



Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ingeniería
Escuela de Ingeniería Química

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE
ORÉGANO (*Lippa graveolens*) Y CANELA (*Cinnamomum zeylanicum Blume*) SOBRE
Aspergillus niger Y *Candida albicans*, PARA LA CONSERVACIÓN DE LA MANZANA
MEDIANTE LA TÉCNICA DE DILUCIÓN Y DIFUSIÓN EN AGAR**

Marleny Alejandra Alvarez Bolaños

Asesorado por la Inga. Mercedes Esther Roquel Chávez

Guatemala, julio de 2023

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*Lippa graveolens*) Y CANELA (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) SOBRE *Aspergillus niger* Y *Candida albicans*, PARA LA CONSERVACIÓN DE LA MANZANA MEDIANTE LA TÉCNICA DE DILUCIÓN Y DIFUSIÓN EN AGAR

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE INGENIERÍA
POR

MARLENY ALEJANDRA ALVAREZ BOLAÑOS
ASESORADO POR LA INGA. MERCEDES ESTHER ROQUEL CHÁVEZ

AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE

INGENIERA QUÍMICA

GUATEMALA, JULIO DE 2023

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE INGENIERÍA



NÓMINA DE JUNTA DIRECTIVA

DECANO A.I.	Ing. José Francisco Gómez Rivera
VOCAL II	Ing. Mario Renato Escobedo Martinez
VOCAL III	Ing. José Milton De León Bran
VOCAL IV	Br. Kevin Vladimir Cruz Lorente
VOCAL V	Br. Fernando José Paz González
SECRETARIO	Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez

TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO

DECANA	Inga. Aurelia Anabela Cordova Estrada
EXAMINADOR	Ing. Jorge Emilio Godínez Lemus
EXAMINADORA	Inga. Adela María Marroquín González
EXAMINADORA	Inga. Dinna Lisette Estrada Moreira
SECRETARIO	Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con los preceptos que establece la ley de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración mi trabajo de graduación titulado:

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*Lippa graveolens*) Y CANELA (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) SOBRE *Aspergillus niger* Y *Candida albicans*, PARA LA CONSERVACIÓN DE LA MANZANA MEDIANTE LA TÉCNICA DE DILUCIÓN Y DIFUSIÓN EN AGAR

Tema que me fuera asignado por la Dirección de la Escuela de Ingeniería Química, con fecha 28 de enero de 2020.



Marleny Alejandra Alvarez Bolaños

Guatemala 25 de enero de 2023

Ingeniero
Williams Guillermo Alvarez Mejía
DIRECTOR
Escuela Ingeniería Química
Presente.

Estimado Ingeniero Alvarez:

Le saludo cordialmente, deseándole éxitos en sus actividades. Por medio de la presente hago constar que he revisado y aprobado el Informe Final en la modalidad seminario de investigación del trabajo de graduación titulado: **“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*Lippa graveolens*) y CANELA (*Cinnamomum zeylanicum Blume*) SOBRE *Aspergillus niger* y *Candida albicans*, PARA LA CONSERVACIÓN DE LA MANZANA MEDIANTE LA TÉCNICA DE DILUCIÓN Y DIFUSIÓN EN AGAR”**, elaborado por la estudiante de la carrera de Ingeniería Química, Marleny Alejandra Alvarez Bolaños, quien se identifica con el registro académico 2015-03574 y con el CUI 2070 24014 01 01.

Agradeciendo la atención a la presente, me suscribo de usted,

Atentamente,



Mercedes Esther Roquel Chávez

ASESORA

Ingeniero Químico

Colegiado activo no. 1451



Guatemala, 09 de mayo de 2023.
Ref. EIQ.TG-IF.012.2023.

Ingeniero
Williams Guillermo Álvarez Mejía
DIRECTOR
Escuela de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería

Estimado Ingeniero Álvarez:

Como consta en el registro de evaluación, correlativo **081-2019**, le informo que reunidos los Miembros de la Terna nombrada por la Escuela de Ingeniería Química, se practicó la revisión del:

INFORME FINAL

Solicitado por el estudiante universitario: **Marleny Alejandra Alvarez Bolaños**.
Identificado con número de carné: **2070240140101**.
Identificado con registro académico: **201503574**.
Previo a optar al título de la carrera: **Ingeniería Química**.
En la modalidad: **TESIS (Informe Final, Seminario de Investigación)**.

Siguiendo los procedimientos de revisión interna de la Escuela de Ingeniería Química, los Miembros de la Terna han procedido a **APROBARLO** con el siguiente título:

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*Lippa graveolens*) Y CANELA (*Cinnamomum zeylanicum Blume*) SOBRE *Aspergillus niger* Y *Candida albicans*, PARA LA CONSERVACIÓN DE LA MANZANA MEDIANTE LA TÉCNICA DE DILUCIÓN Y DIFUSIÓN EN AGAR

El Trabajo de Graduación ha sido asesorado por:

Mercedes Esther Roquel Chávez, profesional de la Ingeniería Química

Habiendo encontrado el referido trabajo de graduación **SATISFACTORIO**, se autoriza al estudiante, proceder con los trámites requeridos de acuerdo a las normas y procedimientos establecidos por la Facultad para su autorización e impresión.

