agente solidificante (Laboratorios Britania, 2015b).

Caldo Nutritivo: Es un medio de cultivo líquido no selectivo, utilizado para el desarrollo de microorganismos con pocos requerimientos nutricionales. Está constituido por pluripectona y extracto de carne, que conforman la fuente de carbono y nitrógeno necesarias para desarrollo de la bacteria (Laboratorios Britania, 2015c).

Sabouraud: Medio de cultivo utilizado para el cultivo de levaduras, aislamiento, conservación e identificación de hongos saprófitos y patógenos asociados con infecciones cutáneas. El Sabouraud se constituye de peptona, tripteína y glucosa que son los nutrientes para el crecimiento de microorganismos, sin embargo, la alta concentración de glucosa, la presencia de Cloranfenicol y el pH ácido inhiben el crecimiento bacteriano, favoreciendo el crecimiento de hongos y levaduras; el agar es el agente solidificante (Laboratorios Britania, 2015d).

Caldo YPD (Yeast Extract- Peptone- Dextrose): Es un medio utilizado para el cultivo de levaduras, ya que la presencia de proteína y extracto de levadura permite el rápido crecimiento de las mismas, de modo que, en la fase logarítmica las células se dividen cada 90 minutos. El caldo YPD está compuesto por extracto de levadura, peptona y dextrosa (Jo Zimbro, Power, Miller, Wilson, y Johnson, 2009).

Mueller – Hinton Agar: Este medio no es selectivo y promueve el desarrollo microbiano. Ha sido recomendado universalmente para pruebas de sensibilidad a antimicrobianos, ya que, presenta bajo contenido de inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina y facilita el crecimiento de la mayoría de patógeno microbianos. Mueller – Hinton Agar está constituido de infusión de carne, peptona ácida de caseína, almidón y agar (Laboratorios Britania, 2015a).

3.5 ACTIVIDAD INSECTICIDA

Los insecticidas son compuestos de origen natural o sintético que poseen la capacidad de prevenir, controlar o contrarrestar insectos (Yumi, 2012). Se consideran insecticidas biológicos a los de origen natural, capaces de controlar plagas sin provocar daños al ambiente, organismos superiores o plantas (Baldeón, 2012).

En este contexto, los aceites esenciales se consideran insecticidas biológicos por provenir naturalmente de las plantas. Estos aceites presentan distintos modos de acción frente a los insectos: dificultan la reproducción, el tiempo de vida, la alimentación, algunos aceites tienen actividad fumigante penetrando en el cuerpo del insecto y actuando como insecticidas de contacto, otros actúan como repelentes (Espitia, 2011), e incluso pueden ser neurotóxicos (Tripathi et al., 2009).

3.5.1 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD INSECTICIDA

Para la determinación de la actividad insecticida se llevan a cabo diferentes métodos que permitan evaluar tanto la efectividad del aceite como su modo de acción, para ello algunos de los métodos utilizados en investigación son: contacto directo con el insecto o con el alimento, actividad fumigante, actividad repelente (Tapondjou, Adler, Fontem, Bouda, y Reichmuth, 2005).

3.5.1.1 Contacto directo

Éste método consiste en mantener en contacto directo con diluciones de aceite esencial por un determinado tiempo a los insectos o a su alimento. Para ello puede utilizarse recipientes con

papel que contenga el aceite (Espitia, 2011), o puede colocarse directamente un volumen de aceite en el insecto o alimento (Benelli y Canale, 2012; Salgado, D'Antonino, y Soto, 2012). Posteriormente se evalúa el porcentaje de mortalidad con respecto al control, que será solo el solvente en que se diluyó el aceite esencial.

3.5.1.2 Actividad fumigante

En este método se somete a los insectos al aceite esencial, pero sin tener contacto directo, es decir, se evalúa la actividad de los compuestos volátiles del aceite esencial. Para ello, los insectos se colocan en un recipiente que contiene un soporte para las diluciones del aceite, mismo que debe estar protegido para que los insectos no entren en contacto directo con él (Ringuelet et al., 2014).

3.5.1.3 Actividad Repelente

Para determinar la repelencia de un aceite esencial se utiliza el método de preferencia de área. Consiste en colocar a los insectos en un recipiente dividido en dos partes, de las cuales una contendrá aceite esencial y la otra solo el solvente (control). Con el fin de que los insectos se dirijan al área que prefieran. De este modo se evalúa si el aceite los atrae o los repele, dependiendo del número de insectos presentes en cada área (Olivero, Caballero, Jaramillo, y Stashenko, 2009).

3.5.1.4 Insectos utilizados para la determinación de actividad insecticida

Pagiocerus frontalis: Es un coleóptero perteneciente a la familia *Curculionidae*, denominado gorgojo del maíz. Mide entre 1,5 mm y 2,5 mm, es de color marrón y posee pocas vellosidades en el dorso, en su cabeza tiene una trompa pequeña (Figura 3). El ciclo de vida de *P. frontalis* es de aproximadamente 40 días, posee cuatro estadios de desarrollo: huevo, larva, pupa y adulto. La duración mínima del ciclo de vida de huevo a adulto en el maíz suave es de 25 días a una temperatura de 23 ° C con una humedad relativa del 90% al 60% y se reporta períodos de supervivencia del adulto hasta de 223 días en maíz suave (Castro y Mejía, 2011).

Vive en regiones con una altura de 1500 – 2600 msnm y temperatura de 18° C – 26°C. Es considerado una plaga grave en Ecuador, Chile, Colombia y Perú. El insecto adulto infecta el grano de maíz antes de la cosecha y en el almacenamiento, taladra el grano y se alimenta de él. Las hembras ovopositan en el interior del grano y cubren el agujero con un mucílago transparente, cuando los insectos son adultos taladra el grano y salen al ambiente (Castro y Mejía, 2011).



Figura 3. Adulto de Pagiocerus frontalis

Fuente: La autora

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

La presente investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Uso Múltiple, Investigaciones Ambientales y Entomología, ubicados en la Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales de la Universidad Técnica del Norte, en la Parroquia El Sagrario, Cantón Ibarra, Provincia Imbabura.

Las muestras vegetales fueron tomadas de las parroquias El Sagrario y Zuleta del Cantón Ibarra Provincia de Imbabura; a una altura de 2500 – 3900 msnm y temperatura de 6 -10 °C (GAD Municipal Ibarra, 2012).

4.2 EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

4.2.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

C. nubigenum: Las muestras se recolectaron en el páramo de la parroquia Zuleta, cantón Ibarra, provincia Imbabura, con autorización número 006-2017-IC-FAU-FLO-DPAI/MAE se seleccionaron plantas en buen estado, es decir, que posean hojas libres de daños causados por condiciones ambientales propias del páramo.

A. arborescens: Se recolectó en la parroquia San Francisco, cantón Ibarra, provincia Imbabura, con autorización número 006-2017-IC-FAU-FLO-DPAI/MAE se seleccionaron plantas en estado de maduración, antes del brote del fruto. La recolección se realizó en la temporada seca, ya que las condiciones ambientales son adversas y esto favorece la producción de aceites esenciales de la planta.

4.2.2 SECADO DE LAS MUESTRAS

Las muestras se sometieron a un proceso de secado a temperatura ambiente y en oscuridad, durante 7 – 10 días, colocando las plantas de manera extendida sobre papel absorbente para evitar la pudrición.

4.2.3 EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

La extracción se realizó mediante el método de hidrodestilación simple; se cortaron las muestras secas de cada planta, se pesaron y se colocaron individualmente con agua en el balón, se llevó a ebullición de manera que el aceite se libere en forma de vapor y sea arrastrado por el vapor de agua hacia un condensador donde al volverse líquidos se separan por su inmiscibilidad y diferencia de densidades (Ayala y Vásquez, 2014).

El rendimiento del aceite esencial se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{ml del aceite extraído}}{\text{gramos de materia prima}} \times 100$$

(Franco, 2015)

El proceso de la extracción de aceite esencial se resume en el esquema de la figura 4.

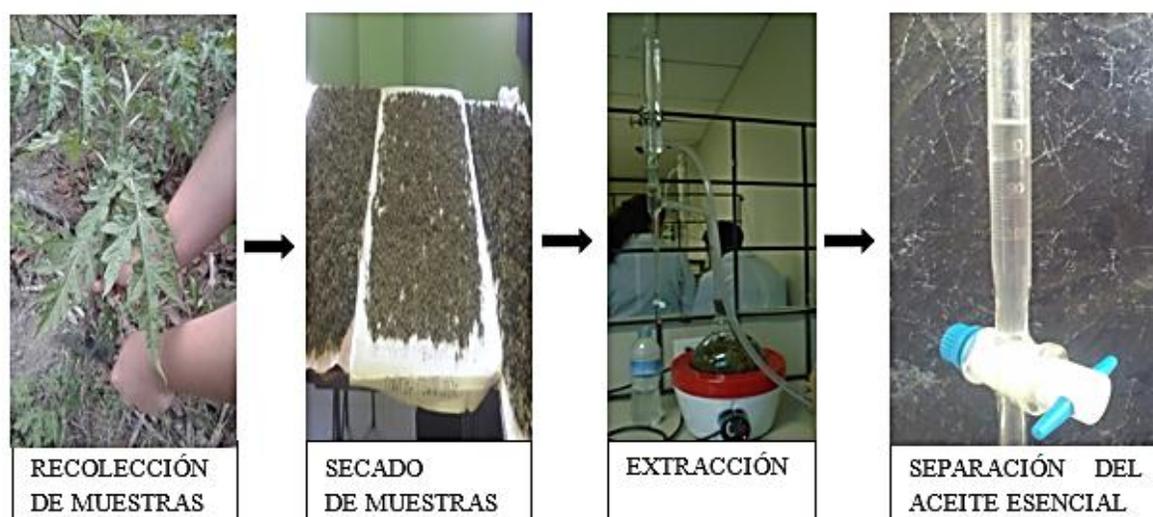


Figura 4. Esquema del proceso de extracción de aceite esencial

Fuente: La autora

4.3 ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Para el análisis del efecto antimicrobiano de los aceites esenciales se utilizaron las bacterias Gram negativas *E. coli* ATCC® 10536, *P. aeruginosa* ATCC® 10145 y *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abaetetuba ATCC® 35640; Gram positivas *S. aureus* ATCC® BAA-1026 y *B. subtilis* ATCC® 11774; y la levadura *C. albicans* ATCC® 10231.

El análisis de actividad antimicrobiana se realizó mediante el método de difusión en agar utilizado por Bailac, Dellacasa, Bernasconi, Firpo, y Ponzi (2000), realizando una siembra homogénea sobre el medio de cultivo Mueller – Hinton Agar con una concentración de microorganismos 10^6 UFC/ml, luego se colocó en la superficie del agar inoculado, un disco de 6 mm de diámetro con 10 μ l de una solución aceite esencial-metanol en diferentes proporciones (1:0, 1:1, 1:3, 1:7, 1:15). Todos los microorganismos fueron incubados a 37 °C durante 24 horas, excepto *C. albicans* que se incubó por 48 horas. Posteriormente se procedió a medir el halo de inhibición en milímetros. El control fue únicamente 10 μ l de metanol. Se realizó el ensayo por triplicado. El esquema del proceso se observa en la figura 5.

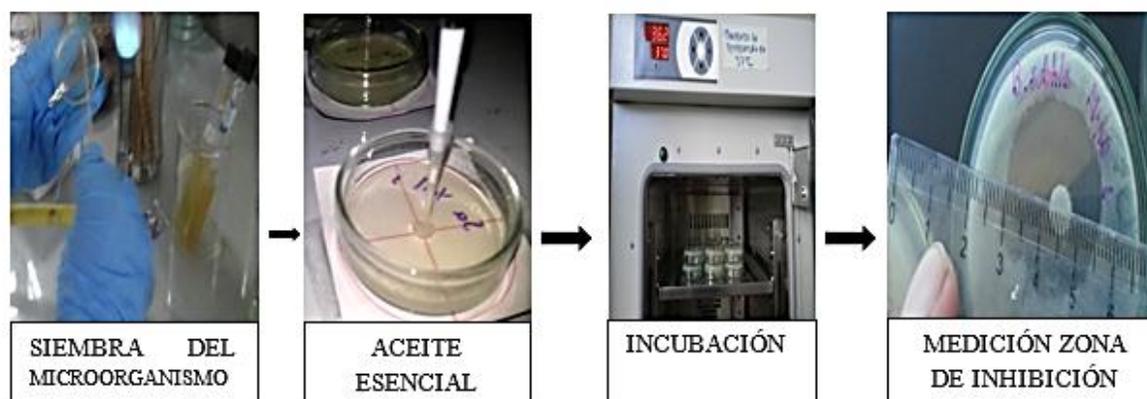


Figura 5. Esquema del proceso de análisis de actividad antimicrobiana

Fuente: La autora

4.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA LETAL

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se determinó mediante el método de dilución en caldo. Las bacterias se cultivaron en caldo nutriente y la levadura en Caldo YPD (Yeast Extract – Peptone – Dextrose). Se colocaron en tubos de ensayo 5ml de suspensión microbiana de concentración conocida y 50 μ l del aceite en sus respectivas diluciones y se llevó a incubación a 37 °C por 24 horas. Los resultados se determinaron midiendo el aumento de la concentración microbiana, para lo cual se midió la densidad óptica y se relacionó este valor con curvas de calibración (Anexo1) realizadas previamente por cada cepa para determinar la concentración microbiana final y con ello la CMI. El ensayo se realizó por triplicado.

La determinación de la Concentración Mínima Letal (CML) se realizó sembrando en medio de cultivo sólido las suspensiones inhibidas y se observó los resultados mediante la presencia o ausencia de crecimiento después de la incubación a 37°C. Las bacterias se sembraron en agar nutriente y se incubaron por 24 horas. Las levaduras se sembraron en Sabouraud y la incubación se realizó por 48 horas. Se realizó el ensayo por triplicado.

En la Figura 6 se presenta el esquema de determinación de CMI y CML.



Figura 6. Esquema de determinación de CMI y CML.

Fuente: La autora

4.5 ANALISIS DE ACTIVIDAD INSECTICIDA

Se realizó la cría del insecto *Pagiocerus frontalis* en un contenedor plástico con una red adaptada en la tapa para permitir el intercambio de gases. Se mantuvo la cría a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) y sin luz solar directa. Se alimentó a los insectos con mazorcas de *Zea maíz*.

4.5.1 EFECTO TÓXICO POR CONTACTO CON EL ALIMENTO

El efecto tóxico de los aceites esenciales sobre *P. frontalis* por contacto con el alimento se determinó colocando diez granos de maíz en un recipiente de vidrio, se aplicó a cada frasco 100 µl de la solución de aceite esencial diluido en metanol en concentraciones de 0.25, 0.50, 1.0, 2.0 y 4.0 µl/ml. Se esperó diez minutos para que se evapore el solvente y posteriormente se colocaron 10 insectos. El control se realizó con 100 µl de metanol. El ensayo se realizó con 3 repeticiones y se evaluó la mortalidad en un tiempo de exposición de 1, 3, 6, 9, 12, 48, 72 horas (Salgado et al., 2012).

