

EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Lippia alba* (Pampa orégano) FRENTE AL CRECIMIENTO DE LA CEPA PATRÓN DE *Streptococcus mutans* ATCC®25175™

EFFECT OF THE ESSENTIAL OIL OF *Lippia alba* (Pampa orégano) AGAINST THE GROWTH OF THE STANDARD STRAIN OF *Streptococcus mutans* ATCC®25175™

Coronel Alva Jhonatan¹, Zevallos Escobar Liz E²

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote

¹E-mail: jhoncoronel@hotmail.com

²E-mail: lzevallose@uladech.edu.pe

Recibido: 08 mayo 2019 - Aceptado: 04 julio 2019

DOI: <https://doi.org/10.18050/cientifi-k.v7i2.819>

RESUMEN

Se determinó el efecto del aceite esencial de *Lippia alba* "pampa orégano" frente al crecimiento de la cepa patrón de *Streptococcus mutans* ATCC®25175™. Los ensayos consistieron en realizar distintas concentraciones 25%, 50%, 75% y 100% del aceite esencial de *Lippia alba*, diluyendo cada concentración en dimetilsulfoxido, un control positivo fue clorhexidina al 0,12% y el control negativo fue dimetilsulfoxido. Para evaluar el efecto del aceite esencial de *Lippia alba* se utilizó los parámetros de Duraffourd. Se embebieron discos de papel filtro con el aceite esencial a diferentes concentraciones y se consideró la inhibición del crecimiento de la cepa *Streptococcus mutans* ATCC®25175™ según la lectura de los halos de inhibición después de 48 horas midiendo el tamaño en milímetros. En las muestras el aceite esencial de *Lippia alba* al 100% obtuvo un promedio de 32.2 mm, aceite esencial de *Lippia alba* al 75 % obtuvo un promedio de 24.4 mm, aceite esencial de *Lippia alba* al 50 % obtuvo un promedio de 19.2 mm, aceite esencial de *Lippia alba* al 25 % obtuvo un promedio de 15.4 mm, el control positivo (Clorhexidina 0.12%) obtuvo un promedio de 14.1 mm y el control negativo DMSO 25% no tuvo efecto inhibitorio del crecimiento sobre la cepa patrón. Se concluyó que el aceite esencial de *Lippia alba* (Pampa orégano) al 100% comparado con el control positivo (Clorhexidina 0.12%) presentó mayor efecto inhibitorio en el crecimiento de la cepa patrón de *Streptococcus mutans* ATCC®25175™.

Palabras clave: Efecto inhibitorio, *Streptococcus mutans*, *Lippia alba*, Pampa orégano.

ABSTRACT

The effect of the essential oil of *Lippia alba* "pampa orégano" against the growth of the *Streptococcus mutans* standard strain of ATCC®25175™. was determined. The tests consisted of performing different concentrations of 25%, 50%, 75% and 100% of the essential oil of *Lippia alba*, diluting each concentration in dimethylsulfoxide; a positive control was chlorhexidine at 0.12% and the negative control was dimethylsulfoxide. In order to evaluate the effect of the essential oil of *Lippia alba*, the Duraffourd parameters were used. Filter paper discs were soaked with the essential oil at different concentrations and the growth inhibition of the strain *Streptococcus mutans* ATCC®25175™. was considered according to the reading of the inhibition halos after 48 hours measuring the size in millimeters. In the samples, the essential oil of *Lippia alba* at 100% averaged 32.2 mm, essential oil of *Lippia alba* at 75% averaged 24.4 mm, essential oil of *Lippia alba* at 50% averaged 19.2 mm, essential oil of *Lippia alba* at 25% averaged 15.4 mm, the positive control (Chlorhexidine 0.12%) averaged 14.1 mm and the negative control DMSO, 25% had no growth inhibitory effect on the standard strain. It was concluded that the essential oil of *Lippia alba* (Pampa orégano) at 100% compared to the positive control (Chlorhexidine 0.12%) presented a greater inhibitory effect on the growth of the standard strain of *Streptococcus mutans* ATCC®25175™.