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”


Jorge Emilio Godínez Lemus
profesional de la Ingeniería Química
COORDINADOR DE TERNA
Tribunal de Revisión
Trabajo de Graduación



Ing. Jorge Emilio Godínez Lemus
INGENIERO QUÍMICO
Colegiado 874

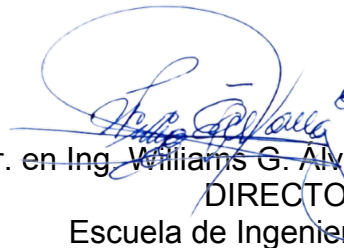
C.c.: archivo



LNG.DIRECTOR.151.EIQ.2023

El Director de la Escuela de Ingeniería Química de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer el dictamen del Asesor, el visto bueno del Coordinador de Área y aprobación del área de lingüística del trabajo de graduación titulado: **DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*Lippa graveolens*) Y CANELA (*Cinnamomum zeylanicum Blume*) SOBRE *Aspergillus niger* Y *Candida albicans*, PARA LA CONSERVACIÓN DE LA MANZANA MEDIANTE LA TÉCNICA DE DILUCIÓN Y DIFUSIÓN EN AGAR**, presentado por: **Marleny Alejandra Alvarez Bolaños**, procedo con el Aval del mismo, ya que cumple con los requisitos normados por la Facultad de Ingeniería.

“Id y Enseñad a Todos”


Mgtr. en Ing. Williams G. Alvarez Mejía: M.U.I.E.,
DIRECTOR
Escuela de Ingeniería Química



Guatemala, julio de 2023.



LNG.DECANATO.OI.548.2023

El Decano de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer la aprobación por parte del Director de la Escuela de Ingeniería Química, al Trabajo de Graduación titulado: **DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*Lippa graveolens*) Y CANELA (*Cinnamomum zeylanicum Blume*) SOBRE *Aspergillus niger* Y *Candida albicans*, PARA LA CONSERVACIÓN DE LA MANZANA MEDIANTE LA TÉCNICA DE DILUCIÓN Y DIFUSIÓN EN AGAR**, presentado por: **Marleny Alejandra Alvarez Bolaños**, después de haber culminado las revisiones previas bajo la responsabilidad de las instancias correspondientes, autoriza la impresión del mismo.

IMPRÍMASE:



Ing. José Francisco Gómez Rivera

Decano a.i.

Guatemala, julio de 2023

AACE/gaoc

ACTO QUE DEDICO A:

- Dios** Por estar presente cada día, darme la fuerza y sabiduría para seguir adelante, por bendecirme con esta carrera universitaria y no dejarme sola.
- Mis padres** Raúl Alvarez y Patricia Bolaños, por ser los pilares de mi vida, guiarme siempre por el camino del bien, estar para mí y darme su amor y apoyo.
- Mi hermana** Gabriela Alvarez, por inspirarme a ser mejor cada día para ser ejemplo en su formación, por ser alegría en mi vida y estar a mi lado.
- Mi amor** Christian Estrada, por ser una de mis mayores inspiraciones en la vida, por ser ese impulso que no me deja caer, darme su amor incondicional y ser mi refugio.
- Mi abuela** Julieta Gil, quien soñaba conmigo llegar a este momento, y por haberme enseñado el valor de amor más puro. (q. e. p. d.).
- Mi mascota** Titi, por ser una perrita increíblemente incondicional, acompañarme en mis desvelos y darle alegría a mi vida, donde quiera que esté.

Mis amigos

Por ser los mejores alentadores, consejeros y confidentes que pude haber conocido.

Mis amigos de carrera

Por apoyarnos siempre y avanzar juntos paso a paso hasta llegar a la meta.

Mis docentes

Por todo su conocimiento y experiencia compartida, formarme profesionalmente y motivarme a ser una excelente profesional.

AGRADECIMIENTOS A:

Dios	Por las bendiciones y oportunidades que me ha dado, guiarme, bendecirme y darme sabiduría a lo largo de la vida.
Mi familia	Por estar siempre para mí, darme su apoyo en todo momento y celebrar mis logros como suyos.
Universidad de San Carlos de Guatemala	Por ser mi alma <i>mater</i> , acogerme y formarme profesionalmente.
Facultad de Ingeniería	Por brindarme excelencia y por todas las experiencias vividas en esta unidad académica.
Mi asesora	Inga. Mercedes Roquel, por su apoyo en esta investigación, compartir su conocimiento en la carrera y en la elaboración de esta investigación.
Mi revisor	Ing. Jorge Godínez, por ser excelente docente y compartir su gran conocimiento en la elaboración de esta investigación.

Licda. Claudia Aldana

Por abrirme las puertas del laboratorio del Hospital el Pilar, para poder realizar la experimentación de esta investigación.

Sra. Vicky Huertas

Por su apoyo en el uso del equipo del laboratorio y compartir su conocimiento y experiencia como técnica.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	V
LISTA DE SÍMBOLOS	VII
GLOSARIO	IX
RESUMEN.....	XIII
OBJETIVOS.....	XV
INTRODUCCIÓN	XVII
1. ANTECEDENTES	1
2. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1. Microorganismos predominantes en las frutas y vegetales	5
2.1.1. Hongos	5
2.1.1.1. Levaduras.....	6
2.1.1.2. Mohos.....	6
2.2. Mohos elegidos para el análisis de actividad antimicrobiana en este estudio.....	6
2.2.1. <i>Aspergillus niger</i>	6
2.2.1.1. Características macroscópicas de <i>Aspergillus niger</i>	7
2.2.1.2. Características microscópicas de <i>Aspergillus niger</i>	7
2.2.2. <i>Candida albicans</i>	8
2.2.2.1. Características macroscópicas de <i>Candida albicans</i>	9

	2.2.2.2.	Características microscópicas de <i>Candida albicans</i>	9
2.3.		Principio de conservación de alimentos	10
2.4.		Conservadores antimicrobianos.....	10
2.5.		Medios de cultivo	10
	2.5.1.	Propiedades de los medios de cultivo que influyen en el crecimiento de los microorganismos.....	11
		2.5.1.1. Humedad.....	11
		2.5.1.2. pH.....	11
		2.5.1.3. Transparencia	11
	2.5.2.	Agar Dextrosa	12
2.6.		Métodos para la determinación de la actividad antimicrobiana	12
	2.6.1.	Contacto directo	12
		2.6.1.1. Dilución en agar	12
		2.6.1.2. Difusión en agar	13
2.7.		Aceites esenciales.....	14
	2.7.1.	Origen botánico del aceite esencial.....	15
	2.7.2.	Orégano	15
		2.7.2.1. Composición química	16
		2.7.2.1.1. Timol	17
		2.7.2.1.2. Carvacrol.....	17
	2.7.3.	Canela.....	18
		2.7.3.1. Composición química	18
		2.7.3.1.1. Eugenol.....	20
		2.7.3.1.2. Cinamaldehído	20
2.8.		Aceites esenciales como agentes microbianos.....	21
	2.8.1.	Modo de acción de los aceites esenciales	22

