

UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO



Campus Celaya-Salvatierra

División de Ciencias de la Salud e
Ingenierías

**Efecto antimicrobiano de quitosano con aceites esenciales contra
*Staphylococcus epidermis***

Tesis que para obtener el título de Licenciado en
Ingeniería en Biotecnología presenta:

Arianna Procel Morales

Director: Dr. Jesús Rubén Rodríguez

Diciembre 2022/ enero 2023.

Celaya, Guanajuato, México.

UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO



Campus Celaya-Salvatierra

División de Ciencias de la Salud e
Ingenierías

Efecto antimicrobiano de quitosano con aceites esenciales contra *Staphylococcus epidermis*

Tesis que para obtener el título de Licenciado en
Ingeniería en Biotecnología presenta:

Arianna Procel Morales

Director: Dr. Jesús Rubén Rodríguez

Diciembre 2022/ enero 2023.

Celaya, Guanajuato, México.

Dedicatoria

A mis padres. Lo logramos.

Agradecimientos

A mis abuelas, las mujeres más fuertes que conozco, mis ejemplos más grandes a seguir, gracias por demostrarme un amor, cariño y apoyo incondicional.

A mis abuelos por ser grandes ejemplos de superación personal a pesar de las adversidades que puedan existir en el camino.

A mis hermanos (André y Amy), mis cómplices, gracias por hacerme reír y transmitirme su alegría, tengo la suerte de compartir mi vida con ustedes, son los mejores hermanos que alguien pudiera desear.

A mi familia por todos contribuir con su granito de arena en mis años de formación, sin ustedes no estaría donde estoy.

A mis amigas (Frida, Jaqueline, Pau, Roxana y al equipo de auxilio VIP) que me entendían y acompañaban en los momentos de estrés o tristeza, gracias por siempre motivarme y no dejarme en los días difíciles. Las admiro y quiero demasiado.

Al Dr. Rubén por ayudar a la elaboración de este proyecto y contagiar sus ganas de estar en constante innovación y mejora.

A mis maestros por compartir su conocimiento y ayudar en mi formación académica, por no solo preocuparse de formar profesionistas de calidad si no también estirarnos una mano amiga cuando los necesitamos.

A mis compañeros de carrera, quienes siempre que los necesité me ayudaron.

Resumen

Staphylococcus epidermis es una bacteria aerobia que se propaga mediante alguna fisura que se encuentre en la piel. A partir de la desacetilación de la quitina se obtiene el quitosano, un biopolímero soluble en soluciones acuosas ácidas, biodegradable, biocompatible y no tóxico, este biopolímero es ideal para la elaboración de películas utilizadas en la industria alimenticia y biomédica. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto inhibitorio del quitosano con aceites esenciales contra *Staphylococcus epidermis* mediante los métodos bactericidas y bacteriostáticos. Para el método bacteriostático se colocaron sensibilizadores con las soluciones a evaluar en una caja petri con medio MH y haciendo un tapete microbiano con el inóculo de la bacteria de interés, mientras que para el bactericida utilizando una microplaca se mezcló medio MH, la bacteria e individualmente en tres diferentes concentraciones cada aceite, así como el quitosano al 1% y el ácido acético. Los resultados demostraron que el aceite de clavo detuvo el crecimiento de *Staphylococcus epidermis*, pero no lo erradicó, por otro lado, el aceite de tomillo no permitió el crecimiento de la bacteria, por lo tanto, su efecto es bacteriostático, el quitosano al 1% y el ácido acético mostraron propiedades tanto bactericidas como bacteriostáticas a diferentes concentraciones. Con ayuda de los resultados obtenidos podemos observar nuevas alternativas para el tratamiento de infecciones por bacterias sin el uso de antibióticos incorporando biopolímeros que se encuentran de manera abundante en la naturaleza.

Palabras clave: bacteria, biopolímero, bactericida, bacteriostático, aceite de tomillo, aceite de clavo.

Abstract

Staphylococcus epidermis is an-aerobic bacterium that spreads through a break in the skin. Chitosan is obtained from the deacetylation of chitin, a soluble biopolymer in aqueous solutions, biodegradable, biocompatible and non-toxic. This biopolymer is ideal for making films used in the food and biomedical industries. The objective of this work was to evaluate the inhibitory effect of chitosan with essential oils against *Staphylococcus epidermis* using bactericidal and bacteriostatic methods. For the bacteriostatic method, sensidisks with the solutions to be evaluated were placed in a petri dish with MH medium and making a microbial mat with the inoculum of the bacterium of interest, while for the bactericide using a microplate, MH medium was mixed, the bacterium and individually in three different concentrations each oil, as well as 1% chitosan and acetic acid. The results showed that clove oil stopped the growth of *Staphylococcus epidermis*, but did not eradicate it, on the other hand, thyme oil does not allow the growth of the bacteria, therefore, its effect is bacteriostatic, chitosan at 1 % and acetic acid showed both bactericidal and bacteriostatic properties at different concentrations. With the help of the results obtained, we can observe new alternatives for the treatment of bacterial infections without the use of antibiotics, incorporating biopolymers that are found abundantly in nature.

Keywords: *bacterium*, biopolymer, bactericide, bacteriostatic, thyme oil, clove oil.

Índice

	Págs.
Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Resumen	iii
Abstract	iv
Índice de Tablas	vii
Índice de imágenes	viii
1. Introducción	1
2. Justificación	3
3. Objetivo general	4
4. Hipótesis	4
5. Marco teórico	5
5.1. <i>Staphylococcus epidermis</i> (<i>S. epidermis</i>)	5
5.2. Quitina	5
5.2.1. Desacetilación de la quitina	6
5.3. Quitosano	7
5.4. Aceite de clavo	9
5.5. Aceite de tomillo	10
5.6. Medio Müller-Hinton	10
5.7. Medio Triptona- soya	12
5.8. Tubo McFarland 0.5	13
5.9. Método bactericida y bacteriostático	13
6. Materiales y Métodos	15
6.1. Preparación del medio TSA	15
6.2. Preparación medio TSB	15
6.3. Preparación del medio Müller-Hinton agar	16
6.4. Preparación del Müller-Hinton caldo	17
6.5. Preparación del quitosano al 1%	18
6.6. Siembra de <i>S. epidermis</i>	18
6.7. Inoculación	19
	5

6.8.	Preparación del tubo McFarland 0.5	20
6.9.	Metodología para método Bacteriostático	20
6.10.	Metodología para método Bactericida	21
7.	Resultados y Discusión	23
7.1.	Resultados	23
7.1.1.	Método bacteriostático	23
7.1.2.	Método bacteriostático y bactericida	29
7.2.	Discusión de Resultados	31
8.	Conclusión	35
	Referencias Bibliográficas	36

Índice de tablas

Tabla 5.3.1: Quitina vs. quitosano	8
Tabla 5.3.2: áreas de oportunidad y aplicaciones del quitosano.	9
Tabla 5.6.1: Fórmula medio MH agar	11
Tabla 5.6.2: Fórmula medio MH broth	11
Tabla 5.7.1: Fórmula medio TSA	12
Tabla 5.7.2: Fórmula medio TSB	13
Tabla 7.1.1: Resultados del método bacteriostático del clavo	23
Tabla 7.1.2: Resultados del método bacteriostático del cloranfenicol	24
Tabla 7.1.3: Resultados del método bacteriostático del quitosano 1%	25
Tabla 7.1.4: Resultados del método bacteriostático del tomillo	26
Tabla 7.1.5: Resultados del control con ácido acético	27
Tabla 7.1.6: Resultados del método bactericida del quitosano 1%	30
Tabla 7.1.7: Resultados del método bactericida del clavo	30
Tabla 7.1.8: Resultados del método bactericida del Tomillo	31
Tabla 7.1.9: Resultados del método bactericida del ácido acético	32

Índice de imágenes

Imagen 5.2.1: Estructura de la Quitina	6
Imagen 5.2.2: Desacetilación de la Quitina	7
Imagen 5.3.1: Estructura del Quitosano	8
Imagen 7.1.1: Clavo (5)	23
Imagen 7.1.2: Clavo (6)	23
Imagen 7.1.3: Clavo (7)	24
Imagen 7.1.4: Cloranfenicol (5)	25
Imagen 7.1.5: Cloranfenicol (6)	25
Imagen 7.1.6: Cloranfenicol (7)	25
Imagen 7.1.7: Quitosano 1% (5)	26
Imagen 7.1.8: Quitosano 1% (6)	26
Imagen 7.1.9: Quitosano 1% (7)	26

1. Introducción

Staphylococcus epidermis es un microorganismo que está en constante evolución, fue considerado por mucho tiempo como un germen contaminante de cultivos. Sin embargo, ahora se le reconoce como un patógeno importante y es considerado el agente causal de diferentes afecciones clínicas, entre ellas: Infecciones urinarias intrahospitalarias, bacteriemia en pacientes inmunosuprimidos, infecciones de dispositivos médicos o cuerpos extraños (García, et al., 2003), esta especie de bacterias aerobias se propagan a través del contacto entrando a los organismos mediante alguna fisura que se encuentre en la piel, puede ser desde una herida grande hasta un grano.

La quitina se encuentra de manera abundante en la naturaleza, en exoesqueletos de crustáceos, insectos y en algunos hongos filamentosos, sin embargo, los exoesqueletos son es la fuente más accesible, en especial los crustáceos marinos como cangrejos y camarones ya que se encuentran disponibles como desecho de la industria marisquera. Los crustáceos son la mayor fuente de quitina a nivel industrial con una producción de entre 2.200 Ton. El contenido de quitina en crustáceos varía entre 2–12% del total de masa corporal, el contenido de quitina, proteína, minerales y carotenoides en el exoesqueleto de crustáceos varía dependiendo de la especie, parte del organismo, estado de nutrición y ciclo reproductivo, el exoesqueleto contiene alrededor del 15– 40% de quitina (α -quitina) (Colina, et al., 2014).

Puede emplearse como material biestable, este biopolímero es biocompatible, biodegradable, con propiedades antimicrobianas. Debido a su estructura lineal de unidades repetidas del monómero (1 \rightarrow 4)- β -N-acetil glucosamina, es ideal en las aplicaciones como biosorbente de iones de metales pesados presentes en aguas residuales (Alcántara & Vilaseca, 2017).