Keywords: Inhibitory effect, *Streptococcus mutans*, *Lippia alba*, Pampa orégano.

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas de salud más prevalente a nivel mundial es la caries dental, el cual intervienen múltiples factores como placas dentarias, saliva, dientes susceptibles, cantidad de sustrato suficiente para su multiplicación, etc. La caries se caracteriza por destruir los tejidos duros del diente con una desmineralización creando una cavidad, posteriormente se genera la pérdida del mismo. El agente causal con mayor frecuencia es una bacteria que pertenece a la familia de los *Streptococcus* grupo *mutans streptococci*, la bacteria a la que me refiero es al *Streptococcus mutans*. “Entre los factores de patogenicidad en el *Streptococcus mutans* destaca: poder acidogénico, acidófilo y acidúrico; síntesis de polisacáridos extracelulares de tipo glucanos insoluble y solubles, fructanos; síntesis de polisacáridos intracelulares; capacidad adhesiva por las proteínas salivales; producción de bacteriocinas con actividad sobre otros microorganismos”. (Centurión, 2015; Huari, 2014; Castro, 2005)

Existen muchos métodos para prevenir y tratar este problema de salud dental, generalmente consisten en utilizar productos antimicrobianos químicos, los cuales a largo plazo generan daños en el organismo ya que su uso prolongado causa resistencia bacteriana e inmunodepresión. Por otro lado, este problema de salud genera problemas en la economía ya que requiere de una inversión personal, gasto de tiempo para acudir a un profesional Odontólogo dejando de lado otros quehaceres como el estudio, trabajo, oficios en el hogar, etc.

Las plantas juegan un rol muy significativo en la

comunidad, actualmente las investigaciones en plantas para combatir diferentes microorganismos patógenos vienen generando una expectativa y están siendo recibidos con mucha atención por los científicos, comprobándose diversas propiedades curativas. “Pampa orégano” *Lippia alba* (Mill) N.E Brown, conocida, comúnmente como “Cidron”, “hierba luisa” (Venezuela), “erva-cidreira” (Brasil), “prontoalivio” (Colombia), es usada en Latinoamérica por sus múltiples beneficios conocidos: calmante gastrointestinal, antidiarreico, sudorífico, expectorante, emenagogo, anhiherpético, disminuye afecciones cutáneas y mucosas, antisépticas, antifúngicas y antibacterianas, “pero su posible uso como bacteriostático de la principal bacteria involucrada en la formación de la placa bacteriana dental, no reúne mayores referencias”. (Agudelo-Gómez et al., 2010; Peso y Gonzales, 1998; Reyes, 2017; Morataya, 2016).

Debido a las propiedades beneficiosas que tiene *Lippia alba* y a su destacada actividad antibacteriana según refieren diversas investigaciones se plantea el siguiente problema ¿Cuál es el efecto del aceite esencial de *Lippia alba* (Pampa orégano) frente al crecimiento de la cepa patrón de *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM? Se consideró como objetivo general determinar el efecto del aceite esencial de *Lippia alba* “pampa orégano” frente al crecimiento de la cepa patrón de *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

Para la obtención del aceite esencial de *Lippia alba* (Pampa orégano), se secaron hojas frescas de *Lippia alba* en una estufa a 40°C durante 10 horas luego se tomaron 600 gramos de hojas secas y troceadas. Posteriormente se llevó a un equipo de tipo Clevenger para la obtención del aceite esencial mediante arrastre de vapor de agua. Después de obtener el aceite esencial se secó con sulfato de sodio anhidro y se guardó hasta su utilización en una refrigeradora a 5°C.