2.8.1.1.	Trifosfato de adenosina (ATD).....	22
2.9.	Extracción de aceites esenciales.....	22
2.10.	Cromatografía.....	23
2.10.1.	Cromatografía de gases	23
3.	METODOLOGÍA.....	25
3.1.	Localización.....	25
3.2.	Variables.....	25
3.2.1.	Variables independientes	25
3.2.2.	Variables dependientes	25
3.3.	Delimitación del campo de estudio	25
3.4.	Diseño experimental	26
3.5.	Recursos humanos.....	27
3.6.	Recursos materiales disponibles	28
3.6.1.	Equipo	28
3.6.2.	Cristalería.....	28
3.6.3.	Reactivos.....	28
3.6.4.	Materiales auxiliares	29
3.7.	Técnica cuantitativa y cualitativa	29
3.8.	Procedimiento para la determinación de la actividad antimicrobiana.....	30
3.8.1.	Desarrollo del microorganismo madre para los microorganismos <i>Aspergillus niger</i> y <i>Candida albicans</i>	30
3.8.2.	Preparación del medio de cultivo para la inoculación de los microorganismos.....	31
3.8.3.	Preparación de inóculos para la técnica de dilución en agar	32

3.8.4.	Preparación de inóculos para la técnica de difusión en agar.....	34
3.8.5.	Incubación de los microorganismos	36
3.8.6.	Determinación de la actividad antimicrobiana	36
3.9.	Diseño de tratamientos	37
4.	RESULTADOS.....	41
5.	INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	47
	CONCLUSIONES.....	51
	RECOMENDACIONES	53
	REFERENCIAS	55
	APÉNDICES.....	59
	ANEXOS.....	71

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURAS

Figura 1.	Ilustración digital de <i>Aspergillus niger</i>	8
Figura 2.	Ilustración digital de <i>Candida Albicans</i>	9
Figura 3.	Difusión en agar	14
Figura 4.	Planta de orégano	18
Figura 5.	Planta de canela.....	21
Figura 6.	Cromatograma típico en columna capilar	24
Figura 7.	Diagrama de diseño experimental.....	27
Figura 8.	Diagrama de flujo de la generación de los microorganismos	31
Figura 9.	Diagrama de flujo de la preparación de inóculos con dilución en agar	33
Figura 10.	Diagrama de flujo de la preparación de inóculos con difusión en agar	35
Figura 11.	Diagrama de flujo de la determinación de la actividad antimicrobiana	37
Figura 12.	Clasificación de los tratamientos	39
Figura 13.	Actividad inhibitoria de los aceites sobre <i>Aspergillus niger</i> con difusión y dilución	42
Figura 14.	Actividad inhibitoria de aceites sobre <i>Candida albicans</i> con difusión y dilución	43
Figura 15.	Análisis de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de canela.....	44
Figura 16.	Análisis de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano	45

TABLAS

Tabla 1.	Concentración mínima inhibitoria	41
Tabla 2.	Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial.....	41
Tabla 3.	Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de orégano.....	41
Tabla 4.	Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de canela	42
Tabla 5.	Aceite esencial más efectivo para cada microorganismo.....	43
Tabla 6.	Método más efectivo para cada microorganismo.....	44
Tabla 7.	Combinación más efectiva de método y microorganismo	45

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Significado
A_c	Aceite esencial de canela
A_o	Aceite esencial de orégano
A_I	Área de inhibición (mm ²)
P	Coefficiente de correlación
C_d	Concentración de aceite diluido (mol/ml)
$C_{A,c}$	Concentración de aceite esencial de canela (M)
$C_{A,o}$	Concentración de aceite esencial de orégano (M)
$C_{A,i}$	Concentración del aceite esencial i (M)
C_c	Concentración de aceite puro (mol/ml)
CMI	Concentración mínima inhibitoria
$CMI_{A,c}$	Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de canela.
$CMI_{A,o}$	Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de orégano.
$\rho_{A,c}$	Densidad del aceite esencial de canela
$\rho_{A,o}$	Densidad del aceite esencial de orégano
s	Desviación estándar
D_C	Diámetro de control (mm)
D_T	Diámetro de tratamiento (mm)
F	Factor de Fisher
g	Gramo
$m_{A,i}$	Masa de aceite esencial (g)

$m_{A,c}$	Masa de aceite esencial de canela (g)
$m_{A,o}$	Masa de aceite esencial de orégano (g)
m_{AD}	Masa de agar Dextrosa (g)
m_{As}	Masa de <i>Aspergillus niger</i> (g)
m_{Ca}	Masa de <i>Candida albicans</i> (g)
m_m	Masa del microorganismo (g)
\bar{x}	Media
<i>As</i>	Microorganismo <i>Aspergillus niger</i>
<i>Ca</i>	Microorganismo <i>Candida albicans</i>
<i>ml</i>	Mililitro
<i>n</i>	Mol
N_o	Número
$\%_I$	Porcentaje de inhibición (%)
$\%_{I,As}$	Porcentaje de inhibición en <i>Aspergillus niger</i> (%)
$\%_{I,Ca}$	Porcentaje de inhibición en <i>Candida albicans</i> (%)
T_I	Temperatura de incubación (°C)
t_I	Tiempo de incubación (h)
$V_{d,A,c}$	Volumen de aceite esencial de canela diluido (ml)
$V_{d,A,o}$	Volumen de aceite esencial de orégano diluido (ml)
$V_{c,A,c}$	Volumen de aceite esencial de canela puro (ml)
$V_{c,A,o}$	Volumen de aceite esencial de orégano puro (ml)
V_d	Volumen de aceite esencial diluido (ml)
V_c	Volumen de aceite esencial puro (ml)

