

Universidad Internacional de las Américas

Carrera de Farmacia

Estudio de la capacidad antibacteriana del aceite esencial de *Salvia officinalis* obtenido por el método de hidrodestilación contra *Staphylococcus aureus*.

Tesis para optar por el grado de Licenciatura

Eva Raquel Blanco Ureña

Tutor:

Dr. Honorio Pérez

Lector:

Dr. Enrique Pacheco Ovares

San José, Costa Rica,

2017

Declaración Jurada

Yo, Eva Raquel Blanco Ureña portadora de la cédula de identidad no. 3 0468 0795; conocedora de las sanciones legales con que la Ley Penal de la República de Costa Rica castiga el falso testimonio.

Declaro bajo la fe de juramento lo siguiente: Que soy estudiante de la carrera de Farmacia de la Universidad Internacional de las Américas y como requisito de graduación debo defender mi tesis para optar por el grado académico de Licenciatura, titulada: “Estudio de la capacidad antibacteriana del aceite esencial de *Salvia officinalis* obtenido por el método de hidrodestilación contra *Staphylococcus aureus*”.

La misma es de mi autoría y no contiene copia parcial ni total de ningún documento anterior y está elaborada siguiendo las disposiciones exigidas por la Universidad.

Además, declaro solemnemente que dicha tesis es fruto de mi esfuerzo e investigación en su totalidad, que en ella no han participado personas ajenas a mi tutor y lector, instituciones ni organizaciones extrañas.



Firmo en la ciudad de San José el viernes 11 de agosto del 2017

Carta del Director de Tesis

San José, viernes 11 de agosto, 2017

Natalia Bastos

Directora de la Carrera de Farmacia

Universidad Internacional de la Américas

Estimada señora:

La estudiante Eva Raquel Blanco Urefia, portadora de la cédula no. 304680795, ha presentado para revisión el tema de Tesis denominado: “Estudio de la capacidad antibacteriana del aceite esencial de *Salvia officinalis* obtenido por el método de hidrodestilación contra *Staphylococcus aureus*”.

En realidad de Tutor, se ha revisado y corregido todos los aspectos referentes a este documento.

Por lo tanto, se hace constar, que se encuentra listo para ser presentado a la Universidad Internacional de las Américas como Tesis.

Atentamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'LP', is written over a horizontal line. The signature is stylized and cursive.

Honorio Pérez

Tutor

Carta del Lector de Tesis

San José, el viernes 11 de agosto de 2017

Natalia Bastos

Directora de la Carrera de Farmacia

Universidad Internacional de la Américas

Estimada Señora Natalia Bastos:

Sirva la presente para saludarla y hacer de su conocimiento mi aprobación en calidad de lector, del trabajo realizado por Eva Raquel Blanco Ureña, portador de la cédula no. 304680795, en su Tesis titulada: “Estudio de la capacidad antibacteriana del aceite esencial de *Salvia officinalis* obtenido por el método de hidrodestilación contra *Staphylococcus aureus*”

Hago constar, que se ha revisado y corregido todos los aspectos referentes a este documento, por lo que manifiesto que el mismo se encuentra listo para ser presentado a la Universidad Internacional de las Américas como Tesis.

Atentamente,



Dr. Enrique Pacheco Ovarés

Lector

Carta de la directora de Carrera

San José el viernes 11 de agosto de 2017

Señores

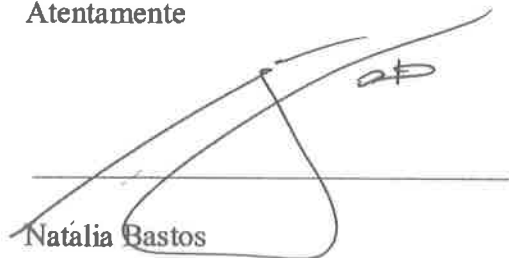
Universidad Internacional de la Américas

Estimados señores:

La suscrita Natalia Bastos, directora de la Carrera de Farmacia, hace constar que ha revisado la Tesis de la estudiante Eva Raquel Blanco Ureña, que ha Titulado: “Estudio de la capacidad antibacteriana del aceite esencial de *Salvia officinalis* obtenido por el método de hidrodestilación contra *Staphylococcus aureus*”.

La mencionada Tesis, responde a los requisitos exigidos en la Guía que nuestra carrera tiene para estos casos. Por tanto, se autoriza a los autores para que lo presente ante el tribunal examinador nombrado para esta ocasión.

Atentamente



Natalia Bastos

Directora de Carrera

Licda. Marianita Devandas A.

Filóloga

naturalspanish@gmail.com - celular 83882070 -@revisiendetesis

San José, 21 de julio de 2017

Señora
Natalia Bastos
Directora de la Carrera de Farmacia
Universidad Internacional de las Américas

Estimada señora:

Hago de su conocimiento que he recibido de Eva Raquel Blanco Ureña, el documento que lleva por título *Estudio de la capacidad antibacteriana del aceite esencial de Salvia officinalis obtenido por el método de hidrodestilación contra Staphylococcus aureus*, para su corrección filológica.

He procedido a revisar los aspectos de forma, en cuanto a redacción, estilo y otros vicios de lenguaje que se pudieran trasladar al texto.

Una vez comprobadas las correcciones, expido esta carta de aprobación para lo que corresponda.

Atentamente,


Licda. Marianita Devandas A.

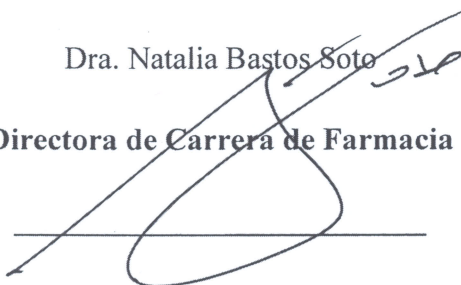
Carné 011009

Tribunal Examinador

Este trabajo de Graduación fue aprobado por el Tribunal examinador de la carrera de Farmacia de la Universidad Internacional de las Américas, como requisito para optar por el grado de Licenciatura en Farmacia.

Dra. Natalia Bastos Soto

Directora de Carrera de Farmacia



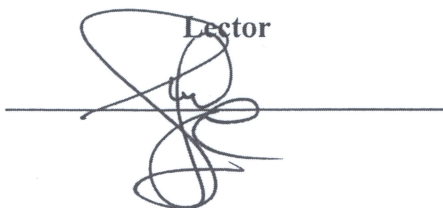
Dr. Honorio Pérez Martínez

Director de Tesis



Dr. Enrique Pacheco Ovarés

Lector



San José, 18 de julio del 2017

Dra. Natalia Bastos Soto
Directora de la Carrera de Farmacia.
Universidad internacional de las Américas.

Estimada Dra. Natalia Bastos.

Sirva la presente para saludarle muy cordialmente y a la vez notificarle que el trabajo de investigación "Estudio de la capacidad antibacteriana del aceite esencial de *Salvia officinalis* obtenido por el método de Hidrodestilación contra *Staphylococcus aureus*", de la sustentante Eva Raquel Blanco Ureña, portadora de la cédula de identidad número 3 0468 0795 de la carrera de Farmacia que será defendida el día 11 de agosto del 2017, está aprobado por mi persona, según consta en esta evaluación.


A mi criterio como tutor, está aprobado porque el estudiante ha demostrado responsabilidad y puntualidad con todos los aspectos.

A continuación, especifico las puntuaciones:

	Rubro	Valor	Nota
1	Cumplimiento de entrega de avance	20%	20%
2	Coherencia entre los objetivos, los instrumentos aplicados y los resultados de la investigación	30%	30%
3	Relevancia de las conclusiones y recomendaciones	25%	25%
4	Calidad y detalle del marco teórico	25%	25%
	TOTAL	100%	100%

Esto es en base al artículo e, del artículo 56 sobre los procesos de ejecución del trabajo de graduación del REGLAMENTO ACADÉMICO DE LA UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS AMÉRICAS.

Atendiendo la atención a la presente, me despido.


Doctor Honorio Pérez Martínez
Cédula 8 0093 0314
Teléfono 8701 0317

Pensamiento

“Aprende como si fueras a vivir toda la vida, y vive como si fueras a morir
mañana”

(Charlie Chaplin)

Agradecimiento

Agradezco primeramente a Dios, por darme la salud y fortaleza para la realización de este trabajo; a mis papás por su apoyo incondicional, confianza y disposición a lo largo de mis años de estudio, ambos son un ejemplo a seguir para mí; a mis hermanos y mis tías por siempre transmitirme su confianza y a Pedro Leiva, mi novio, por acompañarme y darme una palabra de aliento en todo momento.

Quiero agradecer a la Universidad Internacional de las Américas que me dio las herramientas necesarias para crecer como profesional, a mis profesores por participar en mi formación al proporcionarme sus conocimientos, y a mi director de tesis el doctor Honorio Pérez por su paciencia, valiosa orientación y apoyo para seguir este camino de tesis y llegar a su conclusión; por haber confiado en mí y ayudarme con este trabajo.

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo a Dios, por nunca abandonarme y guiarme a través de estos años, ya que fue Él, quien me dio la fuerza y sabiduría para llevar a cabo mi carrera.

A mi papá, Luis Blanco, por velar por mi educación y siempre brindarme su ayuda en todo. A mi mamá Genoveva Ureña, por brindarme siempre su apoyo para seguir adelante y nunca rendirme, a mis hermanos Mariano Blanco e Isaac Blanco por siempre estar conmigo en todos estos años, y a mi novio Pedro por ser mi soporte en los momentos más difíciles.

A todos ellos le agradezco profundamente su confianza, paciencia, amor y ayuda para poder llegar hoy a esta meta tan importante, como es concluir mis años de estudio.

CONTENIDO

CONTENIDO DE ILUSTRACIONES.....	16
CONTENIDO DE TABLAS	19
RESUMEN	20
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	21
Planteamiento del problema.....	21
Hipótesis de investigación	22
Objetivos	22
Objetivo general.....	22
Objetivos específicos.....	22
Justificación	22
Antecedentes	24
Internacionales.....	25
Nacionales	28
Proyecciones del estudio.....	29
Limitaciones.....	30
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	31
Sección I. <i>Salvia officinalis</i>	31
Aceites esenciales	33
Clasificación de los aceites esenciales	34
Consistencia	35
Origen.....	35
Naturaleza química.....	36

	12
Uso	36
<i>Salvia officinalis</i>	36
Clasificación científica.....	36
Descripción botánica.....	37
Hábitat.....	39
Cultivo y cosecha	39
Partes medicinales de la planta.....	41
Usos medicinales.....	41
Análisis químico.....	43
Grupos químicos de importancia presentes en <i>S. officinalis</i>	44
Actividad biológica	48
Toxicidad del aceite esencial.....	49
Sección II. Extracción vegetal	49
Extracción hidrodestilación.....	51
Técnicas de identificación química del aceite esencial de <i>S. officinalis</i>	52
Sección II. Microbiología	53
Introducción a la microbiología	53
Medios de cultivo	55
<i>Staphylococcus aureus</i>	59
Enfermedad estafilocócica.....	60
Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	64
Pruebas diagnósticas de laboratorio.....	64
Concentración mínima inhibitoria (CMI)	67
Sección III. Forma farmacéutica.....	69
Definición de la piel.....	69

	13
Embriogenia	69
Flora normal de la piel	71
Forma farmacéutica	72
Formas farmacéuticas semisólidas	72
Vía de administración tópica.	73
Cutánea.....	73
Ocular.....	74
Ventajas.....	74
Desventajas.....	74
Antisépticos.....	74
Cremigel antibacteriano.	75
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO.....	77
Enfoque.....	77
Diseño	77
Variables de la investigación	78
Procedimiento de recolección y análisis de datos.....	81
Materiales y métodos para la recolección de los datos	81
Obtención del aceite esencial de <i>Salvia officinalis</i> por el método de hidrodestilación.....	81
Pruebas de coloración.....	83
Identificación de cetonas combinación bisulfítica	83
Formulación de cremigel antibacteriano que incluya en su composición el aceite esencial del <i>Salvia officinalis</i>	89
Presupuesto	91
Cronograma.....	92
CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	97

Variable I. Verificar el rendimiento teórico de la técnica de extracción por hidrodestilación del aceite esencial de <i>Salvia officinalis</i>	97
Variable II. Evaluar la capacidad antibacteriana del aceite esencial de <i>S. officinalis</i> por medio de la técnica de difusión en agar.	105
Prueba de sensibilidad antibiótica para medir la capacidad antibacteriana del aceite esencial de <i>Salvia officinalis</i> y comparación con antimicrobianos sensibles a <i>S. aureus</i>	107
Variable III. Identificar a través del análisis de espectrofotometría de masas y ensayos fitoquímicos el contenido de compuestos químicos que poseen efecto antibacteriano presentes en el aceite esencial de <i>S. officinalis</i>	120
Análisis de espectrofotometría de masas.	120
Ensayos fitoquímicos.	123
Variable IV. Formulación de un cremigel antibacteriano que incluya en su composición el aceite esencial de la <i>Salvia officinalis</i>	124
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	129
Conclusiones	129
Recomendaciones	130
REFERENCIAS	132
APÉNDICES	136
Apéndice A	136
Apéndice B.....	136
Formula Media Aritmética	136
Apéndice C.....	137
Formula Varianza.....	137
Apéndice D	137
Formula desviación estándar.....	137
Apéndice E.....	137

Formula estimación del promedio.....	137
Apéndice F.....	137
Fórmula determinación de porcentaje de rendimiento.....	137
Apéndice G.....	138
Formula determinación de Intervalo de confianza con un 95% de confianza	138

CONTENIDO DE ILUSTRACIONES.

Ilustración 1. Planta <i>S. officinalis</i>	38
Ilustración 2. Estructura química alfa y beta tujona.	46
Ilustración 3. Estructura química alcanfor, borneol y 1,8 cineol.....	46
Ilustración 4. Estructura química de alfa humuleno	47
Ilustración 5. Estructura Química Viridiflorol	47
Ilustración 6. Estructura química manool.....	48
Ilustración 7. Espectros de masas de (a) metano y (b) propano	53
Ilustración 8 Agar Sangre	57
Ilustración 9. Prueba de manitol sal para staphylococcus	58
Ilustración 10. Agar Mueller-Hinton	59
Ilustración 11. Tinción de Gram donde se muestran los cocos Gram positivos semejantes a racimos de uvas.	60
Ilustración 12. Impétigo por <i>S. aureus</i>	61
Ilustración 13. Impétigo ampolloso estafilocócico.....	62
Ilustración 14. Método de difusión de agar: disco placa	69
Ilustración 15. Diagrama de la piel.....	71
Ilustración 16. Clevenger modificado	83
Ilustración 17. Secado al aire libre de material fresco de <i>S. officinalis</i>	97
Ilustración 18. Material obtenido después de 15 días de secado al aire libre.....	98
Ilustración 19. Material seco cortado en trozos pequeños.....	99
Ilustración 20. Licuado material seco.....	99
Ilustración 21. Colocación de material molido en balón.....	100
Ilustración 22. Colocación de balón en baño de glicerina.....	100
Ilustración 23. Equipo Clevenger modificado armado.....	101
Ilustración 24. Obtención de vapor del balón con agua y material seco	101
Ilustración 25. Paso de vapor a través de condensador.	102
Ilustración 26. Obtención aceite esencial de <i>S. officinalis</i>	102

Ilustración 27. Aceite esencial de <i>S. officinalis</i>	103
Ilustración 28. Determinación del peso de 1 mL de aceite esencial de <i>S. officinalis</i>	104
Ilustración 29. Cepa obtenida en Hospital Calderón Guardia	105
Ilustración 30. Reactivos y materiales necesarios en tinción de Gram	106
Ilustración 31. Tinción de Gram.....	106
Ilustración 32. Resultado positivo: Prueba de catalasa.....	107
Ilustración 33. Solución madre aceite esencial <i>S. officinalis</i> a 200mg/mL de concentración	108
Ilustración 34. Soluciones de aceite esencial de <i>S. officinalis</i> a diferentes concentraciones	108
Ilustración 35. Antibiograma con solución blanco	110
Ilustración 36. Antibiograma con solución de aceite esencial de <i>S. officinalis</i> a 2% de concentración.....	111
Ilustración 37. Soluciones a diferentes concentraciones de aceite esencial de <i>S. officinalis</i> iniciales.....	112
Ilustración 38. Antibiograma con solución de aceite esencial de <i>S. officinalis</i> al 3% de concentración.....	112
Ilustración 39. Antibiograma con solución de aceite esencial de <i>S. officinalis</i> al 3% de concentración.....	113
Ilustración 40. Antibiograma con solución de aceite esencial de <i>S. officinalis</i> al 5%	113
Ilustración 41. Antibiograma con solución de <i>S. officinalis</i> al 10% de concentración	114
Ilustración 42. Antibiograma con solución de aceite esencial de <i>S. officinalis</i> al 6% de concentración.....	114
Ilustración 43. Antibiograma con solución de <i>S. officinalis</i> al 7% de concentración.....	115
Ilustración 44. Antibiograma con solución de aceite esencial de <i>S. officinalis</i> al 8% de concentración.....	116
Ilustración 45. Formación de halos de inhibición obtenidos en un medio de cultivo Mueller-Hinton con cuatro discos impregnados con solución de aceite esencial de <i>S. officinalis</i> al 10%	116
Ilustración 46. Halos de inhibición obtenidos con cuatro discos de antibióticos sensibles a <i>S. aureus</i>	117

Ilustración 47. Cromatograma obtenido mediante el análisis GC-MS del aceite esencial de <i>S. officinalis</i> obtenido por el método de hidrodestilación.	121
Ilustración 48. Formación de precipitado por la presencia de grupo carbonilo.	123
Ilustración 49. Fase acuosa.....	124
Ilustración 50. Fase oleosa.....	125
Ilustración 51. Envase primario Cremigel.....	126
Ilustración 52. Etiqueta empaque primario cremigel.....	127

CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación Taxonómica <i>S. officinalis</i>	37
Tabla 2. Escala de secado de hojas.....	40
Tabla 3. Formas farmacéuticas semisólidas	73
Tabla 4. Variables.....	78
Tabla 5. Materiales para formulación de cremigel.....	89
Tabla 6. Presupuesto.....	91
Tabla 7. Cronograma	92
Tabla 8. Resultados obtenidos en antibiograma a una concentración de <i>S. officinalis</i> al 8% contra <i>S.aureus</i>	115
Tabla 9. Resultados obtenidos en la prueba de difusión de agar	118
Tabla 10. Resultados del comportamiento estadístico aplicado a los datos obtenidos con la prueba de difusión de agar.....	118
Tabla 11. Principales componentes presentes en aceite esencial de <i>S. officinalis</i> obtenido por el método de hidrodestilación	122

RESUMEN

El siguiente trabajo de investigación, consiste fundamentalmente en un estudio acerca de la capacidad antibacteriana del aceite esencial de *Salvia officinalis* sobre *Staphylococcus aureus*, bacteria Gram positiva caracterizada por ser la campeona eterna de los microorganismos patógenos.

S. officinalis pertenece a la familia *Lamiaceae* y es un subarbolito de tallos leñosos, con una hoja perenne color grisáceo, con flores de color púrpura, y su nombre se deriva del latín “*Salvare*”, que significa guardar o curar; y *officinalis* significa medicinal, por lo que resulta de gran importancia para el ámbito farmacéutico.

El objetivo general de esta tesis es analizar la capacidad antibacteriana del aceite esencial de *S. officinalis* obtenido por el método de hidrodestilación frente a *S. aureus*. Primeramente, mediante la extracción del aceite esencial se verificó el rendimiento teórico del aceite obtenido por el método de hidrodestilación, para de esta forma, obtener material suficiente, con el cual se evaluó la capacidad antibacteriana del aceite esencial contra *S. aureus* por medio de la técnica de agar y, a través de un análisis de espectrometría de masas y ensayos fitoquímicos, se identificaron los componentes responsables de la capacidad antibacteriana del aceite esencial de *S. officinalis*.

Además, se determinó, por medio de la preparación de soluciones a diferentes concentraciones, la concentración mínima inhibitoria por medio de la técnica disco placa y, por último, se realizó una formulación cuya composición es el aceite esencial de *Salvia officinalis*.

El enfoque de esta investigación es de tipo cuantitativo ya que se utiliza la recolección de datos para probar la hipótesis planteada y el análisis de los datos se realizó por medio de la observación de los procedimientos realizados en el laboratorio y su interpretación.

Por último, se concluye la comprobación de la hipótesis planteada al verificar la capacidad antibacteriana del aceite esencial de *S. officinalis* obtenido por hidrodestilación contra *S. aureus*.

Palabras clave: Salvia officinalis, aceite esencial, hidrodestilación, Staphylococcus aureus, antibiograma, cremigel.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Planteamiento del problema

En la actualidad, existen millones de organismos que pueden ocasionar problemas en la salud de los pacientes a nivel cutáneo, así como plantas que poseen las propiedades necesarias para combatirlos de una forma que permita renovar el tratamiento y que pueda ser seguro y eficaz.

El aceite esencial de *Salvia officinalis* (*S. officinalis*) posee propiedades antifúngicas y antibacterianas que, si se extrae correctamente y con el mayor rendimiento posible, podrá ser capaz de generar su efecto para tratar a diferentes bacterias como lo es *Staphylococcus aureus*.

López, Castaño y Mejía (2013) lo afirman en su estudio al mencionar que “entre los aceites registrados con mayor actividad antimicrobiana contra un amplio número de microorganismos patógenos se encuentran los aceites esenciales de *S. officinalis*” (p.81).

La mayor parte de la población ha utilizado tratamientos de origen natural a base de extractos de plantas medicinales a lo largo del tiempo con el fin de mejorar su salud y calidad de vida; por lo tanto, el diseño y desarrollo de formas farmacéuticas de este tipo ofrecen una alternativa confiable y renovadora.

La existencia de pocas investigaciones acerca de la utilidad del aceite esencial de *S. officinalis* hace que sea oportuno y necesario llevar a cabo un estudio más completo y detallado acerca de sus propiedades antibacterianas a través de pruebas que las fundamenten y permitan conocer la importancia de esta planta para la comunidad farmacéutica.

Ante esta oportunidad de contribuir con la salud de la población, se vio la necesidad de la elaboración de una forma farmacéutica, en este caso un cremigel antibacteriano, que permita la prevención y el tratamiento de infecciones a nivel cutáneo de manera que se pueda aprovechar las ventajas que ofrece el aceite esencial de *S. officinalis*.

Es debido a esta necesidad que surge el problema de esta investigación “¿Es posible analizar la capacidad antibacteriana del aceite esencial de *Salvia officinalis* obtenido a través de la técnica de hidrodestilación contra *Staphylococcus aureus*?

Hipótesis de investigación

¿Es posible analizar la capacidad antibacteriana del aceite esencial de *Salvia officinalis* obtenido por la técnica de hidrodestilación contra *Staphylococcus aureus*?

Objetivos

Objetivo general.

Analizar la capacidad antibacteriana del aceite esencial de *Salvia officinalis* obtenido por el método de hidrodestilación contra *Staphylococcus aureus*.

Objetivos específicos.

- Verificar el rendimiento práctico de la técnica de extracción por hidrodestilación del aceite esencial de *Salvia officinalis*.
- Evaluar la capacidad antibacteriana del aceite esencial de *S. officinalis* contra *S. aureus* por medio de la técnica de difusión en agar.
- Identificar a través del análisis de espectrometría de masas y ensayos fitoquímicos, el contenido de compuestos químicos que poseen efecto antibacteriano presentes en el aceite esencial de *S. officinalis*.
- Formular un cremigel antibacteriano que incluya en su composición el aceite esencial del *Salvia officinalis*.

Justificación

En la actualidad el mundo está cargado de contaminación, y la población está constantemente expuesta a microorganismos: bacterias, virus y otros organismos como los hongos, los cuales representan un peligro para la salud de las personas por las enfermedades que transmiten y que son necesarias tratar.

La elaboración de esta tesis permitirá proporcionar información fidedigna, confiable y fundamentada en investigaciones científicas, pruebas de laboratorio y estudios *in vitro* para

la elaboración de una forma farmacéutica que permita tratar las lesiones provocadas por la infección cutánea ocasionada por *Staphylococcus aureus*, a través del extracto del aceite esencial de *Salvia officinalis*, ya que este microorganismo en particular, de acuerdo con Ryan (2011) “es en muchos sentidos el “campeón eterno” de los patógenos microbianos” (p. 348).

El mismo autor afirma que hoy en día *S. aureus* constituye el principal protagonista en los listados de patógenos aislados del torrente sanguíneo en cualquier hospital, en pacientes enfermos gravemente; y, según Mensa *et al* (2008):

De acuerdo con los resultados publicados en el último estudio EPINE, correspondiente al año 2007, *Staphylococcus aureus*, con una prevalencia del 10,6% ocupa el segundo lugar en orden de frecuencia entre los microorganismos causales de infección nosocomial en los hospitales españoles, por detrás de *Escherichia coli* (15,4%) y por delante de *Pseudomonas aeruginosa* (10,3%). (p.45)

Con lo cual, se prueba la importancia de obtener nuevas formas de tratar la infección ocasionada por este microorganismo.

La investigación dará a conocer las principales propiedades antibacterianas presentes en la planta que alega la literatura y que pueden contribuir a la mejora de la salud de las personas, tal como lo afirma Beheshti-Rouy *et al* (2015) “*Salvia officinalis* es una de las hierbas más utilizadas en la medicina tradicional. Se ha conocido popularmente como "Sage". Se ha informado de que la salvia ejerce una variedad de actividades terapéuticas, incluyendo antibacterianas, antivirales, antifúngicas, y el efecto antioxidante” (p. 174).

