



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

ANÁLISIS ANTIMICROBIANO DE LOS ACEITES DE *Anethum graveolens* L Y *Mentha pulegium* FRENTE A *Candida albicans* Y *Enterococcus faecalis*

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA:

CRISTINA ELIZABETH ROSERO GUARNIZO

Riobamba - Ecuador

2023



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

ANÁLISIS ANTIMICROBIANO DE LOS ACEITES DE *Anethum graveolens* L Y *Mentha pulegium* FRENTE A *Candida albicans* Y *Enterococcus faecalis*

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: CRISTINA ELIZABETH ROSERO GUARNIZO

DIRECTORA: DRA. ADRIANA MONSERRATH MONGE MORENO

Riobamba - Ecuador

2023

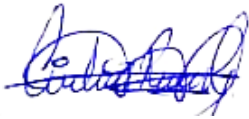
© 2023, Cristina Elizabeth Rosero Guarnizo

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, Cristina Elizabeth Rosero Guarnizo, declaro que el presente Trabajo de Integración Curricular es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Integración Curricular; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

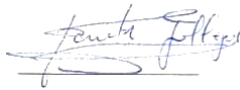


Riobamba, 1 de junio de 2023



Cristina Elizabeth Rosero Guarnizo
172440155-7

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA BIOQUIMICA Y FARMACIA

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; Tipo: Trabajo Experimental, **ANÁLISIS ANTIMICROBIANO DE LOS ACEITES DE *Anethum graveolens L Y Mentha pulegium* FRENTE A *Candida albicans Y Enterococcus faecalis***, realizado por la señorita: **CRISTINA ELIZABETH ROSERO GUARNIZO**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dra. Janneth María Gallegos Núñez, PhD. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2023-06-01
Dra. Adriana Monserrath Monge Moreno DIRECTORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2023-06-01
BQF. Mónica Jimena Concha Guaiña, M.Sc. ASESOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2023-06-01

DEDICATORIA

A mis padres por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad, a mi esposo Andrés Rodríguez por darme su apoyo incondicional, a mis suegros por siempre estar apoyándome y a mi hijo por ser ese motor para seguir adelante el cual no me deja rendirme. Gracias totales a todos.

Cristina

AGRADECIMIENTO

Le agradezco primeramente a Dios que me ha guiado y me ha dado la fortaleza para seguir adelante. A mi familia que siempre me ha dado su apoyo para seguir adelante con mis estudios. A mis profesores por inculcarnos sus conocimientos y su apoyo a lo largo de la carrera.

Cristina

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	xii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xiv
SUMMARY	Error! Bookmark not defined.
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1.	DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA	2
1.1.	Planteamiento del problema	2
1.2.	Justificación	3
1.3.	Objetivos	4
1.3.1.	<i>Objetivo general</i>	<i>4</i>
1.3.2.	<i>Objetivos específicos</i>	<i>4</i>

CAPITULO II

2.	MARCO TEÓRICO.....	5
2.1.	Referencias teóricas.....	5
2.1.1.	<i>Antecedentes de la investigación</i>	<i>5</i>
2.1.2.	<i>Actividad antimicrobiana</i>	<i>6</i>
2.1.2.1.	<i>Agente microbiano</i>	<i>6</i>
2.1.3.	<i>Aceites esenciales</i>	<i>6</i>
2.1.3.1.	<i>Propiedades físicas de los aceites esenciales</i>	<i>7</i>
2.1.4.	<i>Plantas medicinales</i>	<i>7</i>
2.1.4.1.	<i>Anethum graveolens L.....</i>	<i>7</i>
2.1.4.2.	<i>Mentha pulegium.....</i>	<i>10</i>
2.1.5.	<i>Hongos</i>	<i>11</i>
2.1.6.	<i>Candida albicans.....</i>	<i>12</i>
2.1.6.1.	<i>Morfología.....</i>	<i>12</i>
2.1.6.2.	<i>Condiciones de crecimiento.....</i>	<i>12</i>
2.1.6.3.	<i>Epidemiología.....</i>	<i>13</i>

2.1.7.	<i>Cocos</i>	13
2.1.7.1.	<i>Clasificación de los cocos</i>	13
2.1.8.	<i>Enterococcus</i>	13
2.1.9.	<i>Enterococcus faecalis</i>	14
2.1.9.1.	<i>Morfología</i>	14
2.1.9.2.	<i>Condiciones de crecimiento</i>	14
2.1.9.3.	<i>Epidemiología</i>	15
2.1.10.	<i>Concentración mínima inhibitoria</i>	15
2.1.11.	<i>Concentración mínima bactericida</i>	15
2.1.12.	<i>Concentración mínima fungicida</i>	15

CAPITULO III

3.	MARCO METODOLÓGICO	16
3.1.	Descripción de los procesos	16
3.1.1.	<i>Hidrodestilación</i>	16
3.1.2.	<i>Determinación del índice de refracción de los aceites esenciales</i>	16
3.1.3.	<i>Determinación de la densidad relativa de los aceites esenciales</i>	16
3.1.4.	<i>Prueba de difusión por disco</i>	16
3.1.5.	<i>Método de dilución en caldo</i>	17
3.2.	Materiales, equipos y reactivos	17
3.2.1.	<i>Materiales</i>	17
3.2.2.	<i>Equipos</i>	18
3.2.3.	<i>Reactivos</i>	19
3.2.4.	<i>Microorganismos</i>	19
3.3.	Etapas del trabajo experimental	20
3.4.	Enfoque y alcance del trabajo	20
3.4.1.	<i>Enfoque</i>	20
3.4.2.	<i>Alcance</i>	20
3.5.	Tipo y diseño del trabajo	21
3.6.	Métodos, técnicas e instrumentos de la investigación	21
3.6.1.	<i>Extracción de los aceites esenciales</i>	21
3.6.1.1.	<i>Cálculo de la densidad de los aceites esenciales</i>	21
3.6.1.2.	<i>Cálculo del rendimiento de la extracción</i>	22
3.6.1.3.	<i>Cálculo del índice de refacción</i>	23
3.6.2.	<i>Análisis antimicrobiano</i>	23
3.6.2.1.	<i>Preparación de las concentraciones de los aceites esenciales</i>	23

3.6.2.2.	<i>Preparación de los medios de cultivo</i>	23
3.6.2.3.	<i>Procedimiento para la activación de los microorganismos KWIK-STIK</i>	25
3.6.2.4.	<i>Preparación del estándar de McFarland</i>	26
3.6.2.5.	<i>Método de Kirby Bauer</i>	26
3.6.2.6.	<i>Procedimiento para la concentración mínima inhibitoria</i>	26
3.6.2.7.	<i>Procedimiento para la concentración mínima bactericida</i>	27

CAPITULO IV

4.	ANÁLISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS	28
4.1.	Obtención de los aceites esenciales	28
4.2.	Características organolépticas	29
4.2.1.	<i>Aceite esencial de Anethum graveolens L</i>	29
4.2.2.	<i>Aceite esencial de Mentha pulegium</i>	29
4.3.	Características fisicoquímicas	30
4.3.1.	<i>Densidad e índice de refracción del aceite de Anethum graveolens L</i>	30
4.3.2.	<i>Densidad e índice de refracción del aceite de Mentha pulegium</i>	30
4.4.	Rendimiento de extracción	31
4.4.1.	<i>Aceite esencial de Anethum graveolens L</i>	31
4.4.2.	<i>Aceite esencial de Mentha pulegium</i>	31
4.5.	Determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales mediante el método de Kirby Bauer	32
4.5.1.	<i>Actividad antimicrobiana que presentaron los aceites esenciales de Mentha pulegium y Anethum graveolens L frente a Candida albicans</i>	33
4.5.2.	<i>Actividad antimicrobiana que presentaron los aceites esenciales de Mentha pulegium y Anethum graveolens L frente a Enterococcus faecalis</i>	35
4.5.3.	<i>Actividad antimicrobiana que presento la mezcla de los aceites esenciales de Mentha pulegium y Anethum graveolens L frente a Candida albicans</i>	38
4.5.4.	<i>Actividad antimicrobiana que presento la mezcla de los aceites esenciales de Mentha pulegium y Anethum graveolens L frente a Enterococcus faecalis</i>	39
4.6.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales de Mentha pulegium y Anethum graveolens L	40
4.6.1.	<i>Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales de Mentha pulegium y Anethum graveolens L frente a Candida albicans</i>	40
4.6.2.	<i>Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales de Mentha pulegium y Anethum graveolens L frente a Enterococcus faecalis</i> ...	41

4.6.3.	<i>Determinación de la concentración mínima inhibitoria de la mezcla de los aceites esenciales de Mentha pulegium y Anethum graveolens L frente a Candida albicans</i>	43
4.6.4.	<i>Determinación de la concentración mínima inhibitoria de la mezcla de los aceites esenciales de Mentha pulegium y Anethum graveolens L frente a Enterococcus faecalis</i>	44
4.7.	Determinación de la concentración mínima bactericida y fungicida de los aceites esenciales de Mentha pulegium y Anethum graveolens L	45
4.7.1.	<i>Determinación de la concentración mínima fungicida de los aceites esenciales de Mentha pulegium y Anethum graveolens L frente a Candida albicans</i>	45
4.7.2.	<i>Determinación de la concentración mínima bactericida de los aceites esenciales de Mentha pulegium y Anethum graveolens L frente a Enterococcus faecalis</i> ...	46
4.7.3.	<i>Determinación de la concentración mínima fungicida de la mezcla de los aceites esenciales de Mentha pulegium y Anethum graveolens L frente a Candida albicans</i>	47
4.7.4.	<i>Determinación de la concentración mínima bactericida de la mezcla de los aceites esenciales de Mentha pulegium y Anethum graveolens L frente a Enterococcus faecalis</i>	48

CAPITULO V

5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	49
5.1.	Conclusiones	49
5.2.	Recomendaciones	51

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3-1:	Materiales usados en cada procedimiento	17
Tabla 3-2:	Equipos usados en cada procedimiento	18
Tabla 3-3:	Reactivos usados en cada procedimiento.....	19
Tabla 3-4:	Microorganismos usados	19
Tabla 4-1:	Tiempo, número de extracción y volumen de la extracción de los aceites	28
Tabla 4-2:	Característica organolépticas de <i>Anethum graveolens L</i>	29
Tabla 4-3:	Característica organolépticas de <i>Mentha pulegium</i>	29
Tabla 4-4:	Diámetros de los halos de inhibición formados por los aceites esenciales de <i>Mentha pulegium</i> y <i>Anethum graveolens L</i> contra <i>Candida albicans</i>	33
Tabla 4-5:	Diámetros de los halos de inhibición formados por los aceites esenciales de <i>Mentha pulegium</i> y <i>Anethum graveolens L</i> contra <i>Enterococcus faecalis</i>	35
Tabla 4-6:	Diámetros de los halos de inhibición formados por la mezcla de los aceites esenciales de <i>Mentha pulegium</i> y <i>Anethum graveolens L</i> contra <i>Candida albicans</i>	38
Tabla 4-7:	Diámetros de los halos de inhibición formados por la mezcla de los aceites esenciales de <i>Mentha pulegium</i> y <i>Anethum graveolens L</i> contra <i>Enterococcus faecalis</i>	39
Tabla 4-8:	Determinación de la concentración mínima inhibitoria de <i>Mentha pulegium</i> y <i>Anethum graveolens L</i> contra <i>Candida albicans</i>	40
Tabla 4-9:	Determinación de la concentración mínima inhibitoria de <i>Mentha pulegium</i> y <i>Anethum graveolens L</i> contra <i>Enterococcus faecalis</i>	41
Tabla 4-10:	Determinación de la concentración mínima inhibitoria de la mezcla de <i>Mentha pulegium</i> y <i>Anethum graveolens L</i> contra <i>Candida albicans</i>	43
Tabla 4-11:	Determinación de la concentración mínima inhibitoria de la mezcla de <i>Mentha pulegium</i> y <i>Anethum graveolens L</i> contra <i>Enterococcus faecalis</i>	44
Tabla 4-12:	Determinación de la concentración mínima fungicida de <i>Mentha pulegium</i> y <i>Anethum graveolens L</i> contra <i>Candida albicans</i>	45
Tabla 4-13:	Determinación de la concentración mínima bactericida de <i>Mentha pulegium</i> y <i>Anethum graveolens L</i> contra <i>Enterococcus faecalis</i>	46
Tabla 4-14:	Determinación de la concentración mínima fungicida de la mezcla de <i>Mentha pulegium</i> y <i>Anethum graveolens L</i> contra <i>Candida albicans</i>	47
Tabla 4-15:	Determinación de la concentración mínima bactericida de la mezcla de <i>Mentha pulegium</i> y <i>Anethum graveolens L</i> contra <i>Enterococcus faecalis</i>	48

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 2-1:	Planta de <i>Anethum graveolens</i> L.....	7
Ilustración 2-2:	Planta de <i>Mentha pulegium</i>	10
Ilustración 2-3:	Cultivo de <i>Candida albicans</i>	12
Ilustración 2-4:	Cultivo de <i>Enterococcus faecalis</i>	14
Ilustración 3-1:	Etapas del trabajo experimental.....	20
Ilustración 3-2:	Descripción del producto.....	25
Ilustración 4-1:	Halos de inhibición formados por el aceite esencial de <i>Mentha pulegium</i> ...	36
Ilustración 4-2:	Halos de inhibición formados por el aceite esencial de <i>Anethum graveolens</i> L	36

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES.

ANEXO B: ANALISIS ANTIMICROBIANO.

ANEXO C: ESCALA Mc FARLAND.

ANEXO D: ACEITES ESENCIALES.

ANEXO E: ANALISIS DEL CMI Y CMB.

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites de *Anethum graveolens L* y *Mentha pulegium* frente a *Candida albicans* y *Enterococcus faecalis*. La investigación realizada fue experimental ya que existió una manipulación de las concentraciones de los aceites y tuvo un enfoque cuantitativo. Para la obtención de los aceites esenciales, primeramente las plantas fueron recolectadas y acondicionadas, la extracción se la realizó a través de hidrodestilación, posteriormente se realizaron pruebas de control de calidad como densidad, IR, porcentaje de rendimiento, características fisicoquímicas y organolépticas; para poder determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* de los aceites se lo llevó a cabo a través del método de difusión en disco; mientras que, para la determinación de la CMI y CMB que presentan las cepas de interés se lo realizó por el método de dilución. En los resultados se evidenció en cuanto al efecto antimicrobiano y antifúngico mediante el método de difusión en disco, los aceites esenciales de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* a una concentración de 5000 ppm presentaron halos de inhibición frente a las dos cepas; la CMI de los aceites frente a *Candida albicans* fue de 12,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y frente a *Enterococcus faecalis* fue de 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$, la CMB de los aceites esenciales contra *Enterococcus faecalis* fueron de 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para ambos, las concentración mínima fungicida de los aceites contra *Candida albicans* fue de 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$. En conclusión, los aceites esenciales obtenidos cumplen con los parámetros de calidad y se pudo determinar que ambos aceites son sensibles frente a las dos cepas. Se recomienda realizar un tamizaje fitoquímico de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* para conocer qué tipo de componentes y metabolitos presenta cada planta; considerar evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites frente a otras cepas de microorganismos para evaluar su sensibilidad.

Palabras clave: <ENELDO (*Anethum graveolens L*)>, <MENTA (*Mentha pulegium*)>, <*Enterococcus faecalis*>, <*Candida albicans*>, <HIDRODESTILACIÓN>, <EFECTO ANTIMICROBIANO>, <Kirby-Bauer>, <CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA>, <CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA>, <CONCENTRACIÓN MÍNIMA ANTIFÚNGICA>.