GLOSARIO

Aceite esencial	Líquido semi volátil obtenido de material vegetal como plantas, hojas, flores, entre otras.
Actividad antimicrobiana	Medida en porcentaje para determinar la cantidad que puede inhibir un conservador alimenticio ante un microorganismo.
Agar Dextrosa Sabouraud	Medio de cultivo utilizado específicamente para el análisis de los microorganismos elegidos en este estudio.
Aspergillus niger	Hongo de crecimiento rápido que se desarrolla con más frecuencia en medios ácidos como las frutas cítricas.
Candida albicans	Hongo capaz de formar hifas que se manifiestan por la aparición de agentes germinales.
Cepas	Población de microorganismos de la misma especie que se desarrolla a partir de una única célula.
Composición química	Características químicas de los aceites esenciales a las cuales se les atribuye la acción antimicrobiana.

Concentración mínima inhibitoria	Concentración mínima a la cual un inhibidor logra detener el crecimiento de microorganismos.
Conservación de los alimentos	Proceso al cual se someten los alimentos para prolongar su vida útil y prevalecer sus características de calidad, valor nutricional, olor y sabor.
Conservadores antimicrobianos	Aditivos que se agregan a los alimentos con el fin de prolongar su vida útil.
Difusión en agar	Método donde se mide la susceptibilidad de un microorganismo ante la difusión de un inhibidor en un medio de cultivo.
Dilución en agar	Método para determinar actividad antimicrobiana por medio de la dilución de un inhibidor en un medio de cultivo con el microorganismo a analizar.
Hongo	Microorganismo caracterizado por su crecimiento acelerado en condiciones de humedad.
Inoculación	Proceso en el un microorganismo es colocado sobre un medio de cultivo para su análisis y estudio.
Medio de cultivo	Soluciones donde se encuentran condiciones óptimas de nutrientes orgánicos e inorgánicos para el desarrollo y crecimiento de microorganismos.

Micelio	Parte de la morfología del hongo, se caracteriza por ser delgado.
Microorganismos	Ser biológico que se desarrolla por condiciones óptimas en los alimentos, degradándolos y acortando su vida útil.
Tiempo de incubación	Período de tiempo donde se mantienen condiciones de temperatura y humedad para el crecimiento de cultivos microbiológicos.

RESUMEN

Se determinó la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de orégano y canela, sobre los hongos *Aspergillus niger* y *Candida albicans*, utilizando la técnica de dilución y difusión en agar.

Se obtuvo principalmente dos gráficas, una para cada microorganismo, cada una obtiene cuatro curvas, estas son; aceite esencial de canela con la técnica de difusión en agar, aceite esencial de canela con la técnica de dilución en agar, aceite esencial de orégano con técnica de difusión en agar y aceite esencial de orégano con técnica de dilución en agar; cada curva representa el porcentaje de inhibición respecto a la concentración de aceite esencial.

Para *Aspergillus niger*, se obtuvo una concentración mínima inhibitoria de 0.7 M y 0.5 M con el método de dilución y difusión en agar respectivamente, utilizando aceite esencial de orégano; y una CMI de 0.5 M en los métodos de dilución y difusión en agar con aceite esencial de canela. Se determinó que el mejor aceite inhibidor para el microorganismo es el aceite esencial de canela por presentar mayor porcentaje de inhibición siendo 56.38 %. Para ambas técnicas al estudiar *A. niger* se trabajó a un rango de temperatura de 22 – 24 °C.

La CMI para *Candida albicans* fue de 0.9 M y 0.7 M mediante el método de dilución y difusión en agar respectivamente con aceite esencial de orégano y una CMI de 0.5 M y 0.7 M con el método de dilución y difusión en agar respectivamente, con aceite esencial de canela, determinado así el aceite esencial de orégano como mejor inhibidor por presentar 72.01 % de inhibición. El rango de temperatura de incubación para *C. albicans* fue 23-25 °C.

OBJETIVOS

General

Determinar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano (*Lippa graveolens*) y canela (*Cinnamomum zeylanicum Blume*), sobre *Aspergillus niger* y *Candida albicans* para la conservación de la manzana mediante la técnica de dilución y difusión en agar.

Específicos

1. Definir la concentración mínima inhibitoria CMI frente a *Aspergillus niger* para el aceite esencial de orégano mediante dilución en agar.
2. Establecer la concentración mínima inhibitoria CMI frente a *Aspergillus niger* para el aceite esencial de canela mediante dilución en agar.
3. Analizar la concentración mínima inhibitoria CMI frente a *Candida albicans* para el aceite esencial de orégano mediante dilución en agar.
4. Especificar la concentración mínima inhibitoria CMI frente a *Candida albicans* para el aceite esencial de canela mediante dilución en agar.
5. Describir la concentración mínima inhibitoria CMI frente a *Aspergillus niger* para el aceite esencial de orégano mediante difusión en agar.

6. Obtener la concentración mínima inhibitoria CMI frente a *Aspergillus niger* para el aceite esencial de canela mediante difusión en agar.
7. Delimitar la concentración mínima inhibitoria CMI frente a *Candida albicans* para el aceite esencial de orégano mediante difusión en agar.
8. Concretar la concentración mínima inhibitoria CMI frente a *Candida albicans* para el aceite esencial de canela mediante difusión en agar.

INTRODUCCIÓN

La existencia de los microorganismos en la naturaleza de manera que afecte negativamente se puede observar en la mayoría de las ocasiones en los alimentos, estos poseen condiciones óptimas para el desarrollo y crecimiento de los organismos según sea el tipo.