La obtención de esta información va a permitir no solo enriquecer a la comunidad farmacéutica, sino también a los pacientes que son víctimas de las infecciones cutáneas ocasionadas por *S. aureus*; así como un avance en la investigación acerca del aceite esencial de *S. officinalis*.

A partir de lo mencionado, es que se pretende realizar una pequeña investigación alrededor de la obtención del aceite esencial de la planta mediante la técnica de extracción por hidrodestilación, que por su sencillez resulta económica, eficaz y eficiente así tal y como lo expone Bouajaj *et al* (2013) en los resultados de su estudio afirmando que “Treinta y tres

componentes fueron identificados en el aceite hidrodestilado, lo que representó el 98,67% de la composición total del aceite” (p.1674).

Con la investigación se podrá generar resultados más amplios en cuanto al método de extracción del aceite esencial de *S. officinalis* y con respecto a la acción antibacteriana de este, ya que, a través de pruebas fisicoquímicas y espectrometría de masas, se podrá determinar los componentes existentes en el aceite esencial que son responsables de sus propiedades medicinales.

La realización de esta tesis permitirá revisar la información ya existente acerca de las propiedades del extracto del aceite esencial de *S. officinalis* debido a que existen pocos estudios en las bibliotecas costarricenses que demuestran su actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* específicamente. Dicha revisión se verá reforzada con los resultados que se obtengan durante la investigación.

Se podrá conocer cuáles son las variables que producen una diferencia en el efecto antibacteriano a través del estudio *in vitro*, y se obtendrán resultados que permitan fundamentar y comprobar la teoría, obtenida mediante una revisión exhaustiva de los antecedentes acerca del tema de investigación.

La tesis aportará un resultado farmacológico que permitirá contribuir con el tratamiento de forma segura y efectiva, de manera tal que se dé el aprovechamiento entre el ser humano y los recursos naturales (Pino, 2015) puesto que la sociedad actual busca nuevas opciones para el tratamiento de las enfermedades y cada vez más se crea una tendencia de preferir lo “natural” debido a la menor presentación de efectos secundarios, entre otras ventajas que estos proporcionan.

De acuerdo con lo antes mencionado, se podrían fabricar, eventualmente, antibióticos que contengan el aceite esencial de *S. officinalis* que mediante un debido procesamiento permitan el tratamiento de infecciones y enfermedades a un bajo costo, de buena calidad y de manera efectiva.

Antecedentes

A continuación, se muestran una serie de estudios, obtenidos de bibliotecas de las diferentes universidades de Costa Rica y que tienen relevancia en el desarrollo de la

investigación, por lo que son consideradas parte importante en el estudio antibacterial de *S. officinalis*.

Internacionales.

En una investigación de nombre “Potenciación de la actividad antimicrobiana de los aminoglucósidos por el carnosol de *Salvia officinalis*” realizado por Horiuchi *et al* (2007), se encontró que un extracto crudo de *Salvia officinalis* (salvia) redujo las concentraciones inhibitorias mínimas (MICs) de los aminoglucósidos en los enterococos resistentes a la vancomicina (VRE), dentro de las cuales se encontraba *S. aureus*.

Resulta de relevante para este trabajo debido a que *S. aureus* es una bacteria que ha desarrollado resistencia a lo largo de los años y al tomarse en cuenta a *S. officinalis* como una alternativa para el tratamiento de esta, es de vital importancia conocer y tomar en cuenta su capacidad antibacteriana sobre bacterias resistentes.

Un estudio realizado en Marruecos publicado en 2012, llamado “Actividades antibacterianas, alelopáticas y antioxidantes del aceite esencial de *Salvia officinalis* que crece silvestre en las montañas Atlas de Marruecos”; realizado por Bouajaja, Benyamnaa, Bouamamab, Romanaea, Falconieric, Pirasc y Marongiuc en la Universidad de Cadi Ayyad, evaluó el efecto de dos métodos diferentes de extracción de aceite esencial: Hidrodestilación (HD) y la extracción por microondas (MW), sobre el rendimiento, composición, actividad antibacteriana, actividades alelopáticos y antioxidantes de los aceites esenciales aislados de varias partes de la planta de *Salvia officinalis*; se obtuvo que el mejor método de extracción del aceite esencial es el de hidrodestilación, lo que es de importancia para esta tesis debido a que proporciona información relevante en cuanto al método de extracción del aceite esencial de la planta en investigación.

Otro estudio realizado también en el 2012 denominado “Composición química y actividad antibacteriana de aceites esenciales de tres especies de salvia, generalizada en el este de Rumanía” realizado por Coisin, Burzo, Stefan, Rosenhech y Zamfirache, determina la composición química de los aceites esenciales para tres especies de salvia espontáneas desde el este de Rumania y luego se evaluó su potencial antimicrobiano *in vitro*, probándolas en dos cepas de bacterias patógenas: *S. aureus* y *E. coli*. Se obtuvo como resultado las

variaciones en la concentración de los aceites esenciales y se identificaron más de 40 de sus componentes.

Este estudio se tomó en cuenta para esta tesis debido a que permite conocer las diferencias entre las especies de *Salvia officinalis*, sus propiedades y características, así como obtener información acerca de la composición química de la planta y su efecto antibacteriano.

En un artículo publicado, en el siguiente año, por Bouajaj *et al* (2013) con el nombre de “Actividades antibacterianas, alelopáticas y antioxidantes del aceite esencial de *Salvia officinalis* en estado silvestre en las montañas Atlas de Marruecos”, se realizó una extracción de *S. officinalis* cosechada en Marruecos, utilizando los métodos de hidrodestilación y microondas, para determinar su efecto antibacteriano y su composición química.

En el estudio se obtiene un positivo en el efecto antibacteriano de *S.officinalis* principalmente en *Escherichia coli* y determina sus componentes por cromatografía de gases y espectrofotometría de masa, determinando los componentes del aceite entre Marruecos y Tunisia.

Esta revisión es de vital importancia ya que permite conocer la actividad y la composición del aceite esencial de *S. officinalis* cosechada en otro país con condiciones diferentes a las de Costa Rica, además que utiliza el método de extracción por hidrodestilación, utilizado en esta investigación.

Otro estudio realizado, en el mismo año, por López *et al* (2013) denominado “Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Salvia officinalis* sobre microorganismos patógenos transmitidos por alimentos” investigó la actividad antibacteriana del aceite esencial de *S.officinalis* sobre *B. céreas*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogene*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. sonnei* y *S. typhimurium*, las cuales son consideradas como bacterias que frecuentemente son transmitidas por alimentos. En la investigación se concluyó que *S. officinalis* resulta ejercer un efecto antibacteriano sobre estas bacterias y se determinó una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 1 a 4 mg/mL.

La publicación de López (2013) está relacionada directamente con este trabajo ya que estudia directamente el efecto antibacteriano del *S. officinalis* y determina un CMI, lo cual resulta objeto de comparación para efecto de esta tesis.

En otra investigación denominada “ GC-MS Análisis de aceites esenciales de salvia *officinalis*: Comparación de métodos de extracción de los componentes volátiles” por Baj *et al* (2013), se expone la diferencia en la composición del aceite esencial de *S. officinalis* de acuerdo a los métodos de extracción, siendo estos hidrodestilación y microextracción en fase sólida los procedimientos sometidos a la comparación. Como resultado se obtiene una cantidad de componentes volátiles muy similares, sin embargo, debido al tiempo de extracción, la naturaleza de los mismos varía de un método al otro.

Resulta importante para este trabajo el utilizarse el método de hidrodestilación como uno de los sometidos a comparación y ser fuente importante de información en cuanto a composición química del aceite esencial de *S. officinalis* se refiere.

En el 2014 se llevó a cabo un estudio denominado “Actividad antibacteriana de extractos de *Salvia officinalis* y *Rosmarinus officinalis* obtenidos por métodos de sonicación y maceración”; por parte de Balouiri, Sadiki, Ouedrhiri, Farah, Abed, Ibsouda de la Universidad de Sidi Mohamed Ben en Marruecos.

El estudio evalúa a nivel *in vitro* la actividad antibacteriana de los extractos en metanol de *Salvia officinalis* y *Rosmarinus officinalis* cultivados en el jardín del Instituto Nacional de Plantas Medicinales y Aromáticas de Taounate (Marruecos). Se determina el método más eficaz entre maceración como método de extracción o tratamiento con ultrasonidos, comparando también los contenidos fenólicos totales y la actividad antibacteriana de los extractos crudos obtenidos.

Los resultados del estudio mostraron que la sonicación fue el método más eficaz para la extracción de compuestos fenólicos en comparación con la maceración clásica y que todos los extractos mostraron actividad antibacteriana contra las bacterias Gram-positivas ensayadas (*Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*), mientras que para las bacterias Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*) fueron resistentes.

El trabajo de Balouri *et al* se relaciona con la investigación debido a que trata dos técnicas de extracción utilizadas para obtener los compuestos fenólicos presentes en el aceite esencial de *Salvia officinalis*, así como evidencia de la actividad antibacteriana del mismo.

Otro estudio realizado también en el 2014 llamado “Evaluación de propiedades bioactivas y compuestos fenólicos en diferentes extractos preparados a partir de *Salvia Officinalis*” realizado por Natalia Martins en la Universidad de Salamanca en España, evaluó el efecto antifúngico del extracto de metanol/agua de *S. officinalis* contra varias especies de *Candida*, para determinar la actividad antioxidante y para identificar las principales moléculas bioactivas en el extracto, obteniéndose resultados positivos de la actividad antifúngica del extracto en diferentes especies de *C. albicans*.

Resulta importante ya que esta tesis realiza un estudio antibacteriano, lo cual se fundamenta muy claramente en la investigación de Martins (2014).

En este mismo año se llevó a cabo también un estudio denominado “El efecto antibacteriano de enjuague bucal de extracto de salvia (*Salvia officinalis*) contra *Streptococcus mutans* en placa dental: un ensayo clínico aleatorio”; por Beheshti-Rouy en la Universidad de Ciencias Médicas de Hamadan en Irán, en el que se evaluó y comprobó los efectos clínicos de un enjuague bucal que contiene extracto salvia (*Salvia officinalis*) en su formulación para el tratamiento de *Streptococcus mutans* (SM) que causa la placa dental en los niños en edad escolar. Esto ofrece información acerca de la formulación de una nueva forma farmacéutica que obtenga las propiedades antibacterianas de *S. officinalis*.

En el siguiente año, Rus, Alexa, Pop, Sumalan, y Copolovici (2015), publicaron una investigación denominada “Actividad antifúngica y composición química del aceite esencial *Salvia officinalis*” en la cual, a pesar de tratarse acerca del efecto sobre hongos y no sobre bacterias, estudia detalladamente la composición del aceite esencial de *S. officinalis* y las variables en las condiciones de cultivo, cosecha y manipulación que influyen en la naturaleza de los componentes obtenidos en el aceite esencial.

Nacionales.

En el trabajo final de graduación denominado: *Evaluación in vitro del efecto antimicrobiano de extractos vegetales sobre el crecimiento de una bacteria y dos hongos fitopatógenos*; se evalúa el efecto antimicrobiano de extractos vegetales de treinta y una especies distintas de plantas recolectadas en la Escuela de Agricultura de la Región Trópico

Húmedo (EARTH). Este trabajo fue realizado por J. Fayette (2007) en la Escuela Agrícola de la Región del Trópico Húmedo, Costa Rica.

Para el estudio se evaluaron las capacidades de los extractos frente a *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, *Phytophthora palmivora* y *Colletotrichum gloeosporioides*. Se utilizó la prueba de difusión en agar para medir el potencial antibacterial de los extractos vegetales.

Este trabajo es significativo para la investigación ya que, a pesar de no incluir a *S. officinalis*, aporta consideraciones importantes a la hora de realizar las pruebas de sensibilidad para evaluar el efecto antibacteriano del aceite esencial de esta planta.

En la tesis denominada *Análisis de las propiedades antibacterianas de dos preparados farmacéuticos tópicos a partir del extracto de propóleo de abeja* por Vargas (2016) realizada en la Universidad Internacional de las Américas, se lleva a cabo un estudio del efecto antibacteriano del propóleo sobre *S. aureus* por difusión de agar por el método de disco placa, en el cual se obtiene como resultado, definidos halos de inhibición en los cultivos.

Este trabajo, a pesar de no tratarse acerca de *S. officinalis*, estudia el efecto antibacteriano sobre *S. aureus* mediante el mismo método a utilizar para esta investigación, por lo que permite obtener información acerca de la preparación de los medios de cultivo y los antibiogramas.

Se realizó una búsqueda exhaustiva en las diferentes universidades como son UNIBE, UCIMED, Universidad Latina de Costa Rica, UCR y UNA, sin embargo, no se encontró estudios ni publicaciones a nivel nacional relacionados directamente con *S. officinalis* y debido a esto tampoco acerca de su efecto antibacteriano.

Proyecciones del estudio.

La investigación permitirá proporcionar información acerca de los componentes, métodos de extracción y propiedades del aceite esencial de *S. officinalis* a cualquier persona que le interese y que no conozca nada respecto al tema.

También será de utilidad para aquellas personas interesadas en conocer cómo se llevan a cabo las pruebas de sensibilidad en el laboratorio de microbiología, así como todos los aspectos teóricos y prácticos que se deben tomar en cuenta para obtener buenos resultados.

Gracias a la realización de la investigación, tanto estudiantes de farmacia como de medicina podrán tener acceso a la información que aquí se expone, así como todas las personas interesadas en llevar a cabo investigaciones relacionadas con el tema de investigación.

Además, se realizará la formulación de un cremigel a base del aceite esencial de *Salvia officinalis* con propiedades antibacterianas con lo que se espera poder brindar una contribución necesaria a la comunidad estudiantil en general, casas o compañías farmacéuticas y otros investigadores que estén interesados en obtener bases científicas para la formulación de nuevos productos de origen natural.

Limitaciones

Falta de recursos económicos para la realización de pruebas microbiológicas en otras bacterias además de *S. aureus* para determinar la capacidad antibacteriana del aceite esencial de *S. officinalis* en un laboratorio externo a la Universidad Internacional de las Américas.

No contar con el equipo adecuado para un análisis microbiológico completo en el laboratorio de la Universidad Internacional de las Américas.

El no poseer la facilidad para la realización un análisis con un equipo de espectrometría de masas en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas provoca que se deba optar por otras opciones que implican tiempo y dinero extra para la realización de la investigación.

La falta de equipo de extracción por el método de hidrodestilación en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas, hace necesario buscar opciones externas que suponen un aumento en el costo de la investigación

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

En el presente apartado, se procederá a desarrollar todos aquellos conceptos que dan sustento teórico al trabajo de investigación.

Se subdividirá por secciones con el fin de hacer más comprensible y agradable al lector. Tales secciones serán: *Salvia officinalis*, Microbiología, Extracción vegetal y por último Cremigel antibacterial.

Sección I. *Salvia officinalis*

Primeramente, antes de hablar directamente acerca de la *Salvia officinalis* es preciso hacer una pequeña introducción acerca de ciertos temas relacionados y que son de interés central para el desarrollo de este trabajo, lo cual corresponde a lo que son las plantas medicinales y las esencias. Además, se tomarán como principales referencias los autores González (2009) y Pino (2015) para el desarrollo de este apartado.

La fitoterapia, según González (2009) es

La ciencia que estudia la utilidad de las plantas medicinales, que son aquellas que al menos en uno de sus órganos contienen principios activos que pueden ser utilizados con finalidad terapéutica o actuar de precursores para la semisíntesis química. (p. 158)

Esta ciencia, utiliza diferentes partes, dependiendo de la planta en cuestión, como son las raíces, hojas, frutos, corteza, semillas, para un propósito terapéutico, para prevenir, aliviar o curar un estado patológico, o con el objetivo de mantener la salud

La medicina natural desde el inicio de los tiempos y hasta hoy ha sido una de las alternativas más comunes para promover la salud, ya que es a partir de ella que nuestros antepasados curaban y trataban heridas y enfermedades, tal y como lo afirma Reyes, Palou, & López (2012) “La observación casual de que una hoja puesta sobre una herida proporcionaba alivio y una curación rápida, no pasó inadvertida al hombre primitivo, atento observador de la naturaleza” (p.9).

Se puede apreciar que las plantas medicinales constituyen una fuente primaria de obtención de principios activos para el tratamiento de enfermedades y que por sus propiedades en general, cada una de ellas va a ofrecer diferentes capacidades específicas para distintas enfermedades.

En la actualidad, el uso de las plantas, tanto de forma natural como farmacéutica, se consolida y fortalece debido a la gran cantidad de avances e investigaciones científicas que ha permitido transmitir plena seguridad en su uso para mejorar la salud de los pacientes.

Quesada (2010), se refiere a las plantas medicinales como

Aquellos vegetales que elaboran unos metabolitos secundarios, llamados “principios activos”, sustancias que ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial, sobre el organismo vivo. Su utilidad primordial, a veces específica, es servir como droga o medicamento que alivie las enfermedades o restablezca la salud perdida. (p.7)

Claramente se afirma que estas, por su naturaleza, poseen componentes que pueden ser utilizados para mejorar la salud de los pacientes y que ellas por sí mismas, son capaces de producir sustancias beneficiosas que constituyan armas importantes en el tratamiento y prevención de enfermedades.

Igualmente, Quesada (2010) cita las principales plantas que son utilizadas por sus propiedades medicinales y que tienen un papel importante en la terapéutica debido a su uso a través de los años, dentro de las cuales están el tilo, anís, manzanilla, ruda, tomillo, menta, orégano albahaca, romero, y la más importante para esta investigación, la salvia (p.13).

Otros conceptos por tomar en cuenta en este tema son planta oficial y planta aromática las cuales se clasifican de esta manera acuerdo debido a su forma de ingestión, absorción o contacto.

Así pues, Quesada (2010) se refiere a la planta oficial como “...la que por sus propiedades farmacológicas está recogida en la farmacopea o que forma parte de un medicamento preparado conforme a las reglas de aquella” (p.7); este tipo de planta se define en documentos oficiales como es la farmacopea, y que su utilidad medicinal ya se encuentra estudiada de una manera juiciosa y formal en la literatura.

De igual manera, Quesada (2010) se refiere a las plantas aromáticas como “aquellas plantas medicinales cuyos principios activos están constituidos, total o parcialmente, por esencias. Representan alrededor de un 0,7% del total de las plantas medicinales” (p.7).

Tanto la primera como la segunda se refieren a plantas con propiedades que permiten la obtención de principios activos útiles a la hora de realizar una formulación de un medicamento o que, debido a sus características, pueden ser utilizadas para el desarrollo de una forma farmacéutica que permita la curación de heridas, la prevención o el tratamiento, e incluso la curación de enfermedades.

De acuerdo con esta información es necesario hablar acerca de una de las principales fuentes de aprovechamiento de los componentes de las plantas medicinales como son los aceites esenciales.

Aceites esenciales

Según Rodríguez, Alcaraz y Real (2012) “Los aceites esenciales son fracciones líquidas volátiles, generalmente son mezclas homogéneas de hasta 100 compuestos químicos orgánicos, provenientes de la familia química de los terpenoides” (p.4).

Además, afirma que corresponden a metabolitos secundarios sintetizados por las plantas como mecanismos de respuesta a factores ambientales y ecológicos.

Rodríguez *et al* (2012) mencionan que los aceites esenciales son capaces de generar diversos aromas, los cuales resultan agradables y perceptibles al ser humano, generalmente son líquidos poco densos, pero lo son más que el agua bajo temperaturas en condiciones ambientales.

Los aceites esenciales son sustancias solubles en disolventes orgánicos, casi inmiscibles en disolventes polares asociados como el agua y el amoníaco; son inflamables, pueden provocar alergias en personas sensibles a terpenoides, pero no son tóxicos y resultan inocuos siempre y cuando sus límites de toxicidad no sean superados. Según Rodríguez *et al* (2012), “son aceptados como sustancias seguras (GRAS) por la Agencia de Drogas y Alimentos de E.E.U.U. (FDA) (Code of Federal Regulations, 2003)”(p.4).

Estos extractos pueden sufrir degradación química en presencia de ciertos factores como el aire, la luz solar, el calor, los ácidos y bases fuertes y, como resultado, se da la producción de oligómeros de naturaleza indeterminada (Rodríguez *et al.*, 2012).

La Farmacopea Europea (2008) citada por Pino (2015), se refiere a los aceites esenciales como “producto oloroso, usualmente de composición botánicamente, mediante destilación con vapor, destilación seca o por algún proceso mecánico sin calor” (p.12).

Los aceites esenciales son la fuente de donde provienen el olor de las flores, hojas, frutos, corteza y madera de muchas plantas con propiedades aromáticas y que normalmente se encuentran en zonas de clima templado y cálido como es el clima tropical de Costa Rica.

Estas sustancias además de poseer capacidades aromatizantes se caracterizan por poseer poca toxicidad en su mayoría, por ser productos de origen natural, que además son biodegradables, así como por ser capaces de cumplir funciones propias de sustancias obtenidas por vía sintética, lo que ha contribuido a que sean preferidos por la sociedad actual para tratar enfermedades (Pino, 2015).

Por tales razones se afirma que los aceites esenciales se encuentran dentro de las fuentes principales para la formulación de medicamentos, al ser sustancias que contienen los componentes responsables de su función medicinal y de ejercer un efecto beneficioso en la salud de las personas.

Según Pino (2015), dentro de las principales especies en las que es común encontrar los aceites esenciales es en las familias *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Cupressaceae*, *Hypericaceae*, *Lauraceae*, *Leguminosae*, *Liliaceae*, *Malvaceae*, *Myrtaceae*, *Oleaceae*, *Pinaceae*, *Rosaceae*, *Rutaceae*, *Zingiberaceae* y, la más importante para esta investigación, *Lamiaceae*, familia a la cual pertenece la *Salvia officinalis* (p. 13).

Clasificación de los aceites esenciales

De acuerdo con Hernández (2007), los aceites esenciales se clasifican con base en diferentes criterios como son consistencia, naturaleza química de los componentes, origen y su campo de aplicación.

Consistencia

Los aceites esenciales según su consistencia se clasifican en:

Esencias fluidas

Las esencias fluidas, según Hernández (2007), son líquidos volátiles a temperatura ambiente.

Bálsamos

Son aceites que poseen una consistencia más espesa, son poco volátiles y son más propensos a sufrir reacciones de polimerización.

Oleorresinas

Se caracterizan por ser las que tienen concentrado el aroma de las plantas, constituyen sustancias semisólidas y tienden a ser sustancias muy viscosas.

Origen

Según su origen, los aceites esenciales se clasifican, según Hernández (2007, pp.13-15)

Naturales

Los aceites esenciales naturales son muy costosos debido a su bajo rendimiento y son aquellos que se obtienen directamente de la planta y que se caracterizan por no sufrir modificaciones químicas posteriores.

Artificiales

Se obtienen por medio de procesos de enriquecimiento de la esencia misma con uno o varios de sus componentes.

Sintéticos

Son aceites producidos mediante procesos de síntesis química, por la combinación de sus componentes. Los aceites esenciales sintéticos son menos costosos por lo que son los más utilizados como saborizantes o aromatizantes.

Naturaleza química

Monoterpenoides

Este tipo de aceite son ricos en monoterpenos como geraniol, limoneno, pineno entre otros.

Sesquiterpenoides

Como su nombre lo indica, son aceites esenciales ricos en sesquiterpenos como por ejemplo el farnesol, cadineno o cariofileno.

Fenilpropanoides

Los aceites como el del clavo de olor, el junípero o el pino caben en esta clasificación ya que presentan un alto contenido fenilpropanos.

Uso

De acuerdo con su uso se clasifican en:

Cosméticos

Estos aceites son utilizados para la elaboración de perfumes, aromatizantes o jabones.

Terapéuticos

Generalmente, son aceites que se utilizan en aromaterapia, aromacología, entre otros.

Aditivos

Los aditivos son utilizados para impartir olor y/o sabor en alimentos o bebidas.

Salvia officinalis.

Clasificación científica.

Entre los seres vivos existe una gran diversidad, tanto que muchas veces se crea la idea de que no existen dos organismos iguales. Según Waizel *et al.* (2010) esta diversidad en el mundo vegetal se estudia mediante la taxonomía vegetal, el cual constituye un sistema de clasificación donde se refleja tanto el origen evolutivo de los organismos como sus similitudes y diferencias, así como se incluye la identificación o determinación, taxón, nomenclatura, descripción y flora de la planta (p.79).

De acuerdo con lo anterior, *Salvia officinalis* posee su respectiva clasificación taxonómica, lo que permite agruparla y diferenciarla del resto de plantas de su reino. Véase la Tabla 1. Clasificación Taxonómica *S. officinalis*.

Tabla 1. Clasificación Taxonómica *S. officinalis*.

Categoría	Clasificación
Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Viridiplantae</i>
Infrareino	<i>Streptophyta</i>
Superdivisión	<i>Embryophyta</i>
División	<i>Tracheophyta</i>
Subdivisión	<i>Spermatophytina</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Superorden	<i>Spermatophytina</i>
Orden	<i>Lamiales</i>
Familia	<i>Lamiaceae</i>
Género	<i>Salvia</i>
Especie	<i>Salvia Officinalis</i>

Fuente: ITIS Report (2016).

Salvia es según O’Leary y Moroni (2016) es el género más grande de la familia *Lamiaceae*, ya que dentro de esta se encuentran más de 900 especies (p.191).

Descripción botánica.

En la literatura se cuenta con varias descripciones acerca de *Salvia officinalis*, todas ellas acertadas e igualmente válidas, dentro de estas descripciones, Abu-Darwish *et al*, (2013) se refieren a ella como: “*S. officinalis* (salvia, salvia jardín, o salvia común) es un sub arbusto de hoja perenne, con tallos leñosos, hojas de color grisáceo, y azul de flores de color púrpura. Es originaria de la región mediterránea, que se cultiva actualmente en varios países” (p.2).