1595-DBRA-UPT-2023



SUMMARY

The objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of *Anethum graveolens* L and *Mentha pulegium* oils against *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. The research done was experimental since there was a manipulation of the concentrations of the oils and had a quantitative approach. To obtain the essential oils, first the plants were collected and conditioned, the extraction was made through hydro distillation, then quality control tests such as density, IR, yield percentage, physicochemical and organoleptic characteristics were performed; to determine the in vitro antimicrobial effect of the oils, it was made through the disc diffusion method; while, for the determination of the MIC and CMB presented by the strains of interest, it was made by the dilution method. The results showed that the antimicrobial and antifungal effects of the essential oils were determined by the disc diffusion method of *Mentha pulegium* and *Anethum graveolens* L at a concentration of 5000 ppm presented inhibition halos against the two strains; the MIC of the oils against *Candida albicans* was 12.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ and against *Enterococcus faecalis* was 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$, the CMB of the essential oils against *Enterococcus faecalis* were 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ for both, the minimum fungicidal concentration of the oils against *Candida albicans* was 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$. In conclusion, the essential oils obtained meet the quality parameters and it could be determined that both oils are sensitive against the two strains. It is recommended to perform a phytochemical screening of *Mentha pulegium* and *Anethum graveolens* L to know what type of components and metabolites each plant presents; consider evaluating the antimicrobial activity of the oils against other strains of microorganisms to assess their sensitivity.

Keywords: DILL (*Anethum graveolens* L)>, <MINT (*Mentha pulegium*)>, <*Enterococcus faecalis* >, <*Candida albicans*>, <HYDRO DISTILLATION>, <IN VITRO>, <ANTIMICROBIAL EFFECT>, <Kirby-Bauer>, <MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION>, <MINIMUM BACTERICIDE CONCENTRATION>, <MINIMUM ANTIFUNGICAL CONCENTRATION>.



Edgar Mesias Jaramillo Moyano

0603497397

INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad, las plantas han sido empleadas en diferentes áreas, tales como, alimentos, cosmetología y en el área médica; principalmente enfocadas en prevenir y/o curar diversas enfermedades. Los productos derivados de las plantas; extractos y aceites esenciales, poseen diversas propiedades antibacterianas, antifúngicas y/o insecticidas que proporcionan a la ciencia una cantidad ilimitada de oportunidades para el desarrollo de nuevas drogas que ayuden a controlar y combatir el desarrollo microbiano (Bucay, 2018, p.20).

El uso de antibióticos ha mejorado la calidad de vida de la población a nivel mundial, puesto que estos medicamentos han disminuido considerablemente la morbilidad y mortalidad causada por enfermedades infecciosas, aunque esto llega a ser un arma de doble filo, debido a que el uso indiscriminado e irracional de este tipo de medicamentos ha provocado la aparición de un problema de salud mucho más grande conocido como la resistencia a los antimicrobianos (OMS, 2020, p.1).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la resistencia a los antimicrobianos se presenta cuando bacterias, virus, hongos y parásitos sufren cambios al verse expuestos a los antimicrobianos y dejan de ser susceptibles a ellos, lo que con el tiempo resulta más difícil en el tratamiento de las infecciones e incrementa el riesgo de propagación de enfermedades, de aparición de formas graves de enfermedades y de su consecuente muerte. A causa de la farmacoresistencia, los antibióticos y otros medicamentos antimicrobianos resultan ineficaces, por lo que las enfermedades infecciosas son cada vez más difíciles o imposibles de tratar (OMS, 2020, p.1).

La levadura gram positiva denominada *Candida Albicans* y el enterococo gram positivo de nombre *Enterococcus faecalis* son dos tipos de microorganismos diferentes que pueden ocasionar infecciones a nivel genitourinario. La prevalencia en este tipo de infecciones se estima en alrededor de 150 millones de personas por año a nivel mundial (Zambrano, 2019, pp.1-2).

Debido a las problemáticas encontradas, surge la necesidad de comprobar la actividad antimicrobiana en los aceites esenciales de las plantas *Anethum graveolens L* (eneldo) y *Mentha pulegium* (tipo) y la combinación de éstas, para comprobar la existencia de un efecto antimicrobiano frente a cepas ATCC de *Candida albicans* y *Enterococcus faecalis*, con el objetivo de obtener información la cual pueda ser utilizada posteriormente para encontrar métodos naturales alternativos que puedan ayudar a combatir y/o erradicar la resistencia antimicrobiana.

CAPÍTULO I

1. DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema

Las enfermedades de tipo “infección” constituyen un problema de salud importante a nivel mundial, tanto por su frecuencia de aparición, agente patógeno, tratamiento, como por su posible gravedad en las complicaciones locales o sistémicas que pudieran presentarse (Healthy Children, 2016, p.1).

En el siglo pasado, muchos científicos dedicaron su vida a investigar y desarrollar medicamentos conocidos como antibióticos los cuales contribuyeron a disminuir las tasas de morbilidad y mortalidad excesivamente altas que existían, además que se cimentó las bases para la invención de procedimientos complejos y altamente riesgosos como: profilaxis quirúrgica, quimioterapias, trasplantes de órganos y de células hematopoyéticas, etc. Hoy en día resultaría inconcebible la vida tal cual la conocemos sin la presencia de los medicamentos antimicrobianos (Fernández et al., 2021: p.1).

A pesar de los beneficios que suponen los antibióticos, actualmente una amenaza creciente denominada resistencia antimicrobiana ha ido mermando la efectividad de estos fármacos, esta amenaza puede definirse como el proceso natural por el cual microorganismos desarrollan resistencias a los fármacos que se utilizan para combatirlos (Vila, 2018, p.1).

La crisis de la resistencia a los antibióticos se ha atribuido al uso desmesurado, erróneo y mal administrado de estos medicamentos, así como también a la disminución del desarrollo de nuevos medicamentos por la industria farmacéutica; esto se debe principalmente a la reducción de los incentivos económicos, los desafiantes requisitos reglamentarios y el tiempo que toma la investigación (Calderón & Aguilar, 2016: pp.757-758).

Como es de conocimiento, desde tiempos prehistóricos el hombre ha utilizado las plantas con fines medicinales, alimenticios y cosméticos. Actualmente, especies de plantas como *Anethum graveolens* L (eneldo) y *Mentha pulegium* (tipo) son fuentes de información para el descubrimiento de posibles sustancias con importante actividad biológica de interés. Las sustancias derivadas de las plantas han alcanzado una gran trascendencia, por lo que sus aplicaciones en la actualidad cada vez son más versátiles. La resistencia bacteriana ha

despertado la atención de nuevos investigadores en la búsqueda de sustancias con actividad antimicrobiana.

Los aceites esenciales son sustancias aceitosas intensamente aromáticas que se obtienen por diferentes métodos de extracción a partir de material vegetal (flores, tallos, raíces, hojas, frutos, y semillas). Algunas de estas esencias poseen actividad antibacteriana y antifúngica, exhibiéndolas como una fuente potencial de nuevos compuestos antimicrobianos y por tanto representan una alternativa natural que ayudará a combatir la problemática llamada resistencia antimicrobiana (Argote et al., 2017: p.54).

A partir de esto, surge el interés de conocer la actividad antimicrobiana que poseen los aceites esenciales de las plantas *Anethum graveolens L.* y *Mentha pulegium* frente a cepas ATCC de *Candida albicans* y *Enterococcus faecalis*.

1.2. Justificación

Las plantas medicinales han sido consideradas una de las principales fuentes de productos o sustancias curativas desde tiempos ancestrales. Con la llegada de la industria farmacéutica, empezó la síntesis de medicamentos a base de principios activos encontrados en plantas; posteriormente estos principios activos de origen natural fueron remplazados por medicamentos de origen puramente sintético creados en laboratorios (Ortega, 2018, pp.7-8).

Hoy en día, se produce un vuelco hacia nuestros orígenes basados en plantas con el fin de concientizar a la humanidad acerca de la toxicidad y efectos adversos de algunos productos químicos, razón por la cual se ha visto incrementado el consumo de productos de origen natural o vegetal (Ortega, 2018, pp.7-8).

Existe una amplia gama y variedad de plantas de las cuales se puede obtener diversos compuestos derivados como son sus aceites esenciales. A partir de estas esencias podemos descubrir algunas de sus propiedades, como la actividad antimicrobiana, que han sido utilizadas por mucho tiempo en cosmetología, la industria farmacéutica, perfumería y en medicina (Ortega, 2018, pp.7-8).

Aceites esenciales provenientes de diversas plantas han logrado exponer actividad antimicrobiana variable, en estudios *in vitro*, contra bacterias gram positivas y gram negativas (Bermúdez et al., 2019: pp.147-148). Cabe recalcar que los estudios realizados acerca de las

propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales únicamente se han estudiado en microorganismos patógenos para el ser humano (Zerkaria, 2010, p.3).

Actualmente existen pocos estudios sobre las especies de *Anethum graveolens L* y *Mentha pulegium* por lo que no se ha comprobado los beneficios antimicrobianos que poseen estas plantas.

Considerando estas problemáticas, surge el interés de averiguar la actividad antimicrobiana que poseen los aceites esenciales obtenidos de *Anethum graveolens L* y *Mentha pulegium* frente a cepas ATCC de *Candida albicans* y *Enterococcus faecalis*. Una vez finalizado el presente trabajo experimental, se espera que la información obtenida sirva como ayuda en futuras investigaciones, proporcionando las pautas necesarias para el aprovechamiento de un recurso natural como son las plantas medicinales de nuestro país, y que sus derivados puedan ser utilizados para la producción de nuevos medicamentos (Ortega, 2018, p.8).

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites de *Anethum graveolens L* y *Mentha pulegium* frente a *Candida albicans* y *Enterococcus faecalis*.

1.3.2. Objetivos específicos

- Obtener los aceites esenciales de *Anethum graveolens L* (eneldo) y *Mentha pulegium* (tipo) mediante el método de hidrodestilación.
- Evaluar el efecto antimicrobiano *in vitro* de los aceites esenciales a diferentes concentraciones mediante la formación del halo de inhibición.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida que presentan las cepas de *Candida albicans* y *Enterococcus faecalis*.

CAPITULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Referencias teóricas

2.1.1. Antecedentes de la investigación

Una investigación realizada por (Chahal et al., 2017: p.295) determinó que el aceite esencial de las semillas de *Anethum graveolens L* presentó actividad antimicrobiana contra *S. aureus* (ATCC 25923), *C. albicans* (ATCC 90028), *E. coli* (ATCC 25922) y *A. flavus*, excepto *P. aeruginosa* (ATCC 27853), con un halo de inhibición de 16-30 mm de diámetro. La CIM (concentración inhibitoria mínima) del aceite esencial varió entre 5.99-59.47 µg/ml; la concentración más baja de aceite esencial (5,99 µg/ml) contrarrestó a *S. aureus* y *E. coli*. Se evaluó también la actividad antibacteriana de la fracción de aceite esencial, la fracción de agua caliente desodorizada y la fracción de metanol de la planta de eneldo contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. typhi* por medio de los métodos de difusión en disco y dilución en micropozos. La fracción de aceite esencial mostró actividad contra cinco bacterias patógenas (*E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. typhi*) con un halo de inhibición de 7.8-11.3 mm de diámetro, mientras que la fracción de agua caliente desodorizada y la fracción de metanol resultaron inactivas. La cepa más sensible fue *S. epidermidis* con una CIM = 0.25 mg/ml. El cribado de la actividad antimicrobiana de 18 muestras de aceite esencial de eneldo, en Irán, se evaluó individualmente contra *B. subtilis* (ATCC 9372), *E. faecalis* (ATCC 15753), *S. aureus* (ATCC 25923), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27852) y *K. pneumonia* (ATCC 3583). La mayor actividad de los aceites de eneldo se observó contra *B. subtilis* (halo de inhibición = 27 mm; CIM = 1.87 mg/ml). Sin embargo, *E. coli* fue la bacteria gram-negativa más sensible y *E. faecalis* fue la bacteria gram-positiva más resistente.

En una investigación realizada por (Boukhebt et al., 2011: p.267) se obtuvo el análisis e identificación de los aceites esenciales hidrodestilados de dos distintas especies de menta (*Mentha spicata* y *Mentha pulagium*) a través de cromatografía de gases y espectroscopia de masas. Asimismo, se examinó sus propiedades antagonistas contra algunas bacterias patógenas. Se obtuvo un rendimiento aceptable (1.0 y 0.87 % para *M. Pulagium* y *M. Spicata* respectivamente). De los aceites esenciales elaborados de las hojas de *Mentha spicata* se separaron 57 compuestos, que representaban el 97.022% del total de la masa del aceite esencial, de cuales se identificaron 44 compuestos. El principal compuesto fue la carvona con 59.40%;

otros componentes apreciables en el contenido fueron: limoneno con 6.12%, 1.8-cineol, germacreno-D con 04.66%, β -cariofileno con 2.969%) β -bourboneno con 2.796%, α -terpineol con 1.986%, Terpineno-4-ol con 1,120%. En el aceite esencial de *Mentha pulegium* se obtuvieron 43 compuestos, que representan el 99.52% de la masa total del aceite esencial, en los cuales los compuestos identificados fueron 29. El componente principal fue la pulegona ocupando el 38.815%; otros componentes presentes en los aceites esenciales en cantidades apreciables fueron: mentona con 19.240%, piperitenona con 16.528%, piperitona con 6.348%, isomentona con 6.096%, limoneno con 4.293% y Octaan-3-ol con 1.854%. Adicionalmente la elección de los dos aceites esenciales por sus propiedades antagonistas contra bacterias patógenas reveló que no tienen una actividad considerable, excepto la que se analizó contra *Streptococcus pyogenes* (20 y 16 mm para *Mentha Spicata* y *Mentha Pulagium* respectivamente). Estos resultados de inhibición del crecimiento bacteriano se obtuvieron a partir de aceites esenciales sin diluir. Finalmente, es necesario realizar mayores investigaciones en los factores que influyen en la biosíntesis y la bioactividad de los aceites esenciales puesto que están adquiriendo importantes aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica.

2.1.2. Actividad antimicrobiana

2.1.2.1. Agente microbiano

Un agente antimicrobiano tiene la capacidad de destruir o inhibir la replicación de microorganismo; si este “agente” lo produce otro microorganismo se lo conoce entonces como antibiótico. Por tanto, algunas sustancias como las sulfonamidas y quinolonas no se consideran antibióticos. Aquellas sustancias inorgánicas que destruyen la gran mayoría de microorganismo y que además se pueden utilizar sobre la piel, se conoce como antisépticos. Por último, los desinfectantes son antimicrobianos que no se pueden utilizar sobre tejidos vivos, por ello se emplean únicamente para tratar superficies y utensilios de cirugía (Bucay, 2018, p.21).

2.1.3. Aceites esenciales

Los aceites esenciales, aceites volátiles o esencias, son una mezcla de sustancias aromáticas producidas por muchas plantas que se obtienen por medio de diferentes técnicas; la destilación a vapor es una de ellas. Se componen principalmente de metabolitos vegetales secundarios lipofílicos y altamente volátiles. Son compuestos naturales, de composición compleja con agradable aroma, provenientes de plantas a las que aportan olores particulares, generalmente gratos (Montoya, 2010, p.11).

2.1.3.1. *Propiedades físicas de los aceites esenciales*

El olor pronunciado e intenso; sabor abrasivo, irritante y profundo, en ocasiones dulce o amargo, en otras posee un sabor aromático y levemente sabor a fármaco, son las principales propiedades físicas de los aceites esenciales. La densidad de los aceites esenciales es menor a la del agua, excepto los aceites de canela, clavo de olor y sazafrán que poseen una densidad superior a la unidad (Cabezas, 2021, p.30).

Los aceites esenciales poseen actividad óptica; tienen un peso concreto de 0.8 a 2.0 a 15 °C; su punto de ebullición oscila entre 150 y 300 °C; su índice de refracción es de 1.45 a 1.5, además, al exponerlos a la luz se alteran fácilmente, tomando una tonalidad oscura y modificando su perfumería (Montoya, 2010, p.12).