Los hongos filamentosos presentan el crecimiento más típico de los hongos microscópicos. En los alimentos y en los medios de cultivo producen colonias algodonosas o pulverulentas, características a nivel microscópico presentan estructuras tubulares formadas por hifas, estas se desarrollan a partir de esporas y crecen depositando materiales en sus extremos y ramificándose con mucha frecuencia hasta generar una maraña de filamentos que constituyen el micelio.

Es por eso por lo que, en la industria alimenticia el control microbiológico para la conservación de los alimentos es de suma importancia, ya que el objetivo es preservar los productos finales, utilizando para ello conservadores antimicrobianos.

Los conservadores antimicrobianos son aditivos alimenticios que se agregan a los mismos para prolongar su vida útil. Estos conservadores pueden inhibir a los microorganismos por dañar su membrana celular, o por obstaculizar la actividad de sus enzimas o sus mecanismos genéticos. Comúnmente se han utilizado conservantes antimicrobianos químicos.

Considerando la gran variedad de compuestos químicos presentes en los aceites esenciales, se han destinado estos para la inhibición de los microorganismos, su actividad antimicrobiana se atribuye a la acción combinada de varios de sus compuestos fenólicos, estos pueden inactivar enzimas, reaccionar con la membrana celular del microorganismo o alterar la función de su material genético.

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales y su efectividad contra microorganismos se ha investigado recientemente; sin embargo, aún son escasos los estudios de su comportamiento antimicrobiano contra microorganismos evaluado.

Por medio de este trabajo se busca evaluar la actividad antimicrobiana de dos aceites esenciales contra microorganismos específicos por contacto directo del aceite esencial y el microorganismo mediante las técnicas de dilución y difusión con agar dextrosa.

1. ANTECEDENTES

En el estudio *Actividad antibacteriana de los extractos supercríticos del ajo (Allium sativum L), chichipin (Hamelia patens Jacq), orégano (Lippia graveolens Kunth) y té de limón (Cymbopogon citratus (DC) Stapf) sobre el crecimiento in vitro de Staphylococcus aureus, Helicobacter pylori, Escherechia coli y Pseudomonas aureginosa*, se determinó que el extracto supercrítico de orégano (*Lippia graveolens*) presenta actividad antibacteriana sobre el crecimiento bacteriano in vitro de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, mostrando un halo inhibitorio de 12 mm para un porcentaje de efecto inhibitorio de 70.59 % sobre *Escherechia coli* ATCC 25922, muestra un halo inhibitorio de 10 mm para un porcentaje de efecto inhibitorio de 27.28 % sobre *Helicobacter pylori* aislada clínica, muestra un halo inhibitorio de 8 mm, para un porcentaje de efecto inhibitorio estimado de 44.44 % y no representa actividad antibacteriana sobre el crecimiento in vitro de *Pseudomonas aureginosa* ATXX 27853 (Robles, 2014).

En el artículo científico *Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales*, se realiza una revisión bibliográfica sobre los métodos para determinar la actividad antimicrobiana en fase vapor y por contacto directo, así como métodos para la determinación cualitativa y cuantitativa de los componentes químicos de los aceites esenciales, la técnica más empleada para este proceso es la cromatografía de gases, llegando a la conclusión de que la técnica más apropiada dependerá de las características del aceite y del microorganismo (Jurado, Palou y López, 2014).

La publicación del artículo científico *Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas*, relata los aspectos, características, ventajas, desventajas, entre otras propiedades de los agentes antimicrobianos naturales como los aceites esenciales en la prolongación de la vida útil de las frutas y hortalizas, concluyendo que la calidad de los alimentos tratados dependerá de la concentración de los inhibidores utilizados (Rodríguez, 2011).

En estudio *Determinación del efecto inhibitorio del aceite esencial y diferentes extractos de orégano (Lippia berlandieri schauzer) sobre el crecimiento de Fusarium oxysporum tanro IN VITRO como en plántula de tomate*, se determinó que los rendimientos obtenidos del aceite esencial y el extracto de orégano fueron similares con un 4 % aprox., y se obtuvo una concentración mínima inhibitoria de 0.2µl.ml⁻¹ (Cueto, 2010).

Evaluación del rendimiento de extracción del aceite esencial crudo de orégano (LIPPIA GRAVEOLENS) proveniente de dos zonas de distinta altitud, por medio del método de arrastre de vapor, en este estudio se concluyó que no hay diferencia entre las propiedades físicas del aceite esencial de orégano proveniente de varias zonas del país (Quezada, 2008).

El artículo científico *Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales*, se determinó el estudio *In vitro* del aromagrama de 85 aceites esenciales en los microorganismos *Escherichia coli* CETC 515, *Staphylococcus aureus* CECT 239, *Candida albicans* ATCC 26555, donde se determinó que de los 85 aceites esenciales, treinta y nueve presentaron baja o nula actividad microbiana frente a los microorganismos, mientras que el resto alcanzó inhibición antimicrobiana por encima del 50 % (Pitarch, 2000).

En el estudio realizado en la Universidad San Carlos de Guatemala en la facultad de ciencias químicas y farmacia denominado *Actividad antimicrobiana de cinco plantas de la familia compositae nativas de Guatemala*, se analiza el extracto de estas especies provenientes de lugares diferentes para determinar la actividad antimicrobiana de los extractos *Pluchea odorata* contra el hongo *C. albicans* (Rico, 1997).