A partir de la desacetilación de la quitina se obtiene el quitosano, un biopolímero soluble en soluciones acuosas ácidas, biodegradable, biocompatible y no tóxico. Los materiales elaborados con este biopolímero tienen un futuro prometedor, ya

que cuentan con diferentes aplicaciones en las áreas del campo biotecnológico y biomédico, debido a que algunos investigadores probaron su actividad antimicrobiana en la industria alimenticia, mientras que otros evaluaron su biodistribución y los tiempos de retención en la industria farmacéutica. En áreas como la ortopedia y odontología, se ha evaluado la capacidad osteo-integradora que potencializa a estos polímeros para la fabricación y evaluación de plataformas para crecimiento celular y, cirugías periodontales al evaluarse en forma de geles e hidrogeles inyectables, como componente de compuestos en cementos para rellenos óseos y recubrimientos bioactivos que mejoran el comportamiento de los implantes (Escobar, et al., 2013).

La biodegradabilidad y actividad antimicrobiana hacen a este biopolímero ideal para la elaboración de películas utilizadas en la industria alimenticia y biomédica (Espinosa, et al., 2020). El efecto antimicrobiano del quitosano se atribuye a la capacidad quelante y a la presencia de un grupo amino con carga positiva que puede interactuar con los compuestos de carga opuesta que están presentes en la superficie de los microorganismos. Específicamente, el grupo amino ($-NH_2$) toma una carga formal positiva a pH inferiores de 6.3 ($-^+NH_3$) ofreciendo un carácter catiónico al polímero de quitosano, esta densidad de carga interactúa con las cargas negativas de la pared celular de los microorganismos, generando un rompimiento o lisis de estas estructuras, que lleva a la pérdida de compuestos proteicos y otros constituyentes intracelulares (Valencia, 2015). El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto inhibitorio del quitosano con aceites esenciales contra *S. epidermis* mediante los métodos bactericidas y bacteriostáticos.

2. Justificación

En la actualidad debido al uso desmedido de antibióticos las bacterias han generado resistencia a estos, por lo tanto, los ingenieros en biotecnología no pueden descansar en la búsqueda de alternativas para reemplazar el uso de antibióticos, es por ello por lo que pensar en diferentes métodos como lo son los biopolímeros se vuelve una idea novedosa, un ejemplo de biopolímero es el quitosano. En la actualidad, el quitosano promete ser un biopolímero versátil que puede ser utilizado en múltiples campos de la ciencia, promete nuevas aplicaciones biotecnológicas y cada vez podemos encontrar nuevas propiedades fisicoquímicas a las que se les puede dar un uso interesante.

En México, el camarón es la principal especie en la producción pesquera, siendo el estado de Sinaloa el principal productor, seguido por Sonora y Tamaulipas (SIAP, 2014), gracias a esto ha habido un incremento en el interés por descubrir y explorar todas las aplicaciones que puedan existir de la quitina y el quitosano, ya que cuenta con unas excelentes propiedades, es un biopolímero prometedor y un plus es que debido a su composición es amigable con el medio ambiente y ayudará a aprovechar lo que de otra manera sería considerado un residuo como lo son los exoesqueletos de los crustáceos.

3. Objetivo general

Evaluar el efecto inhibitorio del quitosano con aceites esenciales contra *Staphylococcus epidermis* mediante los métodos bactericidas y bacteriostáticos.

4. Hipótesis

El quitosano con aceites esenciales logra inhibir *Staphylococcus epidermis* en pruebas in vitro.

5. Marco teórico

5.1. *Staphylococcus epidermis* (*S. epidermis*)

S. epidermis es un patógeno oportunista importante, principalmente en pacientes que presentan inmunocompromiso o aquéllos a quienes se les han implantados dispositivos médicos como catéteres intravasculares, válvulas cardíacas o prótesis articulares. Las infecciones que causa *S. epidermis* son crónicas y persistentes por su capacidad de formar biopelícula en superficies bióticas y abióticas (Ortega & Franco, 2014).

“Aunque esta bacteria puede usar glucosa para crecer en condiciones anaeróbicas, en condiciones aeróbicas, la producción de ácido se produce a partir de diferentes carbohidratos (fructosa, maltosa, sacarosa y glicerol)” (Ebrahimzadeh, et al., 2014).

S. epidermis es un coco Gram positivo que microscópicamente se observa como racimos de uvas; a diferencia de *S. aureus*, esta bacteria no produce la enzima coagulasa. *S. epidermis* generalmente es una bacteria inocua, ya que forma parte del microbiota de la piel y mucosas de los mamíferos, pero bajo ciertas circunstancias, algunas cepas pueden actuar como patógenos oportunistas. Hasta el momento, el principal factor de virulencia que se le conoce a esta bacteria es la capacidad de formar biopelícula en distintas superficies y materiales (Uçkay, et al., 2011).

5.2. Quitina

La quitina es, después de la celulosa, uno de los polisacáridos más abundantes que se pueden encontrar en la naturaleza, este puede ser encontrado principalmente en caparazones de crustáceos, insectos y algas. “Posee una estructura cristalina altamente ordenada y lineal de alto peso molecular constituida por unidades de N-acetil-D-glucosamina unidas por enlaces β -D (1,4). Es

altamente insoluble y presenta baja reactividad.” (Mármol, et al., 2011). En la imagen 5.2.1 se presenta la estructura de la quitina.

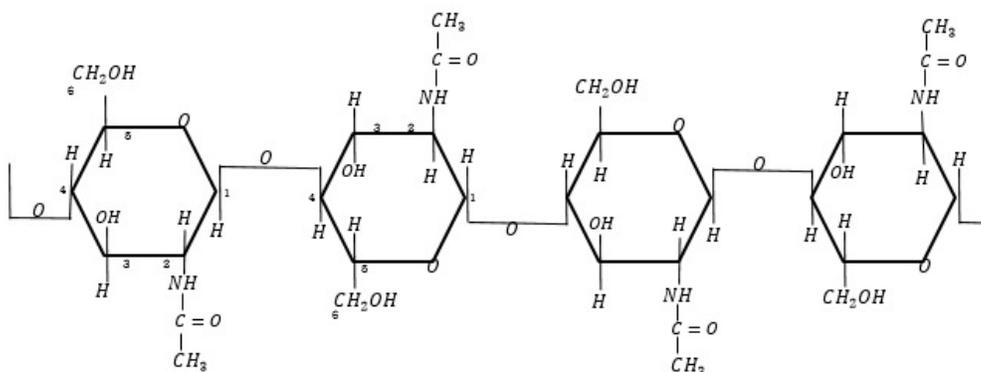


IMAGEN 5.2.1: ESTRUCTURA DE LA QUITINA

Los desechos del camarón (caparazón) son transformados con tecnología en productos de alto valor agregado como quitina, quitosán, amino azúcares, proteínas, pigmentos, entre otros, los cuales son utilizados en las industrias cosmética, alimentaria, agrícola y farmacéutica (Salas, et al., 2017).

Entre las aplicaciones que podemos encontrar para este biopolímero es que puede sustituir el uso de plásticos, tiene usos dentro de la industria agrícola, tratamiento de aguas, efecto antimicrobiano (Lárez, et al., 2019), acelera el proceso del cuerpo de cicatrización, la síntesis del quitosano, entre otras.

5.2.1. Desacetilación de la quitina

La quitina presenta poca solubilidad, pero se puede aplicar un proceso de desacetilación para cambiar este defecto, y de esta manera poder darle más usos. Cuando se somete a un proceso llamado “desacetilar”, que significa quitar de la quitina parte de su estructura, el grupo acetilo, por tratamiento con álcali fuerte a altas temperaturas para obtener quitosano (Mármol, et al., 2011).

La reacción de desacetilación es la que se muestra en la ilustración 5.2.2.

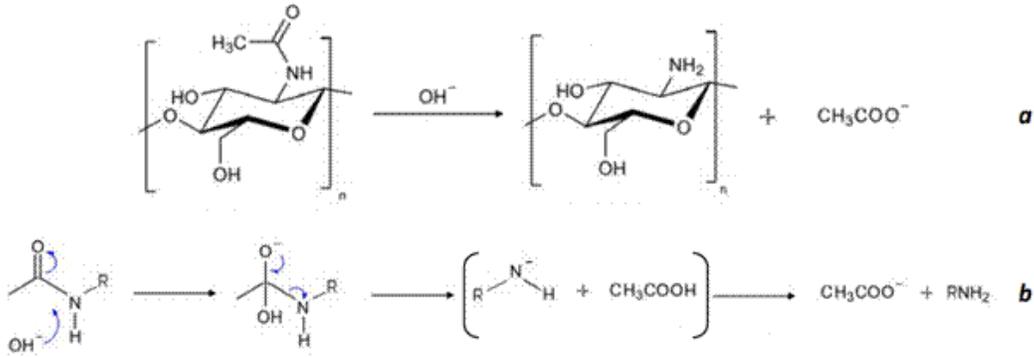


IMAGEN 5.2.2: DESACETILACIÓN DE LA QUITINA

5.3. Quitosano

“El quitosano fue descubierto por Rouget en 1859, quien encontró que al tratar la quitina con una solución caliente de hidróxido de potasio se obtenía un producto soluble en ácidos orgánicos y la nombró “quitina modificada”. Más tarde, en 1894, Hoppe–Seyler fue quien la denominó “quitosano” (de la Paz, et al., 2012).

El quitosano posee mejores propiedades de reactividad y solubilidad, los grupos acetamido que se encuentran en la estructura de la quitina cambian a grupos amino. Se ha descrito como un polímero catiónico lineal, biodegradable, de alto peso molecular, de fácil aplicación y ambientalmente amigable (Mármol, et al., 2011).

Los grupos aminos que se encuentran en la estructura, le dan la capacidad para coagular sustancias coloidales (Campo, et al., 2018).

En la tabla 5.3.1 se mencionan las diferencias más notables entre la quitina y el quitosano.

TABLA 5.3.1: QUITINA VS. QUITOSANO

Quitina Vs. Quitosano	
Diferencias	Semejanzas
El quitosano cuenta con grupos amino.	Ambos sirven para el tratamiento de aguas.
La quitina se obtiene de la piel de los crustáceos, mientras que el quitosano se obtiene a partir de esta.	Son biopolímeros muy importantes por su función en la industria.
El quitosano es mejor para aplicaciones biotecnológicas debido a que es más soluble en agua y disolventes orgánicos.	Presentan estructuras de 6 carbonos.

**Nota: Información adaptada de (Mármol, et al., 2011), (Salas, et al., 2017), (Lárez, et al., 2019), (de la Paz, et al., 2012) & (Campo, et al., 2018).*

Es uno de los biopolímeros más estudiados en el mundo, su estructura molecular permite variadas modificaciones tanto mecánicas como químicas, de las que se pueden obtener propiedades que vislumbran un inmenso potencial de nuevos desarrollos enfocados en su gran mayoría a los biomateriales” (Giraldo, 2015).