Abu-Darwish *et al*, (2013) afirman que la salvia es una de las plantas medicinales de mayor antigüedad. Su etimología misma describe sus propiedades curativas, ya que la palabra salvia se deriva del latín “Salvare”, que significa guardar o curar; y *officinalis* significa medicinal (p.2)

De igual forma, González (2009) la describe como:

Mata o arbustillo espeso, vivaz, rústico de 30-90 cm de altura, y hasta 150, de tallo leñoso en la base, erecto, muy ramificado (vuelo o anchura, unos 60 cm), hojas opuestas, lanceolado-elípticas, vellosas, las inferiores pecioladas, las superiores sésiles, de color verde grisáceo por el haz y blanquecinas por el envés, rugosas, con muchas nervaduras, especialmente notables en el envés, con bordes finamente dentados. Sus flores son de color violeta o azul, a veces blancas o rosadas, bastante grandes, dispuestas en verticilos que constituyen espigas terminales de 3-6 flores; sólo aparecen en los brotes de 2 años, su fruto está en tetraquenio, y su raíz es fusiforme, robusta y fibrosa. Es planta aromática y melífera, muy escasa en estado silvestre y las plantas viejas forman matas muy densas. (p. 158)

Ambas descripciones son específicas y claras ya que dan a conocer a ciencia cierta la apariencia y características propias de la planta, proporcionando la información necesaria para poder diferenciarla. Véase Ilustración 1

Ilustración 1. Planta *S. officinalis*



Fuente: Autora (2017)

Hábitat.

Según González (2009), *S. officinalis* es una planta que se caracteriza por crecer en lugares como pastos, céspedes, peñones, acantilados, inclinaciones secas pedregosas, murallas, páramos, monte bajo, llanuras, laderas áridas, entre otros y además ofrece una descripción detallada acerca de sus condiciones de vida:

Su clima óptimo es templado y templado-cálido, sin variaciones bruscas de temperatura. Pleno sol, semi-sombra o sombra con exposición a mediodía. no tolera los terrenos empapados ni el exceso de agua. Le perjudican inviernos muy rigurosos, aunque es relativamente resistente a las heladas (tolera hasta -5 grados centígrados). Además, es una planta termófila y xerófila que resiste bien a la sequía, pero se puede malograr el cultivo si aquella es prolongada. (p. 159)

De acuerdo con esto se afirma que es una planta capaz de resistir al sol, más no tolera la humedad excesiva. Es una planta resistente, que puede crecer incluso en lugares con poca tierra como son los peñascos.

Cultivo y cosecha

La salvia es una planta que no es originaria de Costa Rica ya que según Abu-Darwish *et al* (2013) “*S. officinalis* es nativa de la región mediterránea, siendo actualmente cultivada en varios países” (p.1). Su cultivo y cosecha son algunos de los aspectos más importantes, que como se mencionó anteriormente, influyen en las características químicas que va a poseer el aceite esencial y que es necesario tomar en cuenta para esta investigación.

González (2007) menciona, en su estudio, varios aspectos importantes acerca de este factor como es la época de recolección, donde se especifica que, al ser las hojas, el órgano oficial de la salvia, estas deben de cosecharse a finales de mayo o junio (p.160).

En cuanto a la duración del cultivo, González (2007) afirma que, el rendimiento aumenta con la edad y más aún si su recolección se realiza, como se mencionó anteriormente, ya que permite triplicar los rendimientos tanto de las hojas como del aceite por ser una época lluviosa (pp. 160-161).

Por otra parte, un paso más es el secado, ya que de acuerdo con Rus (2015), Badiee, Reza y Motaffaf (2012), Fournomiti *et al* (2015) y Baj *et al* (2013), para poder obtener el aceite esencial de *S. officinalis* es recomendable que sus partes aéreas se sometan a este proceso.

El secado es, según Carballo, Telesca y Banchemo (2011), “la extracción de agua en exceso” (p.15), lo que permite, si es realizado correctamente, la conservación de las esencias y sustancias antioxidantes.

El proceso de secado de las hojas de *S. officinalis* puede llevarse a cabo, según Sánchez, Perez, Diosothys y Rodríguez (2005), de tres maneras: “a la sombra, al sol (cubierta con malla protectora) y en estufa de recirculación de aire a 40°C. En todos los casos se volteaba el material vegetal 2 veces al día” (p.2).

Para efectos de este trabajo, se llevó a cabo por el método de secado a sombra, ya que de acuerdo con Sánchez *et al* (2005), esta forma fue la que permitió obtener mayor rendimiento de aceite durante su estudio.

Carballo (2011), afirma en su manual que para el secado se debe de utilizar hojas y tallos finos troceados a 5cm.

El tiempo de secado es debatible ya que este varía de un autor a otro, siendo este variable entre 15-20 días en un lugar bien ventilado (Badiee *et al* (2012, p. 2) ; Fournomiti *et al* (2015, p.2).

De acuerdo con Carballo *et al* (2011), se considera que las hierbas están secas en el momento que cumpla con el grado tres de la siguiente tabla:

Tabla 2. Escala de secado de hojas.

Grado	Características
1	Oreada y blanda
2	Seca y blanda
3	Seca y semiquebradiza

Fuente: Carballo *et al* (2011)

Según este mismo autor, es crucial que la hierba seca conserve su color natural para poder obtener material de calidad. También menciona que, la pérdida de peso en el proceso de secado va a depender de la especie, del órgano y la época en la que es recolectado. En el caso de *S. officinalis*, la relación peso seco de las hojas es de 4:1 Kg. (p.16-17)

Partes medicinales de la planta

Según González (2009)“el órgano oficial, donde se encuentran sus componentes con finalidad terapéutica, es la hoja desecada” (p.158).

Igualmente, López, Bustamante, Guadalupe, Abad y Alonso (2008) se refiere a las hojas como las partes que se utilizan para sus aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica, entre otras.

Usos medicinales

El uso de *Salvia officinalis*, se debe en gran parte a su alto porcentaje de propiedades medicinales tal y como lo expone Bouajaj *et al* (2013) quienes afirman en su estudio, que esta planta posee una amplia gama de propiedades biológicas como son antioxidantes, hipoglucemiantes, antibacterianas, antiinflamatorias, virustáticas, astringentes, fungistáticas y eupépticas.

De acuerdo con esto, varios autores se refieren, en sus estudios, a diversos usos que se le da tanto a la planta en sí, como a su aceite esencial.

Raal, Orav y Arak (2007), afirman que *S. officinalis* es utilizada en diversas preparaciones para tratar inflamaciones e infecciones a nivel de la mucosa bucal y de la garganta, tales como son la estomatitis, gingivitis y faringitis. Además, el autor indica que también se ha utilizado para tratar indicaciones internas como son los síntomas dispépticos y la transpiración excesiva.

De igual forma, Melgarejo, Hillerns, y Narváez (2011), se refieren a los usos específicos de *S. officinalis* a nivel de la boca, de esta manera indican sus propiedades y la aplicación de esta para diversas enfermedades:

La *Salvia officinalis* posee propiedades antisudoríficas, emenagogas, tonificantes, antiespasmódicas, coleréticas, hipoglucemiantes, estimulantes, astringentes y antisépticas,

estas dos últimas permiten combatir afecciones bucofaríngeas como las aftas bucales, amigdalitis, faringitis y gingivitis, pero disminuyendo las posibilidades de enfrentar efectos secundarios que se producirían al utilizar fármacos convencionales (p.110).

Badiee, Reza Nasirzadeh, y Motaffaf (2012), también hablan de los usos de esta planta en sus estudios. Según estos autores:

El aceite esencial (EO) extraído de *S. officinalis* se utiliza en el tratamiento de una amplia gama de enfermedades tales como síndromes respiratorios y digestivos, el corazón y la circulación sanguínea, enfermedades metabólicas y endocrinas, así como por sus muchos otros efectos terapéuticos. (p.1)

Según Abu-Darwish *et al* (2013), la *S. officinalis* se ha utilizado a través de los años en la medicina popular para el tratamiento de la fiebre, el reumatismo, la debilidad sexual, el tratamiento de la bronquitis crónica, así como enfermedades a nivel mental y nervioso.

Estos autores, al igual que los anteriores, afirman que la planta es utilizada para tratar la transpiración por su propiedad antisudorífica, como lo mencionó Melgarejo *et al*, lo cual constituye una de las propiedades más interesantes de la salvia, ya que pocas plantas son conocidas por poseer este tipo de beneficios.

Martins *et al* (2014) afirman en su estudio que es utilizado como agente mucolítico y carminativo, así como regulador hormonal y para el control leve a moderado de pacientes con Alzheimer (párr. 3).

Por último, en un estudio muy reciente hecho en la población marroquí, Balouiri *et al* (2014) afirma que: “Tradicionalmente las hojas infusión de *Salvia officinalis* es utilizado por la población marroquí contra el frío, el reumatismo y la tos” (p.1).

Con lo anterior se puede ver que, a través del tiempo, la sociedad ha utilizado la *S. officinalis* para muchos propósitos entre ellos para tratar infecciones a nivel de la garganta debido a sus propiedades antibacterianas, virustáticas y fungistáticas.

Es utilizada también para las inflamaciones a nivel de la boca debido a sus propiedades antiinflamatorias, y para el tratamiento de síndromes digestivos por sus propiedades eupépticas.

Estos usos entre muchos otros son lo que han caracterizado a *S. officinalis* por ser una planta importante en la medicina, ya que no solo es específica para tratar solo una enfermedad, sino que es realmente útil en un alto número de estas.

Análisis químico

Según Pino (2015), el contenido y la composición de un aceite esencial puede estar afectado por varios factores que son importantes cuando se estudian los componentes volátiles con fines quimiotaxonómicos, dentro de los cuales están la variación fisiológica, variaciones geográficas, condiciones ambientales y factores evolutivos y genéticos.

Según el mismo autor, “los compuestos químicos son sintetizados en la planta durante su desarrollo y corresponden en cada composición específica dentro de los límites predecibles” (p.65),

De lo anterior se puede interpretar que la composición química de la planta depende en gran medida de las condiciones de crecimiento, e incluso de la forma en la cual se cosecha, así como de los componentes que prevalecen en cada una de sus partes.

Dicho esto, al llevar a cabo un análisis químico se deben de tomar en cuenta todos estos factores con el fin de no caer en un error de apreciación y decir que el resultado del análisis está sesgado al identificar otras sustancias que en otros análisis no fueron identificados.

Como alternativa a esto, lo mejor sería establecer los parámetros exactos con los cuales se va a efectuar el análisis químico para poder, a partir de esto determinar de forma fundamentada que el resultado obtenido es producto de factores fijos y a partir de ahí llegar a conclusiones.

A continuación, se va a exponer, de acuerdo a varios estudios hechos recientemente, la composición química de *S. officinalis*.

De acuerdo con González (2009), el aceite está conformado por α tujona y β tujona principalmente (35-60%), lo cual varía, como se dijo anteriormente de la época de recolección y el origen geográfico; en menor proporción por monoterpenos, principalmente

1,8 cineol y alcanfor, y en cantidades muy pequeñas por sesquiterpenos, como son el humuleno, viridifloral y cariofileno (p.163).

De igual manera, Baj *et al* (2013) comparan varios métodos para la extracción del aceite esencial y mencionan que la composición del aceite de salvia de acuerdo con la norma ISO 9909:1997, es de “ α -thuyona, $18,0 \pm 43,0\%$; β - thujona, 3,0 - 8,5%; Alcanfor, 4,5 - 24,5%, 1,8 - cineol, 5,5 - 13,0%; α -humuleno, 0 - 12%; α -pineno, 1,0 - 6,5%; Canfeno, $1,5 \pm 7,0\%$; Limoneno, $0,5 \pm 3,0\%$, linalol y sus ésteres, $<1\%$ y acetato de bornilo, $<2,5\%$ ”y que los componentes volátiles principales son α -thuyona, alcanfor, β -tuyona, 1,8-cineol, viridiflorol y manool (p.39).

Según lo anterior, se puede decir que el aceite esencial de *S. officinalis* está formado en su gran mayoría por terpenos, principalmente por monoterpenos y en menor cantidad por diterpenos y sesquiterpenos.

De esta forma, Baj *et al* (2013) menciona a 1,8-cineol, α -thuyona, β -thuyona y alcanfor como los componentes más estables y más significativos para el aceite esencial, los cuales son monoterpenos oxigenados (p.39).

Grupos químicos de importancia presentes en *S. officinalis*

Según Abu-Darwish *et al* (2013), al igual que Baj *et al* (2013), de los componentes anteriores, los grupos que tienen mayor relevancia en el campo de la medicina son los monoterpenos, como α y β -tiujona, 1,8-cineol y alcanfor. Por lo tanto, resulta necesario, de acuerdo a los objetivos de la presente investigación, estudiar en detalle cada uno de estos.

Terpenos

Los terpenos, según Bruneton (2001) constituyen un amplio conjunto de metabolitos secundarios presentes en los vegetales, ya que la inmensa mayoría de estos son específicos del reino vegetal.

Todos los terpenos se caracterizan por ser especialmente formados por un acoplamiento de un número entero de unidades pentacarbonadas ramificadas que son derivadas del 2-metil butadieno, también llamado isopreno (p.455).

Igualmente, Pino (2015) se refiere a esta síntesis como “la regla del isopreno”, propuesta en 1887 por el químico alemán Wallach y que ha permitido clasificarlos y estudiarlos.

Pino (2015) afirma que en realidad los terpenos no se derivan del isopreno, sino que la fusión de dos o más moléculas de isopreno forma como producto un terpeno. De acuerdo con esto, los terpenos se van a clasificar según las unidades de isopreno que los constituyen tal y como se especifica a continuación: “hemiterpeno (n=1), siendo el isopreno el único existente, monoterpeno (n=2), sesquiterpeno (n=3), diterpeno (n=4), sesterpeno (n=5), triterpeno (n=6), tetraterpeno (n=8) y politerpeno (n=10).” (p.27)

Según lo anterior, dentro del grupo de los terpenos del aceite esencial de *S. officinalis* se encuentran: monoterpenos y sesquiterpenos, por lo que de estos se ampliará la información para este estudio.

Monoterpenos

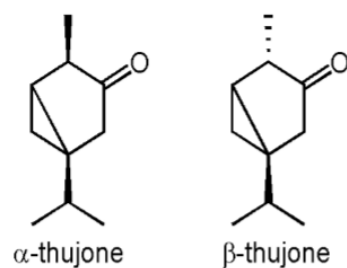
Los monoterpenos son, según Bruneton (2001), los componentes más sencillos de la serie de los terpenos, exceptuando a los hemiterpenos, ya que son el resultado del acoplamiento de dos unidades de isopreno. La mayor parte de sus estructuras están relacionadas con pequeños encadenamientos básicos que resultan del acoplamiento cabeza-cola de dos unidades de isopreno únicamente (p.467).

En el aceite esencial de *S. officinalis*, se encuentran varios ejemplos de monoterpenos como son 1,8-cineol, alcanfor, α tujona, β tujona, acetato de bornilo, canfeno, α humuleno, α -pineno, y limoneno.

Abu-Darwish *et al* (2013) afirma que de estos, 1,8-cineol, alcanfor, α tujona y β tujona, son los responsables de la acción antibacteriana del aceite esencial de *S.officinalis*.

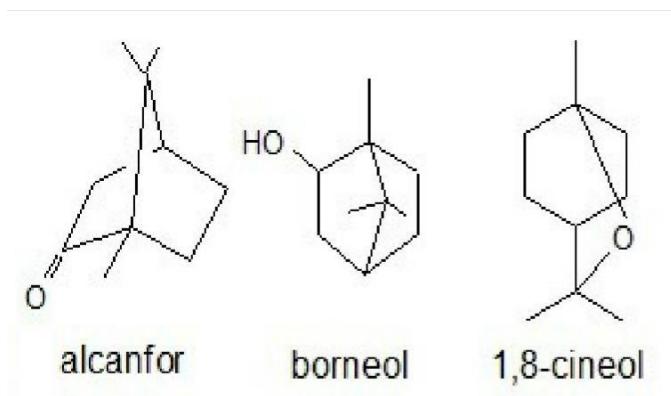
A continuación, se muestran algunos de los componentes mencionados anteriormente, presentes en el extracto de *S. officinalis*, así como su estructura química.

Ilustración 2. Estructura química alfa y beta tujona.



Fuente: Baj *et al* (2013).

Ilustración 3. Estructura química alcanfor, borneol y 1,8 cineol



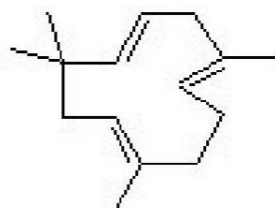
Fuente: Pino (2015).

Sesquiterpenos

Los sesquiterpenos, como se mencionó anteriormente, son terpenos formados por tres unidades de isopreno, y según Pino (2015) “el hecho de poseer cinco átomos de carbono más que los monoterpenos hace que tengan una mayor diversidad estructural y estereoquímica, lo que por ende los hace menos volátiles y de menor importancia sensorial” (p.30).

Dentro de los componentes del aceite esencial de *S. officinalis* que pertenecen a este grupo son α humuleno, viridifloral y acetato de bornilo. A continuación, se muestran algunos ejemplos de la estructura química:

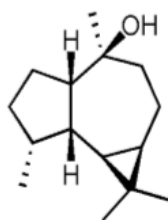
Ilustración 4. Estructura química de alfa humuleno



α -humuleno

Fuente: Pino (2015).

Ilustración 5. Estructura Química Viridiflorol



viridiflorol

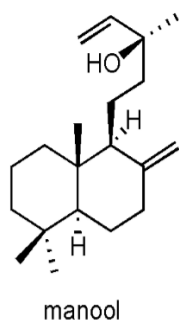
Fuente: Baj *et al* (2013)

Diterpenos

Los diterpenos son terpenos constituidos por cuatro unidades de isopreno fusionadas de cabeza-cola y que por ser moléculas relativamente grandes se caracterizan por poseer puntos de ebullición más altos que los de los sesquiterpenos y pueden ser obtenidos únicamente por destilaciones muy prolongadas (Pino (2015, p.30).

En el aceite esencial de *S. officinalis*, se encuentra el manool, que corresponden a diterpenos fenólicos en los que a su estructura simple se les ha unido un grupo fenol. A continuación, se muestran la estructura química de estos componentes.

Ilustración 6. Estructura química manool



Fuente: Baj *et al* (2013)

Actividad biológica

S. officinalis es, como se ha mencionado en apartados anteriores, una planta con una gran gama de propiedades antisudoríficas, antiespasmódicas, antiinflamatorias, antioxidantes, astringentes, entre otras que han sido utilizadas a través de los años en diferentes remedios e incluso ha logrado despertar un gran interés a nivel farmacéutico por estas razones; sin embargo, en este trabajo las propiedades de mayor interés son las de su efecto antibacteriano con el fin de elaborar una fórmula farmacéutica que permita su uso para prevenir infecciones cutáneas por *Staphylococcus aureus*.

A continuación, se detalla esta característica de la salvia.

Actividad antibacteriana.

En varios estudios se ha otorgado la actividad antibacteriana a ciertos compuestos químicos del aceite esencial. Según Fournomiti *et al* (2015), Abu-Darwish *et al* (2013) y Raal *et al* (2007), es atribuida específicamente al 1,8-cineol, α tujona, β tujona y alcanfor.

El aceite de *S. officinalis*, según López *et al* (2013) posee un efecto inhibitorio en el crecimiento de bacterias de amplio espectro.

Bouajaj *et al* (2012), en su estudio, explica que los compuestos químicos en las especies investigadas más abundantes eran los monoterpenos oxigenados y en sus resultados obtiene una satisfactoria inhibición del crecimiento de las bacterias incluidas en su investigación.

Bouajaj *et al* (2012), también demostraron que este aceite presenta mayor potencial antibacteriano contra bacterias Gram positivas debido a que dentro de sus resultados, todas las bacterias Gram negativas sometidas a ensayo resultaron resistentes al extracto de *S. officinalis*.

López *et al* (2013), mencionan a Longaray *et al* (2007), con quien, al igual que Balouiri, concuerdan en atribuirles a las bacterias Gram negativas la característica de poseer una membrana fosfolípida exterior que la hace casi impermeable a los compuestos lipofílicos del aceite esencial.

Según López *et al* (2013) en su investigación, *S. officinalis* presenta un gran potencial como compuesto antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus* y afirma que es un muy buen candidato para el tratamiento de bacterias resistentes.

Melgarejo *et al* (2011) comprueban en su investigación las propiedades antibacterianas del aceite esencial de *S.officinalis*, y mencionan a Mitic-Culafic, quien compara el potencial antibacteriano del aceite también, y concluye, al igual que López *et al* (2013) que efectivamente posee actividad antibacteriana para *Bacillus subtilis*, *S. aureus* y *E. coli*. principalmente (p.10).

Toxicidad del aceite esencial.

El aceite esencial de *S.officinalis* es conocido, como se mencionó anteriormente por poseer un gran número de aplicaciones en la medicina; sin embargo según González (2009): “El aceite esencial puro y los extractos alcohólicos no deberían utilizarse durante embarazo y la lactancia debido a la presencia de tuyona, lógicamente debido a que una de las acciones principales de la Salvia es la inhibición de la secreción láctica” (p.165).

Sección II. Extracción vegetal

Los aceites esenciales pueden ser obtenidos de diferentes tejidos de las plantas como pueden ser las raíces, semillas, hojas, cortezas, flores e incluso cáscaras de frutas, y puede llevarse a cabo por medios mecánicos o de destilación.

Según Pino (2015), los extractos pueden ser obtenidos con fines, ya sea analíticos o comerciales. En este trabajo se presentan los dos, debido a que con el fin analítico se analizan

sus componentes y no se necesita tanta cantidad del aceite; y comercial, ya que, a la hora de realizar una forma farmacéutica, se necesita mayor cantidad del extracto de *S. officinalis*.

De acuerdo con Pino (2015) la destilación, se define como “una operación en la cual una mezcla de sustancias es separada en sus componentes mediante el uso de calor” (p.91). Además, es uno de los procedimientos de obtención de aceite esencial más empleados debido a que es un método simple y de bajo costo.

Existen diversos tipos de destilación, los cuales se van a clasificar según la manera en la cual sea es contacto del agua con el material vegetal, como son hidrodestilación, destilación por arrastre de vapor, destilación por arrastre agua-vapor y destilación seca (Pino, 2015).

De estos, solo se va a utilizar la extracción por hidrodestilación ya que, según Baj *et al* (2013), es el método mejor y predominante para la extracción de aceites esenciales. Sin embargo, de acuerdo con Análisis químico de aromas (2016) este procedimiento presenta ciertas desventajas, por lo que se va a aplicar también la técnica de arrastre de vapor y el método de extracción de Soxhlet.

Pino (2015) afirma también que, para la extracción de un aceite esencial, primeramente, se debe realizar la obtención del material vegetal del cual se va a extraer. En el caso de *S. officinalis* se utilizan las hojas secas, debido a que, como se mencionó en apartados anteriores, este es el órgano oficial de la planta y del cual se obtiene el aceite esencial.

Para efectos de conocimiento general el porcentaje de rendimiento o contenido de aceite esencial varía de un autor a otro, sin embargo basándose en la información más reciente Rus *et al* (2015), mencionan que este puede variar, dependiendo de la siembra y las condiciones climáticas, entre 0,2% y 0,9% sobre la materia prima y entre 0,5% y 2,65% para el material seco y, como se mencionó anteriormente, se utilizará material seco para efectos de la extracción (p.186).

Por otra parte en la Farmacopea Europea, citada por Raal *et al* (2007), se afirma que el contenido de aceite esencial estándar no es inferior a 15 mL/kg (1,5%) (p.407).

Extracción hidrodestilación.

Consiste en un método en el que el material vegetal es sumergido por completo en el agua en estado de ebullición. Según Pino (2015) el agua al penetrar los tejidos de la planta, va a disolver parte del aceite esencial que se encuentra en estos y que posteriormente va a ser recolectado en un separador de aceite esencial por medio de condensación. Es un método que requiere de largos periodos de tiempo y grandes cantidades de agua para llevarse a cabo.

De acuerdo con Hernández (2007):

La Hidrodestilación es aplicada a material vegetal, que se pueda calentar, sin que la composición química del aceite a extraer sufra alteraciones debido a la cantidad de calor aplicado. El material húmedo o seco se coloca en la cámara de destilación y se cubre con agua, luego el recipiente se calienta hasta que el agua alcance su punto de ebullición. El vapor de agua obtenido, el cual arrastra el aceite, se condensa y recoge. Posteriormente el aceite esencial extraído se separa fácilmente debido a que es inmisible en agua. (p.17)

Por otra parte, Cerpa (2007) define la hidrodestilación como “proceso para obtener el aceite esencial de una planta aromática, mediante el uso del vapor saturado a presión atmosférica” (p.1-5).

Pino (2015) afirma también que los extractos obtenidos por este método son aceites que generalmente se caracterizan por poseer olores fuertes (cierto olor a quemado que tiende a ser menor conforme avanza el tiempo de almacenamiento del aceite), colores más oscuros que, si se comparan con otros métodos, no va a presentarse de la misma manera.

Explica Pina (2015) que estos aceites son propensos a ser de mala calidad debido a que algunos de sus componentes pueden experimentar la hidrólisis, otros como los aldehídos son susceptibles a sufrir polimerización y otros, como en el caso de los fenoles tienden a presentar una alta solubilidad en el agua.

Análisis químico de aromas (2016) menciona las mismas desventajas que Pino (2015) y afirma que, por las reacciones mencionadas anteriormente, no es posible obtener una extracción completa, además de que requiere más combustible en proporción a la cantidad de material que se va a extraer.