El porcentaje de mortalidad se determinó mediante la siguiente fórmula propuesta por Jaramillo, Duarte, y Delgado (2012):

$$\text{Mortalidad} = \frac{\% \text{Mortalidad Tratadas} - \% \text{Mortalidad Control}}{100 - \% \text{Mortalidad Control}} \times 100$$

En la Figura 7 se presenta un esquema del ensayo de efecto tóxico por contacto con el insecto.



Figura 7. Esquema de ensayo de efecto tóxico por contacto con alimento

Fuente: La autora

4.5.2 EFECTO TÓXICO POR CONTACTO CON EL INSECTO

La toxicidad de los aceites esenciales por contacto directo con el insecto se evaluó siguiendo los protocolos descritos por Benelli y Canale (2012). Así, 0,5 μ l de solución de aceite esencial en metanol en concentraciones de 0.25, 0.50, 1.0, 2.0 y 4.0 μ l/ml se aplicó en el tórax de cada insecto. El control se realizó colocando únicamente 0,5 μ l de metanol. Se llevaron a cabo 3 repeticiones y los resultados se determinaron de la misma forma que en el ensayo anterior. El proceso se observa en la Figura 8.



Figura 8. Esquema de ensayo de efecto tóxico por contacto con el insecto.

Fuente: La autora

4.5.3 ACTIVIDAD FUMIGANTE

Para los ensayos de actividad fumigante volátil, 10 insectos se colocaron en frascos de vidrio con tapa rosca. Un soporte de algodón con 100 μ l de las diferentes dosis de aceite esencial se colocó al interior del frasco y se protegió con un pedazo de gasa para evitar el contacto directo con los insectos (Ringuelet et al., 2014). El control se realizó con 100 μ l de metanol. Se evaluó los resultados como en los ensayos anteriores. Este proceso se observa en la figura 9.

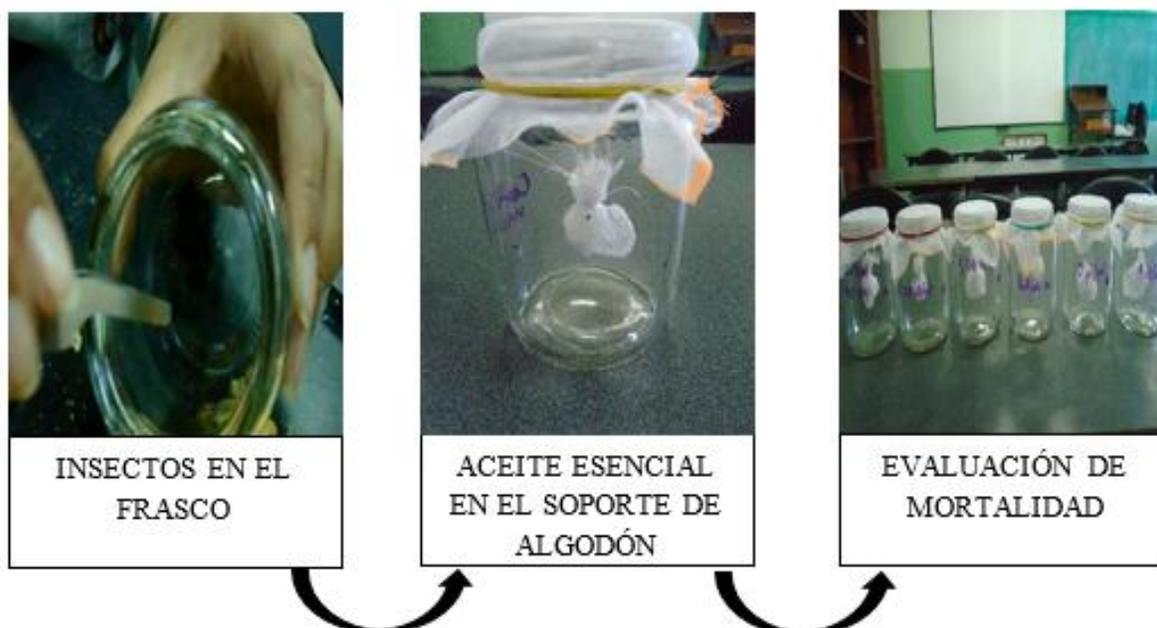


Figura 9. Esquema de ensayo de actividad fumigante.

Fuente: La autora

4.5.4 ACTIVIDAD REPELENTE

La capacidad repelente de los aceites esenciales se evaluó mediante el índice de repelencia, utilizando el método de preferencia de área (Figura 10) escrito por Olivero et al. (2009). Se colocó en cajas Petri de 9cm de diámetro papel filtro cortado por la mitad, aplicando sobre una de las secciones 0,5ml de la solución de aceite esencial diluido en metanol y sobre la otra mitad, el mismo volumen solo del solvente. Posteriormente se colocaron 10 insectos en la parte central de la caja. Se realizó 3 repeticiones y se evaluó la preferencia de área después de 2 y 4 horas. El índice de repelencia se determinó mediante la fórmula utilizada por Castillo, Jiménez, y Delgado (2012):

$$\text{Índice repelencia} = \frac{2(\% \text{insectos en área tratada})}{\% \text{Insectos en área tratada} + \% \text{Insectos en área control}}$$

Se consideró un índice de repelencia neutro si es igual a uno, atrayente si es mayor a uno y repelente si es menor a uno.



Figura 10. Esquema de ensayo de actividad repelente.

Fuente: La autora

4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

4.6.1 EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

Se obtuvo un promedio del rendimiento del aceite esencial de cada planta y se calculó la desviación estándar.

4.6.2 ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Al tratarse de un experimento con condiciones controladas, se aplicó un Diseño Completamente al Azar (D.C.A), con tres repeticiones y seis tratamientos. Estos fueron las 5 diluciones del aceite más un control. La variable respuesta es el diámetro del halo de inhibición.

Se aplicó este diseño por cada aceite esencial.

Los datos se evaluaron estadísticamente mediante el programa IBM SPSS Statistics 23.0. Se realizó un ANOVA y en los casos en los que se detectó diferencias significativas entre los tratamientos se utilizó la prueba de Tukey para analizar la diferencia entre medias. Se realizó un ajuste por Bonferroni para realizar las comparaciones. Se consideraron significativamente diferentes; aquellos tratamientos con una $P < 0.05$.

4.6.3 DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN LA MÍNIMA INHIBITORIA Y LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA LETAL

Concentración mínima inhibitoria: Para este análisis la variable respuesta es la absorbancia después de la incubación. Se consideró el mismo diseño experimental anterior en el programa IBM SPSS Statistics 23.0.

Concentración mínima letal: Se realizaron 3 repeticiones del ensayo, se consideró una concentración letal si no se observa crecimiento en las cajas Petri, y concentración no letal cuando hay crecimiento.

4.6.4 ANALISIS DE ACTIVIDAD INSECTICIDA

Se aplicó un Diseño Completamente al Azar (D.C.A), con tres repeticiones y seis tratamientos, los cuales fueron las 5 diluciones del aceite más un control. La variable respuesta fue el número de insectos muertos.

Los datos se evaluaron estadísticamente mediante el programa INFOSTAT versión 2015 (Grupo Infostat FCA, AR). Se realizó un ANOVA y una vez detectada la diferencia significativa entre

tratamientos se utilizó la prueba de Fisher para analizar la diferencia entre medias. Se consideraron significativamente diferentes aquellos tratamientos con una $P \leq 0.05$.

Este diseño se aplicó por cada aceite esencial y para los métodos de aplicación: contacto con alimento, contacto directo y actividad fumigante.

El ensayo de actividad repelente se analizó de diferente forma, se realizó con tres repeticiones y seis tratamientos, los cuales fueron cinco diluciones del aceite y un control. La variable respuesta fue el número de insectos presentes en cada área. Posteriormente se aplicó la fórmula del índice de repelencia para determinar si el aceite es repelente, neutro o atrayente.

$$\text{Índice repelencia} = \frac{2(\% \text{insectos en área tratada})}{\% \text{Insectos en área tratada} + \% \text{Insectos en área control}}$$

(Castillo et al., 2012)

El índice de repelencia se consideró neutro si es igual a uno, atrayente si es mayor a uno y repelente si es menor a uno.

CAPÍTULO V

RESULTADOS

5.1 EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

Clinopodium nubigenum. De la extracción por hidrodestilación simple se obtuvo un aceite de color amarillo verdoso con una densidad de 0,924 g/ml y un olor fragante, concentrado, fresco, similar a menta. El porcentaje promedio de rendimiento fue 1.66% en una hora de extracción (ver tabla 1).

Tabla 1. Rendimiento de aceite esencial de *Clinopodium nubigenum*

REPETICIÓN	MUESTRA SECA (g)	ACEITE (ml)	RENDIMIENTO (%)
1	62,9	1,0	1,59
2	66,0	0,9	1,36
3	45,4	0,8	1,76
4	52,0	0,9	1,73
5	51,0	1,0	1,86
Promedio	55,5	0,9	1,66
Desviación estándar	8,7	0,1	0,2

Fuente: La autora

Ambrosia arborescens. Se extrajo un aceite de color amarillo, olor rancio y penetrante y con una densidad de 0,956g/ml. Este aceite esencial presentó un rendimiento de 0.37% en una hora de extracción (Tabla 2).

Tabla 2. Rendimiento de aceite esencial de *Ambrosia arborescens*

REPETICIÓN	MUESTRA SECA (g)	ACEITE (ml)	RENDIMIENTO (%)
1	50,6	0,2	0,40
2	52,8	0,2	0,38
3	77,4	0,3	0,32
4	50,1	0,2	0,40
5	53,9	0,2	0,37
Promedio	57,0	0,2	0,37
Desviación estándar	11,5	0,0	0,03

Fuente: La autora

5.2 ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

En el ensayo de difusión en Agar se obtuvieron los siguientes resultados:

Clinopodium nubigenum:

Las zonas de inhibición que se observaron en el ensayo de difusión en agar con el aceite esencial de *C. nubigenum* en diferentes concentraciones tuvieron un diámetro entre 12,7 mm y 45 mm con las cepas utilizadas. En la tabla 3 se presenta en detalle, el diámetro en milímetros de las zonas de inhibición que mostraron los microorganismos con las diferentes diluciones del aceite esencial de *C. nubigenum*.

Tabla 3. Diámetro (mm) del halo de inhibición en el crecimiento de microorganismos tratados con aceite esencial de *C. nubigenum*

DILUCIÓN DE ACEITE	1:0	1:1	1:3	1:7	1:15	METANOL
MICROORGANISMO						
<i>E. coli</i>	13,0 ± 2,6 aA	14,7 ± 1,2 aA	12,7 ± 1,5 aA	15,0 ± 1,0 aA	13,0 ± 1,0 aA	0 bA
<i>S. Abaetetuba</i>	17,4 ± 6,8 aA	18,0 ± 3,6 aA	18,0 ± 0,0 aA	18,0 ± 1,0 aA	19,7 ± 0,6 aA	0 bA
<i>P. aeruginosa</i>	43,3 ± 2,9 Ab	40,0 ± 0,0 aB	19,3 ± 1,2 bA	18,0 ± 2,0 bA	15,0 ± 0,0 bA	0 cA
<i>S. aureus</i>	36,0 ± 8,5 Ac	18,7 ± 2,3 bA	15,3 ± 0,6 bA	14,3 ± 1,2 bA	13,7 ± 0,6 bA	0 cA
<i>B. subtilis</i>	33,0 ± 3,5 Ac	13,7 ± 1,5 bA	18,0 ± 2,6 bA	15,7 ± 1,2 bA	14,7 ± 2,3 bA	0 cA
<i>C. albicans</i>	45,0 ± 0,0 aB	33,3 ± 16,1 bB	17,0 ± 1,0 cA	15,0 ± 2,6 cA	15,3 ± 0,6 cA	0 dA

Fuente: La autora

* Se presenta el promedio del diámetro del halo de inhibición y el error estándar. Las letras minúsculas representan diferencias significativas entre las diluciones del aceite esencial por cepa. Las letras mayúsculas representan diferencias significativas entre las cepas por dilución de aceite esencial. Se consideró $p < 0.05$

De acuerdo con el análisis estadístico realizado se determina que en el ensayo de actividad antimicrobiana por difusión en agar, el aceite puro de *C. nubigenum* mostró el mayor halo de inhibición de 45,0mm frente a *C. albicans*. Sin embargo, la dilución 1:1 también tuvo diferencia significativa con las demás diluciones, presentando un halo de inhibición de 33,3 mm (Figura 11).

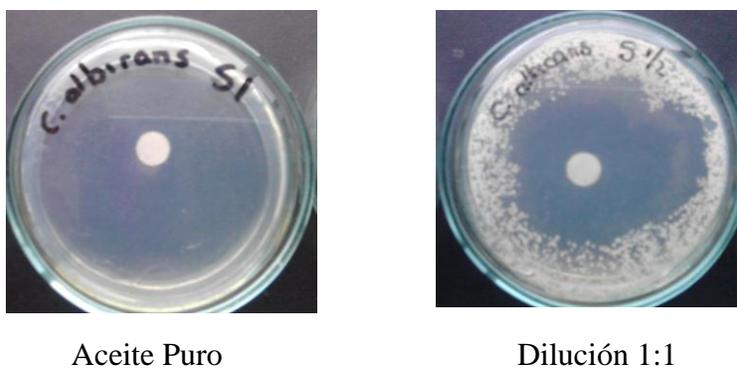


Figura 11. Mayores halos de inhibición de *C. albicans* con aceite esencial de *C. nubigenum*

Fuente: La autora

P. aeruginosa resultó sensible al aceite esencial, presentando los halos de inhibición más grandes (43,3mm y 40,0mm) con aceite puro y dilución 1:1 (Figura 12).

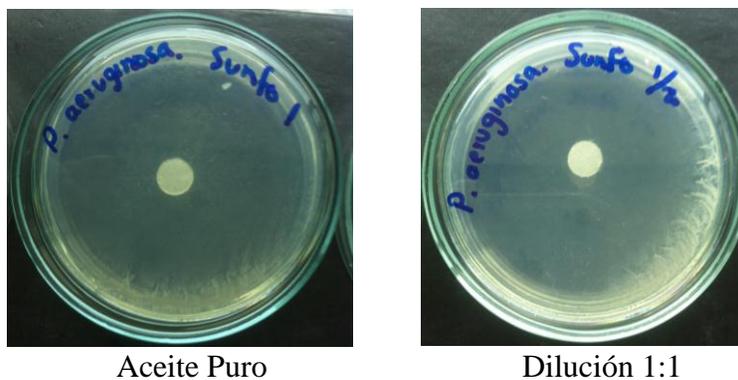


Figura 12. Mayores halos de inhibición de *P. aeruginosa* con aceite esencial de *C. nubigenum*

Fuente: La autora

B. subtilis y *S. aureus* presentaron sensibilidad al aceite puro, mostrando halos de inhibición de 12,3 mm y 15,3 mm respectivamente (Figura 13).