En el estudio *Efecto inhibitorio de la infusión de orégano (Lippia graveoloens) sobre el crecimiento de microorganismos cariogénicos Lactobacillus acidophilus y Streptococcus mutans In Vitro*, se concluyó que la infusión de orégano fue de 30-50 % sobre el crecimiento de *S. mutans* y *L. acidophilus* (Corleto, 1995).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Microorganismos predominantes en las frutas y vegetales

Algunas plantas producen metabolitos antimicrobianos naturales que pueden limitar la presencia de microorganismos. Las frutas y vegetales albergan microorganismos en la superficie; su tipo y nivel varía de acuerdo con la condición del suelo, el tipo de fertilizantes y el agua usada, y la calidad del aire. (Ray y Bhunia, 2010, p. 41)

Dependiendo de las características que el alimento posee, es el microorganismo que encuentra las condiciones óptimas para su crecimiento y su reproducción. Los alimentos con pH bajos no son alterados por bacterias, ya que, los mohos y levaduras toleran mejor la acidez.

2.1.1. Hongos

Son microorganismos unicelulares o pluricelulares que forman un cuerpo filamentosos muy ramificado, mejor conocido como micelio. Estos pueden tener diversas formas, redonda, ovalada o en forma de fibra, pueden formar una red visible a simple vista. Crecen en lugares húmedos, con abundante materia orgánica en descomposición y ausencia de luz solar. Los hongos se clasifican en levaduras y mohos.

2.1.1.1. Levaduras

Hongos unicelulares que a diferencia de los mohos no desarrollan micelio, y por ellos son llamados hongos imperfectos, la mayoría de las levaduras son beneficiosas y se utilizan en la elaboración de diversos alimentos, sin embargo, también existen levaduras perjudiciales.

2.1.1.2. Mohos

Se caracterizan por formar un tramo filamentoso muy esponjoso conocido como micelio, considerados de crecimiento rápido ya que es posible que puedan crecer desde un pequeño pedazo de micelio. Su aspecto al crecer sobre una superficie suele ser la principal característica para identificar qué tipo de moho es. Entre sus propiedades fisiológicas necesitan cantidades pequeñas de humedad para crecer y son capaces de crecer a temperaturas atmosféricas.

2.2. Mohos elegidos para el análisis de actividad antimicrobiana en este estudio

Se determinó el microorganismo a utilizar en base a estudios antecedentes, localidad y mejor combinación con medios de cultivo y aceites esenciales, siendo los mohos elegidos, *Aspergillus niger* y *Candida albicans*.

2.2.1. Aspergillus niger

Las especies de *Aspergillus* están consideradas como el segundo agente más frecuente de enfermedades fúngicas oportunistas. El hongo crece rápidamente en muchos medios. Tiene abundante micelio aéreo que se va haciendo pulverulento y pigmentado a medida que se van produciendo conidios.

Caracterizado por el color negro de las estructuras donde se encuentran las esporas, esta especie se usa industrialmente para la producción de ácido cítrico, ácido glucónico y algunas enzimas. Algunas de sus especies crecen a temperaturas superiores a los 37 °C.

2.2.1.1. Características macroscópicas de *Aspergillus niger*

Cuando el micelio es joven se le puede ver de un color blanco amarillento, conforme se desarrolla y alcanza su etapa adulta adquiere un tono más oscuro y finalmente adquiere diversos colores hasta pardo oscuro, una característica de esta especie es que sus estructuras crecen en el talo.

2.2.1.2. Características microscópicas de *Aspergillus niger*

Sus cabezas esporales suelen ser de forma esférica y se encuentran muy pegadas unas con otras, de color negro, negro pardo o pardo morado; tienen conidios con formas globosa, rugosos. Algunas cepas contienen esclerocios entre los colores gris y negro.

Figura 1.

Ilustración digital de Aspergillus niger



Nota. Shutterstock. Obtenido de K. Kon (2018). *Digital illustration of fungi Aspergillus niger, black mold, which produce aflatoxins, cause pulmonary infection aspergillosis.* [Ilustración digital de hongo Aspergillus niger, moho negro, que producen aflatoxinas, causan infección pulmonar aspergilosis] [Fotografía]. (<https://www.shutterstock.com/image-illustration/digital-illustration-fungi-aspergillus-niger-black-308094836>). Derechos de autor 2018 por Shutterstock.

2.2.2. Candida albicans

Esta especie se desarrolla de diferentes maneras dependiendo de las condiciones de temperatura. Puede considerarse una levadura y un hongo filamentoso. Se reproduce de forma asexual. Produce hifas con abundantes células, algunas crecen en película y alteran los alimentos que tienen mayor acidez, oxidan los ácidos orgánicos y permiten que otros microorganismos que toleran menos la acidez los sigan alterando.

2.2.2.1. Características macroscópicas de *Candida albicans*

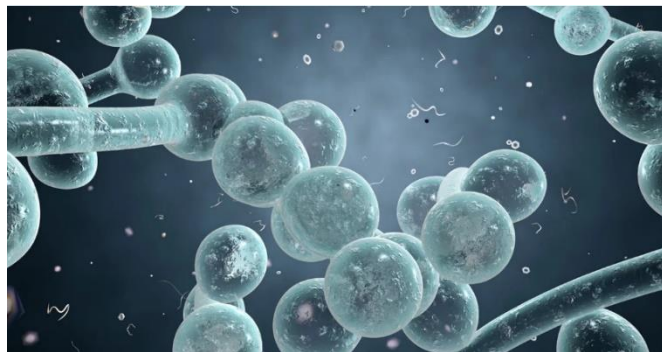
En medio de cultivo agar se observan colonias blandas y esponjosas claras, en un periodo de hasta 48 horas producen abundantes colonias de color crema y opaco, sin orillas de distinto color con aproximadamente de 1 a 2 mm de diámetro.

2.2.2.2. Características microscópicas de *Candida albicans*

Sus células son alargadas en forma de filamentos, con cabezas agrupadas en pequeños grupos; según evidencia estudiada sobre *Candida albicans* su estructura es en forma de hilos que se forman perpendiculares a ellos, su coloración en tonos variables claros.

Figura 2.

Ilustración digital de Candida Albicans



Nota. Imagen digital microscópica de *Candida albicans*. Obtenido de The Candida Diet (2019). *What is Candida albicans?* [¿Qué es Candida albicans?] (<https://www.thecandidadiet.com/what-is-candida-albicans/>), consultado en octubre de 2019. De dominio público.