Al presentar una característica volátil, los aceites esenciales, pasan con mayor facilidad del estado líquido al estado gaseoso en temperatura ambiente o una temperatura mayor. Presentan solubilidad en aceites, éter de petróleo, alcohol, tetracloruro de carbono y otros solventes orgánicos; son insolubles en agua, aunque le transfieren su olor. Son inflamables (Cabezas, 2021, p.30).

Tienen un aspecto oleoso, aunque su consistencia no es del todo aceitosa, sino que presentan fluidez como el agua. La ruptura de las partículas, estructura o glándulas de los aceites esenciales, así como también la exposición al calor, contribuirá a emitir estos olores característicos de esenciales volátiles (Montoya, 2010, p.13).

2.1.4. *Plantas medicinales*

2.1.4.1. *Anethum graveolens L*



Ilustración 2-1: Planta de *Anethum graveolens L*

Fuente: Frey, 2022

- **Taxonomía y origen**

Reino: Vegetal.

División: Espermafita.

Subdivisión: Angiospermas.

Clase: Dicotiledóneas.

Subclase: Coripétalas.

Orden: Umbeliferales.

Familia: Umbelíferas.

Subfamilia: Apioideas.

Tribu: Ammíneas.

Género: Ammi.

Especie: *Majus L.*

Nombre científico: *Anethum graveolens L.*

Origen: Introducida.

Anethum graveolens L es una planta que tiene sus orígenes en Asia Menor y el Mediterráneo. En el antiguo Egipto era muy conocido y utilizado en banquetes de griegos y romanos; su aceite se utilizaba para vigorizar a los atletas en las olimpiadas (Caguana & Quinaluisa, 2017: p.12).

- **Morfología**

Es una planta que florece cada año o dos años, alcanza una altura de 60-90 cm y en ocasiones más. Sus hojas son de color verde intenso, finamente divididas y cuando la planta alcanza su grado de madurez aparecen numerosas flores pequeñas con forma de sombrilla de color amarillo, que producen semillas muy aromáticas (Caguana & Quinaluisa, 2017: p.13).

- **Composición**

Toda la planta emana un olor desagradable característico. En su composición contiene anetol 60%, estragol, zinc, feuchoni y una variedad de felandrina. Además, posee productos minerales, azúcar, mucílago y aleurona (Caguana & Quinaluisa, 2017: p.13).

- **Usos del *Anethum graveolens L***

Uso culinario

El mayor uso que se le atribuye al eneldo es para condimentar comidas. El eneldo presenta un sabor ligeramente amargo y a la vez dulce, por lo que es muy utilizado para condimentar diferentes comidas como: salsas, sopas, platos a base de huevos o también para consumir en fresco con caldos, hortalizas y ensaladas. Es adecuado su uso en las conservas (Caguana & Quinaluisa, 2017: p.16).

Otros usos

En la industria licorera se utiliza su aceite esencial en la fabricación de bebidas aromatizadas a base de eneldo. También se utiliza en la industria farmacéutica (Caguana & Quinaluisa, 2017: pp.16-17).

- **Propiedades**

Anethum graveolens L (eneldo) es considerado un remedio popular para algunas dolencias gastrointestinales tales como la flatulencia, indigestión, dolor de estómago y cólicos. Su fruta tiene un efecto antiespasmódico a nivel uterino, además atenúa los dolores menstruales.

- Es anticancerígeno: Los compuestos carvona y limoneno presentes en el aceite de eneldo poseen actividad anticancerígena.
- Reducen los niveles de colesterol y triglicéridos en sangre, y además aumentan el colesterol bueno HDL.
- Es un excelente protector contra la aterosclerosis debido a que disminuye el riesgo de contraer enfermedades del corazón.
- Contiene nutrientes como el hierro, magnesio, manganeso y calcio que ayudan a fortalecer los huesos y prevenir su desmineralización.
- Ayuda a combatir el mal aliento y limpia la boca gracias a sus propiedades antimicrobianas.
- Posee actividad antihistamínica, antidiarreica y antifatulenta. La fibra que contiene el eneldo favorece al tránsito intestinal evitando así el estreñimiento.
- Ayuda a reducir la cefalea o dolores de cabeza.
- Es un excelente tratamiento para reducir los signos de la edad, puesto que contiene numerosos antioxidantes que ayudan a combatir el envejecimiento prematuro.
- Por su alto contenido en vitamina C ayuda a mejorar el sistema inmune.

- Ayuda a regular el nivel hormonal del cuerpo; incrementa los niveles de progesterona en el cuerpo. Equilibra los ciclos menstruales.
- Mejora la salud de ojos y de piel por su contenido de betacarotenos (Caguana & Quinaluisa, 2017: p.18).

2.1.4.2. *Mentha pulegium*



Ilustración 3-2: Planta de *Mentha pulegium*

Fuente: Asturnatura, 2007

- **Taxonomía**

Especie: *Mentha pulegium*.

Familia: Lamiaceae.

Orden: Lamiales.

Nombre común: poleo, poleo menta, tipo (García, 2016, p.13).

- **Morfología**

El poleo o *Mentha pulegium* es una de las plantas más conocidas del género *Mentha*; pertenece a la familia de las labiadas y es una planta perenne cespitosa. Sus tallos son erectos, de hasta un metro y medio en las etapas finales de maduración de la planta, sus raíces son rizomatosas. Las hojas de esta planta son lanceoladas, ligeramente dentadas y crecen de forma silvestre en las regiones húmedas del centro y el sur de Europa, el oeste de Asia y el norte de África (Jafari et al., 2020: p.61).

- **Componentes**

Mentha pulegium (poleo) tiene en su composición carvacrol y timol, que posee propiedades antibacterianas y antifúngicas. El carvacrol reduce la cantidad de triglicéridos en plasma. El

carvacrol estimula el crecimiento y la proliferación de las bacterias lactobacilos en nuestro organismo. Entre las propiedades terapéuticas de *Mentha pulegium* encontramos que alivia los trastornos gastrointestinales, los vómitos, la colitis ulcerosa y los trastornos hepáticos (Jafari et al., 2020: p.61).

- **Importancia**

Tiene gran importancia médica puesto que se utiliza en el tratamiento del dolor gastrointestinal, esplenomegalia, expectorante para el esputo, alivia malestares en el pecho, alivia dolores de cabeza y se utiliza también como tónico cerebral. También se utiliza en la preparación de antisépticos orales. Contiene un aceite aromático esencial llamado “Polygon” que se utiliza en la preparación de muchos productos farmacéuticos. Todas las partes de *M. pulegium* pueden ser utilizadas para diferentes preparaciones, excepto las raíces (Ebraheem, et al., 2020: p.14).

- **Propiedades**

Las partes aéreas de floración (tallos) de *Mentha pulegium* durante muchos años, se han utilizado tradicionalmente en el tratamiento del resfriado, sinusitis, el cólera, intoxicaciones alimentarias, la bronquitis y la tuberculosis por sus propiedades antimicrobianas (García, 2016: p.13).

2.1.5. Hongos

Los hongos están compuestos únicamente por células eucariotas, al contrario de las bacterias que están constituidas por células procariontas. Existen hongos unicelulares como las levaduras o multicelulares como las hifas, que son las unidades estructurales de los hongos filamentosos (Gómez, 2017: p.2).

Los hongos se reproducen de dos formas: sexuada y asexuada la cual es una característica importante para la taxonomía; sus estructuras reproductivas son las esporas y conidios (importante para la identificación morfológica de los hongos) (Gómez, 2017, pp.2-3).

Muchos de estos hongos poseen gran importancia económica debido a que participan en muchos procesos favorables para la industria (producción de cerveza, de pan, de antibióticos, etc.) (Gómez, 2017, pp.2-3).

2.1.6. *Candida albicans*



Ilustración 2-3: Cultivo de *Candida albicans*

Fuente: Avais, 2022

El hongo *Candida albicans* posee una característica dimórfica, que significa que, se desarrolla de forma distinta en función de la temperatura de crecimiento, como levadura a temperatura de 37°C en el huésped, y como hongo filamentoso a 25°C en la naturaleza. Pertenece al filo Ascomycota y su reproducción es de forma asexual por gemación (Bucay, 2018, p.29).

2.1.6.1. Morfología

Como levadura se observa un aspecto de células redondas u ovaladas, con un tamaño de 3-8 x 2-7 micras, juntas en pequeños grupos. En forma de hongo filamentoso, las células se alargan y se diversifican tomando la apariencia de filamentos, pseudo-hifas o pseudo-micelio (Bucay, 2018, p.29).

2.1.6.2. Condiciones de crecimiento

El hongo *Candida albicans* está asociado generalmente a seres vivos de sangre caliente. Su temperatura óptima de crecimiento es 37 °C, la cual es la temperatura normal en el ser humano. Los tractos digestivos, respiratorio y la mucosa genital de la mujer (vagina), son los reservorios más importantes en los seres humanos y dan origen a candidiasis endógenas. En estas localizaciones se comporta como un saprobio (que se desarrollan o viven a partir de materia orgánica muerta o en descomposición) y su aislamiento no implica por sí solo la presencia de infección. *Candida albicans* no sobrevive durante mucho tiempo en superficies secas pero su supervivencia es mayor cuando existe humedad en el medio. Este hongo ha conseguido aislarse de los cepillos dentales, cremas de manos, cosméticos y ropa (Bucay, 2018, pp.29-30).

2.1.6.3. Epidemiología

Las infecciones causadas por hongos más frecuentes en pacientes que se encuentran gravemente enfermos son las producidas por *Candida* spp. en sus múltiples manifestaciones que requieren tratamiento en función al sitio de infección y las características de los pacientes.

La detección de *Candida* en sitios diferentes a la sangre representa un desafío puesto que puede considerarse como una colonización, una infección local (muguet) o infección invasiva. Es muy importante la detección de la infección en pacientes que se beneficiarían de un tratamiento antifúngico evitando así la progresión de la infección hacia una enfermedad invasiva a la vez que se disminuye la mortalidad asociada (Cornistein, et al., 2013: p.381).

2.1.7. Cocos

Bacterias con forma casi esférica. Según el plano que ocupan luego de la división, se presentan en diferentes formas.

2.1.7.1. Clasificación de los cocos

- **Diplococos:** Cocos que permanecen en pares luego de la división.
- **Streptococos:** Cocos que permanecen en cadenas de cuatro o más células.
- **Tétradas:** Agrupaciones de cuatro cocos en disposición cuadrada. Se dividen en dos direcciones perpendiculares.
- **Sarcinas:** Paquetes cúbicos de ocho células. Resultan de la división celular en tres direcciones perpendiculares.
- **Estafilococos:** Su agrupación es en forma de racimos, no siguen un patrón regular de orientación en el plano de divisiones sucesivas (Vera, 2013, pp.14-15).

2.1.8. Enterococcus

Son cocos gram positivos, están aislados, de a pares, o formando cadenas cortas. Pertenecieron clásicamente a los *Streptococcus* grupo D de Lancefield; pero, en la década de 1980 fueron asignados oficialmente en su propio género. No poseen la enzima catalasa por tanto son catalasa negativa, su respiración es anaerobia facultativa, capaces de crecer en condiciones ligeramente extremas. Sus características bioquímicas destacadas incluyen: la habilidad de crecer en presencia de Cloruro de Sodio al 6,5%; en temperaturas que oscilan entre 10°C y 45°C, y hasta en un pH básico de 9,6. Pueden hidrolizar el glucósido esculina, crecen en presencia de bilis al

40%, pueden sobrevivir por 30 min a 60°C y tiene la capacidad de hidrolizar la L-pirrolidonil β-naftil-amida (PYR); esta habilidad se ha utilizado como parte de una prueba rápida para la detección de enterococos en un laboratorio (Acosta, 2005, pp.1,2).

2.1.9. *Enterococcus faecalis*



Ilustración 2-4: Cultivo de *Enterococcus faecalis*

Fuente: Aspiroz et al., 2013

Forma parte del género *Enterococcus*, encontrándose generalmente en la microbiota bucal y en el tracto gastrointestinal. Son cocos Gram positivos distribuidos en parejas y en cadenas cortas (Galleguillos, 2016, p.7).

2.1.9.1. Morfología

Son de tamaño variable entre 0.5 a 0.8 μm; son de respiración facultativa y crecen en un intervalo de temperatura entre 10 ° a 45 °C. A pesar de ello, su temperatura óptima de crecimiento es de 35 °C (Galleguillos, 2016, p.7).

2.1.9.2. Condiciones de crecimiento

Para su desarrollo óptimo requieren medios con fuente de vitamina B, bases de ácidos nucleicos y una fuente que proporcione carbono como la glucosa. Además, tienen la habilidad de crecer en ambientes tóxicos, con altas concentraciones de NaCl (6,5%).

Asimismo, se ha observado que pueden crecer en medios con pH ácido y alcalino. El pH crítico para su erradicación debe ser mayor a 11, puesto que adquieren alcalina resistencia debido al transporte de protones vinculado a ATP (Galleguillos, 2016, p.7).

2.1.9.3. Epidemiología

Las dos principales especies que causan infección son *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. Los enterococos son una causa principal y los responsables de infecciones nosocomiales, urinarias, endocarditis (Galleguillos, 2016, p.7).

2.1.10. Concentración mínima inhibitoria

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se caracteriza como la concentración más baja de un antibiótico que, tras la incubación, impide el crecimiento de un microorganismo, ya sea este Gram positivo o negativo (López, 2016, p.10).

2.1.11. Concentración mínima bactericida

La Concentración Bactericida Mínima (CMB) se refiere a la concentración más baja de antimicrobiano que, después de un período de incubación específico (típicamente 24 horas), elimina más del 99,9% de los microorganismos viables (Chero, 2016, p.27).

2.1.12. Concentración mínima fungicida

El agente o solución que impide el 99,9% del crecimiento del hongo a partir de un inóculo de subcultivo puro se conoce como Concentración Mínima Fungicida (CMF) (Neyra & Armas, 2018: p.15).

CAPITULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Descripción de los procesos

3.1.1. *Hidrodestilación*

Es una técnica empleada tanto para plantas frescas o secas, las cuales no van a alterarse al estar expuestas al calor directo. En este caso, la sustancia se sumerge en agua, que, al calentarse, extrae el aceite que contiene. En este método la materia vegetal se sumerge completamente en el agua el cual al calentarse empieza a arrastrar el aceite contenido en la planta (Bustamante, 2017, p.11).

3.1.2. *Determinación del índice de refracción de los aceites esenciales*

La relación entre la velocidad de un rayo de luz en el vacío y la velocidad de la luz que pasa a través de la sustancia se conoce como índice de refracción. Es una técnica óptica que está directamente relacionada con la pureza de un aceite esencial (Coronel & Piedra, 2018: p.11).

3.1.3. *Determinación de la densidad relativa de los aceites esenciales*

En algunos casos, es posible sacar conclusiones sobre la composición de los aceites esenciales utilizando la densidad relativa, que se calcula para encontrar la relación entre el peso y el volumen de la muestra (Meza & Vargas, 2013: p.12).

3.1.4. *Prueba de difusión por disco*

Es un método cualitativo adecuado para microorganismos de crecimiento rápido y con baja exigencia, esta prueba se distingue por su facilidad de estandarización. Aunque es un procedimiento sencillo, el efecto inhibitorio del compuesto bajo evaluación dependerá de qué tan bien pueda difundirse a través del medio.

La idea básica del método es aplicar una cantidad predeterminada de antimicrobiano a un disco de papel colocado en la superficie del agar en el que se ha distribuido el inóculo del microorganismo objetivo. Esto hará que se forme un gradiente de concentración antimicrobiana

alrededor del disco a través de difusión, y la sensibilidad del microorganismo se revelará por el tamaño de la zona en la que se inhibe el crecimiento bacteriano (Henao & Muñoz, 2009: p.23).

3.1.5. Método de dilución en caldo

Un método útil para evaluar nuevos compuestos antimicrobianos es el método de macro dilución en caldo, que permite determinar la concentración mínima inhibitoria MIC, que es la concentración más baja requerida para inhibir el crecimiento de un microorganismo objetivo.