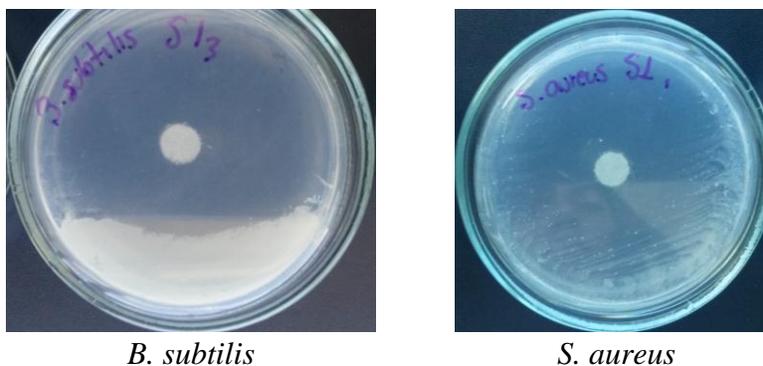


Figura 13. Mayores halos de inhibición de *B. subtilis* y *S. aureus* con aceite esencial de *C. nubigenum*

Fuente: La autora

E. coli y *S. Abaetetuba* tuvieron los menores halos de inhibición, entre 12,7mm y 19,7mm sin diferencias significativas entre las diluciones del aceite (Figura 14).

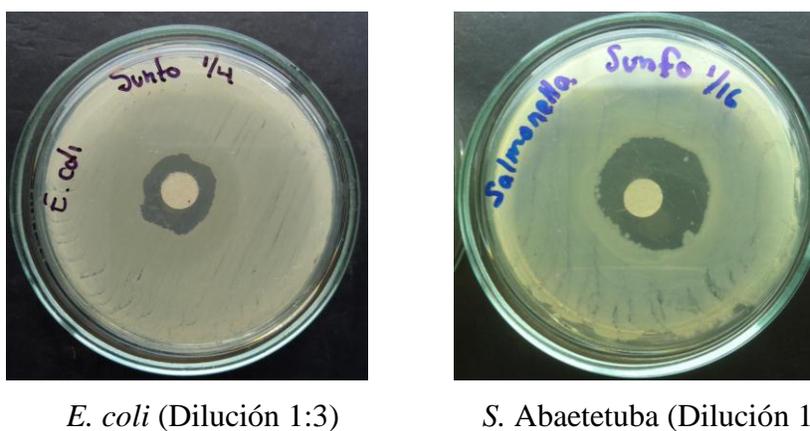


Figura 14. Mayores halos de inhibición de *E. coli* y *S. Abaetetuba* con aceite esencial de *C. nubigenum*

Fuente: La autora

Los resultados anteriores (Tabla 3) están representados gráficamente en la figura 15, donde se observa un gráfico de barras que muestra el diámetro de los halos de inhibición de todas las

cepas en tratamiento con el aceite esencial de *C. nubigenum* en diferentes concentraciones. Se aprecia que los mayores halos de inhibición corresponden a *C. albicans* y *P. aeruginosa*.

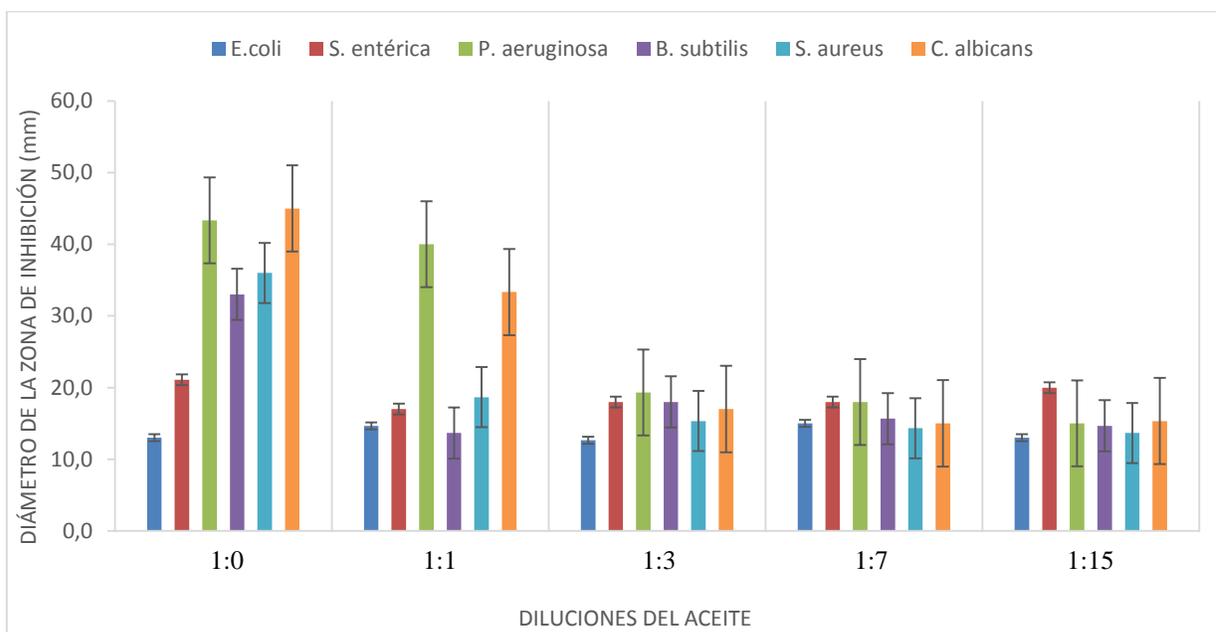


Figura 15. Diámetro de los halos de inhibición con el aceite esencial de *C. nubigenum*.

Fuente: La autora

***Ambrosia arborescens*:**

Los microorganismos en estudio presentaron las siguientes zonas de inhibición con las diferentes diluciones del aceite esencial de *A. arborescens* (Tabla 4). Los halos de inhibición tuvieron diámetros entre 7,0 mm y 27,3 mm en las distintas cepas utilizadas.

Tabla 4. Diámetro (mm) de las zonas de inhibición en el crecimiento de microorganismos tratados con aceite esencial de *A. arborescens*

DILUCIÓN	1:0	1:1	1:3	1:7	1:15	METANOL
MICROORGNISMO						
<i>E. coli</i>	0,0 ± 0,0 aA	7,3 ± 0,6 bA	12,7 ± 2,5 cAB	11,3 ± 1,5 bcAB	10,7 ± 3,2 bcA	0 aA
<i>S. Abaetetuba</i>	0,0 ± 0,0 aA	7,0 ± 1,0 bA	12,0 ± 1,7 bA	9,7 ± 1,2 bA	10,3 ± 2,5 bA	0 aA
<i>P. aeruginosa</i>	27,3 ± 2,5 aC	17,3 ± 0,6 bB	19,0 ± 1,7 bB	15,7 ± 2,1 bAB	15,0 ± 0,0 bAB	0 cA
<i>S. aureus</i>	15,3 ± 1,2 aB	14,7 ± 2,9 aB	14,7 ± 0,6 aAb	15 ± 0,0 aAB	16,7 ± 0,6 aAB	0 bA
<i>B. subtilis</i>	12,3 ± 0,6 aB	13,7 ± 0,6 aAB	15,0 ± 0,0 aAB	17,7 ± 0,6 aB	18,7 ± 5,7 aB	0 bA
<i>C. albicans</i>	19,0 ± 0,0 acB	11,3 ± 1,2 bAB	13,3 ± 2,1 bcAB	16,7 ± 0,6 bcB	15,7 ± 4,9 bcAB	0 dA

Fuente: La autora

* Se presenta el promedio del diámetro del halo de inhibición y el error estándar. Las letras minúsculas representan diferencias significativas entre las diluciones del aceite esencial por cepa. Las letras mayúsculas representan diferencias significativas entre las cepas por dilución de aceite esencial. Se consideró $p < 0.05$

Con base en el análisis estadístico se define que el aceite esencial puro de *Ambrosia arborescens* mostró la mayor actividad antimicrobiana frente a *P. aeruginosa* presentando un halo de inhibición de 27,3mm, las demás diluciones del aceite no tuvieron diferencias significativas entre sí y presentaron halos de inhibición de hasta 19,0mm como se observa en la figura 16.

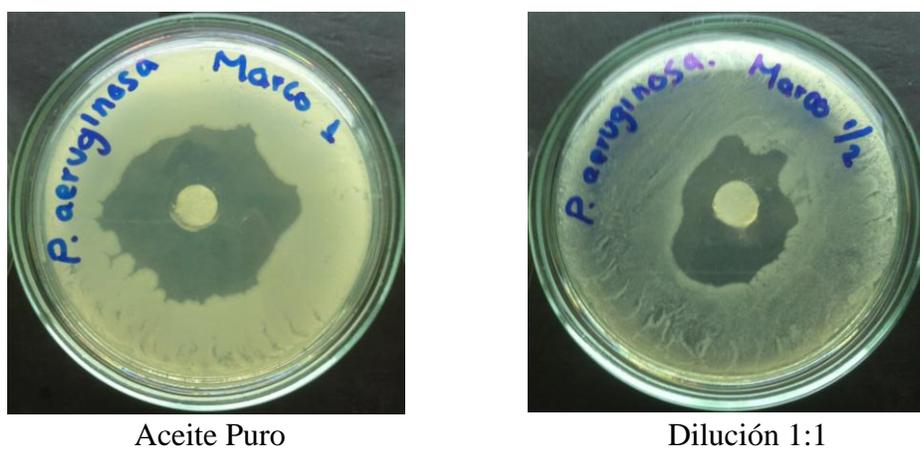


Figura 16. Mayores halos de inhibición de *P. aeruginosa* con aceite esencial de *A. arborescens*

Fuente: La autora

Otras de las cepas sensibles fueron *B. subtilis*, *S. aureus*, en las cuales se observaron halos de inhibición de entre 12,3mm y 18,7mm con las diferentes diluciones del aceite esencial, sin diferencias significativas entre sí (figura 17). *C. albicans* presentó un halo de 19,0mm en presencia del aceite puro y halos de entre 11,3mm y 16,7mm con las demás diluciones, sin diferencias significativas entre ellas (figura 18).

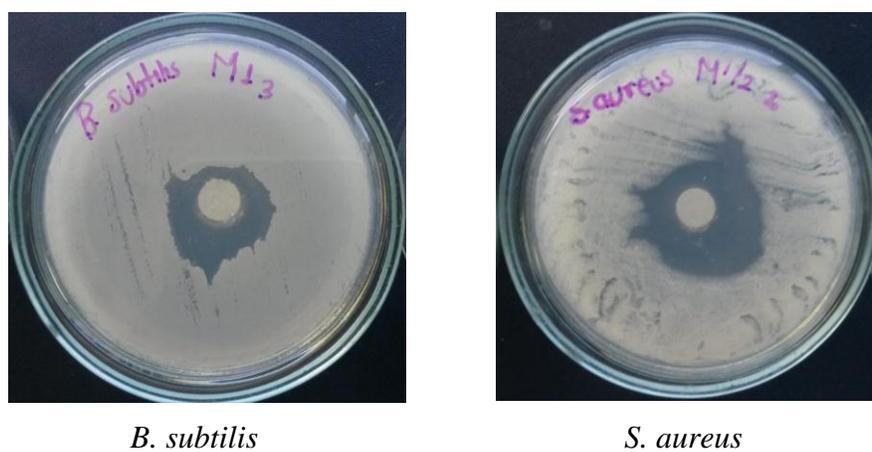


Figura 17. Mayores halos de inhibición de *B. subtilis* y *S. aureus* con aceite esencial de *A. arborescens*.

Fuente: La autora

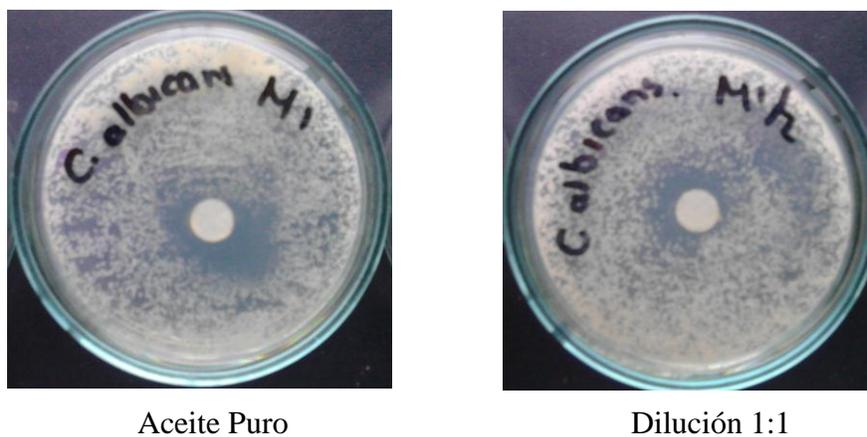


Figura 18. Mayores halos de inhibición de *C. albicans* con aceite esencial de *A. arborescens*

Fuente: La autora

E. coli y *S. Abaetetuba* presentaron halos de inhibición de hasta de 12,7mm con la dilución de 1:3 del aceite esencial, mas no se registró inhibición con aceite puro (Figura 19).

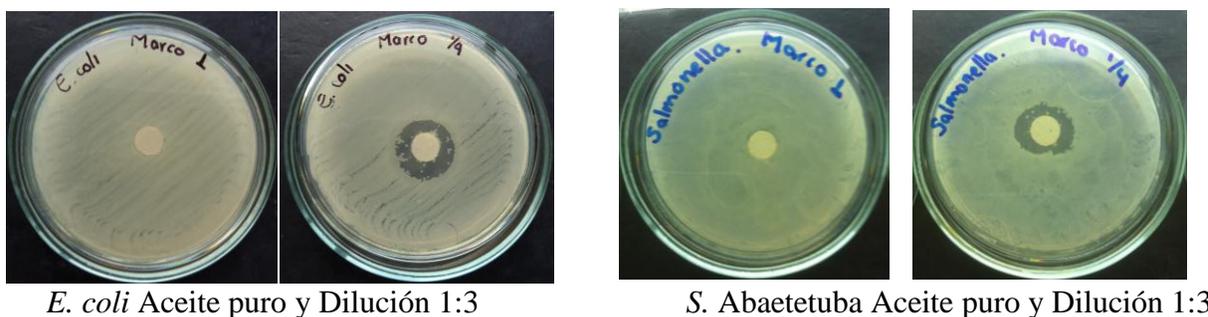


Figura 19. Mayores halos de inhibición de *E. coli* y *S. Abaetetuba* con aceite esencial de *A. arborescens*.

Fuente: La autora

Los resultados de la tabla 4 se presentan en un gráfico de barras (figura 20) donde se muestra el diámetro de los halos de inhibición de todas las cepas tratadas con el aceite esencial de *A. arborescens* en las diferentes concentraciones. Se observa que el halo de mayor diámetro lo presentó *P. aeruginosa* al contacto con aceite puro.