La estandarización de la cepa ATCC®25175 fue según la escala de Mc Farland 0.5, para lo cual se

utilizó un inóculo de colonias de *Streptococcus mutans* en 5ml de suero fisiológico hasta obtener la misma turbidez que el patrón de Mc Farland 0.5. Se realizó un estudio descriptivo *transversal* para determinar la inhibición del crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM en diferentes (25%, 50%, 75% y 100%) concentraciones de aceite esencial de *Lippia alba*. Se utilizaron discos de papel embebidos del aceite esencial de *Lippia alba* para inhibir el crecimiento de la cepa patrón de *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM se usó

como control clorhexidina al 0.12% y como diluyente del aceite esencial de *Lippia alba* se utilizó dimetilsulfoxido. (Huari, 2014)

III. RESULTADOS

Tabla 1.

Halos de inhibición de la cepa “Streptococcus mutans ATCC®25175TM” por efecto del aceite esencial de Lippia alba (pampa orégano) a diferentes concentraciones.

Placas	Aceite 25%	Aceite 50%	Aceite 75%	Aceite 100%	Clorhexidina 0.12%	DMSO 25%
1	7 mm	9 mm	26 mm	20 mm	15 mm	5 mm
2	23 mm	16 mm	9 mm	26 mm	14 mm	5 mm
3	6 mm	11 mm	9 mm	32 mm	15 mm	5 mm
4	12 mm	25 mm	8 mm	14 mm	15 mm	5 mm
5	21 mm	36 mm	62 mm	62 mm	13 mm	5 mm
6	30 mm	20 mm	30 mm	38 mm	10 mm	5 mm
7	22 mm	26 mm	12 mm	20 mm	16 mm	5 mm
8	10 mm	20 mm	38 mm	44 mm	15 mm	5 mm
9	8 mm	10 mm	26 mm	34 mm	14 mm	5 mm

Fuente: Ficha de recolección de datos post inhibición del crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM

Tabla 2.

Estadística descriptiva de los halos de inhibición en cepas de Streptococcus mutans después de aplicar aceite esencial de Lippia alba al 25%, 50%, 75% y 100%

% de aceite esencial	25%	50%	75%	100%	Clorhexidina 0.12%	DMSO 25%
Promedio	15.4 mm	19.2 mm	24.4 mm	32.2 mm	14.1 mm	5 mm
Mediana	12 mm	20 mm	26 mm	32 mm	15 mm	5 mm
Varianza	75.03 mm	78.69 mm	316.53	216.44	3.11 mm	0 mm
Desv. tip.	8.7 mm	8.9 mm	17.8	14.7 mm	1.8 mm	0 mm
Valor mínimo	6 mm	9 mm	8 mm	14 mm	10 mm	5 mm
Valor máximo	30 mm	36 mm	62 mm	62 mm	16 mm	5 mm

Fuente: Ficha de recolección de datos post inhibición del crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM

Tabla 3.

Efecto del ceite esencial de Lippia alba a diferetes concentraciones frente al crecimiento de cepas de Streptococcus mutan ATTCC®25175 “según escala de Duraffourd”

	Aceite esencial de <i>Lippia alba</i> al 25%	Aceite esencial de <i>Lippia alba</i> al 50%	Aceite esencial de <i>Lippia alba</i> al 75%	Aceite esencial de <i>Lippia alba</i> al 100%	Control positivo CLORHE XIDINA 0.12%	Control negativo DMSO 25%
Nula (-)	2(22 %)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	9(100%)
sensible (+)	3(33%)	3(33%)	3(33%)	0(0%)	2(22%)	0(0%)
muy sensible (++)	0(0%)	1(11.1%)	1(11.1%)	1(11.1%)	7(78%)	0(0%)
sumamente sensible (+++)	4(44.4%)	5(55.5%)	5(55.5%)	8(88.8%)	0(0%)	0(0%)
Total de placas	9	9	9	9	9	9

Fuente: Ficha de recolección de datos post inhibición del crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM

IV. DISCUSIÓN

En la investigación realizada se recolectó *Lippia alba* “pampa orégano” en el distrito de Nv. Chimbote – Chimbote, provincia del Santa – Ancash, se obtuvo aproximadamente 9ml de aceite esencial a partir de 600 gr de hojas secas de *Lippia alba* (pampa orégano), “mediante la técnica de arrastre de vapor de agua”. El rendimiento del aceite esencial fue de 1.5% v/p, se han reportado resultados en 1.9%, 1.6% v/p y 0.5% (p/p) de rendimiento de aceite esencial. (Pino, 1997; Blanco, 2014; Duran, 2017; Linde, 2016)

El aceite esencial de *Lippia alba* que se obtuvo fue una sustancia oleosa de color verde transparente, el cual fue producto de la extracción de las hojas secas de la planta, en el equipo Clevenger mediante el método de arrastre de vapor de agua. No existen estudios que contribuyan con la efectividad inhibitoria en el crecimiento de *Streptococcus mutans* por efecto de *Lippia alba*, pero si hay referencia de su actividad bactericida contra otras cepas, diversos estudios publicados consideran que el “aceite esencial de *Lippia alba* presenta actividad antibacteriana”, siendo mayor, en general, sobre los gérmenes Gram positivos, el cual podría ser por su alto contenido en carvona. (Henao, 2011; Rodríguez y Segura, 2018, Pino, 1997)

Para realizar nuestros resultados cualitativamente “se tomaron en cuenta las pautas de Duraffoud basados en estudios estadísticos que le permitieron establecer tablas de actividad antimicrobiana de aceites esenciales frente a un gran número de microorganismos determinando el porcentaje de acción de aceites esenciales de diversas plantas”. (Huari, 2014)

En la tabla 1 se puede observar que el aceite esencial de *Lippia alba* a concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% tuvieron mejor actividad inhibitoria que el control positivo de Clorhexidina al 0.12% respecto al crecimiento de la cepa patrón de *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM, y el control negativo DMSO no presenta actividad inhibitoria del crecimiento (los 5mm es el diámetro del disco). Cosco (2010) inhibió el crecimiento de *Streptococcus mutans* y la flora mixta salival por efecto de

aceite esencial de *Matricaria chamomilla* “manzanilla” ya que sus resultados fueron positivos a diferentes concentraciones, el aceite al 100% tuvo similiar efectividad que el control positivo clorhexidina 0.12%. Por su parte Huari (2014) determinó el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en *streptococcus mutans*, donde obtuvo resultados positivos con el aceite esencial a concentraciones de 25%, 50% y 100%, el control positivo amoxicilina fue superior al aceite esencial al 100% y el control negativo dimetilsulfoxido al 25% no tuvo efecto antibacteriano. Esto indica que el aceite esencial de *Lippia alba* “Pampa orégano” tiene superior efecto inhibitorio en el crecimiento de la cepa *Streptococcus mutans*.

En la tabla 2 se observan los promedios obtenidos de las sustancias aplicadas en la cepa patrón de *Streptococcus mutans* el promedio del control positivo (Clorhexidina 0.12%) fue menor 14.1 mm, que el aceite esencial de *Lippia alba* al 100%, el cual se obtuvo un halo de inhibición de 32.2 mm, el aceite esencial de *Lippia alba* al 75% tubo un halo de inhibición de 24,4mm, al 50% se obtuvo un halo de inhibición de 19.2 mm, al 25% se obtuvo un halo de inhibición de 15.4 mm y el control negativo de DMSO 25% (dimetilsulfóxido) no obtuvo halo de inhibición del crecimiento bacteriano, lo que se consideró que los 5mm es el tamaño del diámetro del disco. Respecto a los halos inhibición, la investigación de Cosco (2010), obtuvo promedios de halos de inhibición con aceite esencial de *Matricaria chamomilla* “manzanilla”, sobre cepa patrón de *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM, concentración al 25% 10.2mm, concentración al 50% 17.8mm, concentración al 100% 22mm y control positivo clorhexidina 0.12% 24.2mm. También Huari (2014), obtuvo promedios de halos de inhibición con aceite esencial de *Minthostachys mollis* sobre cepa patrón de *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM, concentración al 100% media de 10.79 mm, concentración al 50% media de 7.6 mm, concentración al 25% media de 5.0 mm, control positivo amoxicilina 49.3 mm y control negativo DMSO 5.0 mm. Estos resultados

obtenidos indican que el aceite esencial de *Lippia alba* tiene mayor efecto inhibitorio del crecimiento de *Streptococcus mutans*, el cual para es relativamente bueno.