Este método implica el uso de tubos de ensayo que han sido inoculados con una cantidad específica del microorganismo objetivo y diluciones de sustancias antimicrobianas que aumentan en concentración. Después del proceso de incubación que dura 24 horas, la MIC se calcula visualmente observando la ausencia de crecimiento microbiano determinada por la ausencia de turbidez (Flores, 2022: p.16).

3.2. Materiales, equipos y reactivos

3.2.1. Materiales

Tabla 3-1: Materiales usados en cada procedimiento

Preparación de los aceites	<ul style="list-style-type: none"> • Materia vegetal • Frascos ámbar esterilizados de 30 ml • Vaso de precipitación de 1000 ml • Mangueras • Condensador
Determinación de la densidad	<ul style="list-style-type: none"> • Picnómetro 10 ml • Papel
Determinación del índice de refracción	<ul style="list-style-type: none"> • Gotero • Papel
Determinación de la actividad antimicrobiana	<ul style="list-style-type: none"> • Papel absorbente • Aluminio • Cajas Petri • Asa bacteriológica • Pipeta automática • Puntas amarillas • Erlenmeyer 100 ml

	<ul style="list-style-type: none"> • Erlenmeyer 500 ml • Gasa • Hisopos estériles • Algodón • Mechero
Preparación del estándar de McFarland	<ul style="list-style-type: none"> • Tubos de ensayo • Pipeta
Preparación del CMI y CMB	<ul style="list-style-type: none"> • Tubos de ensayo • Gradillas • Erlenmeyer • Mechero • Espátula • Varilla de agitación • Cajas Petri • Asa bacteriológica • Algodón

Realizado por: Rosero C., 2022

3.2.2. Equipos

Tabla 3-2: Equipos usados en cada procedimiento

Preparación de los aceites	<ul style="list-style-type: none"> • Alambique • Baño de circulación • Tubo condensador • Reverbero
Determinación de la densidad	<ul style="list-style-type: none"> • Balanza analítica
Determinación del índice de refracción	<ul style="list-style-type: none"> • Refractómetro
Determinación de la actividad antimicrobiana	<ul style="list-style-type: none"> • Cámara de flujo laminar • Incubadora • Autoclave • Refrigeradora • Vortex • Reverbero

Realizado por: Rosero C., 2022

3.2.3. Reactivos

Tabla 4-3: Reactivos usados en cada procedimiento

Preparación de los aceites	<ul style="list-style-type: none">• Agua destilada• Propilenglicol al 40%• Alcohol potable
Determinación de la densidad	<ul style="list-style-type: none">• Aceite esencial• Agua destilada
Determinación del índice de refracción	<ul style="list-style-type: none">• Aceite esencial• Agua destilada
Determinación de la actividad antimicrobiana	<ul style="list-style-type: none">• Agar Müller Hinton• Agar Dextrosa Sabouraud con Cloranfenicol• Caldo nutritivo• Caldo Müller Hinton• Alcohol potable• Agua destilada
Preparación del estándar de McFarland	<ul style="list-style-type: none">• Ácido sulfúrico al 0.18 M• Cloruro de bario 0.048 M

Realizado por: Rosero C., 2022

3.2.4. Microorganismos

Tabla 3-4: Microorganismos usados

MICROORGANISMOS	ATCC
<i>Candida albicans</i>	10231
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212

Realizado por: Rosero C., 2022

3.3. Etapas del trabajo experimental

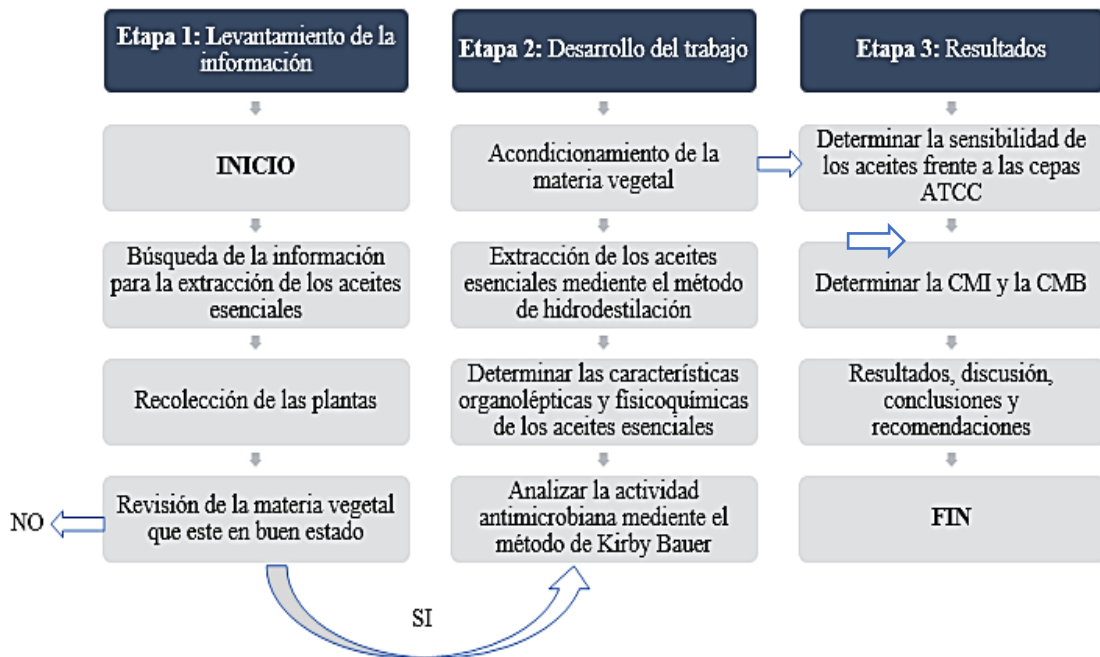


Ilustración 3-1: Etapas del trabajo experimental

Realizado por: Rosero C., 2022

3.4. Enfoque y alcance del trabajo

3.4.1. Enfoque

Este trabajo experimental tiene un enfoque cuantitativo y experimental porque se manipulan variables ya sean dependientes o independientes también mediante el uso de cifras se busca medir un problema específico y se realizan métodos estadísticos.

3.4.2. Alcance

El alcance de este trabajo experimental es correlacional porque en este trabajo se busca la relación de la actividad antimicrobiana que tienen los aceites esenciales frente a las cepas ATCC.

Es un estudio exploratorio debido a que las plantas en estudio han sido poco estudiadas por lo que van a ayudar en futuras investigaciones.

3.5. Tipo y diseño del trabajo

Es un diseño experimental porque se centró en determinar la actividad antimicrobiana que tienen los aceites esenciales a diferentes concentraciones frente a las cepas ATCC, utilizando un método analítico, cuyo objetivo fue establecer una relación de causalidad. Es de tipo de campo porque es un trabajo *in vitro* en el cual se obtendrá información real.

3.6. Métodos, técnicas e instrumentos de la investigación

3.6.1. Extracción de los aceites esenciales

Primero se realizó el acondicionamiento del material vegetal previo a la extracción del aceite. Se llenó las tres cuartas del total de alambique con agua destilada. Se colocó 500 gramos de materia vegetal dentro del alambique. Cerramos el alambique y se lo colocó sobre un reverbero. Se procedió a conectar el condensador al baño de circulación. Se encendió el baño de circulación que estaba previamente llenado con una mezcla de 600 mL de agua destilada y 400 mL de propilenglicol al 40% y se conectó al alambique. Una vez que el alambique alcanzó los 80 °C empezó la destilación de agua y aceite esencial.

Pasado 3 horas aproximadamente se obtuvo una mezcla entre agua y aceite el cual se separó mediante un embudo de separación. Una vez separado el aceite del agua se obtuvo de 1.2 mL a 2 mL de aceite esencial aproximadamente en cada extracción.

3.6.1.1. Cálculo de la densidad de los aceites esenciales

Para el cálculo de la densidad, se pesó el picnómetro vacío en una balanza analítica y se anotó su peso. Se procedió a llenar el picnómetro con agua destilada hasta enrasar, se tapó y el agua salió por el capilar, se procedió a secar el picnómetro, se lo colocó en la balanza analítica y se anotó su peso.

Se desechó el agua destilada y se procedió a llenar el picnómetro con el aceite esencial hasta enrasar, se tapó y el aceite salió por el capilar, se secó el picnómetro, se lo colocó en la balanza analítica y se anotó su peso.

- Para calcular la densidad se utiliza la siguiente fórmula:

$$d_{aceite} = \frac{(m_{picnometro} + aceite) - m_{picnometro}}{(m_{picnometro} + agua) - m_{picnometro}} * d_{agua}$$

Donde:

d_{aceite}: es la densidad por calcular.

m_{picnómetro}: es el peso del picnómetro vacío.

m_{picnómetro} + aceite: es el peso del picnómetro con el aceite esencial.

m_{picnómetro} + agua: es el peso del picnómetro con agua destilada.

3.6.1.2. Cálculo del rendimiento de la extracción

Para calcular el rendimiento, se debe saber la densidad de los aceites la cual se calculó previamente, para obtener el peso en gramos del aceite esencial se utilizó la siguiente fórmula:

$$d_{aceite} * v_{aceite} = m_{aceite\ obtenido}$$

Donde:

d_{aceite}: es la densidad del aceite obtenido.

v_{aceite}: es el volumen del aceite obtenido.

m_{aceite}: masa del aceite obtenido.

- Una vez obtenida la masa del aceite esencial, proceder a calcular el rendimiento de extracción de los aceites esenciales aplicando la siguiente fórmula:

$$p = \frac{m_2}{m_1} * 100$$

Donde:

p: es el porcentaje de rendimiento de la extracción.

m₂: masa final del aceite en gramos.

m₁: masa inicial de la materia vegetal en gramos.

3.6.1.3. Cálculo del índice de refracción

Para el cálculo del índice de refracción, se calibró el refractómetro con agua destilada a una temperatura aproximada de 20 °C, una vez calibrado el refractómetro se colocó una gota del aceite esencial sobre el prisma y se anotó el resultado.

3.6.2. Análisis antimicrobiano

3.6.2.1. Preparación de las concentraciones de los aceites esenciales

Se rotuló 7 Eppendorf con las concentraciones de 2500 ppm, 1250 ppm, 625 ppm, 312.5 ppm, 156.25 ppm, 78.125 ppm 39.06 ppm y se colocó 100 µL de DMSO en cada uno.

Para la preparación de las distintas concentraciones se tomó un vaso de precipitación, se rotuló con la concentración de 5000 ppm y mediante el uso de una balanza analítica se pesó 5 g de aceite esencial. Se agregó 100 µL de DMSO se mezcló muy bien y se obtuvo una concentración de 5000 ppm. Posteriormente se realizó diluciones seriadas tomando 100 µL de la solución con concentración de 5000 ppm hasta llegar a obtener una concentración de 39.06 ppm.

Para la preparación de la mezcla de los aceites esenciales se pesó 2.5 g del aceite de *Anethum graveolens* L y 2.5 g de aceite de *Mentha pulegium* obteniendo 5 g de la mezcla de los aceites en una proporción de 50/50.

3.6.2.2. Preparación de los medios de cultivo

- **Agar Müller Hinton**

Para preparar el Agar Müller Hinton se pesó 37 gramos de agar y se los colocó en 1 litro de agua destilada en un Erlenmeyer de 1000 ml se dejó reaccionar el agar con el agua de 10 a 15 minutos. Se calentó y se agitó frecuentemente, se dejó hervir durante 1 minuto para disolver. Se colocó el Erlenmeyer en el autoclave a esterilizar a 121 °C por 15 minutos.

Luego se sacó el Erlenmeyer y se lo dejó enfriar en la cámara de flujo laminar hasta que la mano soportó su temperatura. Se procedió a distribuir en cajas Petri hasta las tres cuartas partes para un volumen de 20 mL. Se dejó reposar las cajas en la cámara de flujo laminar y se las guardó en refrigeración para su uso.

- **Agar Dextrosa Sabouraud con Cloranfenicol**

Para preparar el agar Dextrosa Sabouraud con Cloranfenicol, se pesó 65 gramos de agar y se colocó en 1 litro de agua destilada dentro de un Erlenmeyer de 1000 mL. Se mezcló con calor hasta disolver agitando frecuentemente. Se dejó hervir durante 1 minuto hasta disolver bien el agar. Se colocó el Erlenmeyer en el autoclave a esterilizar a 118 – 121 °C por 15 minutos.

Luego se sacó el Erlenmeyer y se dejó enfriar en la cámara de flujo laminar hasta que la mano soportó su calor. Se procedió a distribuir en cajas Petri hasta las tres cuartas partes para un volumen de 20 mL y se dejó reposar las cajas en la cámara de flujo laminar y se las guardó en refrigeración para su uso.

- **Agar nutritivo**

Para preparar el Agar nutritivo se pesó 31 gramos de agar y se los colocó en 1 litro de agua destilada en un Erlenmeyer de 1000 mL se dejó reaccionar el agar con el agua de 10 a 15 minutos. Se calentó y se agitó frecuentemente, se dejó hervir durante 1 minuto para disolver. Se colocó el Erlenmeyer en el autoclave a esterilizar a 121 °C por 15 minutos.

Luego se sacó el Erlenmeyer y se lo dejó enfriar en la cámara de flujo laminar hasta que la mano soportó su temperatura. Se procedió a distribuir en cajas Petri hasta las tres cuartas partes para un volumen de 20 mL. Se dejó reposar las cajas en la cámara de flujo laminar y se las guardó en refrigeración para su uso.

- **Caldo nutritivo**

Para preparar el Agar nutritivo se pesó 8 gramos de agar y se los colocó en 1 litro de agua destilada en un Erlenmeyer de 1000 ml se dejó reaccionar el agar con el agua de 10 a 15 minutos. Se calentó y se agitó frecuentemente, se dejó hervir durante 1 minuto para disolver. Se colocó el Erlenmeyer en el autoclave a esterilizar a 121 °C por 15 minutos.

Luego se sacó el Erlenmeyer y se lo dejó enfriar en la cámara de flujo laminar hasta que la mano soportó su temperatura. Se procedió a distribuir en tubos de ensayo, se dejó reposar los tubos de ensayo en la cámara de flujo laminar.

3.6.2.3. Procedimiento para la activación de los microorganismos KWIK-STIK

1. Dejar que el microorganismo alcance una temperatura ambiente el cual se encuentra en una bolsa en refrigeración de 2 a 8 °C y retirar la unidad KWIK-STIK.
2. Desprender la parte despegable de la etiqueta y sujétela a la placa de cultivo primario o al registro de control de calidad. No desmonte el dispositivo durante la hidratación.
3. Con el borde del banco o mesa de trabajo, rompa la ampolla en la parte superior del KWIK-STIK (justo debajo del menisco de líquido) para liberar el líquido de hidratación. Rompa la ampolla solo una vez. Si la rompe varias veces puede hacer que fragmentos de vidrio perforen la carcasa de plástico, y crear así un riesgo de lesiones.
4. Sostenga verticalmente y golpee sobre una superficie dura para facilitar el flujo del líquido a través del eje hacia la parte inferior de la unidad donde está contenida la microesfera. No agite el KWIK-STIK y no cubra el pequeño orificio de ventilación en la parte superior del KWIK-STIK.
5. Pellizque la parte inferior de la unidad y triture la microesfera en el líquido hasta que este se haya disuelto.
6. A continuación, sature de forma abundante el hisopo con el material hidratado y transfiera al medio de agar apropiado o utilice de acuerdo con el POE del laboratorio. Una vez hidratado, utilícelo de inmediato.
7. Inocule la(s) placa(s) de cultivo primario haciendo rodar suavemente el hisopo sobre un tercio de la placa.
8. Mediante un bucle estéril, estríe para facilitar el aislamiento de colonias.
9. Deseche el KWIK-STIK mediante la eliminación adecuada de riesgos biológicos.
10. Inmediatamente incube la(s) placa(s) invertida(s) de cultivo primario inoculado a temperatura y condiciones apropiadas para el microorganismo (Microbiologics 2022: p.1).