2.3. Principio de conservación de alimentos

La preservación de alimentos es el proceso al cual se someten los alimentos para alargar su periodo de vida útil, prevaleciendo sus características de calidad, color, textura olor, valor nutricional y sabor.

La conservación de alimentos puede ser en periodos cortos, que son dados por métodos de cocción o enfriamiento, así como periodos prolongados que son los procesos industriales con un estricto control como por ejemplo la congelación y la deshidratación.

2.4. Conservadores antimicrobianos

Son aditivos alimenticios que se añaden a los alimentos para prolongar su vida útil. Según Frazier y Westhoff (1993) “Los conservadores pueden inhibir a los microorganismos por dañar su membrana celular, o por obstaculizar la actividad de sus enzimas o sus mecanismos genéticos” (p. 191).

Los conservadores que se utilizan en los alimentos, no deben ser tóxicos para el consumo humano, no debe influir en las características organolépticas del alimento original, ni ser alterado por alguna otra sustancia que exista en él.

2.5. Medios de cultivo

Las células de los microorganismos requieren una variedad de nutrientes orgánicos e inorgánicos para su desarrollo y crecimiento, los medios de cultivo son soluciones o gel en los que están presentes las sustancias óptimas para el crecimiento de los microorganismos.

2.5.1. Propiedades de los medios de cultivo que influyen en el crecimiento de los microorganismos

Para que los microorganismos crezcan a un tiempo y velocidad óptimos, se necesita que el medio de cultivo contenga características específicas para evitar contaminación de otros agentes, garantizar validación y proporcionar suficiente material para el análisis. Siendo los más importantes la humedad, el pH y transparencia.

2.5.1.1. Humedad

Es indispensable para el crecimiento del microorganismo ya que si no existe humedad se puede llevar a la muerte de este, los microorganismos, necesitan agua dependiendo de su morfología, en el caso de los mohos, necesitan poca cantidad de humedad.

2.5.1.2. pH

Cada microorganismo tiene su pH mínimo óptimo y máximo de crecimiento, por eso en base al tipo de alimento es el microorganismo que crece, los alimentos carecen de un mecanismo que regule su pH interno. Se refiere a los pH óptimos para el desarrollo de los microorganismos, es indispensable para su aislamiento en variaciones ácidas o alcalinas.

2.5.1.3. Transparencia

Permite la observación en este caso fúngica y evidencia la morfología y crecimiento del microorganismo en medios de cultivo adecuado. En este estudio

se utiliza Agar Dextrosa Sabouraud, el cual posee una apariencia clara amarillenta que permite identificar la estructura de los mohos.

2.5.2. Agar Dextrosa

Este medio de cultivo que tiene un pH ácido de 5.6 aproximadamente es destinado para crecimiento y conservación de hongos, por sus propiedades de pH y humedad que favorece el crecimiento de los mismos.

2.6. Métodos para la determinación de la actividad antimicrobiana

A continuación, se describe la metodología más utilizada en la determinación de actividad antimicrobiana sobre agentes bacteriológicos y fúngicos, por su contacto directo con el agente inhibidor, garantiza una mayor efectividad sobre los mismos.

2.6.1. Contacto directo

Los métodos de contacto directo son efectivos para la determinación de actividad antimicrobiana de los agentes inhibidores, porque se aplican de manera líquida y directa sobre el alimento o el medio de cultivo, a continuación, se describen los más utilizados.

2.6.1.1. Dilución en agar

El método de dilución en agar consiste en preparar distintas soluciones de los aceites esenciales que se estudiarán, para luego agregarlas al mismo tiempo que el medio de cultivo de agar líquido en las cajas petri, y en conjunto solidificarse y dar paso a la inoculación del microorganismo. Su amplio campo

de análisis permite evaluar microorganismos aeróbicos con una velocidad de crecimiento que es variable. Finalmente, los microorganismos a analizar son previamente inoculados para posteriormente incubarlos a su temperatura y tiempo adecuados.

Con este método se puede evaluar varios microorganismos al mismo tiempo, debido a la facilidad de detectar la contaminación, por su transparencia.

2.6.1.2. Difusión en agar

Para este método existen dos formas en las que se puede realizar.

- En la primera forma, se inocula el microorganismo en el agar ya solidificado, y para colocarle la solución de aceite esencial se coloca un papel filtro que impregna el aceite esencial en la superficie del agar con el microorganismo.
- En la segunda forma, se utiliza un perforador estéril, para perforar el medio de cultivo y verter la solución del aceite esencial a las diferentes concentraciones de trabajo.

Después de que se realiza la difusión en el agar y las cajas petri están inoculadas con el microorganismo, se introducen a una incubadora con ajustes de temperatura adecuada según el hongo y se deja incubar por un rango de tiempo óptimo, para los hongos de esta investigación se dejó por un rango de tiempo de 5-7 días. El aceite esencial se difunde en el agar y comienza su mecanismo de acción para inhibir el crecimiento fúngico creando zonas inhibitorias.

Los resultados de este método se obtienen determinando el diámetro de inhibición. Este método tiene algunas restricciones en cuanto al tipo de aceite esencial debido a su volatilidad.

Según Piddock (1990) “La concentración del agente en los discos, cuando el diámetro de la zona es de 30-35mm suele ser indicativo de susceptibilidad, y uno de 15-20mm o menos (dependiendo del agente) indica resistencia” (p. 309).

Figura 3.

Difusión en agar



Nota. Método de difusión en agar, también conocido como método Kirby-Bauer. Obtenido de National Oceanic and Atmospheric Administration (2008). *KB test* [Prueba de Kirby Bauer] (<https://oceanexplorer.noaa.gov/explorations/04etta/background/antimicrobial/media/antimicrobial2.html>), consultado el 5 de enero de 2023. De dominio público.