En la tabla 3 se organizó los resultados según la escala de Duranffourd, en la que se obtuvo para el aceite esencial de *Lippia alba* al 100% tiene una acción 88,8% sumamente sensible sobre la cepa patrón de *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM, el aceite esencial al 75% y 50 % tienen un 55,5% de acción sumamente sensible, el aceite esencial al 25% obtuvo un 44,4 % de acción sumamente sensible, mientras que el control positivo (Clorhexidina 0.12%) un 78% de acción muy sensible. Según la escala de Duranfourd indican que los resultados son relativamente buenos y con la mínima concentración que se trabajó “aceite esencial al 25%” tiene alto porcentaje de acción sumamente sensible el cual es relativamente bueno. (Huari, 2014)

En esta investigación se buscó determinar si el aceite esencial de *Lippia alba* “pampa orégano” ejercía efecto inhibitorio del crecimiento de la cepa patrón *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM, con estos resultados, se

V. CONCLUSIONES

El aceite esencial de *Lippia alba* (pampa orégano) al 100%, presentó mayor efecto inhibitorio del crecimiento de la cepa patrón de *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM con un halo promedio de 32.2 mm, comparado con las concentraciones al 75 %, 50% y 25%. Según la escala de Duranffourd, el aceite esencial de *Lippia alba* al 100% presento actividad sumamente sensible (+++) sobre la cepa patrón

observa y se demuestra la existencia de un efecto de inhibición del desarrollo bacteriano con el aceite estudiado, según los resultados obtenidos; además se encontró diferencias significativas con respecto al tamaño del halo de inhibición a distintas concentraciones de aceite esencial de *Lippia alba*.

Investigaciones realizadas señalan que aceites esenciales que muestran efecto inhibitorio sobre cepas de *Streptococos mutans* revelaron presencia de diversos terpenos y polifenoles, a quienes se les atribuye posible actividad antibacteriana, entre ellos se ha podido considerar al eucaliptol, timol, mentona, carvacrol y citral, que han sido incorporadas y aplicadas en diversas formulaciones para el cuidado de la salud bucal. (Mortaya, 2016, Barrera et al, 2008)

Los resultados de esta investigación sugieren que los aceites esenciales de *Lippia alba* podrían ser considerados como agentes anticariogénicos que podrían ayudar a la formulación de productos medicinales en el manejo de la salud bucal, y otros, teniendo en cuenta su potente actividad al inhibir el crecimiento del *S. mutans*.

de *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM. El control positivo (Clorhexidina 0.12%) presento menor tamaño de halo de inhibición promedio de 14.1 mm, comparado con el aceite esencial de *Lippia alba* al 25% cuyo promedio fue de 15.4 mm, lo que indica comparado con este control presento mayor efecto inhibitorio del crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agudelo-Gómez, L., Gómez, G., Durán, D., Stashenko, E. y Betancur-Galvis, L. (2010). Composición química y evaluación de la actividad antiherpética in vitro de aceites esenciales de *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown y sus componentes mayoritarios. Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud, 42(3), 230-239. Recuperado de: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-08072010000300006&lng=en&tlng=es

Barrera, R., Alarcón, E., Gonsález, L., Villa, A. y Montes, C. (2008) Síntesis de carveol, carvona, verbenol y verbenona. Rev. Ingeniería y Competitividad, 10(1), p. 43 – 63. Recuperado de: <http://bibliotecadigital.univalle.edu.co/bitstream/10893/1663/1/vol.10%20no.1%20art.4.pdf>

Blanco, M. (2014). Rendimiento de biomasa y aceite esencial de quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown en respuesta a las prácticas agronómicas, y sus propiedades farmacológicas. (Tesis de maestría).