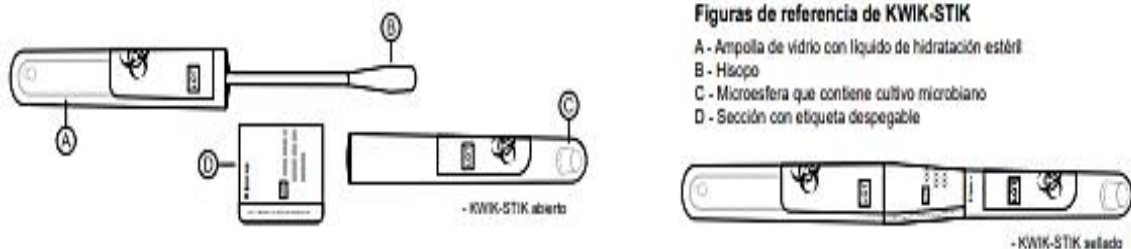


Ilustración 3-2: Descripción del producto

Fuente: Microbiologics, 2022

3.6.2.4. Preparación del estándar de McFarland

Para preparar el estándar se procedió a realizar una solución de ácido sulfúrico al 0.18 M y una solución de cloruro de bario 0.048 M. Luego se le añadió 2 mL del H₂SO₄ 0.18 M a 2 mL de la solución de BaCl₂ 0.048 M se agitaron y mezclaron ambas soluciones.

Se procedió a tomar una colonia aislada del agar nutritivo con un asa de platino flameada estéril y se colocó en un tubo con 2 mL de solución salina estéril 0.9 % y se mezcló. La mezcla de los microorganismos fue comparada con el patrón de McFarland el cual es usado para determinar la sensibilidad bacteriana.

3.6.2.5. Método de Kirby Bauer

Para realizar el método de Kirby Bauer se colocaron todos los materiales codificados dentro de la cámara de flujo laminar para la determinación de la sensibilidad bacteriana. Con la ayuda de hisopos estériles se seleccionaron inóculos que se prepararon con el estándar de McFarland y se sembraron en el medio de cultivo de Müller Hinton.

Las placas que fueron sembradas se las dejó reposar por 5 minutos, luego de este tiempo se procedió a colocar los discos de antibiograma en blanco y los discos de antibióticos con una pinza estéril en la superficie de las placas.

Luego se colocó 20 µL del aceite esencial en cada disco en blanco, se dejó reposar las cajas por 10 minutos, se las tapó y se la llevo a incubar de manera invertida a 37 °C por 24 horas. Al final se determinó el crecimiento bacteriano midiendo el diámetro de cada halo y se anotaron los resultados.

3.6.2.6. Procedimiento para la concentración mínima inhibitoria

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria se preparó el aceite esencial en las concentraciones de 100 µL/mL, 50 µL/mL, 25 µL/mL, 12.5 µL/mL, 6.3 µL/mL y 3.1 µL/mL.

Para obtener las distintas concentraciones se tomó 200 µL de aceite esencial en un tubo de ensayo, se agregó 100 µL de DMSO y finalmente se adicionó 1700 µL de caldo nutritivo y finalmente se obtuvo una concentración de 100 µL/mL.

Luego se tomó 7 tubos de ensayo a los cuales se les agregó 1 mL de caldo nutritivo, se realizó

diluciones seriadas partiendo de la concentración madre de 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$, se fue tomando 1 mL de cada tubo y se mezcló con el caldo nutritivo hasta que se obtuvo una concentración de 3.1 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Posteriormente se añadió 300 μL de microorganismo del tubo 1 al tubo 7, se mezcló muy bien y se tapó cada tubo colocando algodón.

Finalmente se incubó todos los tubos a 37 grados por 24 horas.

3.6.2.7. Procedimiento para la concentración mínima bactericida

Para determinar la concentración mínima bactericida se tomó los tubos sin turbidez de la concentración mínima inhibitoria los cuales se los agitaron y se tomó 100 μL de cada tubo. Se procedió a sembrar en placas Petri las cuales estaban rotuladas con las concentraciones respectivas. Luego se incubaron las placas sembradas a la temperatura y tiempo especificado en función del microorganismo.

CAPITULO IV

4. ANÁLISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

4.1. Obtención de los aceites esenciales

Para la extracción de los aceites esenciales se usaron las hojas, los tallos y las flores de cada especie vegetal.

En la prueba de laboratorio usando el método de hidrodestilación por cada 500 gramos de materia vegetal fresca, se obtuvieron los siguientes resultados bajo las siguientes condiciones:

- Tiempo de destilación: 3 horas.
- Temperatura de destilación: 90 °C.

Tabla 4-1: Tiempo, número de extracción y volumen de la extracción de los aceites

	Tiempo (min)	Numero de extracción	Volumen de aceite obtenido (mL)
Aceite de <i>Anethum graveolens L</i>	180	1	3.5
		2	3.6
		3	3.3
		4	3.4
Aceite de <i>Mentha pulegium</i>	180	1	3.5
		2	3.7
		3	3.4
		4	3.3

Fuente: Registro de los análisis, 2022

Realizado por: Rosero C., 2022

Discusión

Los aceites esenciales se clasifican como metabolitos secundarios de las plantas, son fracciones líquidas volátiles que proporcionan aromas y sabores característicos a las especies vegetales. Están contenidos en glándulas o vesículas secretoras inmersas en los tejidos de las hojas, flores, corteza y semillas de los frutos de muchas especies.

(León et al., 2015: pp.2-3) compara dos métodos para la extracción de aceites esenciales de *Citrus sinensis L*, hidrodestilación e hidrodestilación asistida por radiación microondas indicando que la hidrodestilación fue el menos eficiente debido a procesos de transferencia de calor poco efectivos.

Al comparar los resultados de (León et al., 2015: pp.2-3) con los obtenidos en la investigación, se observan volúmenes extraídos de aceite esencial similares al tiempo de 180 min en ambos casos. Sin embargo, el rendimiento en mililitros podría incrementarse al emplear métodos que impliquen formas de transferencia de calor más efectivos (irradiación, conducción y convección) facilitando la ruptura de las paredes glandulares vegetales con mayor rapidez y acelerando el proceso.

4.2. Características organolépticas

4.2.1. Aceite esencial de *Anethum graveolens L*

Tabla 4-2: Característica organolépticas de *Anethum graveolens L*

Característica Organolépticas	Resultados
Color	Incoloro, café oscuro
Olor	Anisado
Textura	Líquido pegajoso
Apariencia	Homogénea, opaca

Fuente: Registro de las características organolépticas, 2022

Realizado por: Rosero C., 2022

4.2.2. Aceite esencial de *Mentha pulegium*

Tabla 4-3: Característica organolépticas de *Mentha pulegium*

Característica Organolépticas	Resultados
Color	Amarrillo oscuro
Olor	Aromático, mentolado
Textura	Viscosa, pegajosa
Apariencia	Homogénea

Fuente: Registro de las características organolépticas, 2022

Realizado por: Rosero C., 2022

Discusión

La microempresa ecuatoriana Aromavida, extrae y comercializa diversos aceites esenciales, y en la ficha técnica del aceite esencial de *Anethum graveolens* menciona que este presenta propiedades organolépticas como: color incoloro a amarillo claro, de olor agradable anisado, característico las hojas frescas de la planta, su aspecto es fluido y límpido, que al compararlo con los resultados del laboratorio se observa una similitud entre ambos aceites, sin embargo la casa comercial Aromavida no reporta entre sus datos la textura del aceite esencial.

Para el aceite de *Mentha pulegium*, Boukhebti la ficha técnica reporta como resultados del análisis organoléptico un aspecto líquido con color entre transparente y amarillo a amarillo pálido, sin partículas en suspensión visibles y con olor similar al de otras especies de menta. Las características organolépticas determinadas experimentalmente mostraron un color, olor y apariencia similares mientras que la textura no fue reportada en el estudio referenciado, se establece que esta similitud se debe a que en ambos casos la obtención del aceite esencial se realizó mediante la técnica de destilación a vapor (Ventura, 2017, p.5).

4.3. Características fisicoquímicas

4.3.1. Densidad e índice de refracción del aceite de *Anethum graveolens* L

$$d_{aceite} = \frac{m_{picnometro} + aceite - m_{picnometro}}{m_{picnometro} + agua - m_{picnometro}} * d_{agua}$$
$$d_{aceite} = \frac{12.902 - 11.678}{12.987 - 11.678} * 1 = \frac{1.224}{1.309} * 1 = 0.935g/mL$$

El índice de refracción obtenido del aceite esencial de *Anethum graveolens* L fue de 1.490.

4.3.2. Densidad e índice de refracción del aceite de *Mentha pulegium*

$$d_{aceite} = \frac{m_{picnometro} + aceite - m_{picnometro}}{m_{picnometro} + agua - m_{picnometro}} * d_{agua}$$
$$d_{aceite} = \frac{12.875 - 11.678}{12.987 - 11.678} * 1 = \frac{1.197}{1.309} * 1 = 0.914g/mL$$

El índice de refracción obtenido del aceite esencial de *Mentha pulegium* fue de 1.489

Discusión

La determinación de la densidad se realizó estableciendo una relación entre las masas del picnómetro vacío, con agua destilada y con el aceite esencial, obteniendo como resultado la cantidad de masa contenida en un volumen determinado. (Quevedo, 2022, p.34) menciona que el aceite esencia de *Anethum graveolens* presenta una densidad relativa de 0.890-0.910 g/mL y un índice de refracción que oscila de 1.490 hasta 1.515, resultados que se encuentran similares a los obtenidos en el laboratorio, pues el aceite esencial obtenido tuvo una densidad de 0.935 y un índice de refracción de 1.490.

Para el caso del aceite esencial de *Mentha pulegium* (Ruiz, 2017, pp.71-73) indica que la densidad aceptada se encuentra entre: 0.930 y 0.944 y un índice de refracción desde 1.487 hasta 1.494, lo valores que se encuentran por encima de los obtenidos en el laboratorio de manera experimental (densidad = 0.914), estas variaciones ocurren debido a los factores ambientales tales como la temperatura que permiten que el aceite se dilate y su densidad por ende disminuya.

4.4. Rendimiento de extracción

4.4.1. Aceite esencial de Anethum graveolens L

$$p = \frac{m_2}{m_1} * 100$$
$$p = \frac{11.59 \text{ g}}{2000 \text{ g}} * 100 = 0.57$$

4.4.2. Aceite esencial de Mentha pulegium

$$p = \frac{m_2}{m_1} * 100$$
$$p = \frac{11.69 \text{ g}}{2000 \text{ g}} * 100 = 0.58$$

Discusión

El rendimiento de la extracción expresa la cantidad de producto obtenido tras el proceso extractivo como su relación porcentual con la masa inicial de muestra procesada. (Benlembarek, et al., 2022: p.4) obtuvo aceite esencial de *Anethum graveolens L* por hidrodestilación reportando un

rendimiento del 0.8% peso/peso luego de 180 min mientras que el rendimiento obtenido experimentalmente alcanzó el 0.57% en el mismo tiempo.

En contraste, (Mohaddese & Ghasem, 2008: pp.325-327), reportan un 0.27% en el rendimiento volumen/peso en la extracción de aceite esencial de *Mentha pulegium* tras 180 min de extracción, evidentemente inferior al 0.58% conseguido en el laboratorio. Las diferencias observadas al comparar los resultados son explicadas como consecuencia en la variación en los factores ambientales del lugar de estudio, especie vegetal, equipos, reactivos y demás condiciones de trabajo en el laboratorio.

4.5. Determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales mediante el método de Kirby Bauer

Para evaluar e interpretar los resultados de los diámetros obtenidos con los halos de inhibición se tomará como referencia lo indicado por (Ortega, 2018, p.54) con respecto a la sensibilidad de una cepa bacteriana frente a antimicrobianos.

1. Nula (-) si fue inferior o igual a 8 mm.
2. Sensible (Sensible = +) de 9 a 14 mm.
3. Muy sensible (muy sensible = ++) de 15 a 19 mm.
4. Sumamente sensible (S.S = +++) si fue igual o superior a 20 mm.

4.5.1. Actividad antimicrobiana que presentaron los aceites esenciales de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* frente a *Candida albicans*

Tabla 5-4: Diámetros de los halos de inhibición formados por los aceites esenciales de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* contra *Candida albicans*

Aceites esenciales	Concentraciones	Repetición n 1 (mm)	Repetición n 2 (mm)	Repetición n 3 (mm)	Control positivo Fluconazol (mm)	Control negativo
<i>Mentha pulegium</i>	5000 ppm	20	21	19	30	DMSO
	2500 ppm	18	17	15	30	DMSO
	1250 ppm	15	12	15	30	DMSO
	625 ppm	12	13	11	30	DMSO
	312.5 ppm	10	8	9	30	DMSO
	156.25 ppm	8	10	10	30	DMSO
	78.125 ppm	11	9	10	30	DMSO
	39.06 ppm	9	10	9	30	DMSO
<i>Anethum graveolens L</i>	5000 ppm	19	18	18	30	DMSO
	2500 ppm	15	15	16	30	DMSO
	1250 ppm	13	12	12	30	DMSO
	625 ppm	12	11	11	30	DMSO
	312.5 ppm	12	10	12	30	DMSO
	156.25 ppm	11	11	10	30	DMSO
	78.125 ppm	9	9	8	30	DMSO
	39.06 ppm	8	8	8	30	DMSO

DMSO: dimetilsulfóxido

Fuente: Registro de análisis antimicrobiano, 2022

Realizado por: Rosero C., 2022

Discusión

La evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites se realizó mediante el método de difusión en discos de Kirby – Bauer. *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* mostraron un comportamiento similar en cuanto a la inhibición de *Candida albicans* con diámetros inhibitorios directamente proporcionales a la concentración del aceite, a mayor concentración del aceite esencial mayor fue el diámetro medido. El control positivo presentó un diámetro de inhibición aproximándose a los 30 mm mientras que, a una concentración de 5000 ppm, los

diámetros alcanzaron los 20 mm en el primer caso y 18.3 mm en el segundo, indicando efectividad de potencia similar como agentes antifúngicos in vitro.

Según (Benlembarek et al., 2022: p.3) estudios previos realizados con aceite esencial de *Anethum graveolens* tuvieron efecto antifúngico similar en cepas de *Candida albicans* y *Sclerotinia sclerotiorum*, debido a contener compuestos químicos como alcoholes, fenoles, terpenos y cetonas. (Piras et al., 2019: p.3) explica la efectividad antifúngica de aceite esencial de *Mentha pulegium* por su elevado contenido de pulegona, una cetona monoterpénica. Reporta que aceites con contenido de compuestos terpénicos, concretamente timol, carvacrol y fenilpropanoides actúan como excelentes inhibidores del crecimiento fúngico, demostrando que la presencia de grupos fenólicos en la estructura de las moléculas mejora sus propiedades antifúngicas.