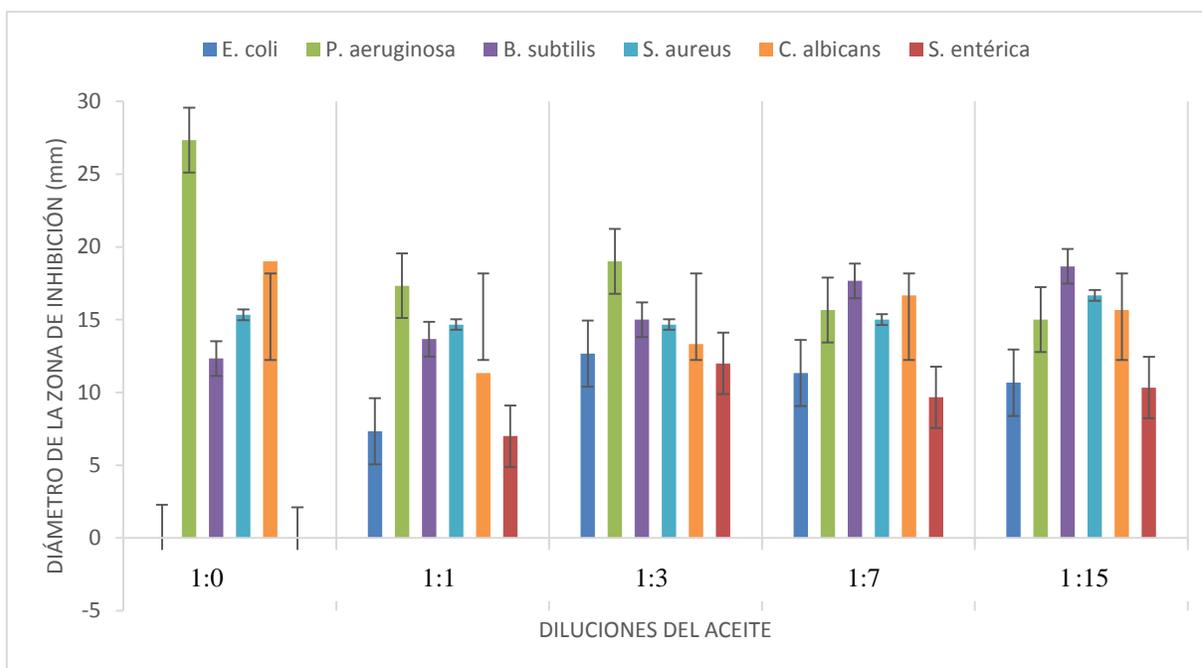


Figura 20. Diámetro de los halos de inhibición con el aceite esencial de *A.arborescens*.

Fuente: La autora

5.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA LETAL

5.3.1 DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA

En este ensayo se registraron los siguientes resultados:

C. nubigenum

El aceite esencial de *C. nubigenum* inhibió el crecimiento de todas las cepas microbianas en al menos una dilución. En la tabla 5 se presenta el aumento del crecimiento microbiano en Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/ml) después de la incubación en presencia de las diferentes diluciones del aceite esencial de *C. nubigenum*.

Tabla 5. Aumento del crecimiento microbiano (UFC/ml) después de la incubación con aceite esencial de *C. nubigenum*

DILUCIÓN	1:0	1:1	1:3	1:7	1:15	METANOL
MICROORGANISMO						
<i>E. coli</i>	0,00 aA	0,00 aA	0,00 aA	0,00 aA	4,97 X 10 ⁵ bA	8,29 X 10 ⁶ cA
<i>S. Abaetetuba</i>	0,00 aA	0,00 aA	7,25 X 10 ⁶ bB	1,61 X 10 ⁷ cB	6,07 X 10 ⁶ bB	1,72 X 10 ⁷ cB
<i>P. aeruginosa</i>	0,00 aA	9,13 X 10 ⁵ aA	2,61 X 10 ⁶ bC	0,00 aA	6,52 X 10 ⁵ cAC	3,14 X 10 ⁶ cC
<i>S. aureus</i>	0,00 aA	0,00 aA	0,00 aA	1,23 X 10 ⁷ abAC	1,65 X 10 ⁷ bA	2,44 X 10 ⁷ cD
<i>B. subtilis</i>	0,00 aA	0,00 aA	3,01 X 10 ⁷ cbB	5,72 X 10 ⁶ cdC	4 X 10 ⁶ adAC	3,76 X 10 ⁷ bD
<i>C. albicans</i>	0,00 aA	0,00 aA	0,00 aA	0,00 aA	0,00 aC	1,46 X 10 ⁶ bE

Fuente: La autora

* Las letras minúsculas representan diferencias significativas entre las diluciones del aceite esencial por cepa. Las letras mayúsculas representan diferencias significativas entre las cepas por dilución de aceite esencial.

De acuerdo al análisis estadístico se determina que el aceite de *C. nubigenum* presentó la mayor inhibición frente a *C. albicans*, puesto que no se observó aumento de población microbiana en ninguna de las diluciones del aceite (Figura 21). Por lo tanto, se define que la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de *C. nubigenum* frente a *C. albicans* es 1:15, ya que no hay diferencia significativa entre las diluciones.

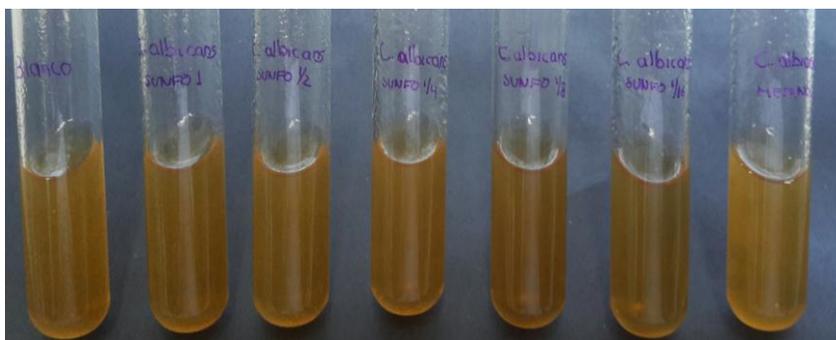
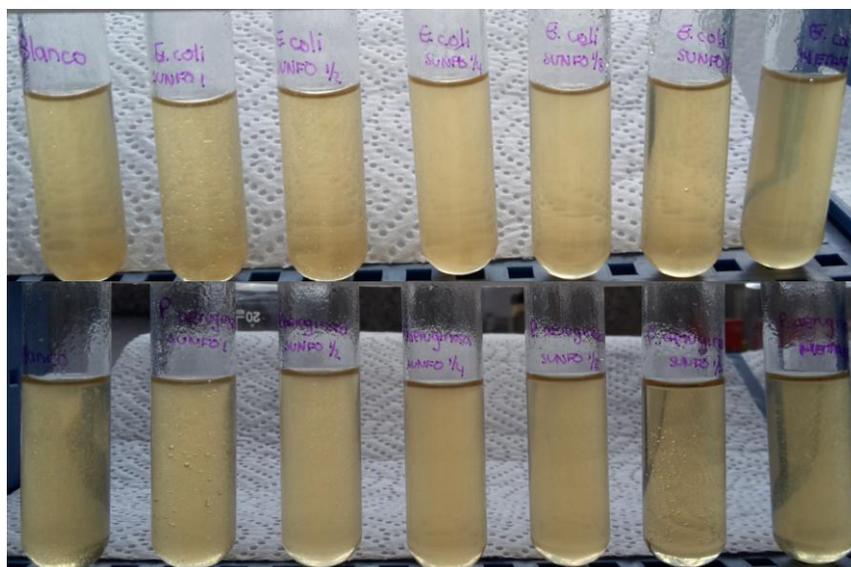


Figura 21. Inhibición del crecimiento de *C. albicans* con aceite esencial de *C. nubigenum*.

Fuente: La autora

En *E. coli* y *P. aeruginosa* no se observó aumento en el crecimiento al estar en contacto con la dilución 1:7 de este aceite esencial (Figura 22), por lo que se determina que la dilución antes mencionada es la CMI frente a estas especies.

E. coli



P. aeruginosa

Figura 22. Inhibición del crecimiento de *E. coli* y *P. aeruginosa* con aceite esencial de *C. nubigenum*.

Fuente: La autora

Frente a *S. aureus* la CMI fue 1:3 ya que en presencia de esta dilución se inhibe totalmente el crecimiento microbiano (Figura 23) y no se presentan diferencias significativas con las concentraciones más altas.

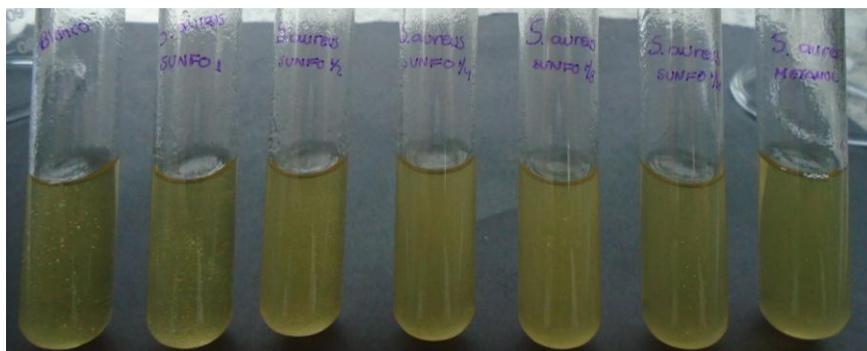


Figura 23. Inhibición del crecimiento de *S. aureus* con aceite esencial de *C. nubigenum*.

Fuente: La autora

Para *S. Abaetetuba* y *B. subtilis* la CMI observada fue 1:1, ya que no tiene diferencia significativa con el aceite puro y no permite el crecimiento microbiano (Figura 24).

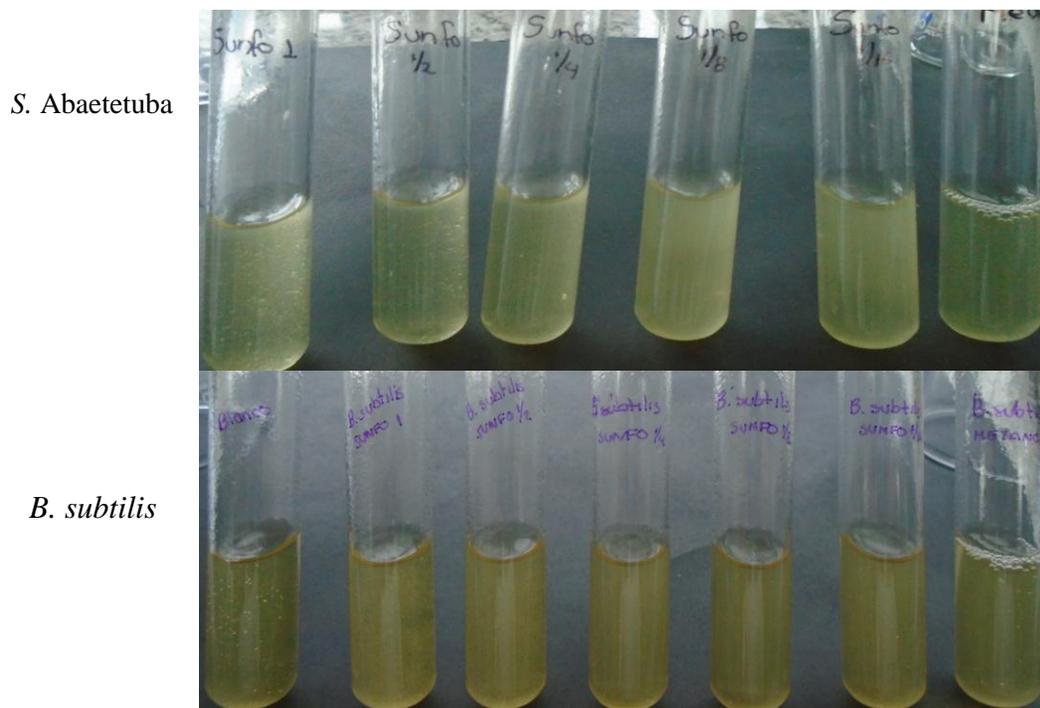


Figura 24. Inhibición del crecimiento de *S. Abaetetuba* y *B. subtilis* con aceite esencial de *C. nubigenum*.

Fuente: La autora

El resumen de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias de este aceite esencial frente a cada cepa se observa en la Tabla 7.

A. arborescens

El aceite esencial de *C. nubigenum* presentó capacidad inhibitoria en al menos una concentración para todas las cepas estudiadas. La tabla 6 muestra el aumento del crecimiento microbiano en Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/ml) después de la incubación en presencia de las diluciones del aceite esencial de *A. arborescens*.

Tabla 6. Aumento del crecimiento microbiano (UFC/ml) después de la incubación con aceite esencial de *A. arborescens*

DILUCIÓN	1:0	1:1	1:3	1:7	1:15	METANOL
MICROORGANISMO						
<i>E. coli</i>	1,5E+07 aA	2,1E+06 bA	3,6E+04 cA	00E+00 cA	4,2E+06 bA	8,3E+06 dA
<i>S. Abaetetuba</i>	5,1E+04 abB	00E+00 aB	0,0E+00 aA	00E+00 aA	2,8E+05 bC	1,7E+07 bC
<i>P. aeruginosa</i>	0,0E+00 aB	0,0E+00 aB	0,0E+00 aA	0,0E+00 aA	0,0E+00 aC	3,1E+06 bC
<i>S. aureus</i>	0,00E+00 aB	0,00E+00 aB	0,00E+00 aA	0,00E+00 aA	1,35E+07 bB	2,44E+07 cD
<i>B. subtilis</i>	0,00E+00 aB	5,72E+06 bcA	6,41E+06 cB	4E+06 abA	4E+06 cA	3,76E+07 dD
<i>C. albicans</i>	0,00E+00 aB	0,00E+00 aB	0,00E+00 aA	0,00E+00 aA	1,56E+05 aBC	1,46E+06 bE

Fuente: La autora

*Las letras minúsculas representan diferencias significativas entre las diluciones del aceite esencial por cepa. Las letras mayúsculas representan diferencias significativas entre las cepas por dilución de aceite esencial.

De acuerdo con el análisis estadístico se determina que el aceite esencial de *A. arborescens* presentó la mayor capacidad inhibitoria contra *P. aeruginosa*, ya que con todas las diluciones se inhibe el crecimiento microbiano (Figura 25) y no se hallan diferencias significativas entre ellas. Por esta razón la CMI frente a esta cepa es 1:15.