El quitosano presenta una gran solubilidad en sustancias acuosas, una baja toxicidad, es inerte en el tracto intestinal de mamíferos, es biodegradable debido a la presencia de quitinasas distribuidas ampliamente en la naturaleza en bacterias, hongos y plantas, así como en el sistema digestivo de diversos animales (Colina, et al., 2014), en la figura 1.2 se muestra la estructura del quitosano.

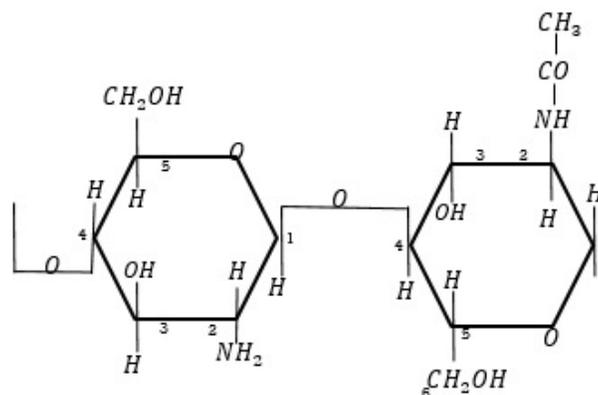


IMAGEN 5.3.1: ESTRUCTURA DEL QUITOSANO

Otro aspecto muy importante a tener en cuenta por parte del quitosano es su facilidad de pasar de un estado físico a otro, esta característica implica una serie de nuevos desarrollos en tan diferentes campos, que su futuro todavía no está escrito (Pedraza, 2015).

Después de la celulosa, la quitina y el quitosano son el segundo suministro más grande de biopolímeros naturales que se ha encontrado (Escobar, et al., 2013), por lo tanto, sus usos y aplicaciones no son limitados, en la tabla 5.3.2 se mencionan algunas áreas de oportunidad y aplicaciones de este biopolímero.

TABLA 5.3.2: ÁREAS DE OPORTUNIDAD Y APLICACIONES DEL QUITOSANO.

Usos del quitosano en la industria:	
Agricultura	<ul style="list-style-type: none"> ● Antifúngicos ● Estimulador de crecimiento ● Reduce el estrés abiótico.
Hidráulica	<ul style="list-style-type: none"> ● Biocoagulantes ● Agente descontaminante
Cosmetológica	<ul style="list-style-type: none"> ● Reducción de pérdida de agua cutánea ● Aumento de elasticidad ● Hidratante
Alimentos	<ul style="list-style-type: none"> ● Fibra dietética ● Recubrimiento

	<ul style="list-style-type: none"> • Empaque
Medicina	<ul style="list-style-type: none"> • Biomateriales • Anticoagulante

*Nota: Información adaptada de (Giraldo, 2015), (Álava, 2015) & (Reyes, et al., 2020)

5.4. Aceite de clavo

“El aceite de clavo (*Syzygium aromaticum*), es un compuesto derivado del árbol de clavo, es una especie perteneciente a la familia Myrtaceae, la cual se caracteriza por habitar en ambientes principalmente tropicales. Es originaria de Indonesia, y actualmente se cultiva en Brasil, Haití, India, Kenia, Madagascar, Malasia, Mauricio, México, Seychelles, Sri Lanka, Tanzania, entre muchos otros países. Crece en suelos ricos en humus arcillosos, así como en suelos lateríticos (propios de las regiones cálidas, pobres en sílice y altos en hierro y alúmina), profundos y sueltos” (Aguilar & López, 2013).

Tiene diversas aplicaciones entre ellas podemos encontrar su efecto antimicrobiano, gracias a esta propiedad este aceite es utilizado para tratar infecciones causadas por bacterias y en la industria alimenticia (Calapi, 2022), se utiliza en la medicina para como estímulo en problemas digestivos, como antifúngico en el área de agronomía (Barrera, 2015), citando a Vázquez, et al., 2013 “cuenta con propiedades anestésicas ya que contiene un compuesto activo que es el eugenol (4-alil-metoxifenol)”.

5.5. Aceite de tomillo

El tomillo es conocido también como *Thymus Vulgaris*, es un arbusto de la familia *Lamiaceae*, que es perenne y aromática, rica en aceite esencial, cuyo principal componente es el timol (Sartoratto, et al., 2004).

El aceite de tomillo muestra actividad antifúngica y antimicrobiana (Matiz, et al., 2015) ya que su componente mayoritario que es el 1,8-cineol en un 21.5%, seguido del B-pineno con 20% y el o-cimeno con 17.9%, así como propiedades antivirales, citotóxicas y antioxidantes (Rojas, et al. 2015). En cuanto a la

agricultura este aceite esencial también ha sido utilizado como recubrimiento ya que actúa como agente microbiano (Ordoñez, et al., 2014).

5.6. Medio Müller-Hinton

El medio de cultivo Müller-Hinton (MH), tiene presentación como agar, así como en caldo, se caracteriza por permitir el crecimiento de una gran cantidad de bacterias por los nutrientes que lo componen, es universalmente recomendado para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (Barrera & Calderón, 2016).

Se utiliza MH para el procedimiento de difusión en disco estandarizado (Matuschek, et al., 2014) y para hacer ensayos para la determinación de sensibilidad que algunas cepas aeróbicas de crecimiento rápido tienen frente a ciertos antibióticos.

En la tabla 5.6.1 se presenta la fórmula del medio MH agar presentada por Becton, Dickinson and Company.

TABLA 5.6.1: FÓRMULA MEDIO MH AGAR

Fórmula (por litro de agua purificada)	
Extracto de carne bovina	2.0 g
Hidrolizado ácido de caseína	17.5 g
Almidón	1.5 g
Agar	17.0 g
pH final= 7.3±0.2	
Nota: <i>Ajustada y/o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento.</i>	

En la tabla 5.6.2 se presenta la fórmula del medio MH broth presentada por Becton, Dickinson and Company.

TABLA 5.6.2: FÓRMULA MEDIO MH BROTH

Fórmula (por litro de agua purificada)	
Extracto de carne bovina	2.0 g

Hidrolizado ácido de caseína	17.5 g
Almidón	1.5 g
pH final= 7.3+-0.2	
Nota: <i>Ajustada y/o suplementada con sales adecuadas para proporcionar 20-25 mg/L de calcio y 10-12.5 mg/L de magnesio, así como a criterios de rendimiento.</i>	

5.7. Medio Triptona- soya

El medio Triptona-soya es un medio utilizado para el crecimiento e inoculación de ciertos microorganismos de interés, tanto el agar como el medio líquido. Tiene un muy buen valor nutritivo, es utilizado para el crecimiento y aislamiento de bacterias aeróbicas y anaeróbicas y es un muy buen medio para observar el desarrollo de un gran número de microorganismos que son exigentes (Biokar, 2018). Favorece el crecimiento de todos los microorganismos de importancia microbiológica tanto grampositivos como gramnegativos, hongos y levaduras.

En la tabla 5.7.1 se presenta la fórmula del medio TSA presentada por Becton, Dickinson and Company (Becton D. a., 2003).

TABLA 5.7.1: FÓRMULA MEDIO TSA

Fórmula (por litro de agua purificada)	
Bacto Tryptone (digerido pancreático de caseína)	15.0 g
Bacto Soytone (digerido papaico de harina de soja)	5 g
Cloruro sódico	5 g
Agar	15.0 g
pH final= 7.3+-0.2	
Nota: <i>Ajustada y/o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento.</i>	

En la tabla 5.7.2 se presenta la fórmula del medio TSB presentada por Becton, Dickinson and Company. (Becton, 2008).

TABLA 5.7.2: FÓRMULA MEDIO TSB

Fórmula (por litro de agua purificada)	
Bacto Tryptone (digerido pancreático de caseína)	15.0 g
Bacto Soytone (digerido papaico de harina de soja)	3.0 g
Cloruro sódico	5.0 g
Glucosa (dextrosa)	2.5 g
Fosfato dipotásico de hidrógeno	2.5 g
pH final= 7.3+-0.2	
Nota: <i>Ajustada y/o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento.</i>	

5.8. Tubo McFarland 0.5

En 1907 Both McFarland introdujo el primer estándar de turbidez para uso en bacteriología. Esta escala consiste en replicar la turbidez que generan las bacterias en un medio utilizando un precipitado elaborado con Cloruro de Bario y Ácido Sulfúrico, para así poder conocer un aproximado de unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro gracias a la densidad óptica. Existen 10 estándares con diferentes opacidades, los estándares de McFarland son utilizados como patrones de turbidez en la preparación de suspensiones de microorganismos (Núñez, 2017).

La manera más efectiva para comprobar si la turbidez entre el tubo patrón y el que contiene el microorganismo de interés es comparando los tubos en un fondo conformado por líneas blancas y negras dispuestas horizontalmente para que estas hagan contraste. Una suspensión bacteriana equivalente en turbidez a la turbidez estándar de 0,5 de McFarland contiene aproximadamente 108 bacterias por ml. (Apéndices, 2009).

5.9. Método bactericida y bacteriostático

Una sustancia antimicrobiana es aquella capaz de inhibir o destruir diferentes tipos de microorganismos, ya sean virus, bacterias, hongos, hasta parásitos, inhibiendo su crecimiento o destruyéndose por completo, esto se puede lograr ya sea por el método bactericida o bacteriostático. En la microbiología existen estos dos métodos para detener el crecimiento de los microorganismos, estos métodos se llevan a cabo comúnmente en pruebas de susceptibilidad in vitro, las designaciones de bacteriostático o bactericida pueden variar según el tipo de microorganismo (Cordiés, et al., 1998).

Según Paredes & Roca, (2004) los agentes antimicrobianos se comportan de diversas maneras: como bactericidas y bacteriostáticos. Como bactericidas, producen la muerte de los microorganismos responsables del proceso infeccioso. Pertenecen a este grupo los antibióticos β -lactámicos, aminoglucósidos, rifampicina, vancomicina, polimixinas, fosfomicina, quinolonas y nitrofurantoínas. Como bacteriostáticos, inhiben el crecimiento bacteriano, aunque el microorganismo permanece viable, de forma que, cuando se suspende el tratamiento, puede volver a recuperarse y multiplicarse. El hecho de que un agente sea bactericida o bacteriostático depende de su mecanismo de acción y, por tanto, de su estructura.