4.5.2. Actividad antimicrobiana que presentaron los aceites esenciales de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* frente a *Enterococcus faecalis*

Tabla 4-5: Diámetros de los halos de inhibición formados por los aceites esenciales de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* contra *Enterococcus faecalis*

Aceites esenciales	Concentraciones	Repetición 1 (mm)	Repetición 2 (mm)	Repetición 3 (mm)	Control positivo Ampicilina (mm)	Control negativo
<i>Mentha pulegium</i>	5000 ppm	15	12	12	28	DMSO
	2500 ppm	11	11	10	28	DMSO
	1250 ppm	11	11	9	28	DMSO
	625 ppm	9	10	9	28	DMSO
	312.5 ppm	9	9	8	28	DMSO
	156.25 ppm	9	8	8	28	DMSO
	78.125 ppm	7	7	8	28	DMSO
	39.06 ppm	6	6	6	28	DMSO
<i>Anethum graveolens L</i>	5000 ppm	12	12	13	20	DMSO
	2500 ppm	8	10	10	20	DMSO
	1250 ppm	8	11	9	20	DMSO
	625 ppm	8	9	9	20	DMSO
	312.5 ppm	9	8	8	20	DMSO
	156.25 ppm	7	7	8	20	DMSO
	78.125 ppm	6	6	6	20	DMSO
	39.06 ppm	6	6	6	20	DMSO

DMSO: dimetilsulfóxido

Fuente: Registro de análisis antimicrobiano, 2022

Realizado por: Rosero C., 2022

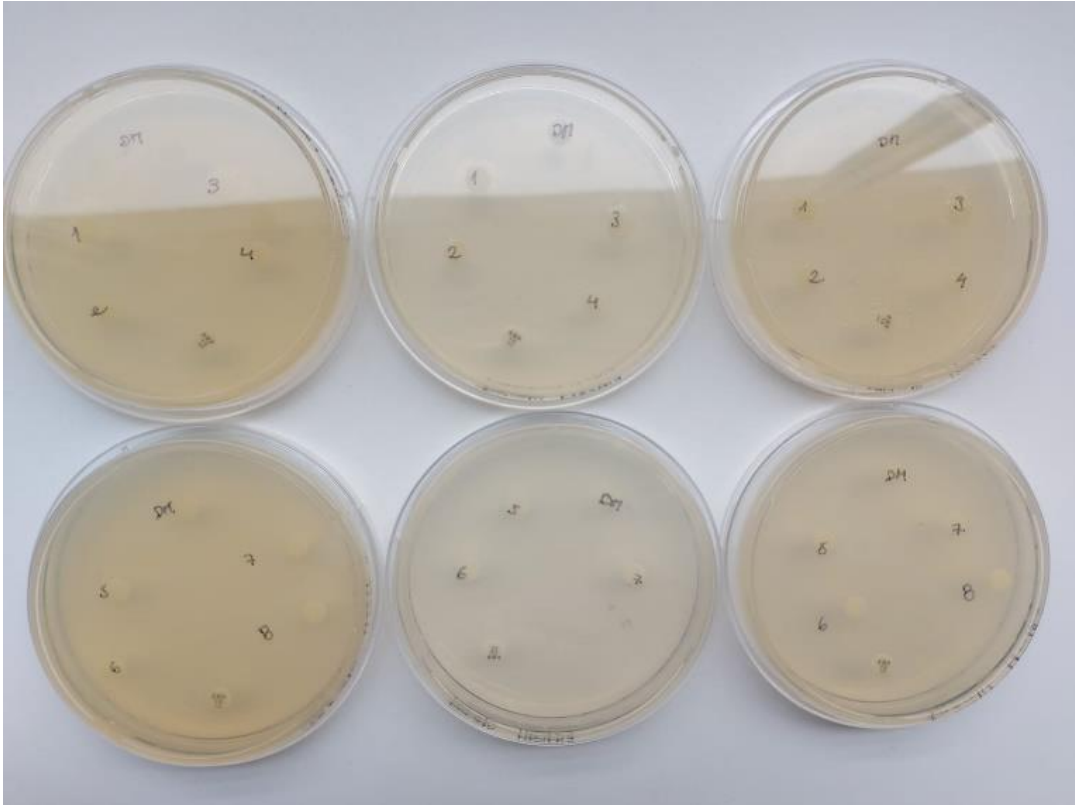


Ilustración 4-1: Halos de inhibición formados por el aceite esencial de *Mentha pulegium*
Realizado por: Rosero C., 2022

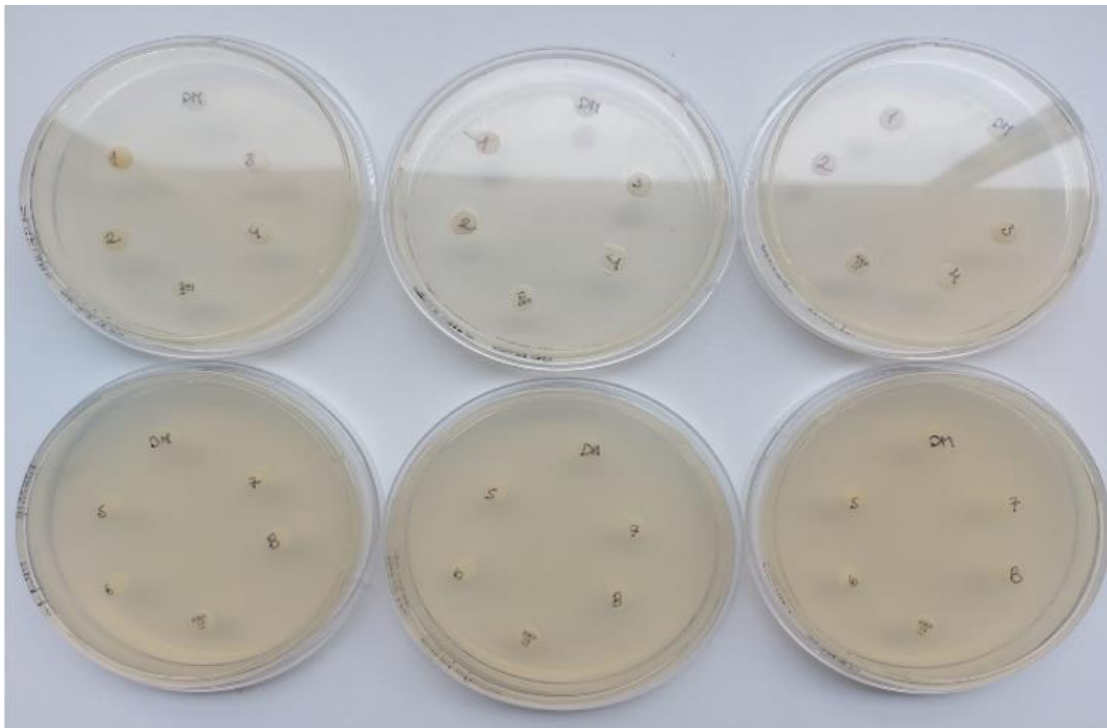


Ilustración 5-2: Halos de inhibición formados por el aceite esencial de *Anethum graveolens L*
Realizado por: Rosero C., 2022

Discusión

Los aceites esenciales de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* presentan ambos actividad antimicrobiana frente a *Enterococcus faecalis*, pues en ambos casos los halos de inhibición son mayores en cuanto mayor es la concentración del aceite esencial, para el control positivo se utilizó ampicilina que presento 28 y 20 mm de halo de inhibición, a una concentración de 5000 ppm los halos de inhibición fueron: 13 y 12 mm para los aceites de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* respectivamente, lo que indica una potencia similar de ambos aceites para el microorganismo de interés.

Según (Castro et al., 2017: pp.46-49) y (Ruiz, 2017, pp.71-73) los aceites esenciales de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* tienen actividad frente a diversos microorganismos incluyendo *Enterococcus faecalis*, dicha actividad antimicrobiana esta mediada por la alta cantidad de terpenos y flavonas que tienen ambas especies vegetales.

4.5.3. Actividad antimicrobiana que presento la mezcla de los aceites esenciales de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* frente a *Candida albicans*

Tabla 4-6: Diámetros de los halos de inhibición formados por la mezcla de los aceites esenciales de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* contra *Candida albicans*

Aceites esenciales	Concentraciones	Repetición 1 (mm)	Repetición 2 (mm)	Repetición 3 (mm)	Control positivo Fluconazol (mm)	Control negativo
<i>Mentha pulegium</i> y <i>Anethum graveolens L</i>	5000 ppm	21	20	21	30	DMSO
	2500 ppm	18	18	17	30	DMSO
	1250 ppm	15	12	15	30	DMSO
	625 ppm	10	9	9	30	DMSO
	312.5 ppm	10	8	9	30	DMSO
	156.25 ppm	8	10	10	30	DMSO
	78.125 ppm	11	9	10	30	DMSO
	39.06 ppm	9	10	9	30	DMSO

DMSO: dimetilsulfóxido

Fuente: Registro de análisis antimicrobiano, 2022

Realizado por: Rosero C., 2022

Discusión

Utilizando la técnica de difusión de discos de Kirby Bauer, se determinó la actividad antifúngica de la mezcla de los aceites esenciales en diferentes concentraciones de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* frente a *Candida albicans*, se obtuvo un máximo de 21 mm de halos de inhibición a la concentración de 5000 ppm, valor bastante parecido al control positivo con fluconazol que presentó un halo de 30 mm. Comparando la actividad antifúngica de ambos aceites por separado y la mezcla se observó un aumento en la potencia de la actividad frente a *Candida albicans*.

Los resultados se correlacionan con lo publicado por (Ortiz, 2018, pp.48-50) quien comparo in vitro la actividad antifúngica de dos aceites esenciales diferentes y la mezcla de estos, frente a *Colletotrichum gloesporioides* demostrando que los halos de inhibición mejoran al mezclar ambos aceites, tal como ocurre con la mezcla de los aceites esenciales obtenidos en el laboratorio.

4.5.4. Actividad antimicrobiana que presento la mezcla de los aceites esenciales de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* frente a *Enterococcus faecalis*

Tabla 4-7: Diámetros de los halos de inhibición formados por la mezcla de los aceites esenciales de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* contra *Enterococcus faecalis*

Aceites esenciales	Concentraciones	Repetición 1 (mm)	Repetición 2 (mm)	Repetición 3 (mm)	Control positivo Ampicilina (mm)	Control negativo
<i>Mentha pulegium</i> y <i>Anethum graveolens L</i>	5000 ppm	12	11	12	25	DMSO
	2500 ppm	10	10	11	25	DMSO
	1250 ppm	9	9	8	25	DMSO
	625 ppm	8	8	8	25	DMSO
	312.5 ppm	6	6	6	25	DMSO
	156.25 ppm	6	6	6	25	DMSO
	78.125 ppm	6	6	6	25	DMSO
	39.06 ppm	6	6	6	25	DMSO

DMSO: dimetilsulfóxido

Fuente: Registro de análisis antimicrobiano, 2022

Realizado por: Rosero C., 2022

Discusión

Al determinar la actividad antimicrobiana de la mezcla de los aceites esenciales de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* frente a *Enterococcus faecalis* se observó una disminución de la potencia de la actividad antimicrobiana, pues a una concentración de 5000 ppm se obtiene un halo de inhibición de 12 mm, inferior al valor reportado a la misma concentración del aceite esencial de *Mentha pulegium* (13 mm), estos datos difieren de lo documentado por (Pájaro et al., 2017: p.8) quienes establecen que al realizar una mezcla de aceites esenciales, la actividad debe ir en aumento debido al aumento de la cantidad de metabolitos secundarios.

4.6. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L*

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria se realiza diluciones de los aceites esenciales a concentraciones de 100 µL/mL, 50 µL/mL, 25 µL/mL, 12.5 µL/mL, 6.3 µL/mL, 3.1 µL/mL, se coloca a cada tubo 1 mL de caldo nutritivo y 100 µL del microorganismo preparado al estándar de McFarland.

4.6.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* frente a *Candida albicans*

Tabla 4-8: Determinación de la concentración mínima inhibitoria de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* contra *Candida albicans*

Aceites esenciales	Diluciones	Repetición 1 (turbidez)	Repetición 2 (turbidez)	Repetición 3 (turbidez)	Control positivo	Control negativo
<i>Mentha pulegium</i>	100 µL/mL	-	-	-	+	-
	50 µL/mL	-	-	-	+	-
	25 µL/mL	-	-	-	+	-
	12.5 µL/mL	-	-	-	+	-
	6.3 µL/mL	+	+	+	+	-
	3.1 µL/mL	+	+	+	+	-
<i>Anethum graveolens L</i>	100 µL/mL	-	-	-	+	-
	50 µL/mL	-	-	-	+	-
	25 µL/mL	-	-	-	+	-
	12.5 µL/mL	-	-	-	+	-
	6.3 µL/mL	+	+	+	+	-
	3.1 µL/mL	+	+	+	+	-

(+): turbidez (-): no existe turbidez

Fuente: Registro de análisis del CMI, 2022

Realizado por: Rosero C., 2022

En la Tabla 4-8 se determina que la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Mentha pulegium* se encuentra en la concentración 12.5 µL/mL, y para el aceite de *Anethum graveolens L* la concentración mínima inhibitoria se encuentra en la concentración de 12.5 µL/mL.

Discusión

La concentración mínima inhibitoria, es un parámetro que permite conocer cuál es la concentración más baja en la que el aceite esencial inhibe el crecimiento de un microorganismo, mediante la determinación de ausencia o presencia de turbidez en tubos de ensayos con muestras a distintas concentraciones, para el caso de *Candida albicans*, el valor de CMI fue de 12.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para ambos aceites esenciales.

(Azüero, 2019, pp.10-11), realizó un estudio con diversos aceites esenciales incluyendo el de *Anethum graveolens L*, concluyó que este aceite presenta una gran actividad antifúngica, pues con tan solo 6 $\mu\text{L}/\text{L}_{\text{aire}}$ inhibió el crecimiento de *T. castaneum*. Por su parte (Montenegro et al., 2020: pp. 5-6) evaluó la actividad antifúngica del aceite esencial y los componentes de *Mentha pulegium* en donde se obtuvo que con 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ya existía actividad frente a hongos y levaduras, gracias a sus riquezas en isopulegol y otros alcoholes terpénicos.

4.6.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* frente a *Enterococcus faecalis*

Tabla 4-9: Determinación de la concentración mínima inhibitoria de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* contra *Enterococcus faecalis*

Aceites esenciales	Diluciones	Repetición 1 (turbidez)	Repetición 2 (turbidez)	Repetición 3 (turbidez)	Control positivo	Control negativo
<i>Mentha pulegium</i>	100 $\mu\text{L}/\text{mL}$	-	-	-	+	-
	50 $\mu\text{L}/\text{mL}$	-	-	-	+	-
	25 $\mu\text{L}/\text{mL}$	-	-	-	+	-
	12.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$	+	+	+	+	-
	6.3 $\mu\text{L}/\text{mL}$	+	+	+	+	-
	3.1 $\mu\text{L}/\text{mL}$	+	+	+	+	-
<i>Anethum graveolens L</i>	100 $\mu\text{L}/\text{mL}$	-	-	-	+	-
	50 $\mu\text{L}/\text{mL}$	-	-	-	+	-
	25 $\mu\text{L}/\text{mL}$	-	-	-	+	-
	12.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$	+	+	+	+	-
	6.3 $\mu\text{L}/\text{mL}$	+	+	+	+	-
	3.1 $\mu\text{L}/\text{mL}$	+	+	+	+	-

(+): turbidez (-): no existe turbidez

Fuente: Registro de análisis del CMI, 2022

Realizado por: Rosero C., 2022

En la Tabla 4-9 se determina que la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Mentha pulegium* se encuentra en la concentración 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$, y para el aceite de *Anethum graveolens L* la concentración mínima inhibitoria se encuentra en la concentración de 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Discusión

La determinación de la concentración mínima inhibitoria para el aceite de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* se realiza observando la turbidez presente en los tubos de ensayos con diferentes soluciones de los aceites esenciales, para el caso de las cepas de *Enterococcus faecalis* se obtuvo que, para ambos aceites, la concentración mínima inhibitoria es de 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

(Serrano et al., 2013: pp.58-59) en su estudio menciona que la inhibición del crecimiento bacteriano que aporta el aceite esencial de *Mentha pulegium* con una concentración de 0.03% es moderada. (Quevedo, 2022, pp.45-46) por su parte indica que para *Anethum graveolens L* se evidencia una inhibición mínima con 0.5 mg/L para *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Esta diferencia de valores se explica dado que la composición de los aceites esenciales se ve influenciada por los diversos factores ambientales, climáticos y de altitud, lo que a su vez varia las respuestas antimicrobianas.