Este mismo autor menciona varias ventajas, dentro de las que están el fácil montaje del equipo y el fácil manejo de sustancias cuyo tamaño de partícula es muy pequeño.

De acuerdo con Baj *et al.* (2013), este método es el mejor y más utilizado para la extracción del aceite esencial de *S. officinalis*, y especifica que se debe de utilizar un periodo de extracción de mínimo una hora y no más de tres horas ya que, cuanto mayor tiempo de extracción, mayor es la pérdida de monoterpenos y mayor la obtención de diterpenos y sesquiterpenos. A pesar de esto, los componentes de mayor importancia para esta investigación son los monoterpenos, al ser los responsables de la actividad antibacteriana, tal y como se mencionó anteriormente.

Técnicas de identificación química del aceite esencial de *S. officinalis*.

La materia y las radiaciones electromagnéticas son capaces de interactuar entre sí con un intercambio de energía.

Según Faraldos y Goberna (2009) “La espectroscopia es considerada como la ciencia que estudia el comportamiento de la materia frente a la radiación electromagnética” (p.51).

Este autor la clasifica en ultravioleta visible (UV-VIS), infrarrojo (IR), microondas, entre otros y hoy en día se le consideran no solo como las radiaciones electromagnéticas, sino también la radiación con iones o con ondas de sonido.

Espectrometría de masas

Con frecuencia, es posible obtener la información acerca de la estructura de una molécula a través de la medición de las masas de los fragmentos producidos cuando las moléculas se desintegran.

La espectrometría de masas, según McMurry (2004) “es una técnica para medir la masa, y en consecuencia el peso molecular de una molécula” (p.394).

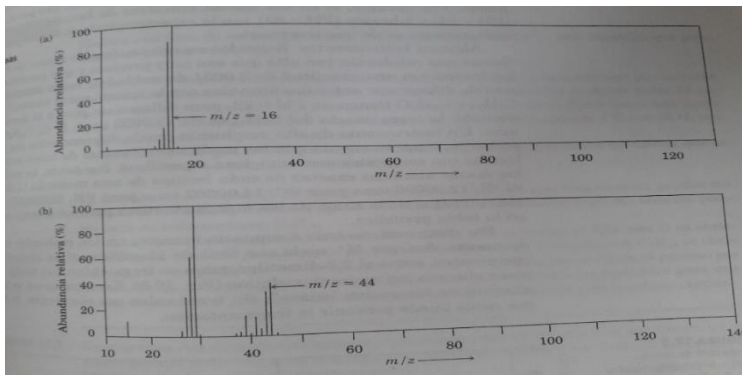
Según este mismo autor, esta técnica de análisis utiliza generalmente, un instrumento de ionización de electrones y sector magnético. Las moléculas se ionizan al chocar con los electrones de gran energía y algunas de estas se fragmentan. El paso de estos fragmentos cargados a través de un campo magnético presente en este instrumento va a clasificarlos de acuerdo a su masa.

Faraldos *et al* (2009) afirman que la espectrometría de masas “se basa fundamentalmente en la ionización de moléculas en fase gaseosa, seguida de la separación y detección de iones generados.” (p.269)

De acuerdo con lo anterior se puede obtener que tanto McCurry (2004) como Faraldos *et al* (2009) definen esta técnica como un análisis de los fragmentos producidos al choque de moléculas y de acuerdo a la masa de estos fragmentos se pueden clasificar y caracterizar; de ahí su nombre de espectrometría de masas.

El espectro de masas es similar a un gráfico de barras, donde las masas se encuentran en el eje x y la intensidad en el eje y , tal y como se muestra a continuación.

Ilustración 7. Espectros de masas de (a) metano y (b) propano



Fuente: McCurry (2004, p.495)

Sección II. Microbiología

Introducción a la microbiología

La ciencia de la microbiología médica está basada en sus pioneros: Pasteur y Koch, quienes, mediante un método experimental, al aislar microorganismos específicos comprobaron que estos podían ser causa de enfermedades (Ryan, 2011, p. 3).

Gracias a estos descubrimientos, es que se inició la época dorada de la microbiología, la cual se encuentra entre 1875 y 1910, ya que fue en este tiempo cuando se definieron muchas enfermedades bacterianas, así como los microorganismos causantes de las mismas (Ryan (2011, p. 3).

Los estudios obtenidos junto con el trabajo realizado por Semmelweis y Lister, quienes investigaron y dieron a conocer los modos de propagación de la enfermedad, llevaron a un gran avance en la salud pública. De igual forma, con el descubrimiento de la penicilina en 1929 por Fleming y el de las sulfonamidas por Domagk en 1935 se abrieron grandes posibilidades de avances en lo que son las enfermedades bacterianas, parasitarias, fúngicas y virales (Ryan, 2011, p. 3).

De acuerdo con Brooks (2014): “La microbiología es el estudio de los microorganismos, un grupo grande y diverso de organismos microscópicos, pero que carecen de estructuras celulares” (p.14).

Esta definición sigue siendo válida siempre y cuando se tome en cuenta que algunos de estos organismos tienen la necesidad de vivir en otros y que algunos tienen formas macroscópicas como por ejemplo algunos mohos y parásitos.

Según Ryan (2011) la microbiología es una ciencia que se define por la pequeñez y su creación se dio gracias a la invención del microscopio, ya que permitió poder ver estructuras muy pequeñas que no se podían ver a simple vista.

De acuerdo con Ryan (2011): “las principales clases de microorganismos en términos de tamaño y complejidad progresivos son virus, bacterias, hongos y parásitos” (p.19).

Los hongos son eucariotas y poseen una pared celular rígida que les da la característica de ser similares a las plantas; los parásitos son también eucariotas y poseen estructuras unicelulares o multicelulares; las bacterias se caracterizan por poseer una estructura celular procariota y, por último, en el caso de los virus son organismo que poseen un genoma y son capaces de tomar el control de la maquinaria de otra célula viviente para replicarse (Ryan, 2011).

La diferencia entre un organismo eucariota y uno procariota radica en que, por ejemplo, los animales, las plantas y, como se especificó anteriormente, los hongos son eucariotas, lo que significa que poseen un núcleo verdadero; y las bacterias junto con las algas azul verdosas son procariotas, los cuales carecen de un núcleo y de otros organelos, además de que poseen un ribosoma de un menor tamaño que los eucariotas (Murray, 2002).

En esta investigación, solamente se van a estudiar la bacteria *S. aureus*, ya que es sobre este microorganismo que se va a llevar a cabo al análisis experimental con el aceite de *S. officinalis*.

Medios de cultivo

Para el desarrollo de este apartado se tomarán como principal referencia a los autores Medina, Casado y Torrico (2012)

Uno de los sistemas más importantes y más comúnmente utilizados para la identificación de los microorganismos, es a través de la observación de su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio.

Pasteur, el padre de la microbiología, descubrió en sus años de estudio que los microorganismos eran capaces de crecer en soluciones ricas en azúcar y nitrógeno. De acuerdo a esto, se pudieron crear los medios de cultivo, material alimenticio idóneo donde se da el crecimiento de los microorganismos.

Para que este ser pueda crecer apropiadamente en un medio de cultivo, debe cumplir con una serie de condiciones como son temperatura, grado de humedad, grado de acidez o alcalinidad adecuadas, disponibilidad de nutrientes adecuados, consistencia adecuada del medio, presencia o ausencia de oxígeno y otros gases, presencia de luz ambiental, pH y esterilidad del medio, además, debe estar exento de otros microorganismos que puedan ser fuente de contaminación. Todo esto debe tomarse en cuenta según el microorganismo que se vaya a estudiar, ya que las condiciones no son las mismas para todos.

Como se mencionó anteriormente, se necesita la presencia de ciertos nutrientes similares a los que se encuentran en los líquidos orgánicos del ser humano, es por esto que los medios de cultivo poseen fuentes de enriquecimiento como bilis, hidratos de carbono para aumentar el valor nutritivo y para detectar reacciones de fermentación; sangre, sangre completa y suero para suscitar el crecimiento de microorganismos menos resistentes y colorantes, este último, como indicador de pH.

De acuerdo con Medina *et al* (2012), los medios de cultivo se pueden clasificar de acuerdo a su estado físico en sólido, líquido, semisólido; según su utilización: en medios comunes, medios de enriquecimiento, medios selectivos, inhibidores, diferenciales, de

identificación, de multiplicación, de conservación y de transporte; de acuerdo a su composición en medios sintéticos, semisintéticos y complejos; y según su origen en naturales, sintéticos y semisintéticos.

La técnica y medio de cultivo que se utilicen en una investigación depende directamente de la naturaleza de la investigación ya que, según Brooks (2014) se pueden dar tres situaciones:

1) cultivar un grupo de células de una especie en particular que se encuentran a la mano; 2) puede ser necesario establecer el número y tipo de microorganismos presentes en un material dado, o 3) podría desearse el aislamiento de un tipo particular de microorganismo a partir de una fuente natural. (p.85)

La primera situación es la que conviene a esta investigación ya que se pretende obtener el crecimiento de *S. aureus* específicamente para realizarle las respectivas pruebas del estudio.

Medios de cultivo comunes.

Para este apartado se tomará como referencia Medina *et al* (2012).

Corresponde a aquellos que poseen todos los componentes mínimos necesarios para permitir el crecimiento de microorganismos, sin ningún requerimiento especial. Dentro de estos medios, los que se van a utilizar en esta investigación son:

Agar sangre.

El agar sangre es un medio de cultivo utilizado principalmente para el crecimiento de estreptococos. Consiste en un medio no selectivo y nutritivo enriquecido con otros nutrientes como cloruro sódico, columbia o tripticase de soja.

La sangre utilizada como aditivo para este método generalmente es sangre de carnero diluida al 5%, también puede ser de caballo, conejo e incluso humana. Facilita las reacciones hemolíticas y puede o no contener sustancias inhibitoras del crecimiento de ciertos microorganismos.

Este medio es utilizado también para los diferentes tipos de hemodíalisis alfa, beta o gama (p.14).

Ilustración 8 Agar Sangre



Fuente: Dra. Trinidad Sabaleta (2010)

Agar manitol salino

De acuerdo con Medina *et al* (2012), el agar manitol salino o también llamado agar champán es un método selectivo muy comúnmente utilizado en microbiología, ya que permite el crecimiento de un grupo determinado de bacterias, y al mismo tiempo evita o inhibe el crecimiento de otras. (p.23)

Este medio se caracteriza por ser selectivo para estafilococos debido a que posee una alta concentración de NaCl (entre 7.5-10% aproximadamente), componente que resulta inhibitorio para muchas bacterias.

Medina *et al*, (2012) afirman que el agar manitol salado permite distinguir a los microorganismos patógenos en un periodo de tiempo muy corto contiene manitol, y rojo de fenol, el cual es un indicador de pH.

Cuando los estafilococos son coagulasa-negativa producen colonias rojas o rosadas que no presentan ningún tipo de cambio, mientras que, si son coagulasa-positiva, como en el caso de *S. aureus*, las colonias formadas son amarillas con zonas amarillas. Medina *et al*. (2012, p.23).

El agar champán, según Medina *et al* (2012), normalmente está compuesto por enzima digestiva de tejido animal, extracto de carne de vaca, enzima digestiva de caseína, D-manitol, rojo de fenol, agar y posee además un pH de 7.4 ± 0.2 al 25°C . (p.23).

Ilustración 9. Prueba de manitol sal para *staphylococcus*



Fuente: Club de Informática Médica y Telemedicina (Universidad de Panamá) (2009)

Agar Mueller-Hinton

El agar Mueller Hinton también se conoce como Agar M-H y es utilizado en la realización de la prueba de sensibilidad a antibióticos en microorganismos aeróbicos por el método de Bauer-Kirby, el cual fue creado por Bauer, Kirby, Sherris y Tuck al utilizar un solo disco impregnado con una alta concentración de antibiótico.

De acuerdo con el National Commitee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) citado por Medina *et al* (2012), el agar Mueller-Hinton es el medio seleccionado para realizar las pruebas de susceptibilidad microbiana debido a su alta reproductibilidad, su poco contenido de sustancias inhibitoras y su capacidad para obtener un crecimiento satisfactorio de la mayoría de los microorganismos patógenos no fastidiosos. Además, este medio de cultivo cumple con los aspectos requeridos de la Organización Mundial de la Salud. (p.21)

En este medio la fuente de carbón, nitrógeno, aminoácidos y vitaminas es provista por la infusión de carne y la peptona de caseína que posee, así como almidón, el cual es

agregado para absorber cualquier metabolito tóxico y el agar, que funciona como agente solidificante.

El agar Mueller-Hinton debe almacenarse entre 2-30°C y su fecha de caducidad es de 5 años en un frasco cerrado. Medina *et al* (2012, p.23)

Ilustración 10. Agar Mueller-Hinton



Fuente: Medina *et al* (2012)

Staphylococcus aureus.

En este apartado se tomará como principal referencia a Ryan (2011).

Los microorganismos pertenecientes al género *staphylococcus* (estafilococos) corresponden a cocos Gram positivos, los cuales tienden a disponerse en forma de racimos, que resultan parecidos a uvas.

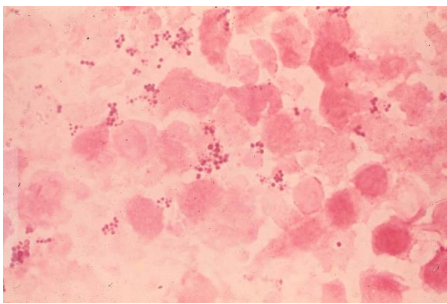
De acuerdo con Ryan (2011): “A nivel mundial, *Staphylococcus aureus* es una de las causas más comunes de infecciones purulentas agudas” (p.346) y la incluye dentro de las especies de estafilococos capaces de colonizar a los seres humanos, siendo, por mucho, la más virulenta debido a su capacidad para formar coagulasa.

La producción de coagulasa de este microorganismo es considerada como signo de la capacidad patógena de *S. aureus* ya que puede depositar la fibrina en la superficie de los estafilococos y afectar su ingestión por las células fagocíticas, así como la destrucción de la bacteria dentro de las mismas.

La coagulasa es, según Brooks (2014) “una enzima que coagula el plasma oxalado o citratado” (p.214), la cual, en el organismo se une a la protrombina y al volverse enzimáticamente activa inicia la polimerización de fibrina, de acuerdo con el autor.

Las células de *Staphylococcus aureus* se caracterizan por unirse en racimos con la misma precisión que lo harían bolas de billar, son uniformemente Gram positivas y su tamaño es regular. Su pared es la de un típico peptidoglucano grampositivo, el cual es entrelazado con cantidades de ácido teicoico (Ryan, 2011).

Ilustración 11. Tinción de Gram donde se muestran los cocos Gram positivos semejantes a racimos de uvas.



Fuente: Ryan (2011)

Enfermedad estafilocócica.

S. aureus es una bacteria, cuyas infecciones se caracterizan por la aparición de lesiones agudas purulentas agresivas que resultan destructivas de manera local en la piel.

De acuerdo con Murray, Rosenthal, Kobayashi y Pfaller (2002) las lesiones piógenas localizadas incluyen:

Impétigo

Consiste en una lesión superficial que ocurre principalmente en la cara y extremidades y es muy común en niños pequeños que inicia como una mancha roja plana denominada mácula, que posteriormente evoluciona a una vesícula llena de pus, la cual después de romperse forma una costra. Murray *et al.* (2002, p.207)

Ilustración 12. Impétigo por *S. aureus*



Fuente: -Van Rijen M, Bonten M, Wenzel R, *et al.* (2008)

Foliculitis

La foliculitis es una infección piógena que se da en los folículos pilosos, donde la base se encuentra elevada y enrojecida, y debajo de la superficie epidérmica se desarrolla una pequeña cantidad de pus. Murray *et al.* (2002, p.207)

Carbunco

Ocurre cuando los forúnculos se extienden hasta el tejido subcutáneo más profundo y al contrario de los anteriormente descritos, los pacientes con esta lesión suelen padecer de fiebre y escalofríos, indicador de que ocurre una extensión sistémica. Murray *et al.* (2002, p.207)

Infecciones estafilocócicas de las heridas

Consiste en una infección producida después de una intervención quirúrgica o traumatismo cuando el microorganismo coloniza la piel. Se caracteriza por edema, dolor, eritema y acumulación de pus. No es común que se de en pacientes inmunocompetentes, a excepción de que exista una astilla, grapa o suciedad que propicie la infección. Murray *et al.* (2002, p. 207-208)

De acuerdo con Murray *et al* (2002), *S. aureus* es el mayor responsable de la producción de impétigo y, si las infecciones de las heridas presentan fiebre y malestar general, se indica tratamiento específico para *S. aureus* (p.208).

Síndrome de la piel escaldada estafilocócica (SPEE)

Consiste en un enrojecimiento con inflamación alrededor de la boca que tiende a extenderse en los dos días siguientes por todo el cuerpo en niños menores de un mes. Si se

aplica presión se produce el desprendimiento de la piel, lo que va a producir la aparición de ampollas y vesículas. Después de siete a diez días, con la aparición de los anticuerpos protectores el epitelio se vuelve intacto sin cicatrices y su tasa de mortalidad es muy baja (Murray *et al*, 2002, p.204).

Impétigo ampolloso

El impétigo ampolloso, de acuerdo con Murray *et al* (2002), es una forma de SPEE producida por las cepas específicas de *S. aureus* productoras de toxina y consiste en la formación de ampollas cutáneas superficiales.

A diferencia de los pacientes con infecciones diseminadas de SPEE, el impétigo ampolloso son ampollas localizadas, cuyo eritema no se disemina más allá de los límites de la ampolla y estas dan positivas en los cultivos (p.204).

Ilustración 13. Impétigo ampolloso estafilocócico



Fuente: Pediatría Integral (2012); XVI (3)

Igualmente, *S. aureus* es capaz no solo de producir infecciones a nivel de la piel, sino también en otros órganos como los pulmones, los huesos o riñones.

Sin importar el lugar donde se den, las infecciones por esta bacteria se caracterizan por presentar fiebres elevadas, como se mencionó anteriormente, y toxicidad sistémica que puede resultar fatal en tan solo unos días. Otros síntomas se producen por la secreción de toxinas, los cuales incluyen diarrea, descamación cutánea, exantemas, entre otros.

Epidemiología.

El principal hábitat humano de *S. aureus* son las fosas nasales anteriores y según Ryan (2011) “Entre el 10 y 30% de la población porta este organismo en dicha localización en

cualquier momento dado, y las tasas entre pacientes y profesionales en hospitales pueden ser mucho mayores” (p.348).

Según Brooks (2014), en los hospitales, las principales zonas de riesgo para las infecciones por *S. aureus* son las unidades de cuidados intensivos, las salas de recién nacidos y los quirófanos ya que, en estas, la propagación de esta bacteria puede provocar una enfermedad clínica importante (p.218).

De acuerdo con este mismo autor, la infección se puede deber también a la contaminación directa de una herida, es decir, de una lesión humana que lo disemina, ya que la fuente más común de propagación epidérmica la constituyen las personas con alguna lesión purulenta, fómites contaminados, el sistema respiratorio y la piel del ser humano (p.218).

S. aureus es un microorganismo que puede sobrevivir en las superficies secas durante un largo periodo de tiempo ya que posee una gruesa capa de péptido glucanos que se lo permiten.

Dentro de los principales factores de riesgo están, de acuerdo con Murray *et al* (2002), la presencia de cuerpos extraños como astillas, catéter, suturas, entre otras; la cirugía previa o el uso antibióticos que supriman la flora normal microbiana (p.204).

Tratamiento

La infección cutánea por *S. aureus* generalmente son tratadas a largo plazo con tetraciclinas. Sin embargo, lo que son los abscesos y lesiones purulentas producidas por este microorganismo son controladas por medio de drenaje junto con el tratamiento antimicrobiano (Brooks, 2014, p.217).

De acuerdo con Brooks (2014), los estafilococos tanto en personas ya infectadas como en las que son portadoras, son difíciles de erradicar debido a su rápida capacidad para crear resistencia a los antibióticos utilizados para tratar la infección (p.217).

Según este autor, para el tratamiento de *S. aureus* en particular se utiliza la vancomicina ya que la resistencia intermedia de este microorganismo a este antibiótico ha sido relativamente muy poco frecuente.

Murray *et al* (2002) afirman que se ha logrado algún efecto con el uso consistente de vancomicina y rifampicina (p.211).

Identificación de *Staphylococcus aureus*.

De acuerdo con Brooks (2014), los estafilococos en general poseen un rápido crecimiento, el cual puede ser mayor si se desarrollan a 37°C, en casi todos los medios de cultivo bajo condiciones aerobias y se caracterizan por ser lisas, redondeadas, brillantes y elevadas; además, son muy resistentes al calor y a la desecación. (p.314)

Las colonias de *Staphylococcus aureus* específicamente, son blancas o doradas y hemolíticas, las cuales después de pasar una noche en agar sangre, forman colonias blancas que posteriormente, tienden a adquirir un color crema-dorado, que corresponde a la base del epíteto de la especie *aureus* y en algunos casos las cepas de esta bacteria pueden mostrar un aro beta hemolítico transparente que rodea la colonia. Brooks (2014, p.347)

Como se mencionó anteriormente la especie de *Staphylococcus aureus* se caracteriza por su producción de coagulasa, la cual a su vez es la prueba más importante para distinguirla de otros estafilococos.

Para demostrarlo, se somete la bacteria a incubación en plasma que va a producir, después de ciertas horas, un coágulo de fibrina. La fibrina es, de acuerdo con la enciclopedia de salud (2016) una “proteína fibrosa con capacidad de agregarse y formar coágulos sanguíneos semisólidos y su función es evitar hemorragias cuando se produce una herida” (parr.1).

Esta proteína es producida por la coagulasa en el cultivo y es por la formación de esta que se permite comprobar la presencia de *Staphylococcus aureus* de otras cepas (Ryan, 2011, p.346).

Pruebas diagnósticas de laboratorio.

Muestras.

La prueba por medio de muestras es llevada a cabo con un hisopo, con el cual se obtiene pus, dependiendo de donde está ubicada la infección, ya sea de un absceso, material de aspirado de tráquea, sangre o líquido cefalorraquídeo para el cultivo. En la mayoría de los

casos se frota el hisopo en las fosas nasales con el fin de determinar si existe colonización a nivel de este sitio para fines epidemiológicos, ya que como se mencionó anteriormente, este es el principal hábitat de la bacteria (Brooks, 2014, p.216).

Frotis.

Los frotis de pus o esputo teñidos con la técnica de Gram son muy utilizados en el caso de los estafilococos, ya que estos, se caracterizan por mostrarse como cocos Gram positivos en forma de racimos, sin embargo, presentan la desventaja de que no se puede distinguir los microorganismos patógenos como *S. aureus* de los saprófitos como *S. epidermidis* (p.216).

Cultivo.

De acuerdo con Brooks (2014):

Las muestras sembradas en placas de agar sangre originan colonias características en un término de 18 h a una temperatura de 37°C, pero es posible que no haya hemólisis ni producción de pigmentos hasta varios días después y son óptimos a una temperatura ambiente. *S. aureus* fermenta manitol, pero otros estafilococos no. Las muestras contaminadas con una microflora mixta pueden cultivarse en medios que contienen NaCl al 7.5%; la sal inhibe la mayor parte de la demás microflora normal, pero no a *S. aureus*. El agar de sal y manitol o los medios cromógenos disponibles en el comercio se utilizar para detectar portadores nasales de *S. aureus* y pacientes con fibrosis quística. (p.204)

Prueba de catalasa.

La prueba de catalasa consiste en colocar una gota de solución de peróxido de hidrógeno al 3% en un portaobjetos, al cual se le va a aplicar determinada cantidad del crecimiento bacteriano presente en la solución. Como es una prueba que detecta la presencia de enzimas citocromo oxidasa, al reaccionar con el peróxido de hidrógeno, va a liberar oxígeno, el cual va a ocasionar la aparición de burbujas, resultado que indica una prueba positiva (p.217).

Prueba de coagulasa.

Consiste en la mezcla de plasma de conejo o humano citratado diluido a 1:5 con un volumen igual, ya sea del cultivo de colonias crecidas en agar o de caldo de cultivo. La mezcla se incuba a una temperatura de 37°C y si en un periodo de entre 1 a 4 horas presenta la formación de coágulos, el resultado de la prueba es positiva (p.217).

Pruebas de sensibilidad a antibióticos.

La resistencia bacteriana es un problema de salud que, actualmente, es muy importante a tomar en cuenta durante la determinación del tratamiento de una enfermedad producida por un microorganismo (Hernández, 2013).

De acuerdo con Lourdes y Geoconda (2013), la determinación de la sensibilidad de las bacterias a determinados compuestos permite seleccionar el medicamento o tratamiento más adecuado para la infección que presenta el paciente ya que las bacterias presentan diferencias en cuanto a su sensibilidad o resistencia basándose no solo en el enfrentamiento de la bacteria con el antibiótico, sino también en la concentración necesaria para que se obtenga una respuesta por parte del agente.

La prueba de sensibilidad, según Brooks (2014) puede ser realizada de dos maneras: mediante difusión en disco o microdilución en caldo o agar. Ambos, deben de realizarse en cepas que provengan de infecciones a nivel clínico relevantes y de forma sistemática.

Método de difusión de agar

De acuerdo con Lourdes (2013), este método consiste en depositar pequeños discos de papel filtro impregnados con determinada concentración de antibiótico en una placa de agar, en la cual previamente se inoculó el microorganismo a estudiar. Al entrar en contacto el disco y la superficie húmeda del agar, el papel filtro va a servir como medio de absorción del agua de manera que se crea un gradiente de concentración al difundirse el antibiótico en el agar. Pasadas 18 a 24 horas, los discos se encontrarán rodeados o no, por una zona donde se inhibió el crecimiento bacteriano, la cual recibe el nombre de halo de inhibición.