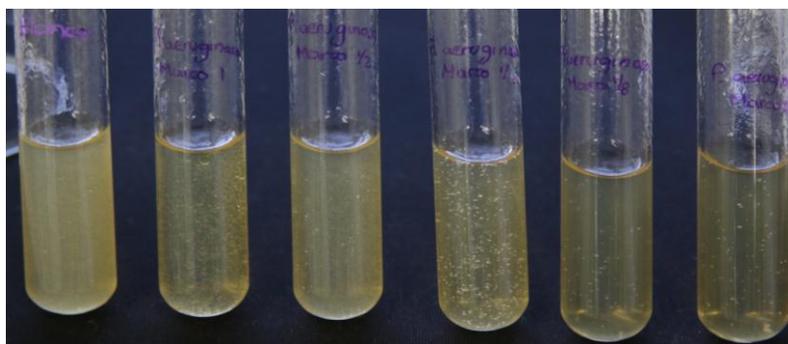
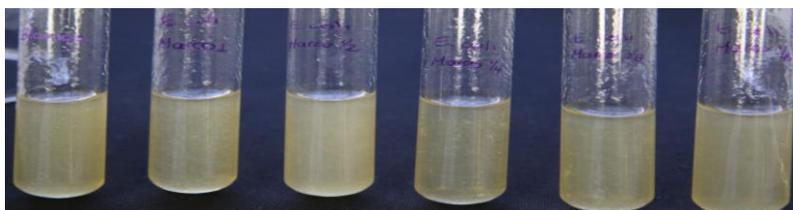


Figura 25. Inhibición del crecimiento de *P. aeruginosa* con el aceite esencial de *A. arborescens*.

Fuente: La autora

La dilución 1:7 de este aceite esencial inhibió el crecimiento de *E. coli*, *S. Abaetetuba*, *S. aureus* y *C. albicans*, sin diferencias significativas entre cepas ni con las diluciones menores (Figura 26). Por lo tanto, 1:7 es la CMI para estas cepas

E. coli



S. Abaetetuba



S. aureus



C. albicans



Figura 26. Inhibición del crecimiento de *E. coli*, *S. Abaetetuba*, *S. aureus* y *C. albicans* con aceite esencial de *C. nubigenum*

Fuente: La autora

B. subtilis fue el más resistente, ya que solo presentó inhibición con el aceite puro, como se observa en la figura 27.

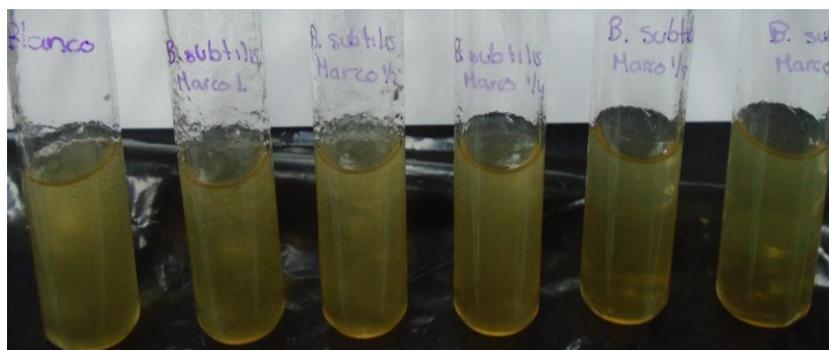


Figura 27. Inhibición de *B. subtilis* con aceite esencial de *C. nubigenum*.

Fuente: La autora

En la Tabla 7 se observa un resumen de las concentraciones Mínimas Inhibitorias de este aceite esencial.

5.3.2 DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA LETAL

El aceite esencial de *C. nubigenum* fue letal para *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*, mientras que el de *A. arborescens* fue letal únicamente para *S. aureus*. En la tabla 7 se indican las concentraciones mínimas inhibitorias y letales de los dos aceites esenciales estudiados.

Tabla 7. Concentraciones mínimas inhibitorias y letales de los aceites esenciales

MICROORGANISMO	<i>E. coli</i>		<i>S. Abaetetuba</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>S. aureus</i>		<i>C. albicans</i>	
	CMI	CML	CMI	CML	CMI	CML	CMI	CML	CMI	CML	CMI	CML
<i>A. arborescens</i>	1:7	-	1:7	-	1:15	-	1:0	-	1:7	1:0	1:7	-
<i>C. nubigenum</i>	1:7	1:3	1:1	-	1:7	-	1:1	-	1:3	1:1	1:15	1:15

Fuente: La autora

5.4 ANÁLISIS DE ACTIVIDAD INSECTICIDA

5.4.1 EFECTO TÓXICO POR CONTACTO CON ALIMENTO

En este método de aplicación el tiempo no fue un factor influyente en la mortalidad, ya que no se observó aumento en el número de insectos muertos respecto al primer día de evaluación. Para el análisis de resultados se realizó el cálculo del porcentaje de mortalidad utilizando la fórmula descrita en el capítulo III, en la cual se toma en cuenta el número de insectos muertos tratados en el aceite esencial y el número de insectos muertos en el control.

Clinopodium nubigenum

La mortalidad de insectos en las diferentes concentraciones del aceite esencial estuvo entre 5% y 18,3%. En la tabla 8 se presenta el promedio del número de insectos (*P. frontalis*) muertos en presencia de las diferentes diluciones del aceite esencial de *C. nubigenum* en el alimento.

Tabla 8. Mortalidad (número de insectos muertos) de *P. frontalis* por contacto de *C. nubigenum* con el alimento

0,25 μ l/ml	0,50 μ l/ml	1 μ l/ml	2 μ l/ml	4 μ l/ml	METANOL
1,42 \pm 0,18	1,83 \pm 0,18	0,75 \pm 0,18	0,75 \pm 0,18	0,50 \pm 0,18	0,0 \pm 0,00
A	A	B	B	B	C

Fuente: La autora

Las letras representan diferencias significativas entre las diluciones del aceite esencial.

En el análisis de actividad insecticida por contacto con el alimento la mayor mortalidad de insectos se registró con la concentración 0,50 μ l/ml del aceite esencial de *C. nubigenum*, la cual no tuvo diferencia significativa con la concentración 0,25 μ l/ml, presentando porcentajes de mortalidad de 18,3% y 14,2 % respectivamente. Las demás concentraciones no tuvieron diferencias significativas entre sí y los porcentajes de mortalidad fueron menores al 10%. Sin embargo, todas fueron diferentes del control.

Ambrosia arborescens

La mortalidad de los insectos en las diferentes concentraciones del aceite esencial fue entre 3% y 12,5%. En la tabla 9 se presenta el promedio de insectos (*P. frontalis*) muertos en presencia de las diferentes diluciones del aceite esencial de *A. arborescens* en el alimento.

Tabla 9. Mortalidad de *P. frontalis* por contacto de *A. arborescens* con el alimento

0,25 µl/ml	0,50 µl/ml	1 µl/ml	2 µl/ml	4 µl/ml	METANOL
0,33 ± 0,18	0,50 ± 0,18	0,83 ± 0,18	0,42 ± 0,18	1,25 ± 0,18	0,0 ± 0,00
CD	BC	AB	BC	A	D

Fuente: La autora

Las letras representan diferencias significativas entre las diluciones del aceite esencial.

El aceite esencial de *A. arborescens* en contacto con el alimento indujo la mayor mortalidad a concentraciones de 1 µl/ml y 4 µl/ml con un porcentaje de 8,3 % y 12,5% respectivamente. Las concentraciones (0,25, 0,50 y 2) µl/ml no tuvieron diferencias significativas entre si y presentaron mortalidades entre 3,3%, 4,2% y 8,3%.

Los resultados anteriores se observan en la figura 28 mediante un gráfico de barras que representa la mortalidad de *P. frontalis* por el método de contacto con el alimento en las diferentes concentraciones de los aceites esenciales de *C. nubigenum* y *A. arborescens*.

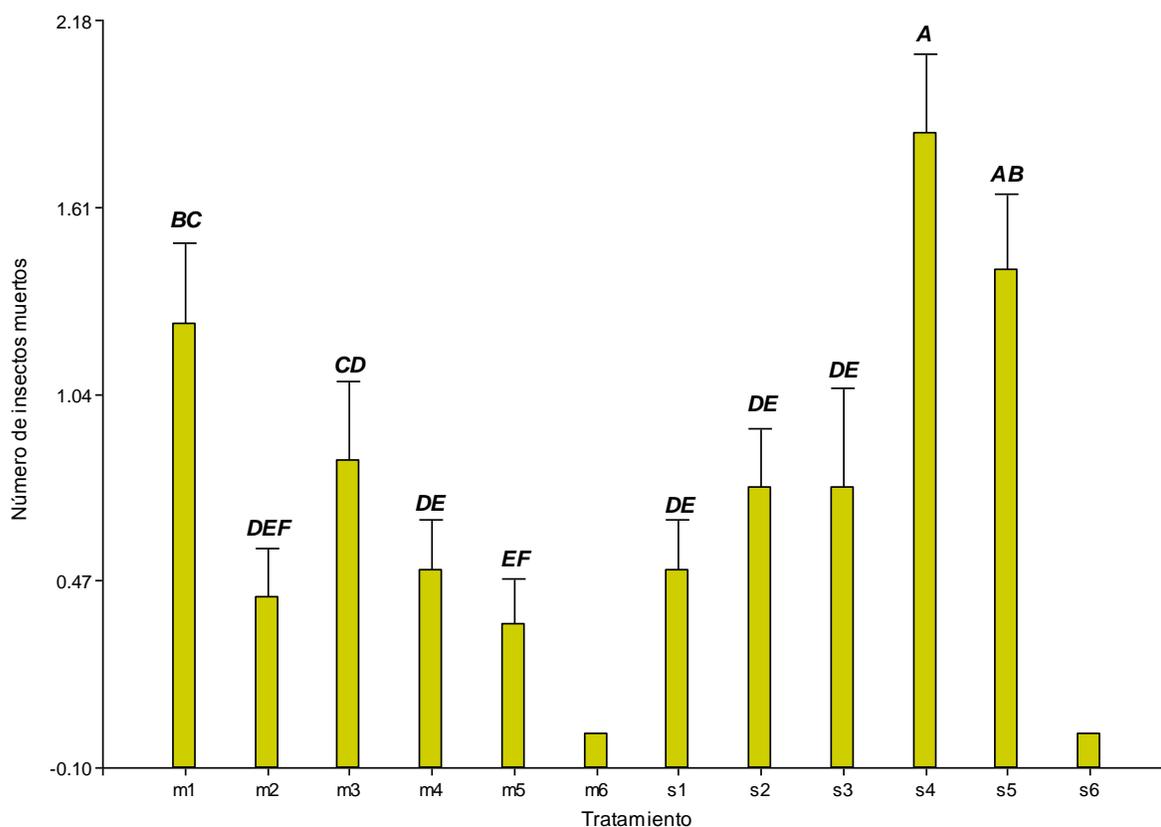


Figura 28. Mortalidad de *P. frontalis* por el método de contacto con el alimento.

Fuente: La autora

Las letras representan diferencias significativas entre los tratamientos, que son las diferentes concentraciones de los aceites esenciales: m= *A. arborescens* y s= *C. nubigenum*; 1= 4 μ l/ml, 2= 2 μ l/ml, 3= 1 μ l/ml, 4= 0,50 μ l/ml, 5= 0,25 μ l/ml, 6 = control (metanol)

5.4.2 EFECTO TÓXICO POR CONTACTO CON INSECTO

En este método de aplicación la mortalidad de *P. frontalis* se incrementó con el paso del tiempo, alcanzando un porcentaje de 74,4% a las 72 horas. Para el análisis de resultados se realizó el cálculo del porcentaje de mortalidad utilizando la fórmula descrita en el capítulo III.

Clinopodium nubigenum

P. frontalis al mantenerse en contacto directo con las diferentes concentraciones del aceite esencial de *C. nubigenum* en los cuatro tiempos evaluados, presentó porcentajes de mortalidad entre 3% a las 12 horas y 74,4% a las 72 horas (Tabla 10).

Tabla 10. Mortalidad de *P. frontalis* por contacto directo con *C. nubigenum*

DILUCIÓN ($\mu\text{l/ml}$)	0,25	0,50	1	2	4	METANOL
TIEMPO (h)						
12	0,33 \pm 0,38 F	0,0 \pm 0,33 F	1,3 \pm 0,33 EF	0,7 \pm 0,33 F	0,33 \pm 0,38 F	0,0 \pm 0,00 F
24	0,33 \pm 0,38 F	0,0 \pm 0,38 F	1,7 \pm 0,38 EF	0,7 \pm 0,38 F	1,0 \pm 0,38 EF	0,0 \pm 0,00 F
48	2,0 \pm 0,72 EF	1,3 \pm 0,72 EF	2,7 \pm 0,72 DE	1,3 \pm 0,73 EF	2,0 \pm 0,72 EF	0,0 \pm 0,00 F
72	6,0 \pm 0,59 B	5,7 \pm 0,59 BC	7,7 \pm 0,59 A	4,3 \pm 0,59 CD	4,0 \pm 0,59 D	1,0 \pm 0,59 EF

Fuente: La autora

Las letras representan diferencias significativas entre las diluciones del aceite esencial en todos los tiempos de evaluación.

El mayor porcentaje de mortalidad (74,4%) se registró a las 72 horas a una concentración de 1 $\mu\text{l/ml}$ del aceite esencial de *C. nubigenum*. La concentración 0,25 $\mu\text{l/ml}$ presentó una mortalidad de 55,5% sin diferencia significativa con 0,50 $\mu\text{l/ml}$ que presentó una mortalidad de 52,2%. Las concentraciones 2 $\mu\text{l/ml}$ y 4 $\mu\text{l/ml}$ no tuvieron diferencias significativas entre ellas a las 72 horas y los porcentajes de mortalidad fueron de 33,3% y 36,7%. Sin embargo, a las 12, 24 y 48 la mortalidad no tuvo diferencias significativas con el control ni entre concentraciones.

Ambrosia arborescens

El aceite esencial de *A. arborescens* en contacto con el insecto indujo porcentajes de mortalidad entre 3% a las 12 horas y 58,8% a las 72 horas. En la tabla 11 se presenta el promedio de *P. frontalis* muertos al estar en contacto directo con las diferentes diluciones del aceite esencial de *A. arborescens* y en los cuatro tiempos evaluados.

Tabla 11. Mortalidad de *P. frontalis* por contacto de *A. arborescens* con el insecto

DILUCIÓN ($\mu\text{l/ml}$)	0,25	0,50	1	2	4	METANOL
TIEMPO (h)						
12	1,0 \pm 0,33 F	0,3 \pm 0,33 F	0,0 \pm 0,33 F	0,7 \pm 0,33 F	1,0 \pm 0,33 EF	0,0 \pm 0,00
24	1,7 \pm 0,38 DEF	0,3 \pm 0,38 F	0,3 \pm 0,38 F	1,0 \pm 0,38 EF	1,3 \pm 0,38 DEF	0,0 \pm 0,00 F
48	3,0 \pm 0,75 CD	2,0 \pm 0,72 DEF	1,7 \pm 0,72 DEF	2,0 \pm 0,72 DEF	2,7 \pm 0,72 DE	0,0 \pm 0,00 F
72	4,7 \pm 0,59 BC	6,3 \pm 0,59 A	5,0 \pm 0,59 AB	5,3 \pm 0,59 AB	6,0 \pm 0,59 AB	1,0 \pm 0,59 EF

Fuente: La autora

Las letras representan diferencias significativas entre las diluciones del aceite esencial en todos los tiempos de evaluación.