4.6.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de la mezcla de los aceites esenciales de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* frente a *Candida albicans*

Tabla 4-10: Determinación de la concentración mínima inhibitoria de la mezcla de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* contra *Candida albicans*

Aceites esenciales	Diluciones	Repetición 1 (turbidez)	Repetición 2 (turbidez)	Repetición 3 (turbidez)	Control positivo	Control negativo
<i>Mentha pulegium</i>	100 $\mu\text{L}/\text{mL}$	-	-	-	+	-
	50 $\mu\text{L}/\text{mL}$	-	-	-	+	-
	25 $\mu\text{L}/\text{mL}$	-	-	-	+	-
<i>Anethum graveolens L</i>	12.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$	-	-	-	+	-
	6.3 $\mu\text{L}/\text{mL}$	+	+	+	+	-
	3.1 $\mu\text{L}/\text{mL}$	+	+	+	+	-

(+): turbidez (-): no existe turbidez

Fuente: Registro de análisis del CMI, 2022

Realizado por: Rosero C., 2022

En la Tabla 4-10 se determina que la concentración mínima inhibitoria de la mezcla de los aceites esenciales de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* se encuentra en la concentración de 12.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Discusión

Para determinar la concentración mínima inhibitoria de la mezcla de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* se utilizó la misma metodología respecto observación de turbidez de los tubos de ensayos, para lo cual se obtiene que a una concentración de 12.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ya no existe crecimiento de la cepa de *Candida albicans*. (Criollo et al., 2013: pp.32-35) realizó una mezcla de 3 aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis*, *Myrceugenella apiculata* y *Mentha pulegium* y evaluó su actividad frente a *Fusarium sp.*, y demostró que dichas mezclas presentaron valores de CMI de 62.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, valore considerablemente elevados frente a los resultados obtenidos en el laboratorio con mezcla de 2 aceites esenciales.

4.6.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de la mezcla de los aceites esenciales de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* frente a *Enterococcus faecalis*

Tabla 4-11: Determinación de la concentración mínima inhibitoria de la mezcla de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* contra *Enterococcus faecalis*

Aceites esenciales	Diluciones	Repetición 1 (turbidez)	Repetición 2 (turbidez)	Repetición 3 (turbidez)	Control positivo	Control negativo
<i>Mentha pulegium</i>	100 µL/mL	-	-	-	+	-
	50 µL/mL	-	-	-	+	-
	25 µL/mL	-	-	-	+	-
<i>Y</i>	12.5 µL/mL	-	-	-	+	-
<i>Anethum graveolens L</i>	6.3 µL/mL	+	+	+	+	-
	3.1 µL/mL	+	+	+	+	-

(+): turbidez (-): no existe turbidez

Fuente: Registro de análisis del CMI, 2022

Realizado por: Rosero C., 2022

En la Tabla 4-11 se determina que la concentración mínima inhibitoria de la mezcla de los aceites esenciales de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* se encuentra en la concentración de 12.5 µL/mL.

La actividad mínima inhibitoria de la mezcla de aceites esenciales de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* es de 12.5 µL/mL, que al ser comparada con la CMI de los aceites por separado se evidencia una mejoría respecto a la inhibición, pues por separado cada aceite esencial presenta una CMI de 25 µL/mL. Datos que se correlacionan con lo propuesto por (Pájaro et al., 2017: p.8), ya que, al determinar la concentración mínima inhibitoria de una mezcla de aceites esenciales, esta fue menor que cuando se realizó por individual, frente a cepas de *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus*

4.7. Determinación de la concentración mínima bactericida y fungicida de los aceites esenciales de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L*

Para la determinación de la concentración mínima bactericida y fungicida se utiliza los tubos en los que se determina el CMI y se toma 100 µL de cada uno de los tubos en los que no se presenta turbidez incluido el del CMI, se colocan en cajas Petri que contienen agar nutritivo.

4.7.1. Determinación de la concentración mínima fungicida de los aceites esenciales de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* frente a *Candida albicans*

Tabla 4-12: Determinación de la concentración mínima fungicida de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* contra *Candida albicans*.

Aceites esenciales	Diluciones	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
<i>Mentha pulegium</i>	100 µL/mL	-	-	-
	50 µL/mL	-	-	-
	25 µL/mL	-	-	-
	12.5 µL/mL	+	+	+
	6.3 µL/mL	+	+	+
<i>Anethum graveolens L</i>	100 µL/mL	-	-	-
	50 µL/mL	-	-	-
	25 µL/mL	-	-	-
	12.5 µL/mL	+	+	+
	6.3 µL/mL	+	+	+

(+): crecimiento (-): no existe crecimiento

Fuente: Registro de análisis del CMB, 2022

Realizado por: Rosero C., 2022.

En la Tabla 4-12 se determina que la concentración mínima fungicida del aceite esencial *Mentha pulegium* se encuentra en la concentración 25 µL/mL y para el aceite esencial de *Anethum graveolens L* la concentración mínima fungicida se encuentra en la concentración 25 µL/mL.

Discusión

Al determinar la concentración mínima fungicida, se pretende conocer la menor concentración a la que, el aceite esencial es capaz de inducir la muerte de un hongo o levadura de interés, para lo

cual se sembró aquellas diluciones que no presentaron turbidez, incluyendo la CMI (12.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$), se observó que la concentración mínima bactericida para el aceite esencial de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* fue de 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ en ambos casos.

(Peinado, 2018, pp.94-96) menciona que el aceite esencial de *Mentha pulegium* presenta una gran actividad fungicida, pues su CMB la obtuvo con una concentración del 30% del aceite esencial frente a *Rhizoctonia solani*, además determina que el principal responsable de la actividad fungicida es el mentol. Por otro lado, (Castro et al., 2017: p.49) menciona que con 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de aceite esencial de *Anethum graveolens L* se logra la actividad fungicida para hongos que participan en la descomposición de alimentos, valor que es mayor al obtenido al laboratorio debido a las diferentes técnicas de extracción de aceites esenciales utilizadas.

4.7.2. Determinación de la concentración mínima bactericida de los aceites esenciales de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* frente a *Enterococcus faecalis*

Tabla 4-13: Determinación de la concentración mínima bactericida de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* contra *Enterococcus faecalis*

Aceites esenciales	Diluciones	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
<i>Mentha pulegium</i>	100 $\mu\text{L}/\text{mL}$	-	-	-
	50 $\mu\text{L}/\text{mL}$	-	-	-
	25 $\mu\text{L}/\text{mL}$	+	+	+
	12.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$	+	+	+
<i>Anethum graveolens L</i>	100 $\mu\text{L}/\text{mL}$	-	-	-
	50 $\mu\text{L}/\text{mL}$	-	-	-
	25 $\mu\text{L}/\text{mL}$	+	+	+
	12.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$	+	+	+

(+): crecimiento (-): no existe crecimiento

Fuente: Registro de análisis del CMB, 2022

Realizado por: Rosero C., 2022

En la Tabla 4-13 se determina que la concentración mínima bactericida del aceite esencial *Mentha pulegium* se encuentra en la concentración 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y para el aceite esencial de *Anethum graveolens L* la concentración mínima bactericida se encuentra en la concentración 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Discusión

Una vez realizada la respectiva siembra de las soluciones sin turbidez, se evidenció un crecimiento bacteriano en las diluciones 12.5 y 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$, mientras que a partir de los de 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ se observó la concentración mínima bactericida para ambos aceites esenciales: *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L.* (Fernández et al., 2017: p.23) mencionan que la actividad bactericida del aceite esencial *Mentha pulegium*, se debe a su capacidad para desnaturalizar proteínas y alterar la membrana celular de las células, incluido las bacterias. Mientras que en el caso del aceite esencial de *Anethum graveolens L.*, (Márquez et al., 2003: p.63) al realizar un estudio de los productos naturales con actividad antimicrobiana descubrió que los compuestos terpenoides le brindan la cualidad de bactericida a la planta en mención.

4.7.3. Determinación de la concentración mínima fungicida de la mezcla de los aceites esenciales de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* frente a *Candida albicans*

Tabla 4-14: Determinación de la concentración mínima fungicida de la mezcla de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* contra *Candida albicans*

Aceites esenciales	Diluciones	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
<i>Mentha pulegium</i> Y <i>Anethum graveolens L</i>	100 $\mu\text{L}/\text{mL}$	-	-	-
	50 $\mu\text{L}/\text{mL}$	-	-	-
	25 $\mu\text{L}/\text{mL}$	-	-	-
	12.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$	+	+	+
	6.3 $\mu\text{L}/\text{mL}$	+	+	+

(+): crecimiento (-): no existe crecimiento

Fuente: Registro de análisis del CMF, 2022

Realizado por: Rosero C., 2022

En la Tabla 4-14 se determina que la concentración mínima fungicida de la mezcla de los aceites esenciales *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens* se encuentra en la concentración 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Discusión

Una vez que se determinó la concentración mínima fungicida de los aceites esenciales por individual, se realiza el mismo proceso para la mezcla a distintas concentraciones de los aceites de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L.*, la CMF para esta mezcla corresponde a 25

uL/mL, lo que al comparar con las CMF individuales no se observa una mejoría pues la dilución con efecto mínimo fungicida es de 25 µL/mL para ambos aceites esenciales. Este resultado se contrapone a lo expuesto por (Criollo et al., 2013: pp.32-35), quien al mezclar los aceites esenciales de *Mentha pulegium* y *Rosmarinus. officinalis* en una proporción 50/50 disminuyó la concentración mínima fungicida en comparación a cuando se utilizó los aceites de manera independiente.

4.7.4. Determinación de la concentración mínima bactericida de la mezcla de los aceites esenciales de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* frente a *Enterococcus faecalis*

Tabla 4-15: Determinación de la concentración mínima bactericida de la mezcla de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* contra *Enterococcus faecalis*.

Aceites esenciales	Diluciones	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
<i>Mentha pulegium</i> Y <i>Anethum graveolens L</i>	100 µL/mL	-	-	-
	50 µL/mL	-	-	-
	25 µL/mL	-	-	-
	12.5 µL/mL	+	+	+
	6.3 µL/mL	+	+	+

(+): crecimiento (-): no existe crecimiento

Fuente: Registro de análisis del CMF, 2022

Realizado por: Rosero C., 2022

En la Tabla 4-15 se determina que la concentración mínima bactericida de la mezcla de los aceites esenciales *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* se encuentra en la concentración 25 µL/mL.

Discusión

Al combinar los aceites esenciales de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* se observó una mejoría respecto a la capacidad bactericida, pues en ambos casos la CMB fue de 50 µL/mL, mientras que, al combinar dichos aceites y por consecuente sus metabolitos activos, la concentración mínima bactericida se reduce a 25 µL/mL. Esta mejoría se explica con los datos emitidos por (López, 2021, pp.57-61), quien establece que el género *Mentha* presenta un sinergismo al momento de combinarse con otros compuestos que tengan actividad antimicrobiana, sobre todo en microorganismos gran positivos, como es el caso de *Enterococcus*.

CAPITULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Se logró obtener los aceites esenciales de *Anethum graveolens L* y *Mentha pulegium*, los cuales al realizarles las determinaciones organolépticas y fisicoquímicas se determinó que cumplen los parámetros de calidad por lo que pudo garantizar la pureza de cada aceite obtenido.
- Se determinó la actividad antimicrobiana y antifúngica de los aceites de *Anethum graveolens L* y *Mentha pulegium* mediante el uso del método Kirby Bauer, logrando establecer que el aceite de *Mentha pulegium* a una concentración de 5000 ppm presentó mayor actividad antifúngica y antimicrobiana contra las cepas de *Candida albicans* y *Enterococcus faecalis* con halos de inhibición promedio de 20 mm y 15 mm respectivamente, mientras que el aceite esencial de *Anethum graveolens L* a una concentración de 5000 ppm fue la que presentó mayor actividad antifúngica y antimicrobiana con halos de inhibición de 19 mm contra la cepa de *Candida albicans* y 12 mm contra la cepa de *Enterococcus faecalis*.
- Se logró determinar mediante la escala de Duraffourd que el aceite esencial de *Mentha pulegium* contra la cepa de *Candida albicans* se considera sumamente sensible y contra la cepa de *Enterococcus faecalis* se considera muy sensible, mientras que el aceite esencial de *Anethum graveolens L* contra la cepa de *Candida albicans* se considera muy sensible y contra la cepa de *Enterococcus faecalis* se considera sensible. La mezcla de los aceites esenciales de *Anethum graveolens L* y *Mentha pulegium* a una concentración de 5000 ppm presentó mayor actividad antifúngica y antimicrobiana contra las cepas de *Candida albicans* y *Enterococcus faecalis* presentando halos de inhibición de 21 mm contra *Candida albicans* lo que permitió definirlo como sumamente sensible y 12 mm contra *Enterococcus faecalis* lo que nos permitió clasificarlo como sensible.
- Mediante el uso del método de macro dilución en caldo y los aceites esenciales a concentraciones de 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 12.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 6.3 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 3.1 $\mu\text{L}/\text{mL}$, se determinó la concentración mínima inhibitoria, la concentración mínima fungicida y bactericida. La concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens L* frente a *Candida albicans* fue de 12.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$. La CMI de los aceites

esenciales contra la cepa de *Enterococcus faecalis* fueron de 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para ambos casos, en cambio la mezcla de los aceites de *Anethum graveolens L* y *Mentha pulegium* presentaron una concentración mínima inhibitoria de 12.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ tanto para la cepa de *Candida albicans* como para la de *Enterococcus faecalis*.

- Los aceites de *Anethum graveolens L* y *Mentha pulegium* contra la cepa de *Candida albicans* presentaron concentraciones mínimas fungicidas de 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$, por otro lado, contra la cepa de *Enterococcus faecalis* los aceites esenciales presentaron concentraciones mínimas bactericidas de 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y la mezcla de los aceites contra las cepas de *Candida albicans* y *Enterococcus faecalis* en ambos casos presentaron una concentración mínima fungicida y bactericida de 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

5.2. Recomendaciones

- Se recomienda realizar el tamizaje fitoquímico de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens* L para conocer qué tipo de componentes y metabolitos presenta cada planta.
- Considerar evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales estudiados en este trabajo experimental frente a otras cepas de interés clínico para valorar su sensibilidad.
- Se debe cumplir con todas las normas de bioseguridad al momento de trabajar en el laboratorio.
- Utilizar distintas concentraciones de los aceites esenciales de *Mentha pulegium* y *Anethum graveolens* L a las usadas en el presente trabajo para identificar el efecto antibacteriano de ambos aceites.

BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA, Silvia. *Enterococcus*. [en línea]. *Grupo Asesor Control de Infecciones y Epidemiología*, 2005. [Consulta: 18 mayo 2023]. Disponible en: <https://codeinep.org/wp-content/uploads/2019/06/Enterococcus.pdf>

ARGOTE, F., et al. “Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*”. Sielo [en línea]. 2017. [Consulta: 17 mayo 2023]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v15nspe2/1692-3561-bsaa-15-spe2-00052.pdf>.

AROMAVIDA. *Ficha técnica de aceites esenciales*. [en línea]. *Aromavida*, 2020. [Consulta: 16 febrero 2023]. Disponible en: <https://www.aromavida.com/wp-content/uploads/2020/05/Ficha-t%C3%A9cnica-Eneldo-tabacundo.pdf>

ASTURNATURA. *Mentha pulegium L.* [en línea]. *Asturnatura*, 2007. [consulta: 17 mayo 2023]. Disponible en: <https://www.asturnatura.com/especie/mentha-pulegium>.

AVAIS, M. *Candidiasis oral*. [en línea]. *Intramed*, 2022. [consulta: 17 mayo 2023]. Disponible en: <https://www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoid=101211>.

AZUERO, J., et al. Caracterización química de aceites esenciales comerciales y evaluación de su capacidad antialimentaria y fumigante contra *Tribolium castaneum*. [En línea] (Trabajo de titulación). (Pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. 2019. pp. 10-11. [Consulta: 13 febrero 2023]. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/43252/AzueroJuan2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y2>

BENLEMBAREK, Khaoula., et al. “Chemical Composition and Biological Activities of *Anethum graveolens* L. Essential Oil from Algeria”. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, vol.25, n° 4 (2022). p. 4.