Este método se recomienda en caso de microorganismos de crecimiento rápido y poco exigentes y se caracteriza por ser un método que es fácilmente estandarizable (p.22).

Método de dilución de caldo o agar.

El método de dilución de caldo es utilizado para determinar de la concentración mínima efectiva (CIM), la cual se define según Ryan (2011) como “Término de laboratorio que define la menor concentración ($\mu\text{g/mL}$) que puede inhibir el crecimiento del microorganismo” (p.325).

Consiste en exponer las cepas por estudiar a diferentes concentraciones de antimicrobiano para observar el crecimiento de los microorganismos y de esta manera determinar la CIM. Los resultados obtenidos de los halos de inhibición se van a interpretar como sensible, intermedio y resistente de acuerdo con las categorías establecidas por National Comitee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Este mismo comité afirma que basta con presentarse un halo de inhibición entre 30-35 mm para considerarse como muy sensible y por debajo de 15 mm, para considerarse como resistentes (Lourdes,2013, p.22).

Hernández (2013) menciona que, de acuerdo con El Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios (en inglés Clinical and Laboratories Standards Institute, o CLSI, radicado en Pennsylvania, EUA), el antibiograma se define como “un perfil general de los resultados de la susceptibilidad antimicrobiana de una especie microbiana frente a una batería de agentes antimicrobianos” (p. 503).

Con lo que se puede interpretar que en general, el antibiograma constituye el resultado de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* y de acuerdo con Hernández se expresa en términos de sensibilidad y resistencia.

Concentración mínima inhibitoria (CMI)

La concentración mínima inhibitoria de acuerdo con Ortiz, Horna, Silva, y Vicente (2005) corresponde a:

La mínima concentración de antimicrobiano (en $\mu\text{g/mL}$) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 37°C . La CMI se ha establecido como "*gold Standard*" frente a otros métodos que evalúan susceptibilidad antimicrobiana; además de confirmar resistencias inusuales, da respuestas definitivas cuando el resultado obtenido por otros métodos es indeterminado. (p.41)

Por otro lado, existe también la concentración mínima bactericida (CMB), la cual se define, según Ortiz *et al* (2005) como “la mínima concentración de antimicrobiano que elimina a más del 99,9% de los microorganismos viables después de un tiempo determinado de incubación (generalmente 24 horas)” (p.41).

Esta última, no se va a llevar a cabo para efectos de esta investigación, sin embargo, es necesario dejar clara la diferencia de la CMI y CMB con el fin de obtener los resultados acertados.

En los estudios de sensibilidad a nivel *in vitro* a las bacterias, de acuerdo con Cercenado y Saavedra-Lozano (2009), se llevan a cabo por medios fenotípicos como técnicas de difusión o de dilución, así como métodos bioquímicos y genéticos (p.214).

En el caso de los métodos fenotípicos o antibiograma, se somete un inóculo bacteriano estandarizado a una o varias concentraciones de antibiótico y de acuerdo a los resultados, se van a interpretar clasificándolos en sensibles, intermedios o resistentes, lo que permite predecir el fracaso (cuando es resistente) o el éxito (cuando es sensible) de un tratamiento; de ahí que resultan los métodos más utilizados para determinar la CMI de un antibiótico (Cercenado y Saavedra-Lozano, 2009).

Dentro de los métodos fenotípicos, las técnicas de dilución permiten obtener la CMI por medio de un medio líquido, como dilución en caldo, o un medio sólido como la dilución de agar. Cercenado (2009) afirma que el medio estandarizado para llevar a cabo un antibiograma es el medio Mueller Hinton. (p.215)

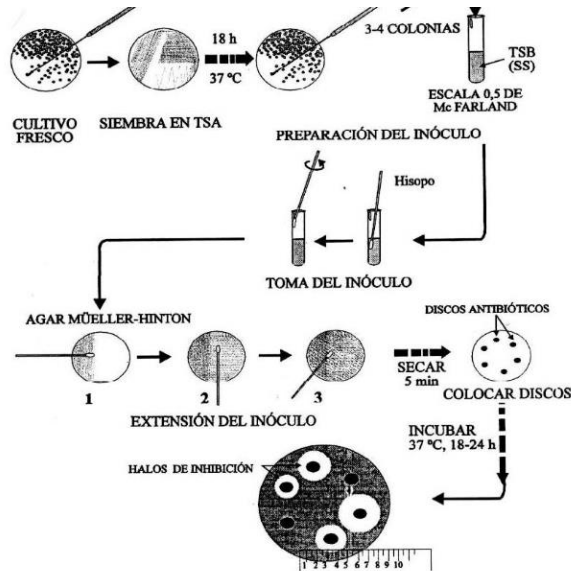
Las técnicas de difusión utilizan discos de papel impregnados con una solución estandarizada del antibiótico, y de igual forma son útiles para la determinación de la CMI (Cercenado, 2009).

Otro método de difusión, de acuerdo con Cercenado, es el E-test el cual utiliza tiras de plástico impregnadas con un antibiótico en concentraciones decrecientes y permite obtener directamente el valor de CMI (p.215).

Para esta investigación, se va a tomar en cuenta solamente el método de difusión de disco.

La utilización del método de disco placa, permitió agilizar la determinación de la sensibilidad de las cepas bacterianas a un gran número de bacterias de manera simultánea.

Ilustración 14. Método de difusión de agar: disco placa



Fuente: Martínez (2014).

Sección III. Forma farmacéutica

Definición de la piel

La piel es un órgano que funciona como cubierta indispensable para una adecuada armonía en el organismo ya que recubre los órganos y tejidos del cuerpo, además que es el sitio por medio del cual se pueden llegar a expresar ciertas enfermedades. De acuerdo con Arenas (2015), la falta de la piel pone en peligro la vida como sucede en algunas enfermedades como *aplasia cutis* o quemaduras.

Embriogenia

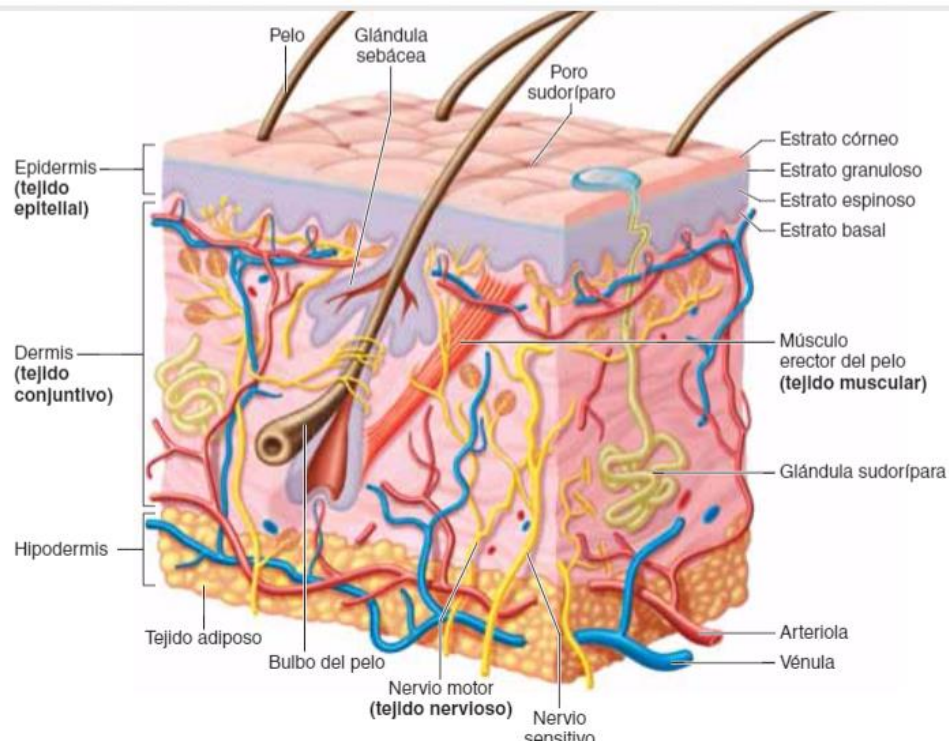
Según Arenas (2015), la piel es derivada del ectodermo, el cual da origen a la epidermis, las glándulas sudoríparas y sebáceas, los folículos pilosos, los melanocitos y la uñas; y el mesodermo donde se origina el tejido conjuntivo, los vasos, el músculo piloerector y las células de Langerhans (p.22).

De acuerdo con Fox (2014), la epidermis cornificada protege la piel contra la invasión de microorganismos que causan enfermedades y contra la pérdida de agua; mientras que la dermis crea glándulas exocrinas, donde se encuentran los folículos pilosos, los cuales son los responsables de producir el pelo; las glándulas sudoríparas, las cuales producen una secreción que emana olores y que enfrían el cuerpo por evaporación; y, por último, las glándulas sebáceas que secretan un sebo oleoso encargado de lubricar la sustancia cornificada de la piel. (p. 19)

Según este Fox (2014), la piel se nutre de los vasos sanguíneos dentro de la dermis, contiene fibras nerviosas y células adiposas o grasas, las que en conjunto forman la hipodermis, la cual es la capa inferior de la dermis. Según Fox (2014): “Además de los vasos sanguíneos, la dermis contiene leucocitos que se desplazan de un sitio a otro, así como otros tipos de células, que protegen contra microorganismos invasivos que causan enfermedad” (p.19).

De acuerdo con lo anterior, se menciona nuevamente la función principal de la piel, como es la de proteger los órganos.

Ilustración 15. Diagrama de la piel



Fuente: Fox (2014)

Flora normal de la piel

El cuerpo humano, como se mencionó anteriormente, presenta una gran superficie cutánea y mucosa, que entra en contacto con el medio ambiente y en la cual existen diversas secciones donde se encuentra la flora normal o conjunto de gérmenes que conviven con el huésped en estado normal sin causarle ninguna enfermedad.

Cada uno de estos microorganismos, posee ciertas características dependientes de factores como la humedad, pH, temperatura y disponibilidad de nutrientes. Además, la piel del ser humano es un territorio extenso y heterogéneo que presenta grandes variaciones en estructura y condiciones ambientales, lo cual determina la densidad y composición de la flora según el área (Torres, 2015, p.1).

De acuerdo con Torres (2015), en la flora normal de la piel, predominan los gérmenes Gram positivos, principalmente por *Staphylococcus spp.* en general *S. epidermidis*, *Micrococcus spp.* y *Corynebacterium spp.* *Propionibacterium acnés*, es un bacilo Gram

positivo que degrada los lípidos secretados por esas bacterias y coloniza las glándulas sebáceas que contiene lipasas (p.4).

Según este mismo autor, en el caso de la flora transitoria, la piel está compuesta por *S. aureus* y menor cantidad de bacilos Gram negativos como *Enterobacterias* y *Acinetobacter* que se encuentran en regiones como la ingle, el perineo y las axilas. En el caso del personal sanitario, esta flora específica puede estar integrada por gérmenes que pueden causar enfermedades por lo que el lavado de manos es la principal medida para prevenirlas.

El estrato córneo es relativamente impermeable y es colonizado por la mayoría de los gérmenes, por lo que sus mecanismos de defensa están representados por el recambio continuo de las células presentes en las capas superficiales de la piel, por los macrófagos y por su bajo pH debido a las glándulas sebáceas (p.4).

Forma farmacéutica

De acuerdo con Hernández (2013), una forma farmacéutica consiste en una “disposición individualizada a la que se adaptan las sustancias medicinales y excipientes para constituir la presentación final de un medicamento” (p.38).

Según este mismo autor, la forma farmacéutica debe reunir diversas características específicas como la estabilidad, pH adecuado, consistencia, agradable olor, almacenamiento, facilidad de manejo, un costo accesible y lo más importante, que sea aceptada por el paciente.

Formas farmacéuticas semisólidas

En esta categoría se incluyen los sistemas farmacéuticos que en su formulación utilizan principios tanto sólidos como líquidos. Dentro de estos se encuentran las cremas, ungüentos, gel y pasta.

De acuerdo con Vargas (2016): “este tipo de presentación se caracteriza porque puede administrarse por distintas vías tales como la rectal, vaginal, nasal y oftálmica” (p.33).

Tabla 3. Formas farmacéuticas semisólidas

Ungüento	Crema	Gel	Pasta
Preparado de consistencia oleosa blanda, adherente a la piel y las mucosas. Está contraindicado en lesiones infectadas pues forma una película aislante que produce el crecimiento de microorganismos aerobios. Se aplica por fricción externamente.	Emulsiones de aceite-agua o agua – aceite, de consistencia semisólida o líquida muy espesa. Se aplica por fricción externamente.	Es una preparación homogénea clara que posee una fase líquida dentro de una matriz de naturaleza polimérica. Posee un menor contenido de sólidos y mayor extensibilidad. No se fricciona al aplicarse.	Semisólido que contiene generalmente la mitad de su peso en polvos. Favorece la absorción de secreciones cutáneas y de humedad.

Fuente: Mora, 2011 citado por Vargas (2016)

Vía de administración tópica.

De acuerdo con Ferrandis (2011), las vías de administración tópica son:

Cutánea.

Esta vía de administración además de ser de acción local, puede también se puede dar la absorción sistémica del fármaco, lo cual depende del estado físico de la piel.

Ocular.

A través de esta vía se pueden administrar preparados en suspensión, solución acuosa o como pomadas y puede absorberse de forma sistémica a través del saco lagrimal. Además, los productos a administrar por esta vía deben ser estériles y una vez abiertos, no deben de ser reutilizados más allá de los primeros siete días (p.7).

Según Aristil (2013), la vía de administración tópica se utiliza principalmente para obtener efectos locales y consiste en aplicar un fármaco ya sea a nivel de la mucosa o de la piel: conjuntiva, bucofaringe, nasofaringe, oftálmica, ótica, vaginal.

Ventajas

1. La administración por vía tópica es una técnica económica y sencilla.
2. Además, permite obtener una acción directamente sobre las superficies enfermas, con una alta concentración de medicamento.

Desventajas

1. La acción de los fármacos sobre las capas profundas de la piel tiende a ser escasa o nula.
2. Existe la posibilidad de que existan efectos tóxicos debido a la absorción cutánea si la superficie a tratar se encuentra lesionada o es extensa.
3. Además, la aplicación de medicamento sobre el ojo, puede generar un olor desagradable por su cercanía con la nariz. (p. 31)

Antisépticos.

Los antisépticos, según Kioskea (2014), se definen como “un producto que puede eliminar o prevenir el crecimiento de bacterias o virus” (p.1). Pueden ser utilizados como fungicida, bactericida, virucida o esporicida, sin embargo, son utilizados generalmente donde se combinan todas sus funciones. Son utilizados en la superficie del cuerpo y se aplican de forma local en la zona afectada.

Según Arévalo y Arribas (2001), los antisépticos destruyen o inhiben el crecimiento de microorganismos sobre los tejidos vivos. Además, son menos tóxicos que los

desinfectantes y se diferencian en que estos últimos, son utilizados sobre objetos y superficies inanimadas.

Cremigel antibacteriano.

Un cremigel es, según Madrigal (2016) “emulsiones cuya fase acuosa está gelificada previamente, mediante el agente gelificante correspondiente” (p.49).

En este tipo de formulación, la fase acuosa se denomina fase acuosa gelificada, donde el gel se suele obtener antes del proceso de emulsificación y posee otra fase oleosa. Las gotitas de esta última se encuentran dentro de la fase acuosa (Alía (2005) citado por Madrigal (2016, p.49).

De acuerdo con J.B. Wilkinson (1990), citado por Madrigal (2016), esta forma farmacéutica se caracteriza por tener la capacidad de extenderse con facilidad en la piel y, al ser levemente oclusivas, si existiera un aumento de la parte oleosa, esta se va a absorber de manera más rápida, además de poseer una proporción elevada de lípidos nutritivos (p.49).

De esta forma, Madrigal (2016), en su tesis realiza una descripción de la elaboración básica de un cremigel.

Primeramente, se obtiene el gel gelificando en la fase acuosa con el agente gelificante adecuado, se calienta la fase acuosa y la gelificada por separado en un baño de agua a una temperatura de entre 50 a 60°C. Una vez se obtiene la fase oleosa fundida, se retiran ambas fases del baño de agua y se incorpora, agitando, la oleosa sobre la gelificada en pequeñas porciones hasta enfriar (p.49).

De acuerdo con Madrigal (2016), para obtener un buen cremigel, el carbopol constituye el agente gelificante más adecuado y más empleado. De igual forma, se utiliza la trietanolamina para la gelificación de la fase acuosa mediante la neutralización de pH, lo que es de suma importancia en la formulación de formas farmacéuticas de aplicación tópica.

El carbopol es según, Morales (2010), un compuesto utilizado en la fabricación de geles debido a su capacidad para proporcionar estabilidad y viscosidad tanto a las soluciones como a las emulsiones y, de acuerdo con la evidencia en la literatura esta capacidad es directamente proporcional a la cantidad que se agregue a la formulación, por lo que se debe

solo de agregar la cantidad adecuada para evitar la obtención de un gel de consistencia pegajosa que no se pueda absorber fácilmente, entre otros inconvenientes (p.93).

Otros componentes en la formulación de un cremigel son el metil y propilparabeno, utilizados como conservantes al ser poco tóxicos. Estos dos son, según Morales (2010), esterres del ácido hidroxibenzoico con metanol y propanol respectivamente, y deben ser utilizados en pequeñas cantidades en las formulaciones para evitar así, la posible aparición de reacciones adversas.

Calvo (2007, citado por Morales, 2010), afirma que otra de las ventajas de estos conservantes es que su acción es independiente del pH en un rango muy amplio, lo que no ocurre en otros conservantes que solo funcionan en medio ácido (p.94).

Los cremigeles constituyen una forma farmacéutica evanescente, de alta extensibilidad, excelente apariencia cosmética por su alto brillo, además un elevado efecto refrescante y generalmente presenta una buena consistencia en dependencia, como se mencionó anteriormente, de la concentración de agente gelificante (Madrigal,2016, p.50)

CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO

En este capítulo de la investigación, se propone cada uno de los procedimientos a llevar a cabo en el estudio experimental como son el trabajo experimental en el laboratorio, la obtención de los datos y resultados y el diseño de la herramienta óptima para resolver el problema planteado.

Enfoque

El enfoque utilizado en la investigación es de tipo cuantitativo ya que, de acuerdo a Hernández, Fernández y Baptista (2014), “utiliza la recolección de datos para probar hipótesis con base en la medición numérica y el análisis estadístico, con el fin establecer pautas de comportamiento y probar teorías”(p.4).

En este tipo de enfoque, los análisis se interpretan en relación a la información obtenida en las predicciones iniciales llamadas hipótesis, así como de los estudios previos realizados y su interpretación; es una explicación de cómo los resultados obtenidos concuerdan con esta teoría ya existente, tal y como se realiza en esta investigación.

Diseño

En esta investigación el diseño corresponde al de tipo experimental de acuerdo con Fleiss (2013); O'Brien (2009) y Green (2003), citado por Hernández *et al.* (2014), como:

Un estudio en el que se manipulan intencionalmente una o más variables independientes (supuestas causas antecedentes), para analizar las consecuencias que la manipulación tiene sobre una o más variables dependientes (supuestos efectos consecuentes), dentro de una situación de control para el investigador. (p.129)

De acuerdo con Hernández *et al.* (2014), se define que el tipo de diseño experimental es el de experimento puro, ya que la investigación concuerda con las dos características propias de este, como son que la investigación contiene grupos de comparación y, que posee también una equivalencia de estos grupos, de manera que se incluyen variables dependientes e independientes (p.141).

Variables de la investigación

Una variable corresponde, según Hernández *et al.* (2014), a “una propiedad que puede fluctuar y cuya variación es susceptible de medirse u observarse” (p.105).

En la presente investigación, las variables en estudio se derivan de los objetivos específicos como apoyo de la investigación.

Tabla 4. Variables

Objetivo	Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Instrumentalización
Verificar el rendimiento teórico de la técnica de extracción por hidrodestilación del aceite esencial de <i>Salvia officinalis</i> .	Técnica de extracción	La extracción es la técnica empleada para separar un producto orgánico de una mezcla de reacción o para aislarlo de sus fuentes naturales, es la separación de un componente de una mezcla por medio de un disolvente. Fernández (2012)	Separar compuestos orgánicos de las soluciones o suspensiones acuosas en las que se encuentran. Fernández (2012)	Equipo Clavenger modificado. Solventes. Calentador agitador
	Tiempo de extracción	Tiempo suficiente para permitir la separación de	Se determina experimentalmente en función del solvente y del	Cronómetro

		los compuestos de interés. Bello (2000)	equipo seleccionado. Bello (2000)	
	Temperatura	Temperatura que contribuye al desplazamiento de la constante de equilibrio de saturación y aumenta la eficiencia del proceso de extracción. Bello (2000)	Determinación de la temperatura en grados centígrados.	Termómetro Calentador agitador.
	Secado de hojas	Extracción de agua en exceso. Carballo, Telesca y Bancharo (2011), (p.15)	Secado a la sombra	Pabilo
Evaluar la capacidad antibacteriana de los aceites esenciales de <i>S. officinalis</i> por medio de la técnica de difusión en agar.	Prueba de sensibilidad de antibióticos (análisis microbiológico).	El antibiograma sirve para medir la sensibilidad de una bacteria a uno o varios antibióticos.	Medir los halos de inhibición que produce el extracto de propóleo para demostrar la capacidad antibacteriana.	Placa Petri. Cultivos de <i>S. aureus</i> . Medición en milímetros con regla. Papel filtro Goteros Sacabocados Discos de Antibióticos

	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	Mínima concentración de antimicrobiano en (mμ/mL) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo o después de 24 horas de incubación a 37° C. Ortiz <i>et al</i> (2005) (p.41)	Concentración dada en mμ/mL a la cual no se observa el crecimiento microbiano.	Observación Placas de Agar Mueller Hinton Cultivos de <i>S. aureus</i> Papel filtro Goteros Sacabocados
Identificar a través del Análisis de Espectrofotometría de masas y ensayos de masas y ensayos fitoquímicos el contenido de compuestos químicos que poseen efecto antibacteriano presentes en el aceite esencial de <i>S. officinalis</i> .	Presencia de metabolitos activos en el extracto de <i>S. officinalis</i> : terpenos (α -tujona, β -tujona, cineol y alcanfor), flavonoides y compuestos fenólicos.	Cambios de coloración que se presentan en el extracto al adicionar determinados reactivos. Revelan la presencia o ausencia de ciertas moléculas. Morales (2011)	Presencia de metabolitos activos por medio de Espectrofotometría de masas. Presencia de terpenos: evidencias de moléculas características del aceite esencial. Ausencia de terpenos: no existe evidencia de moléculas características del	Espectrofotómetro de masa. Tubos de ensayo, gotero, reactivos.

			aceite esencial. Morales (2011)	
Formular un cremigel antibacteriano que incluya en su composición el aceite esencial de <i>Salvia officinalis</i> .	Cremigel antibacteriano	Emulsiones cuya fase acuosa está gelificada previamente, mediante el agente gelificante correspondiente. Madrigal (2016)	Procedimiento detallado más adelante.	Baker Termómetro Agitador de vidrio Calentador agitador

Procedimiento de recolección y análisis de datos.

Se procederá a recolectar los datos provenientes de los procedimientos experimentales correspondientes a los objetivos específicos del trabajo de investigación. Por medio de la realización y observación de estos se podrá obtener los datos necesarios para determinar si la hipótesis propuesta es válida o nula.

El método de análisis de los datos obtenidos consiste en la observación de los procedimientos realizados en el laboratorio de Microbiología de Universidad de Costa Rica y el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas.

Además, se tomarán como principales referencias los autores Martínez (2015) y Morales (2011) para el desarrollo de este apartado.

Materiales y métodos para la recolección de los datos

En este apartado se describen tanto los materiales como los métodos empleados para el desarrollo de la parte experimental de la investigación.

Obtención del aceite esencial de *Salvia officinalis* por el método de hidrodestilación.

El material vegetal utilizado es obtenido en el Arca de las Plantas Verdes, ubicado en Santa Bárbara de Heredia, posteriormente secado a la sombra entre los meses de enero-febrero del año 2017.

Materiales

Licuadaora

Cuchillo

Tabla de picar

Balanza analítica

Clevenger modificado

Reactivos.

Glicerina

Agua destilada

Método

Pesar 500 g de hojas secas de *S. officinalis*.

Cortar las hojas en trozos más pequeños.

Licuar el material vegetal con 5 Litros de agua en varias tandas.

Lavar debidamente el equipo propio del Clevenger (Balón de destilación, bureta).

Agregar 5 Litros de Glicerina en la olla del Clevenger.

Colocar el material vegetal ya licuado en el balón de destilación y remover para mezclar el agua con las hojas.

Colocar el balón con el material en baño María con la glicerina en la olla a una temperatura de 100 °C.

Montar el equipo (Clavenger modificado) de hidrodestilación tal y como se muestra en la siguiente imagen.

Ilustración 16. Clevenger modificado



Fuente: Autora (2017)

Abrir el flujo de agua fría a 1-2 °C.

Asegurarse de que exista un flujo constante de agua a través del condensador.

Permitir que se efectúe la extracción por espacio de tres horas

Se calcula el porcentaje de rendimiento obtenido.

Pruebas de coloración.

Identificación de cetonas combinación bisulfítica

Materiales.

Tubos de ensayo

Gotero

Gradilla

Probeta de 5mL

Reactivos.

Aceite esencial de *S. officinalis*

Solución saturada de bisulfito sódico

Método.

1. Agitar vigorosamente una mezcla que contenga la cetona con una solución saturada de bisulfito sódico.
2. Anotar resultados obtenidos.