6. Materiales y Métodos

6.1. Preparación del medio TSA

a) Materiales

- Balanza analítica
- Frasco schott/Matraz Erlenmeyer
- Espátula
- Autoclave
- Campana de extracción
- Papel tipo parafilm
- Cajas Petri

b) Reactivos

- Medio TSA en polvo
- Agua

c) Preparación

- En la balanza analítica se pesaron 16 gr de TSA en polvo y se diluyeron en 400ml de agua, después se colocó la mezcla en un frasco schott o en su defecto un matraz con un corcho. Seguido se esterilizó en autoclave por 15 min a 121 °C y 101 Pa. Una vez listo, se dejó enfriar un poco, y en la campana de extracción, se vertió el contenido en cajas Petri estériles, gelificado el agar se taparon las cajas Petri y se refrigeró para su resguardo.

6.2. Preparación medio TSB

a) Materiales

- Balanza analítica
- Espátula
- Vaso de precipitado de 500 ml
- Autoclave
- Campana de extracción
- Tubos de ensayo de 10 ml

b) Reactivos

- Medio TSB en polvo
- Agua

c) Preparación

- En la balanza se pesaron 12 gr de TSB en polvo, estos se diluyeron en 400ml de agua en un vaso de precipitado, una vez preparado el medio se vertió el contenido en tubos de ensayo (9 ml aproximadamente por tubo), estos tubos se colocaron en autoclave y se esterilizó por 15 min a 121 °C y 101 Pa. Los tubos obtenidos con medio TSB se refrigeraron y resguardaron.

6.3. Preparación del medio Müller-Hinton agar

Materiales

- Balanza analítica
- Frasco schott/Matraz Erlenmeyer
- Espátula
- Papel tipo parafilm.
- Autoclave
- Campana de extracción
- Cajas Petri

Reactivos

- Medio MH en polvo
- Agua

Preparación

- En la balanza analítica se pesaron 14.8 gr de MH en polvo y se diluyeron en 400ml de agua. Se colocó la mezcla en un frasco schott (puede ser también en un matraz con un corcho). Seguido de esto se esterilizó en autoclave por 15 min a 121 °C y 101 Pa. Después se dejó enfriar un poco, el contenido se vació en cajas Petri estériles dentro de la campana de extracción. Una vez gelificado el agar se taparon las cajas Petri, refrigeraron y resguardaron.

6.4. Preparación del Müller-Hinton caldo

Materiales

- Balanza analítica
- Espátula
- Vaso de precipitado de 500 ml
- Autoclave
- Campana de extracción
- Tubos de ensayo de 10 ml

Reactivos

- Medio TSB en polvo
- Agua

Preparación

- En la balanza analítica se pesaron 8.8 gr de MH en polvo y se diluyeron en 400ml de agua en un vaso de precipitado. Los tubos de ensayo estaban previamente limpios y esterilizados. Después se dejaron enfriar un poco, en la campana de extracción, se vació el contenido en los tubos de ensayo (9 ml aproximadamente por tubo). Se colocaron en autoclave para esterilizar por 15 min a 121 °C y 101 Pa. Los tubos obtenidos con medio MH broth se refrigeraron y resguardaron.

6.5. Preparación del quitosano al 1%

a) Materiales

- Matraz Erlenmeyer
- Probeta
- Espátula
- Balanza analítica

b) Reactivos

- Quitosano
- Ácido acético 1%

c) Procedimiento para 200 ml de quitosano al 1%.

- Se midieron 200 ml de ácido acético al 1% en una probeta. Después se pesaron 2 g de quitosano en la balanza analítica. El quitosano se mezcló con el ácido acético.

**Para fines del experimento el quitosano se esterilizó en autoclave.*

6.6. Siembra de *S. epidermis*

Materiales

- Caja Petri con medio TSA
- Campana de extracción
- Asa
- Mechero
- Papel tipo parafilm
- Incubadora

Reactivos

- Alcohol
- *S. epidermis*

Procedimiento

- En la campana de extracción, se abrió una caja de siembra pura de *S. epidermis*. Se remojó el asa en el alcohol y se pasó por el mechero para esterilizar. Una vez que el asa estuvo fría, se tomó una muestra de *S. epidermis*. Con ayuda del asa contaminada con *S. epidermis*, se realizó un estriado por la caja Petri con TSA. La caja Petri se cerró, contaminada, y se colocó en la incubadora a una temperatura entre 32 y 35 °C por 48 horas.

6.7. Inoculación

Materiales

- Campana de extracción
- Mechero

- Asa
- Incubadora

Reactivos

- Caja Petri con siembra de *S. epidermis*
- Alcohol
- Tubo de TSB

Procedimiento

- En la campana de extracción, se abrió la caja de siembra pura de *S. epidermis*. Se remojó el asa en el alcohol y se pasó por el mechero para esterilizar. Una vez que el asa estuvo fría, se tomó una muestra de *S. epidermis*. Se introdujo el asa en el tubo con TSB. El tubo, ahora contaminado, se colocó en la incubadora a una temperatura entre 32 y 35 °C por 48 horas.

6.8. Preparación del tubo McFarland 0.5

Materiales

- Matraz Erlenmeyer
- Tubo de ensayo

Reactivos

- Ácido sulfúrico 0.18M
- Cloruro de Bario 0.048M

Procedimiento

- Para preparar 100 ml, se mezclaron en un matraz Erlenmeyer 99.5 ml de ácido sulfúrico a 0.18M y 0.5 ml de cloruro de Bario a 0.048M. El resultado de esta mezcla se pasó a un tubo de ensayo para fines del experimento.

6.9. Metodología para método Bacteriostático

Este experimento se realizó por triplicado.

Materiales

- Campana de extracción
- Mechero
- Asa
- Sensi discos de 6mm estériles
- Tubos tipo eppendorf
- Filtros milipore
- Jeringas
- Cotonetes estériles
- Micropipetas (de 100 a 1000 μ l y de 10 a 100 μ l)
- Papel tipo parafilm

Reactivos

- Alcohol
- Cajas Petri con medio MH
- Tubos de ensayo con TSB
- Siembra de *S. epidermis*
- Aceite de clavo
- Aceite de tomillo
- Quitosano al 1%
- Ácido acético
- Cloranfenicol

Procedimiento

- Se inoculó un tubo de TSB con *S. epidermis* que se dejó en la incubadora entre 32 y 48 hrs, esto hasta que alcanzó la turbidez del estándar McFarland 0.5. Previamente se esterilizaron en frío, con filtros milipore, los aceites esenciales (se recomienda reservar en tubos tipo eppendorf). Se comparó el inóculo con el tubo McFarland 0.5, cuando la turbidez fue la

misma se procedió a hacer 2 diluciones para tener una concentración de 10^6 a 10^8 logaritmos por mL. Las diluciones se hicieron con un 1 ml del inóculo. Se remojó el cotonete en el inóculo para hacer un tapete en una caja Petri con medio MH. Se colocaron 2 sensidiscos por caja. En cada sensidisco se colocaron 10 μ l de la solución a evaluar. La caja se cerró y se dejó durante 48 hrs en la incubadora a 32°C para obtener resultados.

6.10. Metodología para método Bactericida

Este experimento se realizará por triplicado.

Materiales

- Microplacas
- Tubos tipo eppendorf
- Filtros milipore
- Jeringas
- Micropipetas (de 20 a 200 μ l y de 10 a 100 μ l)

Reactivos

- Alcohol
- Medio MH agar
- Tubos de ensayo con TSB
- Siembra de *S. epidermis*
- Aceite de clavo
- Aceite de tomillo
- Quitosano al 1%
- Ácido acético

Procedimiento

- Se inoculó un tubo de TSB con *S. epidermis* que se dejó en la incubadora entre 32 y 48 hrs, esto hasta que alcanzó la turbidez de McFarland 0.5. Previamente se esterilizaron en frío, con los filtros milipore, los aceites esenciales (se recomienda reservar en tubos tipo eppendorf). Se comparó

el inóculo con el tubo McFarland 0.5, cuando la turbidez fue la misma se procedió a hacer 2 diluciones para tener una concentración de 10^6 a la 10^8 logaritmos por mL. Las diluciones se hicieron con un 1 ml del inóculo. Se preparó 5 ml de medio MH agar + aceite de tomillo, clavo o quitosano a diferentes disoluciones (50, 100, 150 y 200 ppm). En una microplaca estéril se colocaron 150 μ l del medio MH agar y 20 μ l del inóculo. La microplaca se cerró y dejó durante 48 hrs en la incubadora a 32°C para obtener resultados.

7. Resultados y Discusión

7.1. Resultados

7.1.1. Método bacteriostático

Los resultados del método bacteriostático se muestran de la tabla 7.1.1 a la 7.1.5 los cuales fueron evaluados midiendo los halos de inhibición obtenidos para los diferentes compuestos que se probaron en el presente trabajo (aceites esenciales de clavo y tomillo, quitosano 1%, ácido acético y cloranfenicol).

Como resultado el aceite esencial de clavo (tabla 7.1.1.) presentó un promedio de halo de inhibición de 13.3733 mm de diámetro, con una desviación estándar de 0.8025.

TABLA 7.1.1: RESULTADOS DEL MÉTODO BACTERIOSTÁTICO DEL CLAVO

# de repetición	Resultados de Clavo	
	Sensidisco a	Sensidisco b
5	13.17	12
6	14.44	13.33
7	13.65	13.65
	Media	13.3733333
	D. Estándar	0.80251272

En las imágenes 7.7.1, 7.1.2 y 7.1.3 se muestran visualmente los resultados obtenidos del método bacteriostático del clavo, en las tres imágenes podemos observar claramente la formación de los halos de inhibición sobre el tapete bacteriano.