El mayor porcentaje de mortalidad (58,8%) se registró a las 72 horas en una concentración de 0,50 $\mu\text{l/ml}$ de aceite esencial de *A. arborescens*. Las demás concentraciones no presentaron diferencias significativas entre ellas a 72 horas de evaluación. A las 48 horas las concentraciones no tuvieron diferencias significativas entre ellas, pero si respecto a los demás tiempos de evaluación, los porcentajes de mortalidad en este tiempo estuvieron entre 17% y 30%. Los demás tiempos de evaluación (12 y 24 horas) no se diferencian significativamente del control.

Los resultados del análisis de actividad insecticida por contacto con el insecto se representan en la figura 29 que muestra un gráfico de barras de la mortalidad de *P. frontalis* por el método de contacto con el insecto en las diferentes concentraciones de los aceites esenciales de *C. nubigenum* y *A. arborescens* y en los cuatro tiempos de evaluación.

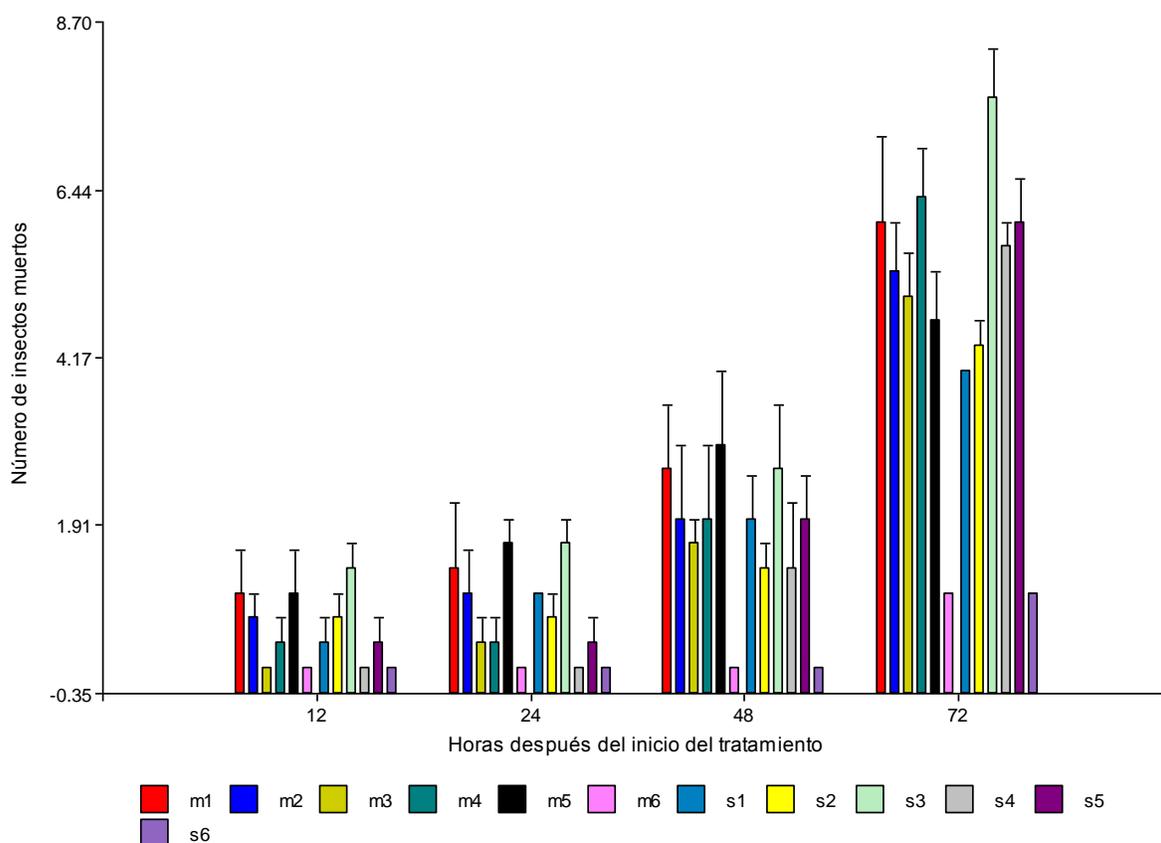


Figura 29. Mortalidad de *P. frontalis* por el método de contacto con el insecto.

Fuente: La autora

Los tratamientos son las diferentes concentraciones de los aceites esenciales: m= *A. arborescens* y s= *C. nubigenum*; 1= 4 μ l/ml, 2= 2 μ l/ml, 3= 1 μ l/ml, 4= 0,50 μ l/ml, 5= 0,25 μ l/ml, 6 = control (metanol)

5.4.3 ACTIVIDAD FUMIGANTE

La mortalidad por actividad fumigante de los aceites esenciales aumentó con el tiempo, alcanzando a las 72 horas mortalidad de 80% con *C. nubigenum*. Para el análisis de resultados se realizó el cálculo del porcentaje de mortalidad utilizando la fórmula descrita en el capítulo III.

Clinopodium nubigenum

La actividad fumigante del aceite esencial de *C. nubigenum* aumentó del 0% a las 12 horas al 80% a las 72 horas. En la tabla 12 se presenta los resultados de mortalidad (promedio del número

de insectos muertos) de *P. frontalis* por actividad fumigante del aceite esencial de *C. nubigenum* en sus diferentes concentraciones y a distintos tiempos.

Tabla 12. Mortalidad de *P. frontalis* por actividad fumigante de *C. nubigenum*.

DILUCIÓN (μl/ml)	0,25	0,50	1	2	4	METANOL
TIEMPO (h)						
12	0,0 ± 0,67 G	0,0 ± 0,72 G	1,7 ± 0,62 EFG	0,3 ± 0,65 G	0,7 ± 0,82 FG	0,3 ± 0,32 G
24	1,0 ± 0,67 FG	0,3 ± 0,72 G	2,3 ± 0,62 DEF	0,3 ± 0,65 G	0,7 ± 0,82 FG	0,3 ± 0,32 G
48	5,0 ± 0,67 B	4,3 ± 0,72 BCD	5,0 ± 0,62 B	4,7 ± 0,65 BC	2,7 ± 0,82 CDEF	0,7 ± 0,32 FG
72	9,0 ± 0,67 A	8,7 ± 0,72 A	8,7 ± 0,62 A	8,7 ± 0,65 A	7,30 ± 0,82 A	5,0 ± 0,32 BCDE

Fuente: La autora

Las letras representan diferencias significativas entre las diluciones del aceite esencial en todos los tiempos de evaluación.

La mayor mortalidad (46% - 80%) se registró a las 72 horas sin diferencias significativas entre las concentraciones. La mortalidad a las 48 horas fue entre 21,5% y 46,2% sin diferencia entre las concentraciones, pero si con los demás tiempos. A las 12 y 24 horas la mortalidad no tuvo diferencia significativa con el control.

Ambrosia arborescens

Los resultados de mortalidad (promedio del número de insectos muertos) de *P. frontalis* por actividad fumigante del aceite esencial de *A. arborescens* en sus diferentes concentraciones y a distintos tiempos se observan en la tabla 13. La mortalidad aumentó de 0% a las 12 horas a 22,2% a las 72 horas.

Tabla 13. Mortalidad de *P. frontalis* por actividad fumigante de *A. arborescens*.

DILUCIÓN ($\mu\text{l/ml}$)	0,25	0,50	1	2	4	METANOL
TIEMPO (h)						
12	0,3 \pm 0,28 B	0,0 \pm 0,52 B	1,3 \pm 1,05 AB	0,0 \pm 0,37 B	0,3 \pm 0,57 B	0,3 \pm 0,22 B
24	0,7 \pm 0,28 B	0,3 \pm 0,52 B	1,7 \pm 1,05 AB	0,0 \pm 0,37 B	0,3 \pm 0,57 B	0,3 \pm 0,22 B
48	0,7 \pm 0,28 AB	1,0 \pm 0,52 AB	2,0 \pm 1,05 AB	0,7 \pm 0,37 B	1,0 \pm 0,57 AB	1,0 \pm 0,22 AB
72	1,0 \pm 0,28 AB	1,3 \pm 0,52 AB	3,0 \pm 1,05 A	1,3 \pm 0,37 AB	2,0 \pm 0,57 AB	1,0 \pm 0,22 AB

Fuente: La autora

Las letras representan diferencias significativas entre las diluciones del aceite esencial en todos los tiempos de evaluación.

La mayor mortalidad fue del 22,2% y se registró a las 72 horas con una concentración de 1 $\mu\text{l/ml}$, las demás concentraciones no presentan diferencias significativas a las 72 y 48 horas y la diferencia con el control no es relevante. La mortalidad a las 12 y 24 horas no tienen diferencias con el control.

El resultado de la actividad fumigante se muestra en la figura 30 con un gráfico de barras que representa la mortalidad de *P. frontalis* por actividad fumigante en las diferentes concentraciones de los aceites esenciales de *C. nubigenum* y *A. arborescens*.

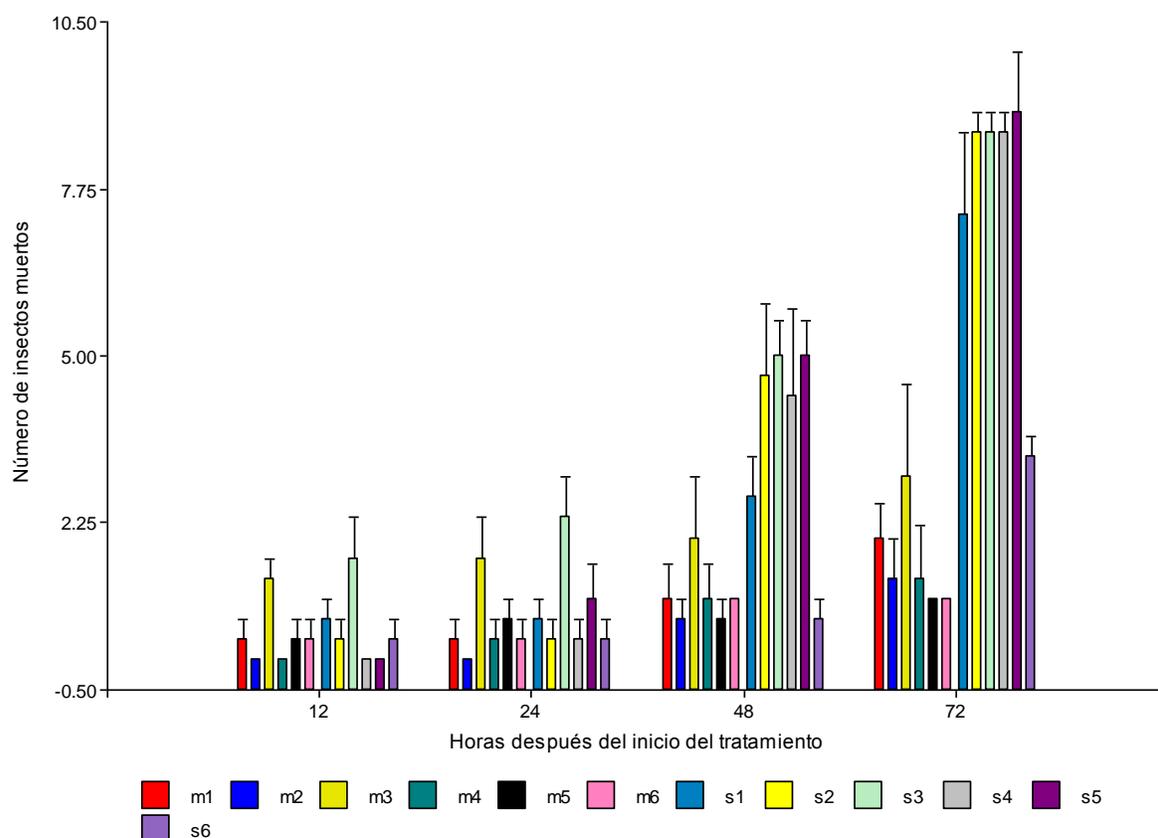


Figura 30. Mortalidad de *P. frontalis* por actividad fumigante.

Fuente: La autora

Los tratamientos son las diferentes concentraciones de los aceites esenciales: m= *A. arborescens* y s= *C. nubigenum*; 1= 4 μ l/ml, 2= 2 μ l/ml, 3= 1 μ l/ml, 4= 0,50 μ l/ml, 5= 0,25 μ l/ml, 6 = control (metanol)

5.4.4 ACTIVIDAD REPELENTE

Clinopodium nubigenum

El aceite esencial de *C. nubigenum* presentó repelencia en todas las concentraciones usadas. En la tabla 14 se presentan en detalle los resultados de la actividad repelente que presentaron las diferentes diluciones del aceite esencial de *C. nubigenum* a 2 y 4 horas después de realizado el ensayo.

Tabla 14. Actividad repelente del aceite esencial de *C. nubigenum* a diferentes concentraciones.

DILUCIÓN ($\mu\text{l/ml}$)	0,25		0,50		1		2		4	
TIEMPO (h)	INDICE									
2	0,5	R	0,7	R	0,5	R	0,3	R	0,4	R
4	0,6	R	0,8	R	0,7	R	0,6	R	0,5	R

Fuente: La autora

Las letras: "R" representa repelente, "N" neutro, y "A" atrayente

Mediante el cálculo del índice de repelencia se demostró que este aceite esencial fue repelente en todas las concentraciones y a los dos tiempos evaluados, ya que el índice fue menor a 1 en todos los casos.

Ambrosia arborescens

El aceite esencial de *A. arborescens* fue repelente en algunas concentraciones y neutro en otras, en la tabla 15 se muestran los resultados de la actividad repelente que presentaron las diferentes diluciones del aceite esencial de *A. arborescens* a 2 y 4 después de realizado el ensayo.

Tabla 15. Actividad repelente del aceite esencial de *A. arborescens* a diferentes concentraciones

DILUCIÓN ($\mu\text{l/ml}$)	0,25		0,50		1		2		4	
TIEMPO (h)	INDICE									
2	0,7	R	0,8	R	0,9	R	1	N	0,8	R
4	0,8	R	0,8	R	1	N	1	N	0,7	R

Fuente: La autora

Las letras: "R" representa repelente, "N" neutro, y "A" atrayente

Al realizar el cálculo del índice de repelencia se demostró que el aceite esencial de *A. arborescens* a las 2 horas de evaluación fue repelente en todas las concentraciones excepto con 2 $\mu\text{l/ml}$ que resultó fue neutro, pues el índice de repelencia fue igual a 1. A las 4 horas de evaluación las concentraciones 1 $\mu\text{l/ml}$ y 2 $\mu\text{l/ml}$ fueron neutras y las demás repelentes.

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN

En el presente estudio se observó un rendimiento del aceite esencial de *Ambrosia arborescens* de 0,37%, siendo mayor al de investigaciones anteriores que reportaron rendimientos de 0,04% y 0,14% para la misma especie (Mendoza, 2016; Ruiz, Díaz, y Rojas, 2015). Sin embargo, el estudio realizado por Guerrero y Pozo (2016) reportó un rendimiento de 3,9% utilizando un equipo de destilación por arrastre de vapor a escala industrial.