Nota: La aparición de un precipitado indica la presencia de carbonilo.

Método para evaluar la capacidad antibacteriana del aceite esencial de *S. officinalis* frente a *S. aureus* y comparación de antimicrobianos sensibles mediante un antibiograma.

Con el fin de determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *S. officinalis*, es necesario comprobar que este es efectivo frente a microorganismos Gram positivos como *S. aureus*.

Pruebas para la identificación de Staphylococcus aureus.

Materiales y equipo para la identificación de S. aureus

Lámpara de alcohol para la esterilización.

Goteros.

Asas para inoculación para la esterilización.

Medios de cultivos de agar sangre y manitol salado.

Medios de cultivo Mueller-Hinton.

Portaobjetos.

Regla con escala milimétrica.

Microscopio.

Hisopos.

Papel filtro.

Sacabocados.

Discos de antimicrobianos.

Reactivos utilizados para identificación de S. aureus

Peróxido de hidrogeno.

Reactivo de Safranina.

Reactivo cristal violeta.

Agua destilada.

Reactivo de Lugol.

Reactivo alcohol acetona.

Método para la siembra e identificación de microorganismos Gram positivos.

El siguiente método fue sugerido por el Dr. Honorio Pérez especialista en el área de microbiología.

S. aureus es un microorganismo que pertenece a la flora normal y coloniza la cavidad nasal en la mayoría de las personas, se realizó un frotis con la ayuda de un aplicador en las fosas nasales de tres voluntarios, con el objetivo de obtener los microorganismos y fueron inoculados en medios de cultivo de agar sangre y manitol salado y, con un hisopo estéril, se realizó un movimiento de estrías sobre el cultivo.

Seguidamente, con el fin de observar el crecimiento de los microorganismos, se almacenó durante 24 horas a una temperatura óptima de 37°C.

Después de realizado esto, se procedió a realizar la prueba de catalasa y una tinción de Gram para la identificación de las bacterias Gram positivas presentes en los cultivos.

Prueba de la catalasa.

Se coloca una gota de solución de peróxido de hidrogeno en un portaobjetos y se aplica una cantidad pequeña del crecimiento bacteriano en la solución. El resultado es positivo si se da la formación de burbujas o liberación de oxígeno.

Tinción de Gram.

Para la realización de esta prueba, se van a distribuir con agua destilada las colonias más pequeñas y aisladas obtenidas en los cultivos sobre un portaobjetos y se deja secar.

Posteriormente, se va a agregar cristal violeta sobre el portaobjetos inoculado con los microorganismos, se espera durante un periodo de 1 minuto y se enjuaga con agua destilada. Seguidamente, se agrega el reactivo de Lugol, se espera un tiempo de 1 minuto y se lava con agua destilada.

A lo obtenido anteriormente, se le añade el reactivo alcohol acetona, el cual se deja por un periodo de 25 segundos y se enjuaga con agua destilada.

Finalmente se agrega el reactivo de Safranina y, transcurrido 1 minuto de tiempo se enjuaga con agua destilada. Esto permite fijar los microorganismos en el portaobjeto con el objetivo de observar en el microscopio el microorganismo *S. aureus* dispuesto en pares, tétradas y en racimos.

Preparación de soluciones de Salvia officinalis a diferentes concentraciones.

Materiales

7 balones aforados de 100 mL.

8 balones aforados de 25 mL.

1 balón aforado de 1000 mL

Probeta 25 mL

Goteros

Beaker 300 mL

Reactivos

Solución salina estéril

Tween 80

Método

Primeramente, se prepara el solvente, para lo cual se agrega 2.5 mg de Tween 80 en un balón aforado de 500 mL y lleva a aforo con solución salina estéril.

Seguidamente se prepara la solución madre a una concentración de 200mg/mL, para lo cual se miden 5.95 mL o 5000 mg (densidad práctica: 840mg/mL) de aceite esencial de *S. officinalis* y se colocan en un balón aforado de 25 mL. Por último, se lleva a aforo con el solvente.

Posteriormente se preparan las soluciones al 0.25%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 5%, 6%, 7%, 8% y 10%, en balones aforados de 25 mL.

Realización de antibiograma

Materiales.

15 medios de cultivo agar Mueller-Hinton

Goteros

Regla con escala milimétrica.

Pinza

Mechero Bunsen

Papel filtro

Sacabocados

Reactivos

Solución de *S. officinalis* a 0.25% (0.5 mg/mL) de concentración

Solución de *S. officinalis* a 0.5% (1 mg/mL) de concentración

Solución de *S. officinalis* a 1% (2 mg/mL) de concentración

Solución de *S. officinalis* a 1.5% (3 mg/mL) de concentración

Solución de *S. officinalis* a 2% (4 mg/mL) de concentración

Solución de *S. officinalis* a 2.5% (5 mg/mL) de concentración

Solución de *S. officinalis* a 3% (6 mg/mL) de concentración

Solución de *S. officinalis* a 5% (7 mg/mL) de concentración

Solución de *S. officinalis* a 6% (7.5 mg/mL) de concentración

Solución de *S. officinalis* a 7% (8 mg/mL) de concentración

Solución de *S. officinalis* a 8% (8.5 mg/mL) de concentración

Solución de *S. officinalis* a 10% (9.5 mg/mL) de concentración

Método

Por medio de la obtención del cultivo de microorganismos presentes en placas de agar sangre y manitol salado, se procederá a realizar el antibiograma y a evaluar la acción del aceite esencial de *S. officinalis*.

Con las lámparas de alcohol, se procederá a esterilizar las asas al colocarlas en el fuego, hasta alcanzar un rojo incandescente.

Por otra parte, con la ayuda de un hisopo estéril se obtendrá una muestra de la colonia seleccionada (se selecciona una colonia de bacterias, aislada y pequeña de las colonias obtenidas en los medios de agar sangre y manitol salado) y se inoculará con movimiento de estrías en los medios de cultivo Mueller-Hinton.

Seguidamente, con papel filtro, se recorta varios discos de papel en forma circular, con la ayuda de un sacabocados.

Se coloca varios discos de papel filtro preparados anteriormente en cada medio Mueller-Hinton inoculado a los cuales se les va a añadir una gota de solución de preparada de *Salvia officinalis*, Por cada concentración de solución de aceite esencial de *S. officinalis* se realizan un cultivo en Agar Mueller-Hinton inoculados por separado, los cuales deben ir debidamente rotulados con la concentración correspondiente.

Posteriormente, los medios se identifican y almacenan durante las siguientes 24 horas.

Para realizar la comparación del halo de inhibición obtenido, se utilizan discos de antibióticos sensibles frente a *S. aureus* como azitromicina, amikacina, vancomicina, gentamicina, ciprofloxacino, entre otros, los cuales se inoculan en los medios de cultivo Mueller-Hinton.

Pasadas las 24 horas de inoculación, se procede a observar los medios Mueller-Hinton, con el fin de evaluar si se da o no la formación de halos de inhibición en cada disco, en cada cultivo de cada concentración.

Por último, se procede a medir los halos de inhibición con regla milimétrica en caso de que se dé la formación de estos, con el fin de determinar la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *S. officinalis*, sobre *S. aureus*.

Formulación de cremigel antibacteriano que incluya en su composición el aceite esencial del *Salvia officinalis*.

Materiales

Tabla 5. Materiales para formulación de cremigel

Fase acuosa	% m/m = cantidad para 100 gramos	Fase oleosa	% m/m = cantidad para 100 gramos
Carbopol 940	1 g	Aceite esencial <i>Salvia officinalis</i>	5
Trietanolamina	pH 7	Aceite mineral	5
Agua destilada	100 g	Span 60	15
		Glicerina	10
		Tween 80	2.45
		Agua destilada	70

Fuente: Autora (2017)

Cristalería y utensilios

Beakers 500 mL

Dos espátulas

Probeta de 25 mL

Dos calentadores agitadores

Dos pastillas de agitación

Dos termómetros

Dos agitadores de vidrio

Método

1. Se procede a colocar en un beaker el agua con el carbopol previamente pesados y se someten a agitación constante en el calentador agitador.
2. Una vez mezclados completamente, se agregan unas gotas de trietanolamina y se agita manualmente hasta obtener la consistencia deseada. Con esto se obtiene la fase acuosa.
3. Seguidamente se calienta a una temperatura de 75 °C en un beaker el aceite esencial de *S. officinalis*, el Span 60 y el aceite mineral y se somete a agitación constante.
4. En otro beaker, también a una temperatura de 75 °C se mezclan en baño maría, el agua destilada, la glicerina y el tween previamente pesados.
5. Se agrega el beaker preparado en el punto 3, al beaker preparado en el punto 4, y se somete a agitación constante hasta enfriar. Con esto se obtiene la fase oleosa.
6. Una vez obtenidas ambas fases, se agrega poco a poco la fase oleosa en la fase acuosa hasta obtener una mezcla homogénea.

Presupuesto

Tabla 6. Presupuesto

PRESUPUESTO PROYECTO DE INVESTIGACIÓN					
Partida	Costo unitario	Cantidad en Unidades	Total	Primer Año	Segundo Año
Personal					
Investigador 1					
Filólogo	55 000	1	55 000		
Equipamiento					
Alquiler cámara fotográfica	25000	1	25000		
Impresora	100 000	1	100 000		
Costos operativos					
Pasajes bus	2000/250/350	20/22/22	40 000/ 5500/770 0		
Gasolina	10 000	1	10 000		
Materia prima <i>S. officinalis</i>	3800	6	47800		
Alquiler de Clevenger modificado	16 000	1	16 000		
Análisis espectrometría de masas	23 000	1	23 000		
Material de oficina	2500	1	2500		
Impresiones	3000	4	12 000		
Empastes	3000	4	12 000		
Totales	243900		356500		

Fuente: Autora (2017)

Cronograma

Tabla 7. Cronograma

Actividades	Periodo 2016												Periodo 2017																							
	Oct				Nov				Dic				Enero				Febrero				Marzo				Abril				Mayo				Junio			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Investigación de antecedentes	x						x								x																					
Elaboración Capítulo I		x	x	x																																
Búsqueda de información (artículos científicos, libros, antologías)	x	x	x	x	x	x	x	x	x				x	x			x	x	x		x															
Elaboración Capítulo II			x	x	x	x	x		x	x																										
Elaboración Capítulo III						x	x	x																												
Búsqueda de materia prima <i>S. officinalis</i>						x		x					x	x	x																					
Búsqueda de información sobre métodos de extracción en CIPRONA, UCR									X					x	x																					

Actividades	Periodo 2016												Periodo 2017																											
	Oct				Nov				Dic				Enero				Febrero				Marzo				Abril				Mayo				Junio							
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4				
Compra materia prima <i>S. officinalis</i>								x																																
Secado materia prima <i>S.officinalis</i>								x	X												x	x																		
Extracción por soxhlet										x																														
Extracción por arrastre con vapor										x																														
Extracción por hidrodestilación																						x																		
Elaboración soluciones al 0.25%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, y 2.5%																								x																
Elaboración antibiograma con concentraciones al 0.25%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, y 2.5% y de concentración																								x	x															

CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Los datos e información suministrada en este capítulo corresponden a los resultados obtenidos del proceso de investigación de cada una de las variables de los objetivos, indicadas en el capítulo anterior.

A continuación, se proporcionará el análisis de los resultados, donde la información ha sido obtenida por medio de la observación y que corresponden a los objetivos 1, 2, 3 y 4.

Variable I. Verificar el rendimiento teórico de la técnica de extracción por hidrodestilación del aceite esencial de *Salvia officinalis*.

Para la obtención del aceite esencial de *S. officinalis* se utilizó el método de extracción por hidrodestilación, para lo cual, primeramente, se obtuvo el material fresco en El Arca de las Plantas Verdes en Santa Bárbara de Heredia en el mes de febrero de 2017.

Se adquirió 5 Kg de hojas frescas, las cuales se sometieron a secado ya que, como se mencionó en el Capítulo II, se obtiene la conservación de las esencias y sustancias antioxidantes en el aceite.

Se utilizó el método de secado al aire libre, el cual, se inició el martes 22 de febrero al miércoles 5 de marzo del 2017, para un periodo total de 12 días, hasta que se obtuvo un material seco y semiquebradizo.

Ilustración 17. Secado al aire libre de material fresco de *S. officinalis*



Fuente: Autora

Ilustración 18. Material obtenido después de 15 días de secado al aire libre



Fuente: Autora

Pasados los 12 días se procedió a realizar la hidrodestilación donde primeramente se pesó el obteniendo 822.8 g de material seco, lo cual contradice la literatura la cual afirma que se necesitan 5 Kg de hojas frescas de *S. officinalis* para obtener 1 Kg de material seco, de acuerdo con lo descrito en el Capítulo II.

Seguidamente se cortó el material seco en pedazos pequeños y luego se licuó en 5 litros de agua destilada, con el fin de aumentar la superficie de contacto entre la planta y el agua y de esta manera obtener un mayor rendimiento. Debido a que el material es muy voluminoso, se realizó primero la hidrodestilación de 522. 8 g y luego en otra los 300 g restantes.

Ilustración 19. Material seco cortado en trozos pequeños



Fuente. Autora

Ilustración 20. Licuado material seco



Fuente: Autora

Para realizar la extracción se colocó el material ya licuado en un balón con agua destilada hasta que lo cubriera, se removió para que se mezclara bien y se colocó el balón dentro de una olla con glicerina ya que esta tiene un punto de ebullición más elevado que el agua y permite facilitar la extracción.

Ilustración 21. Colocación de material molido en balón



Fuente: Autora

Ilustración 22. Colocación de balón en baño de glicerina



Fuente: Autora

Después de armado el equipo Clevenger modificado, se sometió a una temperatura de 100 a 120°C ya que, de acuerdo con la literatura, si se excede este rango se pierden los metabolitos del aceite y, por consiguiente, aquellos responsables del efecto antibacteriano del aceite.

Ilustración 23. Equipo Clevenger modificado armado



Fuente: Autora

Una vez obtenidos los vapores resultantes del calentamiento del material seco con el agua en el balón, estos pasaron a través de un condensador a una temperatura de $1-2^{\circ}\text{C}$, el cual los enfrió dando como resultado el aceite esencial puro, sin ningún tipo de solvente (en este caso el agua) ya que el sistema del equipo proporcionó un círculo cerrado que hacía que el agua presente en los vapores volviera al balón.

Ilustración 24. Obtención de vapor del balón con agua y material seco



Fuente: Autora

Ilustración 25. Paso de vapor a través de condensador.



Fuente: Autora

Ilustración 26. Obtención aceite esencial de *S. officinalis*



Fuente: Autora

El proceso completo duró aproximadamente 3 horas y 34 minutos, ya que la primera hora consistió solamente en calentar, la extracción fue de aproximadamente 2 horas y 40 minutos. De acuerdo a Baj *et al* (2013), el mínimo de tiempo de extracción es de una hora y si, el tiempo de extracción es muy largo (más de tres horas) se corre el riesgo de que se dé la pérdida de monoterpenos.

El total de aceite esencial obtenido fue de 16.5 mL, con una consistencia oleosa propia del aceite, incoloro y con un olor muy fuerte, penetrante y agradable.

Ilustración 27. Aceite esencial de *S. officinalis*



Fuente: Autora

Una vez obtenido el aceite se procedió a determinar el porcentaje de rendimiento (Véase Anexo 6), para lo cual primeramente se determinó la masa correspondiente a 1 mL de aceite esencial, siendo este equivalente a 0.84 mg.

Ilustración 28. Determinación del peso de 1 mL de aceite esencial de *S. officinalis*.



Fuente: Autora

Seguidamente, se calculó y se obtuvo un porcentaje de rendimiento de 1.68%, el cual es superior al mencionado en la Farmacopea Europea de 15 mL/Kg (1.5%) y, excede casi tres veces el porcentaje de rendimiento teórico mínimo de 0.5% mencionado por Rus (2015).

Además, de acuerdo con Rus *et al* (2015), el porcentaje de rendimiento teórico con material fresco es de 0,2% y 0,9%, porcentaje que es menor al rendimiento teórico con material fresco. Al obtener un porcentaje de rendimiento mayor al porcentaje de rendimiento teórico con material seco, se puede deducir que el uso de material seco permite obtener un mayor rendimiento, ya que se obtuvo un mayor porcentaje incluso a nivel teórico que el establecido con material fresco.

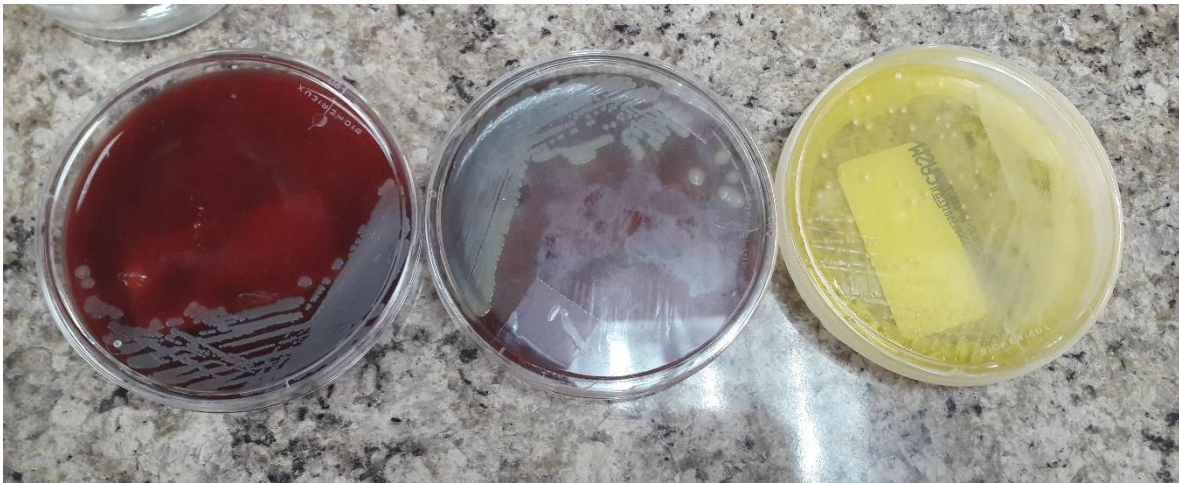
La obtención del este resultado se pudo deber al hecho de que se cortó y se molió el material seco, para una mayor superficie de contacto, además del tiempo de extracción fue óptimo para obtener tal cantidad de aceite.

El método de extracción permitió obtener un aceite esencial puro directamente sin someterlo a métodos de separación del solvente.

Variable II. Evaluar la capacidad antibacteriana del aceite esencial de *S. officinalis* por medio de la técnica de difusión en agar.

Primeramente, se evaluó la capacidad antibacteriana del aceite esencial de *S. officinalis* contra una cepa de *S. aureus* obtenida del Hospital Calderón Guardia, cultivada en un medio agar sangre y manitol salado.

Ilustración 29. Cepa obtenida en Hospital Calderón Guardia



Fuente: Autora (2017)

Las colonias presentes en el cultivo presentaron un color gris amarillo propio de *S. aureus* y, con el fin de comprobar su pureza, se realizó la prueba de Tinción de Gram para lo cual se tomó las colonias más pequeñas, se distribuyeron en un portaobjetos con agua destilada y se dejó secar.

Seguidamente se le agregó una serie de reactivos con el fin de fijar los microorganismos para poder observarlos en el microscopio.

Ilustración 30. Reactivos y materiales necesarios en tinción de Gram

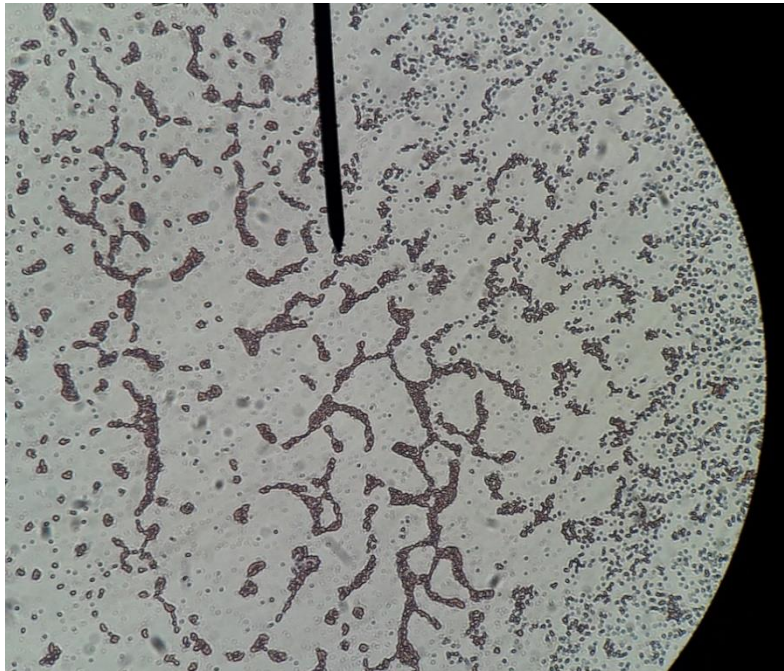


Fuente: Autora

Se agregó cristal violeta a los microorganismos extendidos en el portaobjetos, se esperó por 1 minuto y se enjuagó con agua destilada. Luego se le agregó Lugol e igualmente se esperó un minuto y se enjuagó con agua destilada. Este mismo procedimiento se repitió con el alcohol cetona y con la safranina.

Una vez hecho esto, se procedió a verlo en el microscopio, y como resultado se observó la presencia de cocos en pares, racimos y tétradas.

Ilustración 31. Tinción de Gram



Fuente: Autora

Por otra parte, se llevó a cabo la prueba de catalasa, donde se tomó parte de las colonias aisladas y pequeñas, se dispersaron en un portaobjetos y se le agregó agua oxigenada (peróxido de hidrógeno). Como resultado, se dio la formación de burbujas como muestra de la liberación de oxígeno, ya que al producirse catalasa por *S. aureus*, se separa el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.

Ilustración 32. Resultado positivo: Prueba de catalasa



Fuente: Autora

Los resultados positivos de las pruebas anteriores permiten comprobar la presencia de *S. aureus* en los cultivos realizados, con lo cual se puede llevar a cabo el antibiograma.

Prueba de sensibilidad antibiótica para medir la capacidad antibacteriana del aceite esencial de *Salvia officinalis* y comparación con antimicrobianos sensibles a *S. aureus*.

Preparación soluciones de S. officinalis a diferentes concentraciones.

Primeramente, se llevó a cabo la preparación del solvente para lo cual se pesó 5 mg de Tween 80 y se agregó a un balón aforado de 1000 mL, el cual se llevó a aforo con solución salina estéril.

El Tween 80, de acuerdo con Acofarma (2013) “es un agente emulgente no iónico, con amplio e intenso poder emulgente y suspensor, que originan emulsiones de fase externa acuosa (O/W)”. (p.2)

Lo que permitió la distribución de aceite esencial de *S. officinalis* uniforme por la solución, evitando de esta forma la formación del precipitado que se da, por ejemplo, al diluirlo en agua, para de esta manera lograr la solubilidad del aceite esencial.

Seguidamente, se llevó a cabo una solución madre a una concentración de 200mg/mL, para de esta manera preparar las soluciones a las diferentes concentraciones, con el fin de determinar a cuál de estas se obtenía un halo de inhibición aceptable, que pudiera demostrar la capacidad antibacteriana del aceite esencial de *S. officinalis*, tomando en cuenta la concentración mínima inhibitoria reportada en la literatura.

Ilustración 33. Solución madre aceite esencial *S. officinalis* a 200mg/mL de concentración



Fuente: Autora (2017)

Ilustración 34. Soluciones de aceite esencial de *S. officinalis* a diferentes concentraciones



Fuente: Autora (2017)

Preparación de cultivos en Agar Mueller-Hinton para prueba de sensibilidad Microbiana.

Se realizó cultivos de *S. aureus* a los cuales, por medio del método de disco se sometieron las diferentes soluciones concentradas de aceite esencial.

Para esto, con la ayuda de un hisopo estéril se obtuvo una muestra de la colonia seleccionada, aislada y pequeña de las colonias obtenidas en los medios de agar sangre y manitol salado y se inoculó con movimiento de estrías en los medios de cultivo Mueller-Hinton.

Seguidamente, con papel filtro, se recortaron varios discos de papel en forma circular, con la ayuda de un sacabocados y se colocó varios de estos en medio Mueller-Hinton inoculado.

A los discos mencionados se les añadió una gota de solución de preparado de *Salvia officinalis*. Por cada concentración, se realizó un cultivo en agar Mueller-Hinton inoculados por separado, a los cuales se le rotuló debidamente con el fin de evitar confusiones de placas, y con cinco discos cada cultivo, con el fin de determinar la concentración a la cual se obtiene inhibición del crecimiento microbiano, ya que de acuerdo con López *et al* (2013) y Padilla (2015), la concentración mínima inhibitoria de aceite esencial de *S. officinalis* contra *S.aureus*, se encuentra entre 4 mg/mL y 5mg/mL.

Posteriormente, almacenaron durante las siguientes 24 horas.

Para realizar la comparación del halo de inhibición obtenido, se utilizaron discos de antibióticos sensibles frente a *S. aureus* como azitromicina, amikacina, vancomicina, gentamicina, ciprofloxacino, entre otros, los cuales se inoculan en los medios de cultivo Mueller-Hinton.

Pasadas 24 horas de incubación de los medios de cultivo Mueller-Hinton con discos impregnados con aceite esencial de *S. officinalis*, se observó la formación de halos de inhibición microbiana.

Inicialmente se realizó un cultivo blanco, cuyos discos fueron impregnados con el solvente, para de esta manera descartar su intervención en los resultados a diferentes concentraciones.

Esta prueba no demostró ejercer ningún efecto antibacterial sobre *S. aureus*.