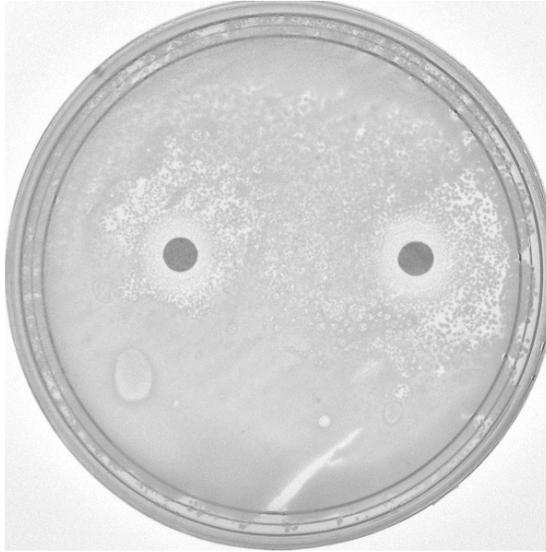


Imagen 7.1.1: Clavo (5)



IMAGEN 7.1.2: CLAVO (6)

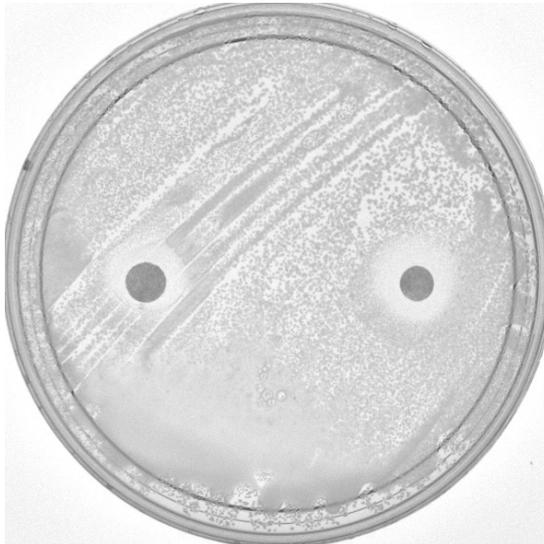


IMAGEN 7.1.3: CLAVO (7)

Para el método bacteriostático se tomó como control el cloranfenicol, que es un antibiótico que se utiliza como tratamiento contra la bacteria que se utilizó para el experimento, obteniendo halos de inhibición de 51.6 mm y una desviación estándar de 2.6 (tabla 7.1.2).

TABLA 7.1.2: RESULTADOS DEL MÉTODO BACTERIOSTÁTICO DEL CLORANFENICOL

# de repetición	Resultados de Cloranfenicol	
	Sensidisco a	Sensidisco b
5	50.49	52.86
6	55.59	52.71
7	48.36	49.18
	Media	51.6
	D. Estándar	2.69436016

De las imágenes 7.1.4 a la 7.1.6 podemos observar el efecto bacteriostático que tiene el cloranfenicol contra *S. epidermis*.

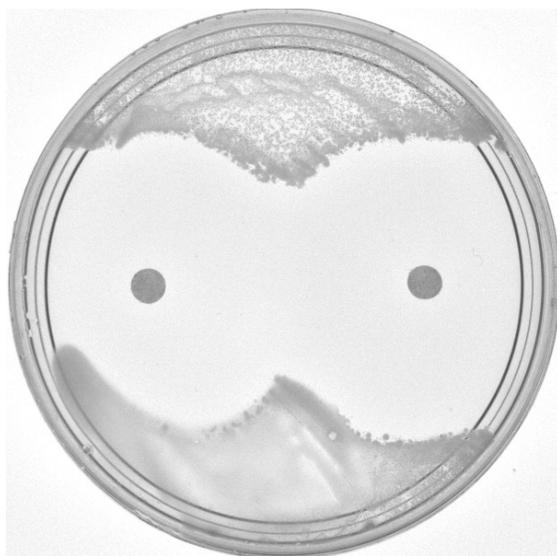


IMAGEN 7.1.4: CLORANFENICOL (5)

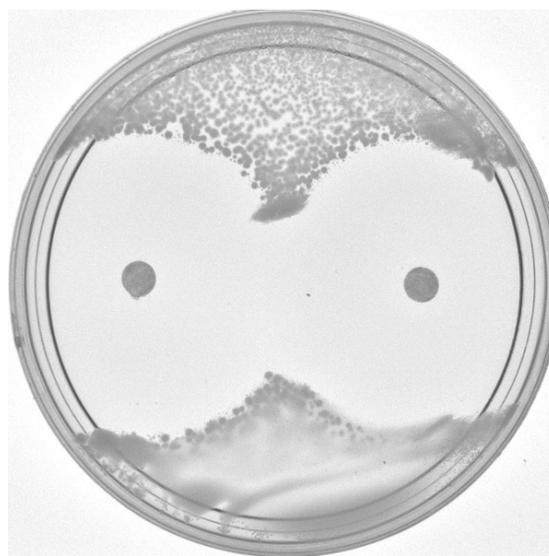


IMAGEN 7.1.5: CLORANFENICOL (6)

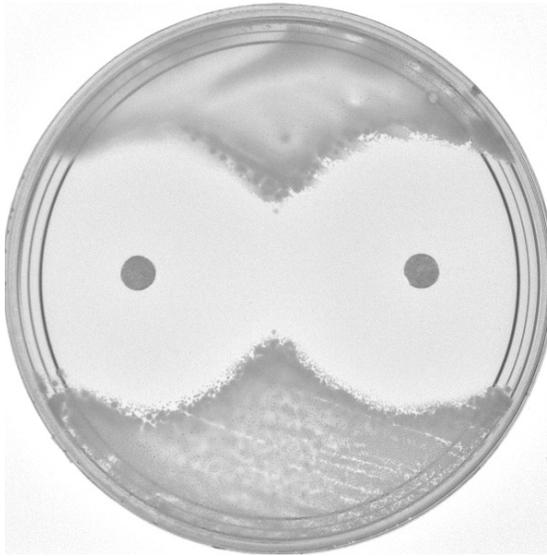


IMAGEN 7.1.6: CLORANFENICOL (7)

Observando los resultados de la tabla 7.1.3 el quitosano muestra actividad bacteriostática, con halos de inhibición con una media de 11.465 mm y una desviación estándar de 0.8939.

TABLA 7.1.3: RESULTADOS DEL MÉTODO BACTERIOSTÁTICO DEL QUITOSANO 1%

# de repetición	Datos quitosano 1%	
	Sensidisco a	Sensidisco b
5	11.19	11.69
6	12.85	12.74
7	11.24	10.64
	Media	11.465
	D. Estándar	0.8939519

Si siguiendo con las imágenes 7.1.7 a la 7.1.7 podemos observar los halos de inhibición que se describen en la tabla 7.1.3. de esta manera observamos el efecto bacteriostático del quitosano sobre la bacteria de interés.



IMAGEN 7.1.7: QUITOSANO 1% (5)

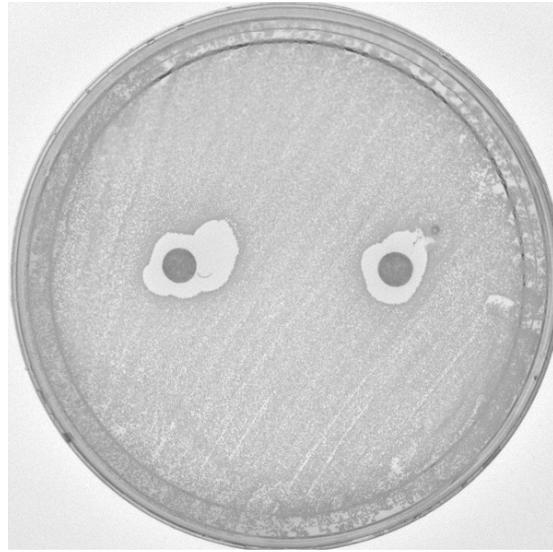


IMAGEN 7.1.8: QUITOSANO 1% (6)



IMAGEN 7.1.9: QUITOSANO 1% (7)

El aceite de tomillo (tabla 7.1.4) no presentó crecimiento bacteriano, es decir que no se observó halo de inhibición alguno para este aceite en específico.

TABLA 7.1.4: RESULTADOS DEL MÉTODO BACTERIOSTÁTICO DEL TOMILLO

# de repetición	Resultados de Tomillo	
	Sensidisco a	Sensidisco b
5	0	0
6	0	0
7	0	0
	Media	0
	D. Estándar	0

En las imágenes 7.1.10, 7.1.11 y 7.1.12, se puede ver que el tomillo no permite que *S. epidermis* presente algún tipo de reproducción bacteriana o crecimiento.

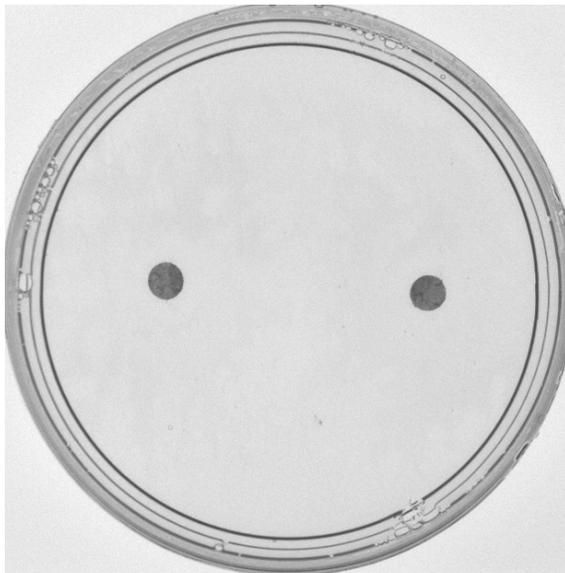


IMAGEN 7.1.10: TOMILLO (5)



IMAGEN 7.1.11: TOMILLO (6)

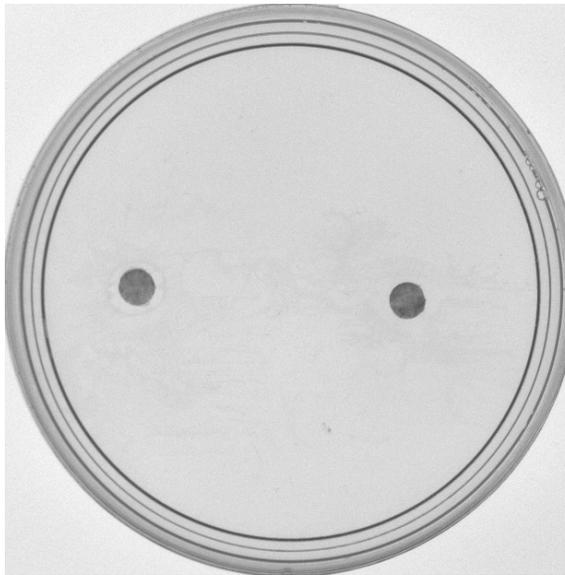


IMAGEN 7.1.12: TOMILLO

Tomando en cuenta que el quitosano fue preparado con ácido acético, se tomó como control este compuesto y viendo los resultados, el ácido acético también presenta actividad antimicrobiana en ambos métodos, los resultados se muestran en la tabla 7.1.5. muestra que la media de los halos de inhibición del ácido acético es de 9.5 mm y la desviación estándar de 1.9, mientras que en el método bactericida no hubo crecimiento bacteriano.