El rendimiento del aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* fue de 1,56%, a diferencia de estudios anteriores que presentaron rendimientos de 0,27% y 1% (Gilardoni et al., 2011; Guerra, 2016).

Las variaciones en los rendimientos pueden deberse a que la cantidad de aceite que posee una planta depende de varios factores, como son: la edad de la planta, la época, lugar de recolección y las condiciones climáticas a las que la planta está expuesta (Espinosa, 2006). Los rendimientos obtenidos en este estudio son mayores a los de estudios similares mencionados, puesto que las plantas se recolectaron en la temporada seca cuando las condiciones climáticas provocan estrés a la planta induciendo a una mayor producción del aceite esencial.

Los resultados del análisis de difusión en agar demostraron que el aceite *C. nubigenum* tiene actividad antimicrobiana y antifúngica frente a todas las cepas utilizadas, lo cual coincide con investigaciones anteriores que reportan estas propiedades en el aceite puro de *C. nubigenum*

frente a *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *C. albicans* (El-Seedi et al., 2008; Gilardoni et al., 2011). En el mencionado estudio de referencia no se indican ensayos realizados con el aceite esencial diluido, sin embargo, en la presente investigación las diluciones del aceite también presentan actividad antimicrobiana.

E. coli y *S. Abaetetuba* tuvieron la menor sensibilidad al aceite esencial de *C. nubigenum*, lo cual valida la investigación realizada por Jerves et al. (2014), en la cual reporta inactividad de extractos de *C. nubigenum* frente a *E. coli* y *S. Abaetetuba*. Estas bacterias presentan resistencia debido a la complejidad de su estructura celular que impide el paso de compuestos a través de la membrana celular (Nazzaro et al., 2013).

El aceite esencial de *Ambrosia arborescens* mostró actividad antimicrobiana frente a todas las cepas utilizadas, sin embargo, *P. aeruginosa*, fue la más sensible, tanto en aceite puro, como en las diluciones del mismo. Este resultado concuerda con investigaciones anteriores que reportan actividad antimicrobiana del extracto de *A. arborescens* frente a esta cepa (Ibarra y Paredes, 2013).

Las cepas menos sensibles fueron *E. coli* y *S. Abaetetuba* que presentaron halos de inhibición con las diluciones del aceite esencial de *A. arborescens* y no con el aceite puro. Esto podría deberse a una limitación de la técnica utilizada, ya que, la hidrofobicidad del aceite esencial impide la difusión de ciertos compuestos en el agar, además por su volatilidad algunos compuestos pueden evaporarse durante la incubación (Reyes et al., 2014).

Los resultados anteriores no se comparan con otros datos, ya que, no existen estudios realizados con aceite esencial de esta planta. Sin embargo, la investigación realizada por Ibarra y Paredes, (2013) con extracto blando de *A. arborescens* registró actividad antimicrobiana frente a *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* en bajas concentraciones del extracto. Rojas et al. (2003) en su investigación, en cambio, reportan que el extracto crudo de *A. arborescens* en etanol no presenta actividad antimicrobiana frente a *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis* y *C. albicans*.

La resistencia de *E. coli* y *S. Abaetetuba* a ambos aceites esenciales puede explicarse con base en que éstos presentan distintos modos de acción. Frente a bacterias Gram negativas la actividad antimicrobiana del aceite esencial se limita, ya que éste tipo de bacteria posee una membrana

externa casi impermeable, por la cual la mayoría de los compuestos hidrofóbicos no pueden atravesar (Nazzaro et al., 2013). Sin embargo, la susceptibilidad no solo depende de la composición del aceite esencial, si no de las diferencias que puede haber entre las bacterias. Pues se han observado diferentes comportamientos incluso entre cepas de la misma especie (De Martino, De Feo, Fratianni, y Nazzaro, 2009).

S. aureus y *B. subtilis* presentaron mayor sensibilidad que *E. coli* y *S. Abatetuba*, resultados que se atribuyen a que las bacterias Gram positivas son más susceptibles, ya que su pared celular permite el paso de compuestos hidrofóbicos que pueden actuar en la membrana y el citoplasma. Los compuestos fenólicos presentes en los aceites esenciales tienen actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas, siendo capaces de interferir con las enzimas relacionadas a la producción de energía a bajas concentraciones y en concentraciones altas desnaturizar proteínas (Nazzaro et al., 2013).

La sensibilidad de *C. albicans* se debe a que la interacción directa del aceite esencial con la membrana de las células fúngicas afecta la permeabilidad de la célula, provocando daños generales como la fuga del contenido citoplasmático, destrucción de organelos, cambio de la presión osmótica y con ello la muerte celular (Tolouee et al., 2010).

La determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitoria y Letal demostró que las menores concentraciones del aceite esencial de *C. nubigenum* inhiben el crecimiento de la mayoría de las especies utilizadas, excepto *S. Abaetetuba* y *B. subtilis*. En otro estudio también se reporta que el aceite esencial de esta planta en concentraciones bajas presenta actividad inhibitoria para *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* (El-Seedi et al., 2008). Sin embargo, no se menciona la letalidad del aceite, a diferencia de la presente investigación que determinó que el aceite esencial antes mencionado es letal para *E. coli* y *S. aureus* en las concentraciones de 1:3 y 1:1 respectivamente.

Un estudio realizado por Gilardoni et al. (2011) analizó la CMI y CML del aceite de *C. nubigenum* para *C. albicans* y determinó que el aceite es letal hasta en concentración de 5µl/ml. Este resultado concuerda con los obtenidos en la presente investigación ya que la menor concentración usada resultó ser letal para la levadura.

El aceite esencial de *Ambrosia arborescens* presentó capacidad inhibitoria para todas las cepas en las dos concentraciones menores utilizadas, exceptuando *B. subtilis* que solo fue inhibido con el aceite puro. Además, el aceite puro fue letal para *S. aureus*. Resultados sobre CMI y CML del aceite esencial de esta planta no han sido reportados, ya que solo se han realizado estudios con otro tipo de extractos y no se han observado resultados favorables en cuanto a letalidad (Ibarra y Paredes, 2013). Sin embargo, investigaciones anteriores demuestran que plantas de la familia Asteraceae presentan capacidad para inhibir el crecimiento de algunos hongos (Zapata, Durán, Stashenko, Betancur-Galvis, y Mesa-Arango, 2010).

En el contacto del aceite esencial con el alimento el tiempo no influyó en la mortalidad, todas las concentraciones utilizadas presentaron diferencias significativas con el control. Sin embargo, la concentración que tuvo mayor mortalidad fue 0,25 $\mu\text{l/ml}$ de *C. nubigenum* y 4 $\mu\text{l/ml}$ de *A. arborescens*, mas, en ambos casos la mortalidad fue menor al 20%. Estos resultados concuerdan con estudios realizados con plantas de la familia Lamiaceae que demostraron que al aplicar el aceite esencial por ingestión, la actividad insecticida frente a miembros de la familia Curculionidae decrece con el tiempo (Ngamo et al., 2004). Investigaciones anteriores reportan que existe actividad insecticida de aceites esenciales por este método utilizando concentraciones altas de extractos (Hincapié, Lopera, y Ceballos, 2008), ya que al utilizar concentraciones bajas la mortalidad no supera el 60% (Chirino, Carriac, y Ferrero, 2001).

En el análisis de actividad insecticida del aceite esencial de *C. nubigenum* por contacto con el insecto se registró mortalidad de 74,4%, sin embargo, este porcentaje de mortalidad es menor que el de actividad fumigante. Con el aceite esencial de *A. arborescens* se registró una mortalidad de 58,8%. Siendo ésta la mayor mortalidad en todos los métodos de aplicación de este aceite esencial, lo que indica que la mejor vía de ingreso puede ser cuticular (Werdin, Murray, y Ferrero, 2008). Por otra parte, el aceite esencial de *A. arborescens* en estudios anteriores ha presentado actividad insecticida débil (Orozco y Lentz, 2005).

La actividad fumigante es uno de los métodos más utilizados en análisis de aceites esenciales (Gutiérrez, Stefanazzi, González, Benzi, y Ferrero, 2009). En los estudios realizados en este trabajo la actividad fumigante de los aceites esenciales incrementó con el tiempo, ya que se registró la mayor actividad a las 72 horas después de realizado experimento. Con *C. nubigenum*

se presentó una mortalidad de entre 46% y 80%, sin diferencias significativas entre las concentraciones. Estos resultados sugieren que la mejor vía de ingreso del aceite esencial de *C. nubigenum* al insecto es respiratoria (Werdin et al., 2008). El estudio realizado por Li et al. (2015) reporta actividad insecticida de una planta de género *Clinopodium* frente a plagas de postcosecha, utilizando el método de fumigación. El aceite esencial de *A. arborescens* a concentración 1 µl /ml presentó el 22,2% de mortalidad de *P. frontalis* a las 72 horas.

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- El rendimiento del aceite esencial de *C. nubigenum* es alto, considerando el promedio general de rendimiento (<1% y 3%), la cantidad necesaria de planta para la extracción no es elevada, lo que abre la posibilidad de una aplicación industrial.

- El rendimiento del aceite esencial de *A. arborescens* es menor, sin embargo, la planta tiene un amplio rango de adaptabilidad, por lo que puede ser cultivada para una aplicación industrial.

- Los aceites esenciales estudiados presentan gran potencial de inhibición frente a *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* y *S. aureus*, bacterias que están relacionadas con enfermedades infecciosas en animales. Esto permite la posibilidad del uso de los aceites esenciales como método de prevención ante dichas enfermedades previo ensayos en campo.

- El aceite esencial de *C. nubigenum* es letal para *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*, lo que representa la posibilidad de su uso en el control de enfermedades previo ensayos en campo.
- *B. subtilis* es una bacteria utilizada en control biológico, fue menos sensible a los aceites esenciales, por lo que este aceite podría usarse en un plan de manejo integrado de plagas.
- La actividad insecticida fue mayor por el método de actividad fumigante y a concentraciones bajas. Además, el efecto se incrementa con el tiempo, lo que permitiría la aplicación del aceite esencial como control de plagas en graneros.
- Los dos aceites esenciales fueron repelentes, esto permite la posibilidad del uso en control preventivo de plagas.

RECOMENDACIONES

- Realizar la caracterización de los aceites esenciales, para relacionar la actividad antimicrobiana e insecticida con los compuestos encontrados.
- Analizar la actividad antimicrobiana y poder insecticida utilizando mezclas de los aceites esenciales.
- Realizar un estudio de campo con formulaciones de los aceites esenciales tanto frente a plagas como a enfermedades, que incluya la determinación del solvente adecuado para su uso rentable y un análisis organoléptico del residuo del aceite esencial en los granos para consumo.
- Realizar un análisis económico que compare la eficiencia de un producto a base de aceites esenciales con los agroquímicos convencionales, considerando la posibilidad de la realización de este tipo de productos por parte de los agricultores.

CAPÍTULO VIII

BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS

BIBLIOGRAFÍA

- Adelantado, C., Arosemena, E., Calvo, M., Manteca, L., Martín, M., Ordóñez, G., ... Zekaira, D. (2008). La Salmonella, de actualidad desde siempre. Real Escuela de Avicultura.
- Aguilar, Z., Hidalgo, P., & Ulloa, C. (2009). *Plantas Útiles de los Páramos de Zuleta, Ecuador*. Quito- Ecuador.
- American Type Culture Collection. (s. f.). *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula ATCC ® 10145™. Recuperado 16 de septiembre de 2016, a partir de <https://www.atcc.org/Products/All/10145.aspx#culturemethod>
- Ayala, S. E., & Vásquez, T. A. (2014). Evaluación de la actividad antifúngica in vitro del marco (Ambrosia arborescens Mill.) y matico (Aristeguietia glutinosa Lam.) sobre hongos patógenos causantes de la dermatomicosis.

- Bailac, P. N., Dellacasa, A. D., Bernasconi, H. O., Firpo, N. H., & Ponzi, M. I. (2000). Composición del aceite esencial y actividad antimicrobiana de *Eupatorium patens*. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, 45(2), 207-211. <https://doi.org/10.4067/S0366-16442000000200006>
- Baldeón, X. (2012, febrero). *Actividad Insecticida de los Aceites Esenciales de Tagetes minuta, Tagetes terniflora y Tagetes zipaquirensis sobre Premnotrypes vorax*.
- Ballesta, M. C., Pascual, M. J., & Soler, A. (2004). Toxicidad y repelencia de aceites esenciales en plagas de almacén de arroz. *Boletín de sanidad vegetal. Plagas*, 30(1), 279-286.
- Benelli, G., & Canale, A. (2012). Learning of visual cues in the fruit fly parasitoid *Psytalia concolor* (Szépligeti) (Hymenoptera: Braconidae). *BioControl*, 57(6), 767-777. <https://doi.org/10.1007/s10526-012-9456-0>
- Breed, R., Murray, E., & Smith, N. (1957). *Bergeys manual of determinative bacteriology* (Seventh). Baltimore.
- Castillo, L., Jiménez, J., & Delgado, M. (2012). Actividad biológica in vitro del extracto de *Capsicum chinense* Jacq contra *Bemisia tabaci* Genn. *Chapingo Serie Horticultura*, 18, 345-356.
- Castresan, J. E., Rosenbaum, J., & González, L. A. (2013). Estudio de la efectividad de tres aceites esenciales para el control de áfidos en pimiento, *Capsicum annum* L. *Idesia (Arica)*, 31(3), 49-58. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292013000300007>
- Castro, R., & Mejía, K. (2011). *Preferencia alimentaria de Pagiocerus frontalis en variedades de Maíz en el distrito de Coya, provincia de Calca*. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, El Cusco - Perú. Recuperado a partir de <https://es.scribd.com/doc/132011636/seminario-pagiocerus-frontalis>

- Celis, Á., Mendoza, C., Pachón, M., Cardona, J., Delgado, W., & Cuca, L. E. (2010, febrero 28). Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. Una revisión. *Agronomía Colombiana*.
- Cervantes, E., García, R., & Salazar, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61(1), 28-40.
- Chávez, I. (2013). Uso de extractos de Hierba mora y Marco para control de *Rhopalosiphum maidis*. Sangolquí - Ecuador: Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.
- Chirino, M., Cariac, M., & Ferrero, A. (2001). Actividad insecticida de extractos crudos de drupas de *Schinus Molle* L. (Anacardiaceae) sobre larvas neonatas de *Cydia Pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). *Control Bio*. Recuperado a partir de <http://controlbiologico.info/index.php/es/articulostesisboletines/item/actividad-insecticida-de-extractos-crudos-de-drupas-de-schinus-molle-l-anacardiaceae-sobre-larvas-neonatas-de-cydia-pomonella-l-lepidoptera-tortricidae>
- De Martino, L., De Feo, V., Fratianni, F., & Nazzaro, F. (2009). Chemistry, antioxidant, antibacterial and antifungal activities of volatile oils and their components. *Natural Product Communications*, 4(12), 1741-1750.
- Delgado, J., & Ullauri, C. (2012). *Identificación de bacterias más frecuentes causantes de IVU en mujeres de edad fértil que acuden a los laboratorios de servicios de salud de la UNL. Periodo Octubre 2011-Abril 2012.*
- El-Seedi, H. R., Khattab, A., Gaara, A. H. M., Mohamed, T. K., Hassan, N. A., & El-kattan, A. E. (2008). Essential Oil Analysis of *Micromeria nubigena* H.B.K. and its Antimicrobial