Ilustración 35. Antibiograma con solución blanco



Fuente: Autora (2017)

Seguidamente, se estudiaron las soluciones de 0.5 mg/mL, 1mg/mL, 2mg/mL, 3mg/mL, 4mg/mL y 5 mg/mL o, 0.25%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2% y 2.5% respectivamente, sin embargo, no se obtuvo la formación de halo de inhibición a estas concentraciones, contrariando la concentración mínima inhibitoria de 4 mg/mL, reportada en la literatura.

Ilustración 36. Antibiograma con solución de aceite esencial de *S. officinalis* a 4% de concentración



Fuente: Autora (2017)

Debido a los resultados anteriores se prepararon soluciones más concentradas 3%, 5% y 10% o 6 mg/mL, 7mg/mL y 9.5m/mL respectivamente, para de esta forma conseguir resultados que permitieran obtener una referencia de las concentraciones inhibitorias y de esta manera aprovechar la solución madre del aceite esencial, ya que no se obtuvo inhibición del crecimiento microbiano a la concentración mínima inhibitoria teórica.

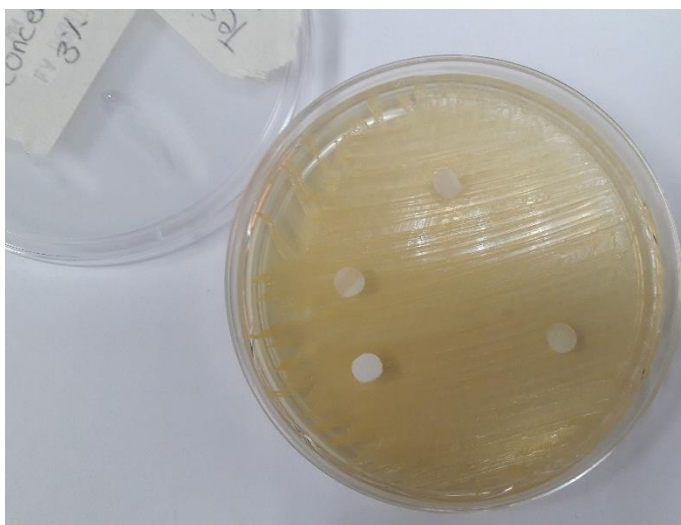
Ilustración 37. Soluciones a 3%, 5% y 10% de concentración de aceite esencial de *S. officinalis*



Fuente: Autora (2017)

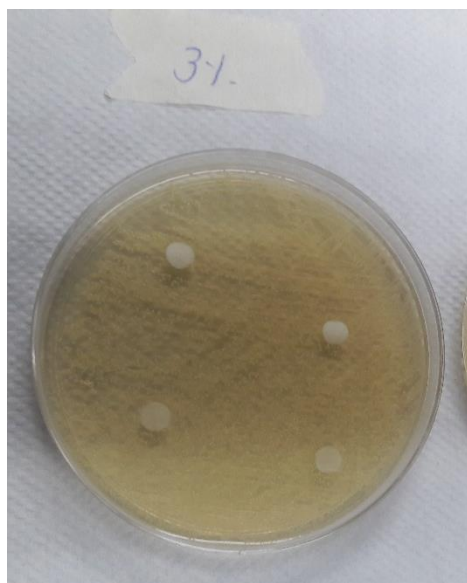
Las concentraciones al 3% y al 5% no demostraron ejercer efecto antibacteriano sobre *S. aureus* al no darse la formación de halos de inhibición

Ilustración 38. Antibiograma con solución de aceite esencial de *S. officinalis* al 3% de concentración



Fuente: Autora (2017)

Ilustración 39. Antibiograma con solución de aceite esencial de *S. officinalis* al 3% de concentración



Fuente: Autora (2017)

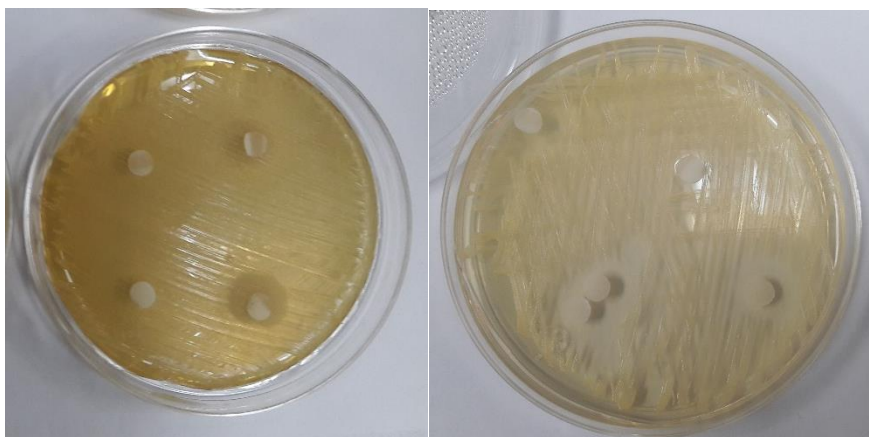
Ilustración 40. Antibiograma con solución de aceite esencial de *S. officinalis* al 5%



Fuente: Autora (2017)

Por otra parte, se obtuvieron halos de inhibición considerables pasadas 24 horas a una concentración del 10%, que mostraron, en promedio, una medida de su diámetro de 16.6 mm, lo que permitió obtener referencia de que la mínima concentración era mayor a 5% y menor a 10%.

Ilustración 41. Antibiograma con solución de *S. officinalis* al 10% de concentración



Fuente: Autora (2017)

Seguidamente se prepararon soluciones de aceite esencial al 6%, 7% y 8% o 7.5mg/mL, 8mg/mL 8 mg/mL respectivamente con el fin de determinar si se obtenía halos de inhibición aceptables a una menor concentración.

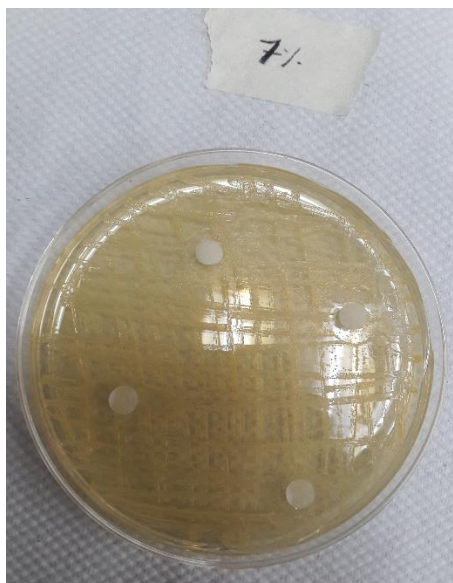
A las concentraciones de 6% y 7% no se obtuvo formación de halos de inhibición lo que permitió descartar estas concentraciones

Ilustración 42. Antibiograma con solución de aceite esencial de *S. officinalis* al 6% de concentración



Fuente: Autora (2017)

Ilustración 43. Antibiograma con solución de *S. officinalis* al 7% de concentración



Fuente: Autora (2017)

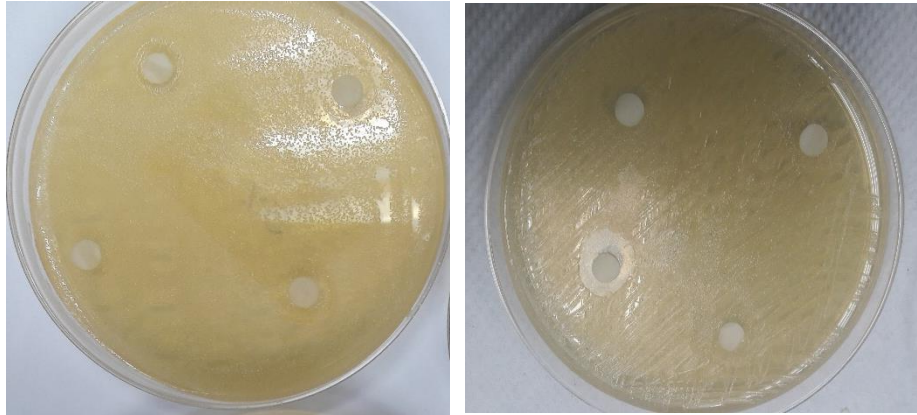
Sin embargo, se obtuvo la formación de halos de inhibición considerables en el antibiograma con una solución de aceite al 8%, pero no tan definidos como los obtenidos con una concentración al 10%, por lo que se decidió realizarlo nuevamente para comprobar los resultados, obteniéndose resultados similares.

Tabla 8. Resultados obtenidos en antibiograma a una concentración de *S. officinalis* al 8% contra *S. aureus*

Concentración de solución de aceite esencial de <i>S. officinalis</i>	Diámetro Halo de inhibición (mm)	Promedio (mm)
8.5 mg/mL (8%)	15,13,12, 15	11

Fuente: Autora (2017)

Ilustración 44. Antibiograma con solución de aceite esencial de *S. officinalis* al 8% de concentración



Fuente: Autora (2017)

De acuerdo con esta información, se llevó a cabo la evaluación de la capacidad antibacteriana del aceite esencial de *S. officinalis* a una concentración del 10%, ya que si bien se obtuvieron halos de inhibición al 8%, estos en promedio resultan inferiores a 15 mm, y de acuerdo con Cercenado *et al* (2007) y Lourdes y Geoconda (2013), “halos de inhibición con una medida inferior a los 15 mm, se considera como resistente”(p.8).

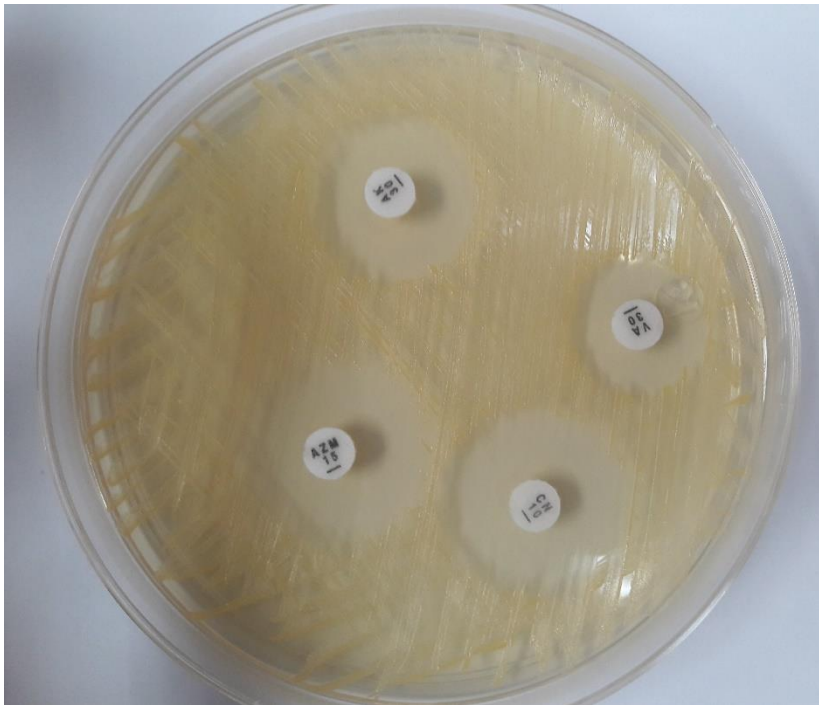
Ilustración 45. Formación de halos de inhibición obtenidos en un medio de cultivo Mueller-Hinton con cuatro discos impregnados con solución de aceite esencial de *S. officinalis* al 10%



Fuente: Autora (2017)

De acuerdo con la figura anterior, se pudo obtener evidencia de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *S. officinalis* frente a *S. aureus*, mediante la formación de los halos de inhibición debidamente marcados.

Ilustración 46. Halos de inhibición obtenidos con cuatro discos de antibióticos sensibles a *S. aureus*.



Fuente: Autora (2017)

La ilustración anterior muestra la formación de halos de inhibición de mayor tamaño correspondientes a disco de antimicrobianos sensibles como azitromicina, vancomicina, ciprofloxacina y amikacina de evidencian su actividad bactericida.

Estos halos obtenidos permiten tener una referencia para comparar la actividad bactericida del aceite esencial de *S. officinalis* con respecto a los antibióticos que son sensibles a *S. aureus* y normalmente utilizados como tratamiento, para de esta forma evaluar la capacidad antibacteriana del aceite esencial.

De acuerdo con los resultados obtenidos mostrados en las figuras anteriores, se tomó la medida de los halos de inhibición indicados en la siguiente tabla.

Tabla 9. Resultados obtenidos en la prueba de difusión de agar

Mo	Disco	Halo de inhibición, tres repeticiones (mm)	Disco de amikacina (mm)	Disco de vancomicina (mm)	Disco de ciprofloxacina (mm)	Disco de azitromicina (mm)
<i>S. aureus</i>	1	20	26	20	30	30
	2	20				
	3	15				
	4	13				
	5	15				

Fuente: Autora (2017)

A los resultados anteriores obtenidos con el aceite esencial de *S. officinalis* en la Tabla 6, se les aplicó una serie de fórmulas (Véase Anexo 2, 3, 4 y 5) para ilustrar el comportamiento estadístico. En la siguiente tabla se muestran los resultados.

Tabla 10. Resultados del comportamiento estadístico aplicado a los datos obtenidos con la prueba de difusión de agar

Microorganismo	Media aritmética (Promedio)	Varianza	Desviación estándar	Intervalo de confianza
<i>S. aureus</i>	16.6	10.3	3.20	16.6 ± 3.98

Fuente: Autora

De acuerdo con los resultados mostrados en la tabla 6, se obtuvo halos de inhibición de 20mm, 20mm, 13 mm, 15mm y 15 mm alrededor de los discos impregnados con el aceite esencial de *S. officinalis* en los cultivos.

En el caso del cultivo con diferentes antibióticos a los cuales *S. aureus* muestra sensibilidad, los halos de inhibición obtenidos fueron de 26mm para el disco de amikacina, 20mm para el de vancomicina, de 30mm para la ciprofloxacina y de 30mm para la azitromicina, obteniendo una actividad bacteriostática del aceite esencial de *S. officinalis*, equivalentes a los obtenidos con la vancomicina.

Cercenado *et al* (2007) y Lourdes y Geoconda (2013), concuerdan en que, como regla general los halos de inhibición se interpretan como altamente sensibles si se encuentran entre 30mm y 35mm y, halos de inhibición con una medida inferior a los 15 mm, se considera como resistente (p.8).

La media aritmética mostrada en la tabla 7 de los halos de inhibición obtenidos con el aceite esencial de *S. officinalis*, es de 16.6 mm, valor que, tomando en cuenta lo anterior, permite afirmar y descartar la resistencia de *S. aureus* ya que se evidenció la formación de halos claros, capaces de demostrarlo.

De igual forma, la tabla 3 (Véase Anexo 1) que Cercenado *et al* (2007) muestra en su trabajo, indica que el halo de inhibición aceptable para la vancomicina frente a *S. aureus* debe ser mayor o igual a 15 mm, con lo que, si se compara con el promedio de los halos de inhibición de los discos impregnados del aceite esencial de *S. officinalis*, se puede interpretar que *S. aureus* es sensible al aceite esencial de *S. officinalis*, siendo su actividad bactericida similar al de la vancomicina.

Por otro lado, de acuerdo con los resultados obtenidos en la tabla 7, la varianza obtenida indica que, el halo de inhibición varía de la media o promedio hacia arriba y hacia abajo en 10.3 mm aproximadamente.

La desviación estándar obtenida indica una relación con la media del halo de inhibición que se desvía hacia arriba y hacia abajo en 3.20mm, y, por último, con un grado de confianza del 95% se determinó un intervalo de confianza de ± 3.98 mm, en el cual se sabe con certeza que, de acuerdo con el promedio, los halos de inhibición confiables se encuentran entre 20.98 mm 12.62mm.

Si se analizan los resultados, estos se encuentran dentro del intervalo de confianza establecido y permiten garantizar la fiabilidad de los datos.

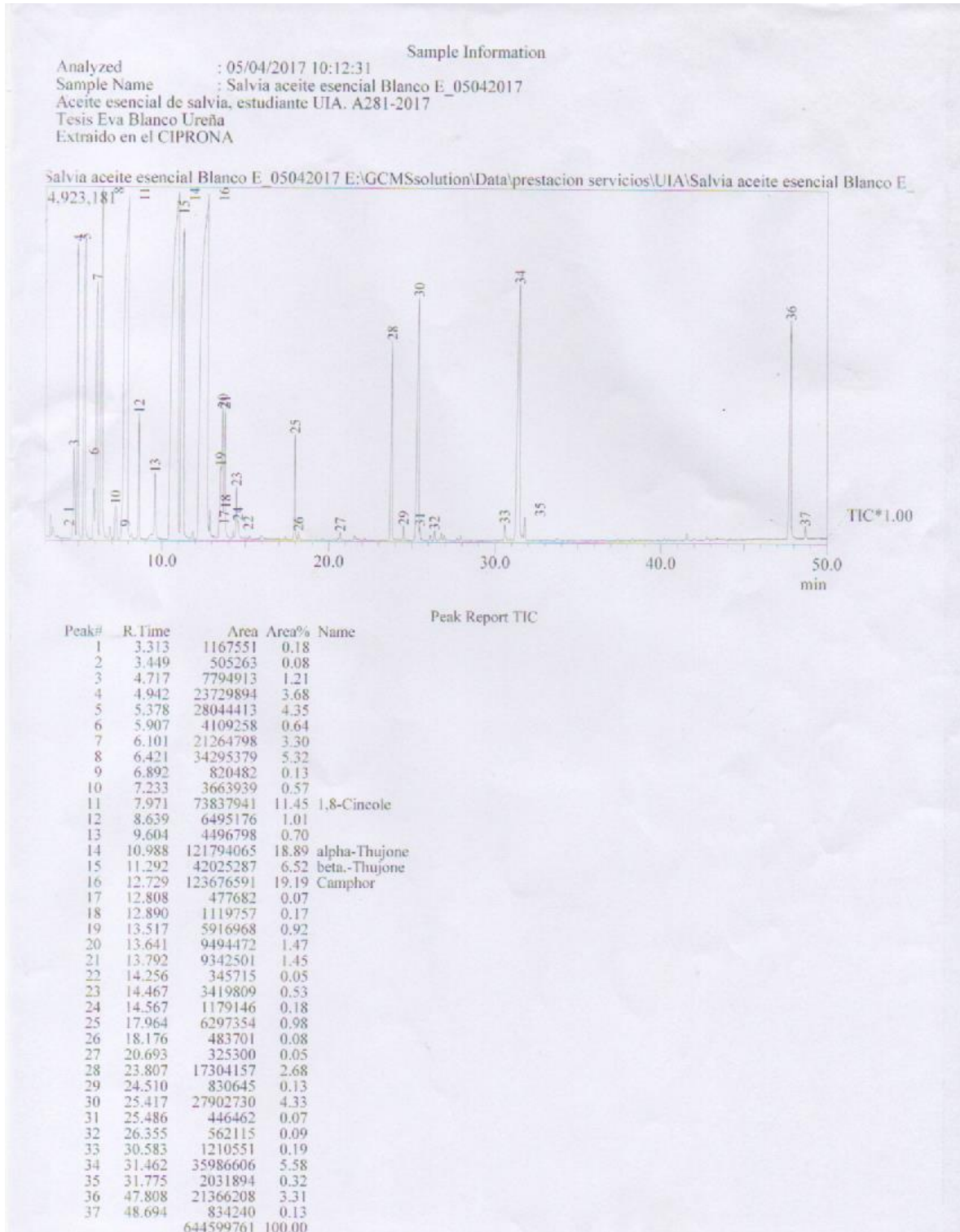
Variable III. Identificar a través del análisis de espectrofotometría de masas y ensayos fitoquímicos el contenido de compuestos químicos que poseen efecto antibacteriano presentes en el aceite esencial de *S. officinalis*.

Análisis de espectrofotometría de masas.

Primeramente, se llevó a cabo un análisis de espectroscopia de masas para determinar los componentes que según Fournomiti *et al* (2015) y Abu-Darwish *et al* (2013) son específicamente los responsables del efecto antibacteriano del aceite esencial de *S. officinalis*.

El análisis se realizó en el centro de investigación CIPRONA en la Ciudad de la Investigación de la Universidad de Costa Rica. Para el aceite esencial obtenido en la extracción por hidrodestilación de *S officinalis* se determinó y cuantificó la composición porcentual de al 1,8-cineol, tujona y alcanfor.

Ilustración 47. Cromatograma obtenido mediante el análisis GC-MS del aceite esencial de *S. officinalis* obtenido por el método de hidrodestilación.



Fuente: CIPRONA, UCR (2017)

En el resultado del análisis, se puede observar la presencia de los monoterpenos anteriormente mencionados en grandes proporciones, siendo estos los que lideran el porcentaje de la composición del aceite de *S. officinalis* sobre los demás componentes.

Tabla 11. Principales componentes presentes en aceite esencial de *S. officinalis* obtenido por el método de hidrodestilación

Componente	Porcentaje de área (%)
1, 8 cineol	11.45
α Tujona	18.89
β Tujona	6.52
Alcanfor	19.19

Fuente: Autora

De acuerdo con los resultados anteriores, se puede observar que el componente que se presenta en mayor porcentaje es el alcanfor, seguido por α tujona, luego 1,8 cineol y por último β tujona en menor proporción que los demás.

Los componentes anteriores, tal y como se mencionó en la literatura en el capítulo II, corresponden a monoterpenos oxigenados responsables de ejercer un efecto antibacteriano sobre *S. aureus*. Además son los componentes que se encuentran en mayor proporción en el aceite esencial según Bouajaj *et al* (2013) (p.1675).

De acuerdo con Jusnu Can Baser y Bushvauer (2010), los porcentajes anteriores se encuentran dentro de los rangos teóricos establecidos.

En el caso de 1, 8 cineol se encuentra entre 4% y 18%, presentándose un porcentaje de 11.45%, el cual resulta mucho mayor al mínimo. En cuanto a α y β tujona, ambas se encuentran igualmente muy por encima del rango establecido como es 9-72% y 2-24% respectivamente. Por último, en el caso del alcanfor, se obtuvo un porcentaje de 19.19%, resultando mayor al máximo establecido, el cual es de 1-18%.

De acuerdo con lo anterior, se puede decir que los porcentajes son bastante considerables, por lo que, tomando en cuenta los resultados obtenidos en la variable número

uno, son estos componentes los responsables del efecto antibacteriano del aceite esencial de *S. officinalis*.

Ensayos fitoquímicos.

Identificación de cetonas

Al ser α tujona una cetona monoterpénica, se realizó este ensayo para determinar la presencia de la misma en el aceite esencial.

Para esta prueba, se agregó en un tubo de ensayo 1 mL de aceite esencial y se agitó vigorosamente con una solución saturada de bisulfito sódico.

Como resultado, se obtuvo la formación de un precipitado en el tubo de ensayo, que muestra de la presencia de un carbonilo.

Ilustración 48. Formación de precipitado por la presencia de grupo carbonilo.



Fuente: Autora

Variable IV. Formulación de un cremigel antibacteriano que incluya en su composición el aceite esencial de la *Salvia officinalis*.

Para la realización de la formulación, primeramente, se pesaron los componentes de la fase acuosa, y se mezclaron con la ayuda de un calentador agitador. Una vez obtenida una mezcla homogénea se agregó trietanolamina como emulgente para obtener el gel o fase acuosa.

Ilustración 49. Fase acuosa



Fuente: Autor

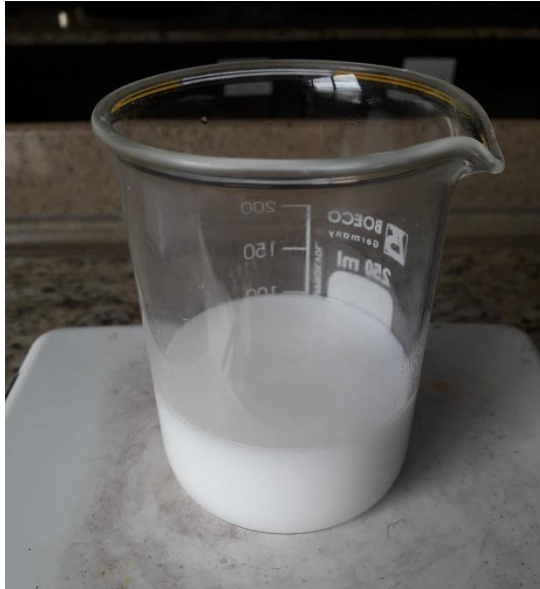
Por otra parte, se agregó en el beaker, el aceite esencial de *S. officinalis*, el aceite mineral y, el Span 60 como agente emulgente, a agitación constante a una temperatura de 75°C durante 32 minutos, de manera que se obtuviera una mezcla homogénea.

En otro beaker se agregó y se sometió a agitación constante el tween, la glicerina, como solvente, y el agua destilada, igualmente a una temperatura de 75°C durante 30 minutos.

Pasado el tiempo, se agregó el beaker 1 en el beaker 2 poco a poco y se sometió a agitación constante en el calentador agitador durante aproximadamente 40 minutos, hasta

enfriar. De esta forma se obtuvo una emulsión aceite/agua, la cual corresponde a la fase oleosa, de aspecto lechoso por la naturaleza de sus componentes y, estable debido a la acción emulgente y suspensora del Tween.

Ilustración 50. Fase oleosa



Fuente: Autora (2017)

Una vez obtenidas tanto la fase acuosa como oleosa, ambas a temperatura ambiente, se agregó, poco a poco, la fase oleosa en la fase acuosa y, con la ayuda de un agitador de vidrio, se mezcló hasta obtener una mezcla homogénea.