TABLA 7.1.5: RESULTADOS DEL CONTROL CON ÁCIDO ACÉTICO

# de repetición	Resultado de Ácido acético	
	Sensidisco a	Sensidisco b
5	10.33	10.84
6	7.46	7.46
7	8.67	12.33
	Media	9.5
	D. Estándar	1.9750519

El principal motivo para hacer un segundo control para este experimento con el ácido acético, era comprobar si este potenciaba de alguna manera el efecto del quitosano para detener el crecimiento bacteriano, y los resultados que se

presentan de las imágenes 7.1. 13 a la 7.1.15 podemos observar que efectivamente hay un halo de inhibición.

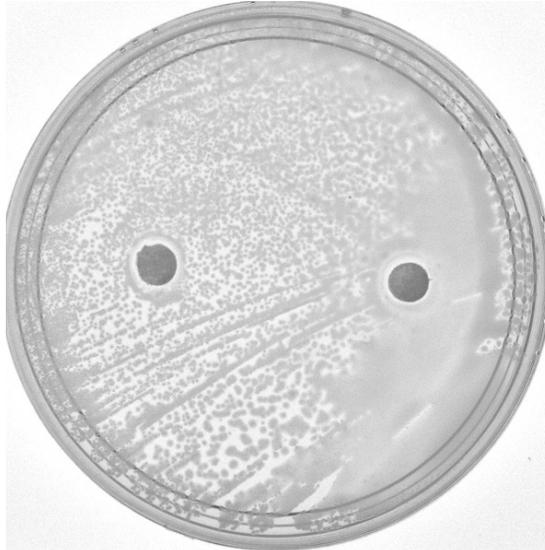


IMAGEN 7.1.13: ÁCIDO ACÉTICO (5)

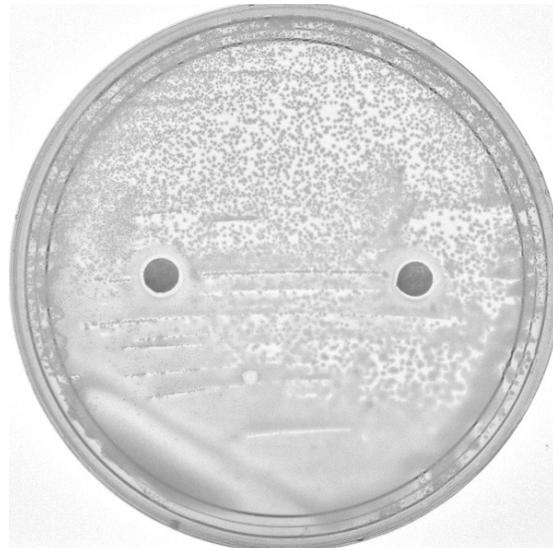


IMAGEN 7.1.14: ÁCIDO ACÉTICO (6)

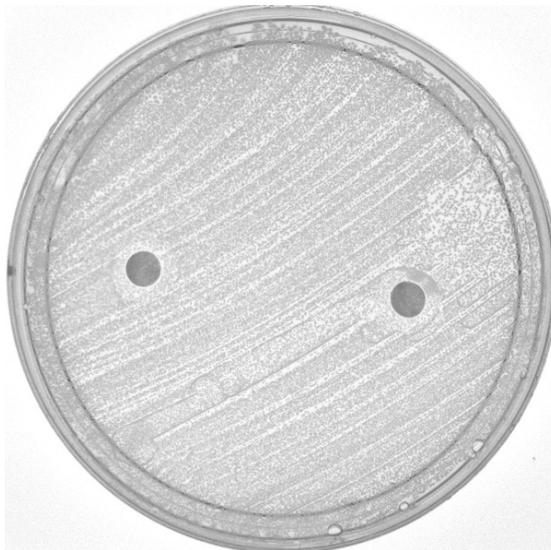


IMAGEN 7.1.15: ÁCIDO ACÉTICO (7)

7.1.2. Método bactericida

En las tablas de 7.1.6 a la 7.1.9 muestran los resultados del método bactericida contra *S. epidermis*, para este método se evaluó la ausencia o presencia de la bacteria.

Los resultados obtenidos con el quitosano nos muestran que en cuanto a la actividad bactericida no se observó crecimiento de *S. epidermis* en ninguno de los pocillos a diferentes diluciones (tabla 7.1.6).

TABLA 7.1.6: RESULTADOS DEL MÉTODO BACTERICIDA DEL QUITOSANO 1%

Resultados Quitosano 1%			
Concentración	R1	R2	R3
50 ppm	x	x	x
100 ppm	x	x	x
150 ppm	x	x	x
200 ppm	x	x	x

**Las "x" representan la ausencia de crecimiento de S. epidermis, mientras que "o" representan crecimiento*

Como se muestra en la imagen 7.1.16, el quitosano al 1%, no permitió que la bacteria de interés creciera, esto lo hace un buen agente bactericida en todas las concentraciones con las que se experimentó.

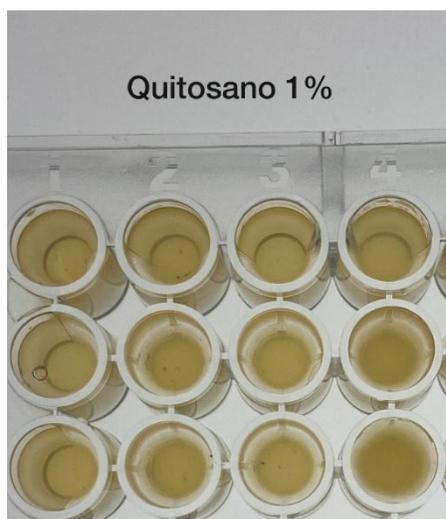


IMAGEN 7.1.16: QUITOSANO 1%

En el método bactericida el clavo no logró eliminar el crecimiento bacteriano, como se muestra en la tabla 7.1.7.

TABLA 7.1.7: RESULTADOS DEL MÉTODO BACTERICIDA DEL CLAVO

Clavo			
Concentración	R1	R2	R3
50 ppm	o	o	o
100 ppm	o	o	o
150 ppm	o	o	o
200 ppm	o	o	o

**Las "x" representan la ausencia de crecimiento de S. epidermis, mientras que "o" representan crecimiento*

En la imagen 7.1.17 se puede observar cómo en todos los pocillos, con diferentes concentraciones de clavo, hay crecimiento de *S.epidermis*. Por lo tanto podemos descartar al clavo como método bactericida.

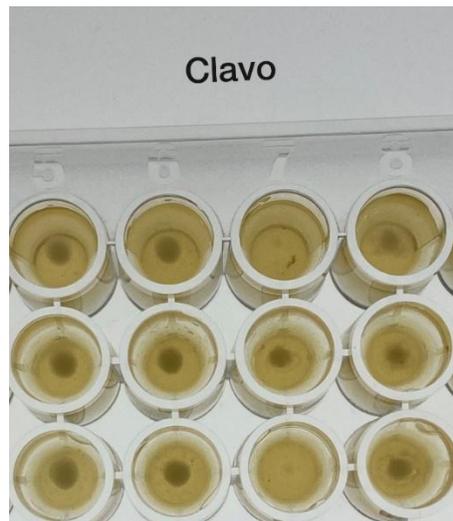


IMAGEN 7.1.17: CLAVO

El tomillo, una vez más, no permitió el crecimiento de la bacteria, como se puede observar en la tabla 7.1.8, por lo tanto podemos concluir que este aceite tiene efecto bactericida.

TABLA 7.1.8: RESULTADOS DEL MÉTODO BACTERICIDA DEL TOMILLO

Tomillo			
	R1	R2	R3
50 ppm	x	x	x
100 ppm	x	x	x
150 ppm	x	x	x
200 ppm	x	x	x

**Las "x" representan la ausencia de crecimiento de S. epidermis, mientras que "o" representan crecimiento*

Observando la imagen 7.1.18 se puede vislumbrar como no hay presencia ni crecimiento bacteriano. Por lo cual el aceite de tomillo es un agente bactericida.

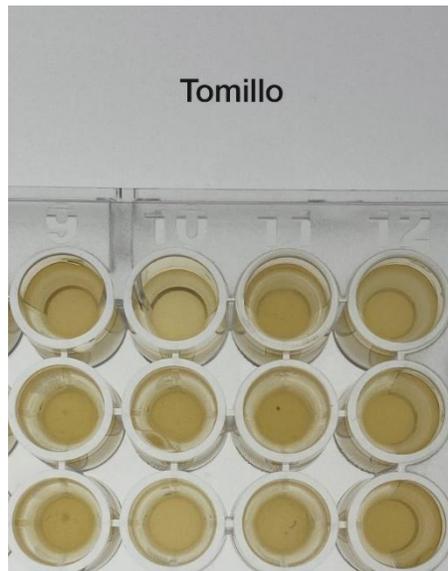


IMAGEN 7.1.18: TOMILLO

En la tabla 7.1.9 se presentan los resultados del control con ácido acético, en los cuales podemos observar que tampoco se presentó crecimiento de *S. epidermis*.

TABLA 7.1.9: RESULTADOS DEL MÉTODO BACTERICIDA DEL ÁCIDO ACÉTICO

Vinagre		
R1	R2	R3
x	x	x

**Las “x” representan la ausencia de crecimiento de S. epidermis, mientras que “o” representan crecimiento.*

Mostrando la imagen 7.1.19, podemos observar en los resultados del control, que la bacteria de interés no muestra crecimiento en ninguno de los pocillos de la microplaca, por lo tanto el vinagre si tiene capacidad bactericida.



IMAGEN 7.1.19; ÁCIDO ACÉTICO

7.2. Discusión de Resultados

Según Pastrana, et al., (2017) los aceites esenciales y sus componentes cuyas propiedades antibacterianas están evidentemente relacionadas con su carácter lipofílico, presentan un efecto antibacteriano contra las bacterias gram negativas, dado que ellas poseen una membrana externa rica en lipopolisacáridos que le proporciona una superficie hidrofílica. Se conoce de manera parcial, la composición química de las sustancias antimicrobianas de las especias; sin embargo, los componentes más comunes son los taninos, aldehídos y ácidos orgánicos. Así mismo, Yaíma, et al., (2009) demostraron concretamente que derivados fenólicos tales como el carvacrol y el eugenol provenientes de clavo y tomillo causan la desintegración de la membrana de *E. coli* y *S. typhiurium*. El eugenol, componente mayoritario del aceite de clavo de olor, actúa inhibiendo la producción de enzimas extracelulares, tales como amilasas y proteasas, lo que provoca el deterioro de la pared y un alto grado de lisis celular.