- Activity. *Journal of Essential Oil Research*, 20(5), 452-456.
<https://doi.org/10.1080/10412905.2008.9700057>
- Espinosa, A. (2006). Extracción, caracterización y determinación de la actividad antibacteriana y antimicótica del aceite esencial de Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus* (DC) stapf). Recuperado a partir de <http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/511>
- Espitia, C. R. (2011, septiembre 12). *Evaluación de la actividad repelente e insecticida de aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas utilizados contra tribolium castaneum herbst (coleoptera: tenebrionidae)*. Universidad Nacional de Colombia.
- Forbes, B. A. (2009). *Diagnostico Microbiologico*. Ed. Médica Panamericana.
- Franco, Y. L. (2015). Evaluación del proceso de extracción de aceites esenciales de hojas de citrus aurantifolia (Limón sutil) citrus sinensis (Naranja) y citrus nobilis (Mandarina) mediante hidrodestilación. Quevedo: UTEQ.
- GAD Municipal Ibarra. (2012). *Plan de Ordenamiento Territorial del Cantón Ibarra*. Ibarra - Ecuador: Gobierno Autónomo Descentralizado de Ibarra.
- Gilardoni, G., Malagon, O., Morocho, V., Negri, R., Tosi, S., Guglielminetti, M., ... Finzi, P. V. (2011). Phytochemical researches and antimicrobial activity of *Clinopodium nubigenum* Kunth (Kuntze) raw extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(5), 850-855. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000139>
- Granados, C. (2012, abril). *Alternativas biorracionales para el control de paratrioza Bactericera cockerelli sulcer (Hemiptera: psillidae) en laboratorio*.
- Guerra, A. (2016). Evaluación de la actividad antioxidante Bioautográfica de dos variedades de aceites esenciales andinos (*Clinopodium nubigenum* (Kunt) Kuntze y *Baccharis latifolia*

- (Ruiz & Pav.) Pers. Recuperado a partir de <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/12183>
- Guerrero, P. P., & Pozo, K. N. (2016). Evaluación de la actividad antioxidante bioautográfica de cinco variedades de aceites esenciales andinos (*Aristeguietia glutinosa*; *Myrcianthes rhopaloides*; *Ambrosia arborescens*; *Lantana camara*; *Minthostachys mollis*). Recuperado a partir de <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/12184/1/UPS-QT09500.pdf>
- Gutiérrez, M. M., Stefanazzi, N., González, J. W., Benzi, V., & Ferrero, A. A. (2009). Actividad fumigante de aceites esenciales de *Schinus molle* (Anacardiaceae) y *Tagetes terniflora* (Asteraceae) sobre adultos de *Pediculus humanus capitis* (Insecta; Anoplura; Pediculidae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. Recuperado a partir de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85611774012>
- Hincapié, C., Lopera, D., & Ceballos, M. (2008). Actividad insecticida de extractos de semilla de *Annona muricata* (Anonaceae) sobre *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 34(1), 76-82. Recuperado a partir de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0120-04882008000100010&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Ibarra, M. V., & Paredes, E. A. (2013, julio 1). Eficacia antibacteriana in vitro de marco (*Ambrosia arborescens* Mill.) y paico (*Chenopodium ambrosioides* L.) en una formulación cosmética.
- INEC. (2015). *Indicadores Laborales* (Informe Ejecutivo). Ecuador: Dirección de Estudios Laborales y Económicos. Recuperado a partir de

http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/EMPLEO/2015/Marzo-2015/Informe_Ejecutivo_Mar15.pdf

Jacobsen, E., & Sherwood, S. (2002). *Cultivo de granos andinos en Ecuador: informe sobre los rubros quinua, chocho y amaranto*. Editorial Abya Yala.

Jaramillo, B. E., Duarte, E., & Delgado, W. (2012). Bioactividad del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* colombiano. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(1), 54-64. Recuperado a partir de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962012000100006&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Jerves, L., Cuzco, N., Tobar, V., Ansaloni, R., Maes, L., & Wilches, I. (2014). Medicinal plants used in South Ecuador for gastrointestinal problems: An evaluation of their antibacterial potential. *Journal of Medicinal Plants Research*, 8(45), 1310-1320. <https://doi.org/10.5897/JMPR2014.5656>

Jo Zimbro, M., Power, D., Miller, S., Wilson, G., & Johnson, J. (2009). *Difco & BBL Manual* (Segunda). United States of America: Becton, Dickinson and Company. Recuperado a partir de https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/242720.pdf

Laboratorios Britania. (2015a). *Mueller Hinton Agar*. Argentina: Laboratorios Britania. Recuperado a partir de <http://www.britanialab.com/productos/B02137%20REV%2001-STUART%20MEDIO%20DE%20TRANSPORTE.pdf>

Laboratorios Britania. (2015b). *Nutritivo Agar*. Argentina: Laboratorios Britania. Recuperado a partir de <http://www.britanialab.com/productos/B02122%20REV%2001-NUTRITIVO%20AGAR.pdf>

- Laboratorios Britania. (2015c). *Nutritivo Caldo*. Argentina: Laboratorios Britania. Recuperado a partir de <http://www.britanialab.com/productos/B02123%20REV%2001-NUTRITIVO%20CALDO.pdf>
- Laboratorios Britania. (2015d). *Sabouraud Glucosado Agar*. Argentina: Laboratorios Britania. Recuperado a partir de <http://www.britanialab.com/productos/B02150%20REV%2001-SABOURAUD%20GLUCOSADO%20AGAR.pdf>
- Li, H. Y., Liu, X. C., Chen, X. B., Liu, Q. Z., & Liu, Z. L. (2015). Chemical Composition and Insecticidal Activities of the Essential Oil of *Clinopodium chinense* (Benth.) Kuntze Aerial Parts against *Liposcelis bostrychophila* Badonnel. *Journal of food protection*, 78(10), 1870-4. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-089>
- López, S. G., & Salazar, F. R. C. (2014). *Fundamentos para el ejercicio de la medicina. Guía para el examen de residencias médicas*. ERM. Editorial El Manual Moderno.
- MAGAP. (2012). *Censo Nacional de Agropecuaria*. Ecuador.
- Mena, P., & Hofstede, R. (2006). Los páramos ecuatorianos. En *Botánica económica de los Andes centrales*. La Paz: Universidad Nacional de San Andrés. Recuperado a partir de <http://beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdfer/Capitulo%2006.pdf>
- Mendoza, S. (2016). Formulación bioinsecticida a partir del aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Mill (altamisa) de aplicación canina. Recuperado a partir de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/25130>
- Modrzewska, B., & Kurnatowska, A. (2010). [Interspecies differentiation of *Candida albicans* (Robin, 1853) Berkhout, 1923 strains from multifocal invasions--their identity or similarity parameters]. *Wiadomości Parazytologiczne*, 56(3), 253-268.

- Molina, N. (2001). Uso de extractos botánicos en control de plagas y enfermedades. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, 59, 76-77.
- Murillo, W., & Salazar, D. F. (2011). Green tendencies in the agriculture for the handling and control of plagues. *Tumbaga*. Facultad de Ciencias de la Universidad del Tolima.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 6(12), 1451-74. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>
- Ngamo, L. S., Goudoum, A., Ngassoum, M. B., Mapongmetsem, P. M., Kouninki, H., & Hance, T. (2004). Persistence of the insecticidal activity of five essential oils on the maize weevil *Sitophilus zeamais* (Motsch.) (Coleoptera: Curculionidae). *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 69(3), 145-147.
- Olivero, J., Caballero, K., Jaramillo, B., & Stashenko, E. (2009). Repellent activity of the essential oils from *Lippia origanoides*, *Citrus sinensis* and *Cymbopogon nardus* cultivated in Colombia against *Tribolium castaneum*, Herbst. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 41(3), 244-250.
- Orozco, O. L., & Lentz, D. L. (2005). Poisonous plants and their uses as insecticides in Cajamarca, Peru. *Economic Botany*, 59(2), 166. [https://doi.org/10.1663/0013-0001\(2005\)059\[0166:PPATUA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1663/0013-0001(2005)059[0166:PPATUA]2.0.CO;2)
- Ortuño, M. (2006). *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes*. España: aiyana ediciones.
- Pardi, G., & Cardozo, E. (2002). Algunas consideraciones sobre *Candida Albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. *Acta Odontológica Venezolana*, 40(1), 9-17.

- Peredo, H., Palou, E., & López, V. (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas Selectos de Ingeniería en Alimentos, 3-1*, 23-32.
- Prasad, R. (2012). *Candida Albicans: Cellular and Molecular Biology*. Springer Science & Business Media.
- Reyes, F., Palou, E., & López, A. (2012). Vapores de aceites esenciales: alternativa de microbianos naturales. México: Universidad de las Américas de Puebla.
- Reyes, F., Palou, E., & López, A. (2014). Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. México: Universidad de las Américas de Puebla.
- Ringuelet, J., Ocampo, R., Henning, C., Padín, S., Urrutia, M. I., & Bello, G. D. (2014). Actividad insecticida del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown sobre *Tribolium castaneum* Herbst. en granos de trigo (*Triticum aestivum* L.). *Revista Brasileira de agroecología*, 9(2). Recuperado a partir de <http://www.aba-agroecologia.org.br/revistas/index.php/rbagroecologia/article/view/15442>
- Roca, D. (2014). Pseudomonas aeruginosa: un adversario peligroso. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 48(4), 465-474.
- Rodríguez, J. A. S., Serrano, S., Marfil, R., & Jodral, M. (2009). *Patógenos emergentes en la línea de sacrificio de porcino*. Ediciones Díaz de Santos.
- Rogg, H. (2001). *Manual: manejo integrado de plagas en cultivos de la Amazonía Ecuatoriana*. IICA Biblioteca Venezuela. Recuperado a partir de <https://books.google.com/books?id=X-uTHzXmJloC&pgis=1>

- Rojas, M. M., Corzo, M., Sánchez, Y., Brito, D., Montes de Oca, R., Martínez, Y., & Pino, O. (2014). Actividad antibacteriana de aceites esenciales sobre *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *Revista de Protección Vegetal*, 29(3), 197-203.
- Rojas, R., Bustamante, B., Bauer, J., Fernández, I., Albán, J., & Lock, O. (2003). Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 88(2-3), 199-204. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00212-5](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00212-5)
- Ruiz, C., Díaz, C., & Rojas, R. (2015). Composición química de aceites esenciales de 10 plantas aromáticas peruanas. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 81(2), 81-94. Recuperado a partir de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1810-634X2015000200002&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Salgado, N., D'Antonino, L. R., & Soto, A. (2012). Essential oil of *Piper crassinervum* to control of *Sitophilus seamaiz* (coleoptera: curculionidae). *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, 16(1), 99-107.
- Sánchez, Y., Pino, O., Correa, T. M., Naranjo, E., & Iglesia, A. (2009). ESTUDIO QUÍMICO Y MICROBIOLÓGICO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Piper auritum* KUNTH (CAISIMÓN DE ANÍS). *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), 39-46.
- SENPLADES. (2013). *Plan Nacional del Buen Vivir 2013 - 2017* (1.ª ed.). Quito, Ecuador: Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo.
- Silva, M., García, M., Caballero, A., Fernández, N., & Silva, L. (2006). *Técnico especialista en laboratorio de atención primaria del instituto catalán de la salud. Temario volumen ii*. MAD-Eduforma.

- Sulca, T. (2010). *Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos de acmella repens (botoncillo) urtica dioica (ortiga negra) y sanchus oleraceus (kana yuyo), plantas registradas en la parroquia la Esperanza- Imbabura sobre astaphylococcus aureus, pseudomo.*
- Tapondjou, A. L., Adler, C., Fontem, D. A., Bouda, H., & Reichmuth, C. (2005). Bioactivities of cymol and essential oils of Cupressus sempervirens and Eucalyptus saligna against Sitophilus zeamais Motschulsky and Tribolium confusum du Val. *Journal of Stored Products Research*, 41(1), 91-102. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2004.01.004>
- Tolouee, M., Alinezhad, S., Saberi, R., Eslamifar, A., Zad, S. J., Jaimand, K., ... Razzaghi-Abyaneh, M. (2010). Effect of *Matricaria chamomilla* L. flower essential oil on the growth and ultrastructure of *Aspergillus niger* van Tieghem. *International Journal of Food Microbiology*, 139(3), 127-133. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.032>
- Torres, A. (2012, diciembre). *ESTUDIO DE LA HIDRODESTILACION DEL ACEITE ESENCIAL DE Lippia alba (Mill) N.E Br., EN UN DESTILADOR A ESCALA PILOTO.*
- Torres, D., & Capote, T. (2004). Agroquímicos un problema ambiental global: uso del análisis químico como herramienta para el monitoreo ambiental. *Revista Ecosistemas*, 13(3). <https://doi.org/10.7818/re.2014.13-3.00>
- Tripathi, A. K., Upadhyay, S., Bhuiyan, M., & Bhattacharya, P. R. (2009, noviembre 30). A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*. Academic Journals.
- Vásquez, J. P. N., Mejía, A. F. D., Mesa, A. M., & Arboleda, S. (2014, febrero 22). *ACTIVIDAD LARVICIDA Y ANTIBACTERIANA DE Ambrosia peruviana WILLD. XII CONGRESO COLOMBIANO DE FITOQUÍMICA.*

- Vera, M. B. (2008, agosto). *Estudio fitoquímico de una planta de la flora del Ecuador: Ambrosia arborescens*. Sangolquí, Ecuador.
- Werdin, J. O., Murray, A. P., & Ferrero, A. A. (2008). Biological activity of essential oils from «Schinus molle» var. «Areira» (Anacardiaceae) against nymphs II of «Nezara viridula» (Hemiptera: Pentatomidae). *Boletín de sanidad vegetal. Plagas*, 34(3), 367-375. Recuperado a partir de <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2741272&info=resumen&idioma=SPA>
- Yáñez Rueda, X., Parada, D. Y., & Lugo Mancilla, L. L. (2011). Variabilidad del rendimiento del aceite esencial de *Calycolpus moritzianus* nativo de Norte de Santander (Colombia) de acuerdo con el tratamiento de la hoja. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*. Recuperado a partir de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90322640007>
- Yumi, J. (2012, febrero). *Determinación de la Actividad Insecticida de los Aceites Esenciales de Tagetes terniflora y Tagetes zipaquirensis en Brevicoryne brassicae*.
- Zapata, B., Durán, C., Stashenko, E., Betancur-Galvis, L., & Mesa-Arango, A. C. (2010). Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia Asteraceae. *Revista Iberoamericana de Micología*, 101-103. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2010.01.005>

ANEXOS

ANEXO 1. Curvas de calibración UFC/ml vs absorbancia