- Universidad Nacional de la Plata. Argentina. Recuperado de: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/43581/Documento_completo.pdf?sequence=1
- Castro, V. (2005) Inhibición del crecimiento in vitro de *Streptococcus mutans* por papaina y sanitrend. (Tesis). Universidad de Chile. Chile. Recuperado de: http://www.tesis.uchile.cl/tesis/uchile/2005/castro_v/sources/castro_v.pdf
- Centurión, K. (2015). Efecto antibacteriano in vitro de diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (tara) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 35668. (Tesis magistral). Universidad Privada Antenor Orrego. Trujillo. Recuperado de: http://repositorio.upao.edu.pe/bitstream/upaoep/972/1/CENTURI%C3%93N_KARINA_ANTIBACTERIANO_INVITRO_ETAN%C3%93LICO.pdf
- Cosco, D. (2010). Actividad inhibitoria del crecimiento de *Streptococcus mutans* y la flora mixta salival por acción del aceite esencial de *Matricaria chamomilla* manzanilla. (Tesis). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. Recuperado de: <http://www.cop.org.pe/bib/tesis/DANYALEJANDROCOSCOROBLES.pdf>
- Duran, D., Monsalve, L., Rene J., Stashenko, E. (2007). Estudio comparativo de la composición química de aceites esenciales de *Lippia alba* provenientes de diferentes regiones de Colombia, y efecto del tiempo de destilación sobre la composición del aceite. *Scientia Et Technica*. 11 (33). Recuperado de: <http://revistas.utp.edu.co/index.php/revista-ciencia/article/view/6067/3305>
- Henaó, S., Martínez, J., Pacheco, N. y Marín, J. (2011). Actividad bactericida de extractos acuosos de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown contra *Helicobacter pylori*. *Rev Col Gastroenterol*. 26(2). Recuperado de: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99572011000200002
- Huari, M. (2014) Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (MUÑA) en *Streptococcus mutans*. (Tesis). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. Recuperado de: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/3680/1/Huari_gg.pdf
- Linde, G., Colauto, N. y Gazim Z. (2016). Quimiotipos, extracción, composición y aplicaciones del aceite esencial de *Lippia alba*. *Revista Scielo. Rev. Bras. Pl. Med., Campinas*, 18(1), p.191-200. Recuperado de: <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v18n1/1516-0572-rbpm-18-1-0191.pdf>
- Morataya, M. (2016). Caracterización Farmacopeica de cuatro plantas aromáticas de Guatemala Albahaca de monte (*Ocimum micranthum*), Oregano (*Lippia graveolens*), Salvia sija (*Lippia alba*) y Salvijá (*Lippia chiapasensis*). (Tesis). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. Recuperado de: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2389.pdf
- Peso, N. y Gonzales, A. (1998). Caracterización Agronómica de Pampa orégano. *Folia Amazónica*. Instituto de Investigación de la Amazonia Peruana. 9 (1-2). Disponible en: <http://www.iiap.org.pe/Upload/Publicacion/Folia%209.pdf#page=179>.
- Pino, J., Ortega, L., Rosado, A., Rodrigues, J. y Baluja, R. (1997). Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) n. e. Brown. *Rev Cubana Farm*. 30(1). Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75151996000100007&script=sci_arttext&lng=pt
- Reyes, G. y Sánchez, A. (2017). Efecto de la infusión de *Lippia alba* en los parámetros productivos y control bacteriano en pollos de engorde. (Tesis). Universidad Técnica de Machala. Ecuador. Recuperado de: http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/am/48000/10537/1/DE00005_TRABAJO_DETITULACION.pdf