Como resultado, se obtuvo un cremigel de aspecto brillante, color blanco, con un leve aroma característico de aceite esencial de *S. officinalis*, suave al tacto, cremoso, levemente oclusivo y fácil de extender a través de la piel, ideal para el tratamiento tópico de las afecciones cutáneas ocasionadas por el impétigo debido a la infección por *S. aureus*.

Ilustración 51. Cremigel compuesto por aceite esencial de *S. officinalis*



Fuente: Autora (2017)

Como envase primario, se eligió un tubo con 25 gramos de cremigel de manera que rinda por un mes o más, dependiendo de la afección y con el fin de facilitar la portabilidad del mismo, obtener mayor facilidad y comodidad de aplicación para el paciente y proporcionar un aspecto estéticamente llamativo y agradable.

Ilustración 51. Envase primario Cremigel



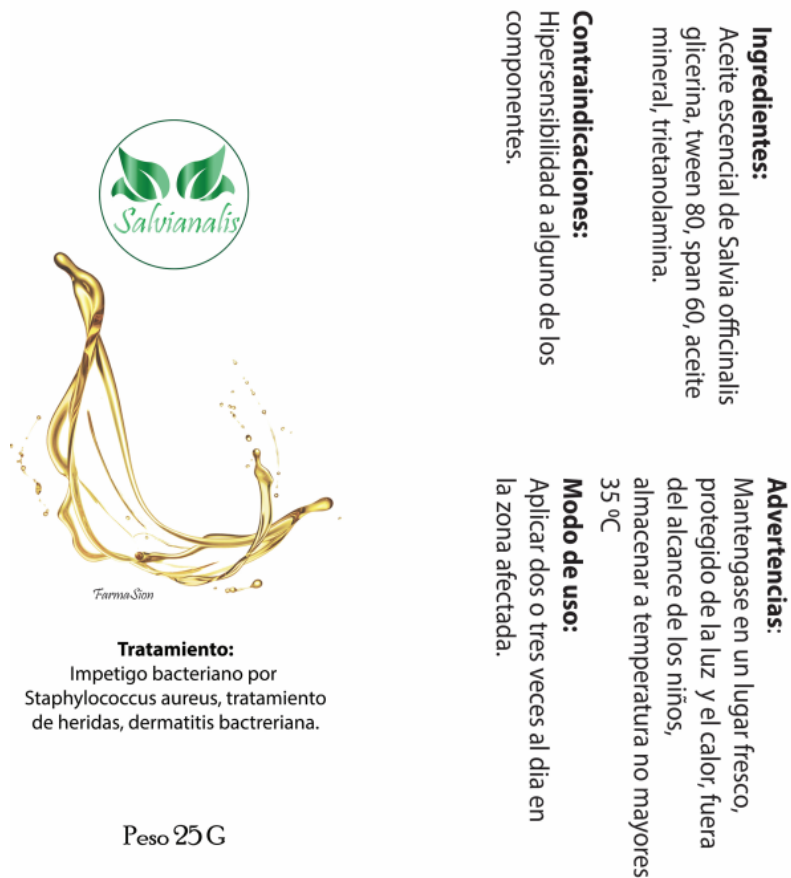
Fuente: Autora (2017)

Además, se realizó una etiqueta, que contiene el nombre comercial de la formulación: “Salvianalis”; el cual es la combinación del nombre científico de la salvia, ya que, como se

mencionó en el capítulo II, la palabra salvia se deriva del latín “salvare”, que significa guardar o curar; y *officinalis* que significa medicinal.

En cuanto a los colores de la etiqueta, esta es de fondo translúcido, cuyo logo representa las hojas de la planta y contiene la información necesaria para su aplicación.

Ilustración 52. Etiqueta empaque primario cremigel



Fuente: Autora (2017)

No fue posible determinar una aproximación de la rentabilidad para la producción de esta formulación a gran escala, ya que no se cuenta con el equipo de extracción necesario para obtener aceite esencial en grandes cantidades.

Sin embargo, la materia prima es de muy bajo costo y el rendimiento del aceite esencial es muy alto. Además, cabe destacar que el material fresco, si se obtiene en temporada de verano, es de menor costo.

En cuanto a la dirección de producto, este va encaminado principalmente a los hospitales y clínicas públicas, privadas o mixtas, ya que es en este lugar donde existe una mayor incidencia de infecciones nosocomiales ocasionadas por *S. aureus*.

Los principales beneficiarios van a ser los pacientes con infecciones cutáneas ocasionadas por *S. aureus* y que buscan tratamientos alternativos para curar sus heridas.

Además, dentro de las principales propiedades del aceite esencial del *S. officinalis* se encuentra, según Bouajaj *et al* (2013), su capacidad antioxidante, por lo que otra aplicación de esta formulación sería de carácter estético, como lo es su capacidad para curar heridas y cicatrizarlas.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Al finalizar la investigación, se llegó a las siguientes conclusiones:

1. El porcentaje de rendimiento del aceite esencial de *S. officinalis* obtenido fue de 1.68%, con lo cual se logró verificar el mayor rendimiento práctico con respecto al teórico.
2. El método de hidrodestilación permitió obtener un alto porcentaje de rendimiento, mayor al porcentaje de rendimiento teórico establecido en la literatura con material seco.
3. La temperatura para el proceso de extracción por hidrodestilación debe encontrarse entre 100-120 °C para evitar la pérdida de metabolitos activos en el aceite esencial de *S. officinalis*.
4. El tiempo mínimo requerido del proceso de extracción por hidrodestilación debe ser de 1 h para poder obtener los componentes bactericidas del aceite esencial de *S. officinalis*.
5. El volumen total de aceite esencial de *S. officinalis* por el método de hidrodestilación fue de 16.5 mL, mayor al especificado en la Farmacopea Europea (15 mL/Kg), lo cual demostró un mayor porcentaje de rendimiento.
6. Se obtuvieron halos de inhibición que demostraron la sensibilidad de la cepa de *S. aureus* frente al aceite esencial de *S. officinalis* a una concentración de 10% o 9.5 mg/mL, concentración mayor a la CMI reportada en la literatura 4mg/mL.
7. Se obtuvo la presencia de estafilococos en las placas de cultivos, al identificarlos con la prueba de catalasa positiva y realizar la tinción de Gram, en la cual se logró observar al microscopio, cocos grampositivos en racimos, característicos del *Estafilococos aureus*.
8. La prueba de sensibilidad a antibióticos resultó positiva frente al microorganismo *S. aureus*, con un halo de inhibición promedio de 16.6 ± 3.98 mm, lo cual evidencia la capacidad antibacteriana del aceite esencial de *S. officinalis* al ser comparados

con los halos obtenidos con los antibióticos: amikacina, vancomicina, ciprofloxacina y azitromicina.

9. El análisis realizado por espectrofotometría de masas permitió determinar la presencia de 1, 8 cineol, α tujona, β tujona y alcanfor en el aceite esencial de *S. officinalis*; responsables del efecto antibacteriano del aceite esencial de *S. officinalis*.
10. El análisis fitoquímico para la identificación de cetonas resultó positivo al obtener un precipitado, evidencia de la presencia de una cetona monoterpénica con es α tujona en la muestra de aceite esencial de *S. officinalis*.
11. Se obtuvo, un cremigel de consistencia agradable, color blanco, cremoso, suave al tacto, fácil de aplicar y levemente oclusivo.
12. Los terpenos presentes en el aceite esencial de *S. officinalis* permitieron obtener una formulación homogénea, cuyos componentes se acoplaron satisfactoriamente en la formulación.
13. Con base en el fundamento teórico donde se destaca las propiedades antibacterianas, al antibiograma y el análisis para la determinación de los metabolitos activos responsables de su actividad, se verifica la capacidad antibacteriana del aceite esencial de *S. officinalis*.
14. Como respuesta a la hipótesis planteada, sí es posible evaluar la efectividad práctica del aceite esencial de *Salvia officinalis* obtenido por la técnica de hidrodestilación contra *Staphylococcus aureus*.

Recomendaciones

1. Se sugiere, evaluar detalladamente cuál método genera la mayor cantidad de aceite esencial, para así evitar perder tiempo en extracciones fallidas.
2. Se recomienda el uso de glicerina en el baño maría para el proceso de extracción por hidrodestilación en lugar de agua, ya que su punto de ebullición es mayor.
3. Se recomienda realizar un análisis general por el método de espectrofotometría de masas y no uno parcial con el fin de determinar en su totalidad los metabolitos activos presentes en el aceite esencial de *S. officinalis*.
4. Se debe realizar las pruebas de sensibilidad, lo más rápido posible después de obtenido el aceite, para así evitar la pérdida de metabolitos activos en el aceite

esencial y mantener en refrigeración el aceite esencial con el fin de evitar la oxidación de metabolitos activos presentes en el aceite esencial.

5. Se sugiere utilizar al menos 6 Kg de material fresco de *S. officinalis* para obtener de manera segura 1 Kg de material seco.
6. Estudiar el secado con distintos métodos de secado de la planta tales como: secado al sol o secado artificial en estufa.
7. Se sugiere la utilización de un desecante para eliminar cualquier traza de agua que pudiera quedar en el aceite esencial con el fin de descartar la posibilidad de que su existencia influya en el porcentaje de rendimiento.
8. Se recomienda hacer un análisis exhaustivo que permita conocer los componentes del aceite esencial con el propósito de no desperdiciar el mismo en pruebas innecesarias.
9. Se sugiere realizar más estudios microbiológicos, contra mayor número de especies de bacterias para confirmar una mejor respuesta en la capacidad bactericida del aceite esencial de *S. officinalis*.
10. Se recomienda pesar el peso total del aceite esencial obtenido para así poder compararlo con el peso obtenido por 1 mL del mismo.
11. Se aconseja comparar la extracción por hidrodestilación con otras técnicas de extracción para de esta manera evaluar su incidencia en la determinación de la capacidad antimicrobiana del aceite esencial.
12. Se sugiere, comparar los resultados y garantizar la adecuada identificación de los metabolitos activos mediante la utilización de otros métodos de identificación.
13. Para la elaboración de la formulación a gran escala, se recomienda la utilización de equipo de extracción más grande, para de esta manera poder determinar la rentabilidad del producto. Además, se debe de cotizar el precio del material fresco de acuerdo a las estación del año en la cual se va a adquirir.

REFERENCIAS

- M. Abel Hernández Chávez. (2013). *Farmacología general Una guía de estudio*. (McGraw-Hill Interamericana, Ed.). Retrieved from <http://www.ebooks7-24.com/book.aspx?i=668>
- Abu-Darwish, M. S., Cabral, C., Ferreira, I. V., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Cruz, M. T., ... Salgueiro, L. (2013). Essential oil of common sage (*Salvia officinalis* L.) from Jordan: Assessment of safety in mammalian cells and its antifungal and anti-inflammatory potential. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/538940>
- Acofarma. (2013). Fichas De Información Técnica Benzoílo Peróxido. Acofarma. S.A. Retrieved from http://www.acofarma.com/admin/uploads/download/4167-ab8da0f0e3915d95870268660f970c3b869987a5/main/files/Benzo__lo_per__xido.pdf
- Arévalo, J., & Arribas, J. (2001). Guía de utilización de antisépticos. *Sociedad Española de ...*, (3), 1–15. Retrieved from <http://200.5.106.165/html/Departamentos/Samp/Microbiologia/Guia para la utilizacion de antisepticos en PDF.pdf>
- Aristil, M. P. C. (2013). *Manual de farmacología básica y clínica*. Retrieved from <http://www.ebooks7-24.com/book.aspx?i=425>
- Badiee, P., Reza Nasirzadeh, A., & Motaffaf, M. (2012). Comparison of *Salvia officinalis* L. essential oil and antifungal agents against candida species. *Journal of Pharmaceutical Technology and Drug Research*, 1(1), 7. <https://doi.org/10.7243/2050-120X-1-7>
- Baj, T., Ludwiczuk, A., Sieniawska, E., Skalicka-Woźniak, K., Widelski, J., Zieba, K., & Głowniak, K. (2013). GC-MS analysis of essential oils from *Salvia officinalis* L.: comparison of extraction methods of the volatile components. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 70(1), 35–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23610957>
- Balouiri, M., Sadiki, M., Ouedrhiri, W., Farah, A., Abed, S. El, & Koraichi, S. I. (2014). Antibacterial activity of extracts from *salvia officinalis* and *rosmarinus officinalis* obtained by sonication and maceration methods. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(2), 167–170.
- Beheshti-Rouy, M., Azarsina, M., Rezaie-Soufi, L., Alikhani, M. Y., Roshanaie, G., & Komaki, S. (2015). The antibacterial effect of sage extract (*Salvia officinalis*) mouthwash against *Streptococcus mutans* in dental plaque: A randomized clinical trial. *Iranian Journal of Microbiology*, 7(3), 173–177.
- Bouajaj, S., Benyamna, a, Bouamama, H., Romane, a, Falconieri, D., Piras, a, & Marongiu, B. (2013). Antibacterial, allelopathic and antioxidant activities of essential oil of *Salvia officinalis* L. growing wild in the Atlas Mountains of Morocco. *Natural*

- Product Research*, 27(June 2015), 1673–1376.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2012.751600>
- Brooks, G. F. (2014). *Microbiología Médica* (26th ed.). McGraw-Hill Interamericana.
 Retrieved from <http://www.ebooks7-24.com/?il=2267>
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales, I* (Editorial Acribia S.A), 1073.
- Carballo, S., Telesca, J., & Banchemo, L. (2011). *Manual de secado solar de especies medicinales y aromáticas*.
- Cercenado, E., Cantón, R., María, C. :, Meseguer, A., Autores, P., Begoña, J., ... Puig De La Bellacasa, J. (2007). *Procedimientos en Microbiología Clínica*.
- cercenado, E., & Saavedra-Lozano, J. (2009). El antibiograma. Interpretación del antibiograma: conceptos generales (I). *Anales de Pediatría Continuada*, 7(4), 214–217. [https://doi.org/10.1016/S1696-2818\(09\)71927-4](https://doi.org/10.1016/S1696-2818(09)71927-4)
- Cerpa, M. (2007). Hidrodestilacion de aceites esenciales: Modelado y Caracterización, 304.
- Faraldos, M., & Goberna, C. (2009). *Técnicas de análisis y caracterización de materiales* (2a. ed.) (2da Edición). Retrieved from <http://site.ebrary.com/lib/bibliouiasp/detail.action?docID=10523043&p00=faraldos>
- Ferrandis, V. (2011). Formas Farmaceuticas y Vias de Administracion. *FORMAS FARMACEUTICAS Y VIAS DE ADMINISTRACION Curso de Farmacologia Para Fisioterapeutas*, 12, 1–65. Retrieved from <http://cofsegovia.portalfarma.com/Documentos/Curso Fisioterap?utas/3.- FORMAS FARMAC?UTICAS Y V?AS DE ADMINISTRACI?N.pdf>
- Fournomiti, M., Kimbaris, A., Mantzourani, I., Plessas, S., Theodoridou, I., Papaemmanouil, V., ... Alexopoulos, A. (2015). Antimicrobial activity of essential oils of cultivated oregano (*Origanum vulgare*), sage (*Salvia officinalis*), and thyme (*Thymus vulgaris*) against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, and *Klebsiella pneumoniae*, 1, 1–8.
- Fox, S. I. (2014). *Fisiología Humana*. (M.-H. Interamericana, Ed.) (13th ed.). Retrieved from <http://www.ebooks7-24.com/book.aspx?i=1671>
- Gómez, M. (2012). *Elementos de estadística descriptiva*. (E. UNED, Ed.) (4th ed.).
- González Vázquez, J. F. (2009). Interés farmacéutico de la “*Salvia officinalis*” y de la “*Euphrasia officinalis*.” *Cuadernos Del Tomás*, 1, 157–171.
- Hernández, C. R. N. (2013). Lectura interpretada del antibiograma Construed reading of the antibiogram, 42(3), 502–506.
- Hernandez, L. (2007). *Estudio de aceites esenciales de las plantas *Ocotea sinuata* (Mez) Rohwer y *Persea povedae* W.C. Burger*. Universidad de Costa Rica.
- Hernández, R., Fernández, C., & Baptista, C. (2014). *Metodología de la investigación. Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53).

<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

- Horiuchi, K., Shiota, S., Kuroda, T., Hatano, T., Yoshida, T., & Tsuchiya, T. (2007). Potentiation of antimicrobial activity of aminoglycosides by carnosol from *Salvia officinalis*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 30(February), 287–290. <https://doi.org/10.1248/bpb.30.287>
- Jusnu Can Baser, K., & Bushvauer, G. (2010). *Handbook of Essential Oils*. (K. Jusnu Can Baser & G. Bushvauer, Eds.). United States of América: Taylor and Francis Group.
- Kenneth Ryan. (2011). *Microbiología Médica* (5 Año: 201). McGraw-Hill Interamericana. Retrieved from <http://www.ebooks7-24.com/?il=472>
- Kioskea. (2014). Antiséptico - Definición, 2014.
- López, L., Castaño, H., & Mejía, C. (2013). Efecto Antimicrobiano Del Aceite Esencial de *Salvia officinalis* sobre microorganismos patógenos transmitidos por alimentos. *Actualidades Biológicas*, 35(98), 77–83.
- Lourdes, K., & Geoconda, G. (2013). *Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito. Tesis*. Retrieved from <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
- Madrigal Ureña, A. J. (2016). *Formulación de un cremigel con acción antibacteriana a base del aceite esencial del *Chenopodium ambrosioides**. Universidad Internacional de las Américas.
- Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Henriques, M., Silva, S., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from *Salvia officinalis* L. *Food Chemistry*, 170, 378–385. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.096>
- McMurry, J. (2004). *Química Orgánica*. (Thomson, Ed.) (6ta ed.). Mexico.
- Medina, M., Casado, M. C., & Torrico, G. (2012). Medios de Cultivo en un Laboratorio de Microbiología. *Revista de Investigación*, 2(4), 1–42. Retrieved from <https://libroslaboratorio.files.wordpress.com/2012/09/medios-de-cultivo-en-un-laboratorio-de-microbiologc3ada.pdf>
- Melgarejo, V., Hillerns, I., & Narváez. (2011). *disminución del índice gingival en sujetos con gingivitis Effectiveness of topical use of *Salvia officinalis* in the gingival index decrease in subjects with gingivitis*.
- Mensa, J., Barberán, J., Llinares, P., Picazo, J. J., Bouza, E., Lerma, F. Á., ... Rodríguez, J. A. G. (2008). Guía de tratamiento de la infección producida por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. *Revista Espanola de Quimioterapia*, 21(4), 234–258.
- Morales Andrea. (2010). *ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIFÚNGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE ROSMARINUS OFFICINALIS OBTENIDO MEDIANTE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN SOXHLET*". Universidad Internacional de la Américas.
- Murray, P., Rosenthal, K., Kobayashi, G., & Pfaller, M. (2002). *Microbiología médica*.

(Elsevier España S.A, Ed.) (4ta edición).

- O'Leary, N., & Moroni, P. (2016). Las Especies De Salvia (Lamiaceae) Para Argentina. *Darwiniana, Nueva Serie*, 4(1), 91–131.
<https://doi.org/10.14522/darwiniana.2016.41.694>
- Ortiz, J., Horna, G., Silva, M., & Vicente, W. (2005). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades. *Revista Medica Herediana Versión On-Line*, 16(1), 39–45. Retrieved from
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2005000100007
- Padilla Fernández, E. (2015). *Formulación y control de calidad de un enjuague bucal elaborado a partir de los extractos totales de Matricaria recutita L. (Manzanilla) y de Salvia officinalis L. (Salvia)*. Universidad Central del Ecuador.
- Pino Alea, J. A. (2015). *Aceites esenciales: química, bioquímica, producción y usos*. Editorial Universitaria. Retrieved from
<http://site.ebrary.com/lib/bibliouiasp/detail.action?docID=11125861>
- Raal, A., Orav, A., & Arak, E. (2007). Composition of the essential oil of Salvia officinalis L. from various European countries. *Natural Product Research*, 21(5), 406–411.
<https://doi.org/10.1080/14786410500528478>
- Reyes, F., Palou, E., & López, M. (2012). Aceites esenciales: alternativa de antimicrobianos naturales. *Temas Selectos de Ingeniería En Alimentos*.
- Roberto Arenas Guzmán. (2015). *Dermatología Atlas, diagnóstico y tratamiento*. (M.-H. Interamericana, Ed.) (6th ed.). Retrieved from <http://www.ebooks7-24.com/book.aspx?i=1461>
- Rodríguez, M., Alcaraz, L., & Real, S. (2012). Procedimientos Para La Extracción De Aceites Esenciales En Plantas Aromáticas. *Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca Y Alimentación (SAGARPA)*, 47.
- Rus, C. F., Alexa, E., Pop, G., Sumalan, M., & Copolovici, M. (2015). ANTIFUNGAL ACTIVITY AND CHEMICAL COMPOSITION OF SALVIA OFFICINALIS L. ESSENTIAL OIL, 47(2), 186–194.
- Sanchez, E., Perez, A., Diosothys, C., & Rodríguez, C. (2005). Caracterización farmacognóstica de Salvia officinalis L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*.
<https://doi.org/1028-4796>
- Torres, M. E. (2015). Flora Humana Normal, 1–5. Retrieved from
<http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap 13.pdf>
- Vargas, J. (2016). *Análisis de las propiedades antibacterianas de dos preparados farmacéuticos tópicos a partir del extracto de propóleo de abeja*. Universidad Internacional delas Américas.

APÉNDICES

Apéndice A

Tabla 3. Patrones estándar del halo de inhibición para estafilococos, puntos de corte equivalentes a la CMI y diámetro del halo de inhibición para la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 empleada como control de calidad.

GRUPO	Antimicrobiano	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)			Punto de corte Equivalente a la CMI (µg/ml)		S. aureus ATCC 25923 intervalo ^a
			Resistente	Intermedia	Sensible	Resistente	Sensible	
A	Penicilina G ^{b,c}	10 U	≤28	--	≥29	β-lactamasa ^b		26-37
	Oxacilina ^b (<i>S. aureus</i>) (<i>Estafilococos coagulasa -</i>)	1	≤10	11-12	≥13	≥4	≤2	18-24
		1	≤17	--	≥18	>0.5	<0.25	--
B	Vancomicina ^d	30	--	--	≥15	≥32	≤4	17-21
	Teicoplanina	30	≤11	11-13	>14	>32	≤8	15-21
	Eritromicina ^e	15	≤13	14-22	≥23	≥8	≤0.5	22-30
	Claritromicina ^e	15	≤13	14-17	≥18	≥8	≤2	26-32
	Azitromicina ^e	15	≤13	14-17	>18	>8	≤2	21-26
	Clindamicina ^e	2	≤14	15-20	>21	>4	<0.5	24-30
	Trimetoprim / sulfametoxazol	1,25/23,75	≤10	11-15	>16	>8/152	<2/38	24-32
C	Gentamicina	10	≤12	13-14	>15	≥8	≤4	19-27
	Ciprofloxacino	5	≤15	16-20	≥21	≥4	≤1	22-30
	Ofloxacino	5	≤12	13-15	≥16	≥8	≤2	24-28
	Levofloxacino	5	≤13	14-16	>17	>8	≤2	25-30
	Cloranfenicol ^e	30	≤12	13-17	≥18	≥32	≤8	19-26
	Rifampicina ^{e,f}	5	≤16	17-19	>20	≥4	≤1	26-34
	Tetraciclina ^g	30	≤14	15-18	>19	>16	≤4	24-30
D	Norfloxacino	10	≤12	13-16	≥17	≥16	≤4	17-28
	Lomefloxacino	10	≤18	19-21	>22	≥8	≤2	23-29
	Nitrofurantoina	300	≤14	15-16	>17	>128	≤32	18-22
	Sulfisoxazol	250 o 300	≤12	13-16	>17	>350	≤100	24-34
	Trimetoprim	5	≤10	11-15	≥16	≥16	≤4	19-26

Elaborado con datos del NCCLS, 2000.

a) Además de *S. aureus* ATCC 25923, ensayar *E. coli* ATCC 35218 con: amoxicilina/clavulánico de 18 a 22 mm.; ampicilina/sulbactam de 13 a 19 mm.

b) Las cepas resistentes de *S. aureus* producen β-lactamasa, y para estas pruebas es preferible el empleo de discos de penicilina G de 10 U. Utilizar penicilina G para estudiar la sensibilidad de todos los estafilococos a todas las penicilinas sensibles a la penicilinas.

c) Estafilococos resistentes a oxacilina son resistentes a todos los β-lactámicos (la sensibilidad a β-lactámicos puede deducir estudiando solo penicilina y oxacilina).

d) Todos los estafilococos con un diámetro del halo de inhibición igual o menor de 14mm deben ser estidados para determinar la CMI de la vancomicina.

e) No para microorganismos aislados del tracto urinario.

f) No utilizar rifampicina sola para el tratamiento de infecciones estafilocócicas.

g) Tetraciclina es el representante de todas las tetraciclinas.

Fuente: Cercenado *et al* (2007) (p.15)

Apéndice B

Formula Media Aritmética

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

Fuente: Morales (2010)

Apéndice C

Formula Varianza.

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_j - \bar{X})^2}{n-1}$$

Fuente: Morales (2010)

Apéndice D

Formula desviación estándar

$$S = \sqrt{S^2}$$

Fuente: Morales (2010)

Apéndice E

Formula estimación del promedio

$$\bar{X} \pm Z \left(1 - \frac{\alpha}{2} \right) \times \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Fuente: Morales (2010)

Apéndice F

Fórmula determinación de porcentaje de rendimiento

$$\%derendimiento = \frac{grextractoseco}{grhojasmolidas} \times 100$$

Apéndice G**Formula determinación de Intervalo de confianza con un 95%de confianza**

$$\bar{X} - Z_{1-\alpha/2} \cdot \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Fuente: Gómez (2012)