En un estudio realizado por Coy & Acosta (2013) demostraron que el aceite de tomillo tiene 30 componentes, 43% corresponden a monoterpenos no oxigenados, 40% a monoterpenos oxigenados y porcentajes más pequeños de compuestos tipo sesquiterpeno, el mismo estudio, señala que el aceite de tomillo inhibió de manera exitosa distintos tipos de bacterias Gram negativas, hasta en un 60%.

Valencia (2015) realizó una revisión literaria en la que menciona que una de las principales razones para que el quitosano posee actividad antimicrobiana es la presencia de un grupo amino con carga positiva a pH inferior a 6.3 (carbono 2) el cual interactúa con las cargas negativas de la pared celular de los microorganismos, generando un rompimiento o lisis de estas estructuras, que lleva a la pérdida de compuestos.

Según Valenzuela & Arias (2012) la actividad antibacteriana del quitosano es más compleja y difiere entre bacterias gram-positivas y gram-negativas debido a la diferente composición de la superficie celular entre ambos tipos de bacterias, los

investigadores coinciden que posee tres posibles acciones: carácter catiónico, agente quelante y penetración al interior de la célula.

Pérez, et al., (2014) obtuvieron que de las concentraciones que tienen quitosano a partes iguales a las concentraciones de ácido acético, no son tan efectivas, como aquellos, en los cuales las concentraciones de quitosano están por encima de las del ácido acético. Aunque el ácido acético no es el que ocasiona la inhibición, si juega un rol muy importante dado que a mayor concentración de ácido acético mayor es la solubilidad del polímero y la protonación de los grupos amino ($^+NH_3$).

El modo de acción del cloranfenicol es que inhibe la síntesis proteica de las bacterias, en un fragmento extraído de un artículo escrito por Clavo & Martínez (2009), se expone la manera en que este medicamento funciona que es que los ribosomas bacterianos están formados por dos subunidades (30S y 50S) aquí diferentes componentes pueden ser lugares de unión para los antimicrobianos, proteínas L para el caso del cloranfenicol, La mayoría de los antibióticos de este grupo tienen actividad bacteriostática, aunque los aminoglucósidos se comportan como bactericidas. La acción bactericida o bacteriostática también va a depender de las concentraciones del antimicrobiano, y del microorganismo afectado. Cordiés, et al. (1998) mencionan que el cloranfenicol puede inhibir la síntesis de las proteínas en las bacterias, este antibiótico se une a los ribosomas bacterianos y bloquean la acción del RNA mensajero, este bloqueo en ocasiones es reversible.

8. Conclusión

En las pruebas bacteriostáticas, el aceite de clavo, el quitosano al 1% y el ácido acético mostraron halos de inhibición mostrando que estos compuestos si detuvieron el crecimiento de *Staphylococcus epidermis*, el aceite de tomillo no mostró crecimiento bacteriano en ninguna de las repeticiones realizadas.

Para el método bactericida el aceite de tomillo, el quitosano al 1% y el ácido acético erradicaron la bacteria en las 3 diferentes concentraciones que se utilizaron para evaluar esta capacidad, mientras que el aceite de clavo no mostró capacidad bactericida.

De igual manera, podemos concluir que el ácido acético que se utiliza en la elaboración del quitosano ayuda a este en su efecto antimicrobiano, el quitosano por sí solo también presentó propiedades antimicrobianas que ayudan a eliminar y detener el crecimiento de *S. epidermis*.

Gracias a este trabajo de investigación podemos ver las nuevas alternativas para el manejo de infecciones por bacterias, el uso de biopolímeros como el quitosano es un campo muy novedoso y con ayuda de los avances tecnológicos, cada vez se encuentran más aplicaciones para este.

Referencias Bibliográficas

- Lárez Velásquez, C., Rojas Pirela, M., Chirinos, A., & Rojas Avelizapa, L. (2019). Nuevos Retos En Agricultura Para Los Biopolímeros De Quitina Y Quitosano. Parete 1: Efectos Beneficiosos Para Los Cultivos. *Revista Iberoamericana De Polímeros Y Materiales* , 118-136.
- Aguilar González, A. E., & López Malo, A. (2013). Extractos Y Aceite Esencial Del Clavo De Olor (*Syzygium Aromaticum*) Y Su Potencial Aplicación Como Agentes Antimicrobianos En Alimentos. *Temas Selectos De Ingeniería De Alimentos* 7 , 35-41.
- Álava, J. M. (julio de 2015). Aplicación de quitosano como biocoagulante en aguas residuales contaminadas con hidrocarburos. *Enfoque UTE*, 6(3), 52-64. Recuperado el noviembre de 2022, de <https://doi.org/10.29019/enfoqueute.v6n3.69>
- Alcántara Campos , J. C., & Vilaseca Morera , F. (2017). Quitina Nanocristalina Para Tratamiento De Aguas Residuales. *UCV - SCIENTIA*, 72-73.
- Apendices. (2009). *Medicina Y Laboratorio*, 15(11-12), 557-560. Acceso en 14 De Marzo De 2023, Disponible En <https://www.medigraphic.com/Pdfs/medlab/myl-2009/myl0911-12d.pdf>
- Barrera Guarderas, J. F., & Calderón Racines, M. D. (2016). *Evaluación De La Eficacia De Una Intervención Administrativa Sobre Los Procesos De Preparación Del Agar Mueller Hinton En El Hospital General De Las Fuerzas Armadas Del Ecuador Y En El Hospital Pablo Arturo Suárez*. Instituto Superior De Postgrado, Postgrado De Patología Clínica: Quito: UCE.

- Barrera, J. J. (2015). *Alternativas Con Extractos Vegetales Y Aceite De Clavo Para El Control De Ojo De Gallo (Basidiomycete) En El Cultivo De Café (Coffea Arabica)*. Sistematización de proyectos de extensión universitaria, 109.
- Becton, D. A. (Agosto De 2003). BD Tryptic Soy Agar. Heidelberg, Alemania. Acceso en 8 De Marzo De 2023, Disponible en <https://legacy.bd.com/europe/regulatory/assets/ifu/hb/ce/ba/es-ba-256665.pdf>
- Becton, D. A. (Febrero De 2008). BD Tryptic Soy Broth (TSB). Heidelberg, Alemania. Acceso en 8 De Marzo De 2023, Disponible en <https://legacy.bd.com/europe/regulatory/assets/ifu/hb/ce/ba/es-ba-257107.pdf>
- Becton, D. A. (Febrero De 2017). Instrucciones de uso –medios en placa listos para usar. Heidelberg, Alemania. Acceso en 8 de marzo de 2023, Disponible en <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8774#:~:Text=Muller%20Hinton%20Agar%20es%20un,Ej.%2C%20Pseudomonas%20spp>.
- Biokar. (Enero De 2018). Trypto-casein soy (TSA) agar. Beauvais, Francia. Acceso en 8 De Marzo De 2023, Disponible en https://www.bioser.com/wp-content/uploads/2022/05/TDS_TRYPTO-CAS EINE-SOJA-AGAR_BK047_BM017_049_050_Env11.pdf
- Britania, L. (2018). Tripteina Soya Agar. Caba, Argentina. Acceso en 8 De Marzo De 2023, Disponible en [file:///C:/Users/Arypr/Downloads/Agar%20TSA%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Arypr/Downloads/Agar%20TSA%20(1).pdf)
- Cáceres Espitia, J. J., Caycedo Lozano, L., & Trujillo Suárez, D. M. (2022). Efecto bactericida del ácido acético presente en el vinagre, una alternativa a desinfectantes sintéticos o químicos. Revisión sistemática. *Revista Boletín Redipe*, 11(1), 440-451. Acceso en 18 De Marzo De 2023, Disponible en <https://doi.org/10.36260/Rbr.V11i1.1653>

- Calapi, M. (2022). *Elaboración De Un Acabado Antimicrobiano Mediante El Proceso De Micro Encapsulado Aplicando Aceite De Clavo De Olor (Syzygium Aromaticum) En Medias Tobilleras Lisas De 100% Algodón* . [Tesis De Pregrado, Universidad Técnica Del Norte].
- Campo Vera, Y., Delgado, M. A., Yuly, R., Mora, G., & Carreño Ortiz, J. (2018). Evaluación Preliminar Del Efecto Del Quitosano Y Cáscara De Naranja En La Coagulación-Floculación De Aguas Residuales. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* , 565-572.
- Clavo, J., & Martínez Martínez , L. (2009). Mecanismos De Acción De Los Antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 27(1), 44-52. Acceso en 19 De Marzo De 2023, Disponible en <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-S0213005X08000177>
- Colina, M., Andrés , A., Rincón, D., Molina, J., Medina, J., Ynciarte, R., . . . Montilla, B. (2014). Evaluación de los procesos para la obtención química de quitina y quitosano a partir de desechos de cangrejos. Escala piloto e industrial. *Revista Iberoamericana De Polímeros*, 21-43.
- Cordiés Jackson, L., Manchado Reyes, L. A., & Hamilton Cordiés, M. L. (1998). Principios Generales De La Terapéutica Antimicrobiana. *Acta médica*, 13-27. Acceso en 14 De Marzo De 2023, Disponible en <https://docs.bvsalud.org/Biblioref/2022/06/20291/Principios-Generales-De-La-Terapeutica.Pdf>
- Coy Barrera, C. A., & Acosta, G. E. (2013). Actividad Antibacteriana Y Determinación De La Composición Química De Los Aceites Esenciales De Romero (*Rosmarinus officinalis*), Tomillo (*Thymus vulgaris*) Y Cúrcuma (*Curcuma Longa*) De Colombia. *Revista Cubana De Plantas Medicinales.*, 18(2), 237-246. Acceso en 17 De Marzo De 2023, Disponible en <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v18n2/pla07213.pdf>

- De La Paz, N., Fernández, M., López, O. D., Nogueira, A., García, C. M., Perez, D., . . . Díaz, Y. (2012). Optimización del proceso de obtención de quitosano derivada de la quitina de langosta. *Revista Iberoamericana De Polímeros* , 103-116.
- Ebrahimzadeh Namvar, A., Bastarahang, S., Abbasi, N., Sheikhi Ghehi, G., Farhadbakhtarian, S., Arez, P., . . . Ganji Chermahin, S. (2014). Clinical Characteristics Of Staphylococcus Epidermidis: A Systematic Review. *GMS Hygiene And Infection Control*, 9(3), 1-10. Acceso en 19 De Marzo De 2023, Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4184040/pdf/HIC-09-23.pdf>
- Escobar Sierra, D. M., Ossa Orozco, C. P., Quintana, M. A., & Ospina, W. A. (Abril De 2013). Optimización De Un Protocolo De Extracción De Quitina Y Quitosano Desde Caparazones De Crustáceos. *Scientia Et Technica*, 260-266.
- Espinosa Cavazos, K. G., Sáenz Galindo, A., & Castañeda Facio, A. O. (17 de enero de 2020). Películas De Quitosano Propiedades Y Aplicaciones. Saltillo, Coahuila, México.
- Garcia Apac, C., Pardo Valdespino, J., & Seas Ramos , C. (2003). Bacteremia Por Staphylococcus Epidermidis Y Absceso De Partes Blandas En Un Paciente Post Operado: Reporte De Un Caso. *Revista Médica Hered*, 221-223.
- Giraldo, J. D. (2015). Propiedades, obtención, caracterización y aplicaciones del quitosano. Medellín, Colombia.
- Granados, C., Yáñez, X., Acevedo, D. (2014). Evaluación De La Actividad Antioxidante Del Aceite Esencial Foliar De Myrcianthes Leucoxylla De Norte De Santander (Colombia). *Información Tecnológica*, 25(3), 11-16. Acceso en 17 de marzo de 2023, Disponible en https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642014

000300003#:~:Text=Se%20evalu%C3%B3%20la%20capacidad%20antioxidante,Los%20antioxidantes%20artificiales%20en%20alimentos.