BERMÚDEZ, M., et al. “Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Psidium guajava* y *Cymbopogon citratus* L”. *Agronomía Mesoamericana* [en línea], 2019, (Costa Rica). 30 (1), pp. 147-163. [consulta: 17 mayo 2023]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/437/43757673010/html/>.

BOUKHEBTI, H., et al. “Chemical composition and antibacterial activity of Mentha pulegium L. and Mentha spicata L. essential oils”. Scholars Research Library [en línea]. 2011, 3 (4), pp. 267-275. [consulta: 17 mayo 2023]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/279908671_Chemical_composition_and_antibacterial_activity_of_Mentha_pulegium_L_and_Mentha_spicata_L_essential_oils.

BUCAY, L. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO DE MENTHA FRENTE A CANDIDA ALBICANS [en línea]. (Trabajo de titulación). (Pregrado). UNIVERSIDAD REGIONAL AUTÓNOMA DE LOS ANDES, Ambato, 2018. [consulta: 17 mayo 2023]. Disponible en: <https://dspace.uniandes.edu.ec/bitstream/123456789/8795/1/PIUAMFCH027-2018.pdf>.

CABEZAS, C. EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE CANELA (*Cinnamomum zeylanicum*) SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS DE LA CARNE MOLIDA DE RES [en línea]. Milagro: UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR, 2021. [consulta: 17 mayo 2023]. Disponible en: <https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/CABEZAS%20PINZON%20CARLOS%20EDUARDO.pdf>.

CAGUANA, M., & QUINALUISA, V. DIAGNÓSTICO DEL POTENCIAL AGROINDUSTRIAL DE SUNFO (*Clinopodium nubigenum*) Y ENELDO (*Anethum graveolens*) [en línea]. (Trabajo de titulación). UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI, Latacunga, 2017. [consulta: 17 mayo 2023]. Disponible en: <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/4190/1/UTC-PC-000114.pdf>.

CALDERÓN, G., & AGUILAR, L. “RESISTENCIA ANTIMICROBIANA: MICROORGANISMOS MÁS RESISTENTES Y ANTIBIÓTICOS CON MENOR ACTIVIDAD”. REVISTA MEDICA DE COSTA RICA Y CENTROAMERICA LXXIII [en línea], 2016, vol. 201, [consulta: 17 mayo 2023]. Disponible en: <https://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/621/art03.pdf>.

CASTRO, D., et al. “Evaluación in vitro de la capacidad antimicrobiana del aceite esencial de eneldo-Anethum graveolens-como inhibidor del crecimiento de Staphylococcus aureus, coliformes y hongos presentes en la carne de trucha”. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, vol. 64 n° 2 (2017), p. 46-49.

CHAHAL, K., et al. “Chemistry and biological activities of *Anethum graveolens* L. (dill) essential oil: A review. ~ 295 ~”. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* [en línea], 2017, 6 (2), [consulta: 17 mayo 2023]. ISSN 2349-8234. Disponible en: <https://www.phytojournal.com/archives/2017/vol6issue2/PartF/6-2-67-817.pdf>.

CHERO, D. *EFEECTO ANTIBACTERIANO In Vitro DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE Psidium guajava y Medicago sativa SOBRE Streptococcus mutans ATCC 25175* [en línea]. Perú: Universidad Señor de Sipán, 2016. [consulta: 18 mayo 2023]. Disponible en: <https://repositorio.uss.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12802/145/CHERO%20NEPO.pdf?sequence=7&isAllowed=y>.

CORNISTEIN, W., et al. “*Candida: epidemiología y factores de riesgo para especies no albicans. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*” [en línea], 2013, 31 (6), [consulta: 17 mayo 2023]. ISSN 0213-005X. DOI 10.1016/J.EIMC.2012.09.011. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-candida-epidemiologia-factores-riesgo-especies-S0213005X12003229>.

EBRAHEEM, R., et al. “In vitro Propagation of *Mentha pulegium* L. and Testing, The Antifungal Activity of Stem Nodes Callus and Shoots Extracts Against *Acremonium strictum* L”. *International Journal of Biotech Trends and Technology (IJBTT)* [en línea], 2020, vol. 10, [consulta: 17 mayo 2023]. ISSN 2249-0183. Disponible en: <http://ijbttjournal.org/2020/volume-10-issue-3/IJBTT-V10I3P603.pdf>.

FERNÁNDEZ, D., et al. “Los antibióticos y su impacto en la sociedad”. *Cienfuegos* [en línea], 2021, 19 (2), pp. 477-491°. [consulta: 17 mayo 2023]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/1800/180068641015/html/>.

FREY, S. *Eneldo: propiedades, beneficios y usos, para qué sirve.* [en línea]. 2022. [consulta: 18 mayo 2023]. Disponible en: <https://ecoinventos.com/eneldo/>.

GALLEGUILLOS, C. Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de nanopartículas de cobre frente a *Enterococcus faecalis* [en línea]. (Trabajo de titulación). (Pregrado). UNIVERSIDAD DE CHILE, Chile. 2016. [consulta: 18 mayo 2023]. Disponible en: <https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/142358/Evaluaci%C3%B3n-de-la-actividad-antibacteriana-in-vitro-de-nanopart%C3%ADculas-de-cobre-frente-a-Enterococcus-faecalis.pdf?sequence=1>.

GARCIA, J. *EVALUACION DE LA SUPLEMENTACION DE 2 NIVELES DE POLEO (MENTHA PULEGIUM) DIETA DE POLLOS DE ENGORDE* [en línea]. Bogotá: UNIVERSIDAD ANTONIO NARIÑO, 2016. [consulta: 17 mayo 2023]. Disponible en: http://repositorio.uan.edu.co/bitstream/123456789/4474/1/2020_JasonDamianGarciaBarrero.pdf

GÓMEZ, F. *Características generales de los hongos e infecciones sistémicas y oportunistas de las micosis tropicales.* [en línea]. 2017. [consulta: 17 mayo 2023]. Disponible en: http://aula.campuspanamericana.com/_Cursos/Curso01417/Temario/Experto_Med_Tropical/M5 T1-Texto.pdf.

HEALTHY CHILDREN. *Información general sobre las enfermedades infecciosas.* [en línea]. 2016. [consulta: 17 mayo 2023]. Disponible en: <https://www.healthychildren.org/Spanish/health-issues/conditions/infections/Paginas/Overview-of-Infectious-Diseases.aspx>.

JAFARI, B., et al. “Antibacterial effects of *Thymus vulgaris*, *Mentha pulegium*, *Crocus sativus* and *Salvia officinalis* on pathogenic bacteria: A brief review study based on gram-positive and gram-negative bacteria”. *Jorjani Biomedicine Journal* [en línea], 2020, vol. 8, [consulta: 17 mayo 2023]. Disponible en: <http://www.jorjanijournal.goums.ac.ir/article-1-763-en.pdf>.

LEÓN, G., et al. “Comparación de dos métodos de extracción del aceite esencial de *Citrus sinensis L*”. *Revista cubana de farmacia*, 2015, vol. 49, n° 4, p. 2-4.

LÓPEZ, Bryan. *Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales aislados en las especies de la familia Lamiaceae y su efecto sinérgico.* 2021. [En línea] (Trabajo de titulación). (Pregrado). Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Químicas, Carrera de Química Farmacéutica. Quito, Ecuador. 2021. pp. 57-61. [Consulta: 13 febrero 2023]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/25088/1/UCE-FCQ-CQF-LOPEZ%20BRYAN.pdf>

LÓPEZ, M. *Determinación de la concentración mínima inhibitoria mediante el método automatizado y su relación con el método de difusión en disco en muestras de urocultivo en el hospital regional docente ambato en el período octubre 2015 – febrero 2016* [en línea]. (Trabajo de titulación). (Pregrado). Universidad Técnica de Ambato, 2016. p.10. [Consulta: 18 mayo 2023]. Disponible en: <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/22436/2/LOPEZ%20ESTRELLA%2c%20M ARIA%20TERESA.pdf>.

MÁRQUEZ, D., et al. “Productos naturales con actividad antimicrobiana parte I. *Vitae*”. 2003, vol. 10, n° 2, p. 63.

MOHADDESE. M., & GHASEM. H. *Antimicrobial activity and chemical composition of Mentha pulegium L. essential oil. Journal of ethnopharmacology*, 2008, vol. 119, n° 2, p. 325-327.

MONTENEGRO, Iván., et al. “Antifungal activity of essential oil and main components from *Mentha pulegium* growing wild on the Chilean central coast”. *Agronomy*, 2020, vol. 10, no 2, p. 254.

MONTOYA, G. “ACEITES ESENCIALES Una Alternativa de Diversificación para el Eje Cafetero”. *UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE MANIZALES FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES* [en línea], 2010, vol. 1, [consulta: 17 mayo 2023]. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/55532/9588280264.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

NEYRA, L., & ARMAS, N. Evaluación in vitro de la actividad fungicida y fungistática del extracto metanólico de la *minthostachys mollis* (muña) sobre cepa de *Candida albicans* ATCC®1023 [en línea]. (Trabajo de titulación). UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS, Lima, Perú. 2018. [consulta: 18 mayo 2023]. Disponible en: https://repositorioacademico.upc.edu.pe/bitstream/handle/10757/625175/Neyra_EL.pdf?sequence=5&isAllowed=y.

OMS. *Resistencia a los antibióticos*. [en línea]. 2020. [consulta: 17 mayo 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>.

ORTEGA, A. *Determinación del efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de tomillo (Thymus vulgaris) y oregano (Origanum vulgare) frente a la bacteria Staphylococcus aureus* [en línea]. (Trabajo de titulación). (Pregrado). Universidad Politécnica Salesiana, 2018. [consulta: 17 mayo 2023]. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16043/1/UPS-CT007779.pdf>.

ORTIZ, Daniela. Comparación in vitro de la actividad antifúngica de los aceites esenciales de citronella (*Cymbopogon nardus*) y eucalipto (*Eucalyptus globulus*) frente al agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*). [En línea] (Trabajo de titulación). (Pregrado).

Universidad Politecnica Salesiana Sede Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Carrera de Agroindustria. Cuenca, Ecuador. 2018. pp. 48-50. [Consulta: 13 febrero 2023]. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16596/1/UPS-CT008049.pdf>

PÁJARO Nerlis., et al. “Potencialidades de una mezcla de aceites esenciales frente a bacterias implicadas en el acnÃ©”. *Revista Cubana de Farmacia*, 2019, vol. 51, n° 4, pp. 2-5

PEINADO, Sonia., et al. Efecto in vitro de doce aceites esenciales sobre el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia sclerotiorum* y la germinación de esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum*. [En línea] (Trabajo de titulación). (Pregrado). Universidad de Almería, Facultad de Ingeniería, Carrera de Ingeniero Agrícola. Almería, España. 2018. pp. 94-96. [Consulta: 13 febrero 2023]. Disponible en: http://repositorio.ual.es/bitstream/handle/10835/7189/TFG_PEINADO%20MALDONADO,%20SONIA.pdf?sequence=1

PIRAS, Alessandra., et al. “Antifungal activity of essential oil from *Mentha spicata L.* and *Mentha pulegium L.* growing wild in Sardinia island (Italy) ”. *Natural product research*, 2021, vol. 35, no 6, p. 3.

QUEVEDO, Marjorie. Caracterización del aceite esencial de eneldo (*Anethum graveolens*), en función de la composición química, capacidad antioxidante y actividad antimicrobiana. [En línea] (Trabajo de titulación). (Pregrado). Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC), Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Carrera de Agroindustria. Latacunga, Ecuador. 2022. p. 34. [Consulta: 13 febrero 2023]. Disponible en: <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/9439/1/PC-002377.pdf>

RUIZ, Verenice., et al. Composición química y actividad antioxidante de aceites esenciales obtenidos de cinco especies de plantas cultivadas en Yucatán. [En línea] (Trabajo de titulación). (Posgrado). Instituto Tecnológico de Mérida, División de Estudios de Posgrados e investigación, Mérida, México. 2017. pp. 71-73. [Consulta: 16 febrero 2023]. Disponible en: <https://rinacional.tecnm.mx/bitstream/TecNM/1774/1/RUIZ-17-COMPOSICI%2B%C3%B4N%20QUIMICA%20Y.pdf>

SILVA, Fernandes., et al. “Essential oils from *Mentha viridis (L.) L.* And *Mentha pulegium L.*: cytogenotoxic effects on human cells”. *American Journal of Plant Sciences*, 2017, vol. 8, n° 6, p. 23.

VERA, O. *IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS CAUSANTES DE INFECCIONES DE PIEL Y TEJIDOS BLANDOS EN PACIENTES DEL ÁREA DE MEDICINA INTERNA DEL HOSPITAL PROVINCIAL GENERAL ISIDRO AYORA.* [en línea]. Loja: Universidad Nacional e Loja, 2013. [consulta: 18 mayo 2023]. Disponible en: <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/4048/1/VERA%20VERA%20OLGA%20MIREYA.pdf>.

VILA, J. *Resistencias Antimicrobianas.* [en línea]. 2018. [consulta: 17 mayo 2023]. Disponible en: <https://www.isglobal.org/antimicrobial-resistance>.

ZAMBRANO, R. *Infecciones de vías urinarias en mujeres, su conducta y factores de riesgo.* [en línea]. 2019. [consulta: 17 mayo 2023]. Disponible en: <https://revistas.itsup.edu.ec/index.php/Higia/article/view/513/761>.

ZERKARIA, D. *Los aceites esenciales una alternativa a los antimicrobianos.* [en línea]. 2010. [consulta: 17 mayo 2023]. Disponible en: https://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/wpsa1182855355a.pdf.



ANEXOS

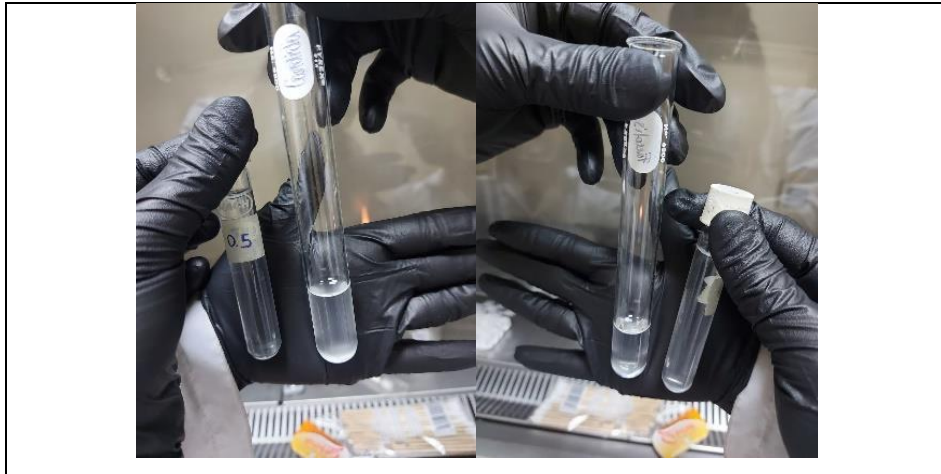
ANEXO A: EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES.



ANEXO B: ANALISIS ANTIMICROBIANO.



ANEXO C: ESCALA Mc FARLAND.



ANEXO D: ACEITES ESENCIALES.



ANEXO E: ANALISIS DEL CMI Y CMB.





esPOCH

Dirección de Bibliotecas y
Recursos del Aprendizaje

UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y
DOCUMENTAL

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 28 / 11 / 2023

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: Cristina Elizabeth Rosero Guarnizo
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Ciencias
Carrera: Bioquímica y Farmacia
Título a optar: Bioquímica Farmacéutica
f. Analista de Biblioteca responsable: Ing. Rafael Inty Salto Hidalgo

1595-DBRA-UPT-2023