INEGI. (2009). Censo Económico. México.

Macfarland, B. (1907). The Nephelometer: An Instrument For Estimating The Number Of Bacteria In Suspensions Used For Calculating The Opsonic Index And For Vaccines. Acceso en 13 De Marzo De 2023

Mármol, Z., Páez , G., Rincón, M., Araujo, K., Aiello, C., Chandler, C., & Gutierrez, E. (2011). Quitina Y Quitosano Polímeros Amigables. Una Revisión A Sus Aplicaciones. *Revista Tecnocientífica URU*, 53-58.

Matiz Melo, G. E., Fuentes López, K., & León Méndez, G. (2015). Microencapsulación De Aceite Esencial De Tomillo (*Thymus vulgaris*) En Matrices Poliméricas De Almidón De Ñame (*Dioscorea Rotundata*) Modificado. *Revista Colombiana De Ciencias Químico - Farmacéuticas*, 189-207. Acceso en 26 De Enero De 2023

Matuschek, E., Brown, D., & Kahlmeter, G. (Abril De 2014). Development Of The EUCAST Disk Diffusion Antimicrobial Susceptibility Testing Method And Its Implementation In Routine Microbiology Laboratories. *Clinical Microbiology And Infection*, 255-266. Acceso en 2 de febrero de 2023, Disponible en <https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/action/showpdf?pii=S1198-743X%2814%2960298-6>

Montero-Recalde, M., Mira, J., Avilés-Esquivel, D., Pazmiño-Miranda, P., & Erazo-Gutiérrez, R. (2018). Eficacia Antimicrobiana Del Aceite Esencial De Tomillo (*Thymus vulgaris*) Sobre Una Cepa De Staphylococcus Aureus. *Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 588-593. Acceso en 26 De Enero De 2023

Moreno, E., Alfaro, R., Guzmán, V. S., Rimaycuna, J., & Cruz, G. J. (S.D.). Efecto De La Reducción Del Peso Molecular De Quitosano Obtenido De Plumas De Pota (*Dosidicus Gigas*) Utilizando Dos Métodos De Despolimerización Sobre Su Capacidad Antimicrobiana. *Revista De Investigación Científica*,

13(1), 25-33. Acceso en 18 De Marzo De 2023, Disponible en <File:///C:/Users/Arypr/Downloads/43-442-1-PB.Pdf>

Núñez, J. E. (Septiembre de 2017). Determinación De La Correlación Entre Métodos Visuales, Ópticos Y Difusión En Placa En El Crecimiento De Escherichia Coli. Ambato, Ecuador: UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO. Acceso en 13 De Marzo De 2023, Disponible en <Https://Repositorio.Uta.Edu.Ec/Bitstream/123456789/26334/1/BQ%20135.Pdf>

Núñez, K. (Septiembre de 2010). Correlación De Suspensiones Estandarizadas De Microorganismos Por El Método Turbidimetrico Vs Escala De Mcfarland. León, Nicaragua. Acceso en 13 De Marzo De 2023, Disponible en <Http://Riul.Unanleon.Edu.Ni:8080/Jspui/Bitstream/123456789/895/1/216220.Pdf>

Ordoñez Bolaños, D. Y., Zuñiga Camacho, D., Hoyos Concha, J. L., Mosquera Sánchez, S. A., & Mosquera Sánchez, L. P. (2014). Efecto De Recubrimiento De Almidón De Yuca Modificado Y Aceite De Tomillo Aplicado Al Pimiento (*Capsicum annuum*). *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas*, 5(5), 795-805. Acceso en 24 De Enero De 2023

Ortega Peña, S., & Franco Cendejas, R. (Septiembre de 2014). Importancia Médica Del Biofilm De *Staphylococcus epidermidis* En Las Infecciones De Prótesis Articular. México.

Osorio, M. R., Matiz, G., Atencia, M., Herazzo, J., & Camacho, F. (2012). Diseño Y Evaluación In Vivo De Fórmulas Para Acné Basadas En Aceites Esenciales De Naranja (*Citrus sinensis*), Albahaca (*Ocimum basilicum L*) Y Ácido Acético. *Biomédica*, 32(1), 125-133. Acceso en 18 De Marzo De 2023, Disponible en Http://Www.Scielo.Org.Co/SciELO.Php?Script=Sci_Arttext&Pid=S0120-41572012000100014

- Paredes, F., & Roca, J. J. (2004). Acción De Los Antibióticos: Perspectiva De La Medicación Antimicrobiana. *OFFARM*, 23(4), 117. Acceso en 14 De Marzo De 2023, Disponible en <https://www.Elsevier.Es/Es-Revista-Offarm-4-Pdf-13059414>
- Pastrana Puche, Y. I., Durango Villadiego, A. M., Acevedo Correa, D. (2017). Efecto antimicrobiano del clavo y la canela sobre patógenos. *Bioteología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, 15(1), 56-65. Acceso en 17 De Marzo De 2023, Disponible en [Http://www.Scielo.Org.Co/Pdf/Bsaa/V15n1/V15n1a07.Pdf](http://www.Scielo.Org.Co/Pdf/Bsaa/V15n1/V15n1a07.Pdf)
- Pedraza, J. D. (27 De Mayo de 2015). Un futuro para la quitina y el quitosano.
- Pérez Cordero, A., Rojas Sierra, J., Rodríguez Ruiz, J., Arrieta Alvarez, I., Arrieta Alvarez, Y., & Rodríguez Carrascal, A. (2014). Actividad Antibacteriana De Soluciones Acidas De Quitosano Obtenido De Exoesqueleto De Camarón. *Revista Colombiana De Bioteología*, 16(1), 104-110. Acceso en 19 De Marzo De 2023, Disponible en [Http://www.Scielo.Org.Co/SciELO.Php?Script=Sci_Arttext&Pid=S0123-34752014000100013](http://www.Scielo.Org.Co/SciELO.Php?Script=Sci_Arttext&Pid=S0123-34752014000100013).
- Reyes Pérez, Juan José, Rivero Herrada, Marisol, García Bustamante, Erick Leonardo, Beltran Morales, Félix Alfredo, Ruiz Espinoza, Francisco Higinio. (2020). Aplicación de quitosano incrementa la emergencia, crecimiento y rendimiento del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum L.*) en condiciones de invernadero. *Biotecnia*, 22(3), 156-163. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v22i3.1338>.
- Rojas Armas, J., Ortiz Sánchez, J., Jáuregui Maldonado, J., Ruiz Quiroz, J., & Almonacid Román, R. (2015). Aceite Esencial De Thymus Vulgaris L (Tomillo), Su Combinación Con EDTA Contra Cándida Albicans Y Formulación De Una Crema. *Anales De La Facultad De Medicina*, 235-240. Acceso en 24 De Enero De 2023

- Salas Ovilla, R., Gálvez López, D., & Rosas Quijano, R. (10 de Octubre de 2017). La quitina: lo mejor de los desechos marinos. Nuevo León, Monterrey, México. Acceso en 7 De Marzo De 2023
- Sartoratto , A., Manchado, A., Delarmelina, C., Figueira, G., Duarte, M., & Rehder, V. (2004). Composition And Antimicrobial Activity Of Essential Oils From Aromatic Plants Used In Brazil. *Brazilian J Microbiol*, 275-280. Acceso en 24 de Enero De 2023
- SIAP, S. D. (2014). *Servicio De Información Agroalimentaria Y Pesquera (SIAP)*. Acceso en 7 De Marzo De 2023, Disponible en Servicio De Información Agroalimentaria Y Pesquera (SIAP): <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-pesquera>
- Uçkay, I., Harbarth, S., Pittet, D., Hoffmeyer, P., Emonet, S., Lübbecke, A., & Ferry, T. (Noviembre de 2011). Meticillin Resistance In Orthopaedic Coagulase-Negative Staphylococcal Infections. *Journal Of Hospital Infection*, 248-253.
- Valencia, G. A. (2015). Efecto antimicrobiano del quitosano: una revisión de la literatura. *Scientia Agroalimentaria*, 2, 32-38. Acceso en 18 De Marzo De 2023, Disponible en <https://revistas.ut.edu.co/index.php/scientiaagro/article/view/743/579>
- Valenzuela V, C., & Arias, J. I. (2012). Potenciales Aplicaciones De Películas De Quitosano En Alimentos De Origen Animal: Una Revisión. *Avances En Ciencias Veterinarias*, 27(1), 33-47. Acceso en 18 De Marzo De 2023, Disponible en <https://revistateoria.uchile.cl/index.php/ACV/article/view/21997/23317>
- Vázquez, G., Castro, T., Hernández, A., Castro, J., & De Lara, R. (2013). Comparación Del Efecto Anestésico Del Aceite De Clavo, Solución Salina Y Solución Coloidal En Juveniles De *Chirostoma Jordani* (Woolman, 1894). *Archivos De Medicina Veterinaria*, 59-66.
- Yaíma, S., 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. Acceso en 17 de marzo de 2023, Disponible en Http://Scielo.Sld.Cu/Scielo.Php?Script=Sci_Arttext&Pid=S1010-2752200900100006