2.7. Aceites esenciales

A diferencia de un compuesto químico puro, los aceites esenciales son obtenidos de material vegetal que están conformados por diferentes

compuestos en una proporción y composición variable, la mayoría de estos compuestos son volátiles y líquidos, presentan poder rotatorio e índice de refracción elevado.

En la industria mayormente los aceites esenciales se han estudiado desde el punto de vista aromático y como saborizantes. Sin embargo, se ha descubierto un campo nuevo en la aplicación de estos, debido a sus componentes químicos son potencialmente funcionales para utilizarlos como agentes antimicrobianos.

2.7.1. Origen botánico del aceite esencial

Describe la especie botánica de la cual proviene cada planta vegetal, y dependiendo de su variedad se le atribuyen los agentes responsables de los mecanismos de acción contra el crecimiento de los microorganismos.

2.7.2. Orégano

Este estudio se enfoca en la especie *Lippa graveolens*, la cual es una planta aromática de origen vegetal que está conformada por características fenólicas, morfológicas y fitoquímicas, los principales compuestos químicos son:

- Terpenos
 - Timol
 - Carvacrol

Los cuales han presentado gran actividad antimicrobiana en estudios.

2.7.2.1. Composición química

- Flavonoides
 - Apigenina
 - Luteolina
 - Agliconas
 - Alcoholes Alifáticos
 - Compuestos Terpenos
 - Narnigenina
 - Pinocebrina
 - Lapachenol

- Aceite esencial de especie *Lippia*
 - Limoneno
 - Alfa-Pineno
 - Beta-Cariofileno
 - P-Cimeno
 - Canfor
 - Linalol
 - Alfa-Pineno
 - Carvacrol
 - Timol

- Extractos metanólicos (hojas)
 - Iridoides
 - Ácido logánico

- Loganina
- Secologanina
- Dimetil secologanosido

2.7.2.1.1. Timol

Uno de los compuestos que se encuentra en mayor proporción en el aceite esencial de orégano, al que se le atribuye la actividad antimicrobiana contra los microorganismos, por su grupo hidroxilo que forma un puente de hidrógeno con la enzima, que en este caso son las enzimas de los compuestos fúngicos.

2.7.2.1.2. Carvacrol

Estudios se ha demostrado que este compuesto ha presentado actividad antimicrobiana efectiva contra bacterias y fúngicos, demostrando la inactivación de microorganismos en biopelículas sobre superficies de acero inoxidable.

Figura 4.

Planta de orégano



Nota. Ilustración de planta de orégano con hoja y flor. Obtenido de R. Aguilar (2014). *Flowering stem* [Tallo floreciente] (<https://tropical.theferns.info/image.php?id=Lippia+graveolens>), consultado en octubre de 2019. De dominio público.

2.7.3. Canela

Sus hojas son de color verde amarillo brillantes y con flores de blancas a amarillas con intensa fragancia. Los aceites esenciales de la especie *Cinnamomun zeylanicum Blume* contienen fenoles como el eugenol y aldehídos como el cinamaldehído como sus principales compuestos químicos y son a los que se les atribuye la actividad antimicrobiana.

2.7.3.1. Composición química

- Ácidos

- Ascórbico
- Palmítico p-cumérico
- Terpenos
 - Alfa-pineno
 - Alfa-terpineno
 - Alfa-ylangeno
 - Beta-pineno camfeo
 - Cariofileno
 - Limoneno
 - Linalol
- Compuestos fenólicos tienen amplia propiedad fisiológica
 - Antialérgica
 - Antiinflamatoria
 - Antimicrobiana
 - Antioxidante
 - Cardioprotectora
- Aceite esencial de especie *Cinnamomum*
 - Cinamaldehído
 - Eugenol
 - Farnesol
 - Gammaterpineol
 - Geraniol
 - Isoeugeneol

- Cariofileno
- 3-fenilpropenal (aldehído cinámico) corteza

2.7.3.1.1. Eugenol

Es un derivado fenólico líquido, color amarillo, se encuentra en un porcentaje del 4 al 10 %, se le atribuye la actividad antimicrobiana a nivel de la membrana celular del compuesto fúngico teniendo una fuga de iones y la pérdida de contenido celular y proteínas de este, provocando su destrucción.

2.7.3.1.2. Cinamaldehído

Se encuentra en un 60-75 % en esta especie, es el compuesto orgánico que le da olor y sabor a la canela, está compuesto por un aldehído unido a un grupo fenilo, es polar y en su mecanismo de acción hace que las células de los microorganismos pierdan integridad en su material celular y rompan la membrana provocando así la muerte de este.

Figura 5.

Planta de canela



Nota. Planta de canela *Cinnamomum zeylanicum* o *Cinnamomum verum*. Obtenido de F. Köhler (2007). Una rama de canelo (*Cinnamomum verum*) en floración. (1) flor; (2) flor en sección longitudinal; (3) estambres estériles; (4, 5) estambre fértil; (6) polen; (7) carpelo; (8, 9, 10) fruto y semilla. (https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/24/Cinnamomum_verum_-_K%C3%B6hler%E2%80%93s_Medizinal-Pflanzen-182.jpg), consultado el 5 enero de 2023. De dominio público.

2.8. Aceites esenciales como agentes microbianos

En la actualidad, hay diversos estudios que han demostrado la efectividad de los aceites esenciales para inhibir el crecimiento de bacterias y hongos. Debido a los principales activos químicos descrito con anterioridad. En esta sección se analiza su mecanismo de acción.

2.8.1. Modo de acción de los aceites esenciales

El modo de acción de estos compuestos fenólicos ha sido estudiado y aun no se ha determinado con exactitud, puesto que pueden inactivar enzimas esenciales para el crecimiento de los microorganismos, reaccionar con la membrana celular o alterar la función del material genético y se ha observado que las grasas, proteínas y temperatura afecta la actividad antimicrobiana de estos compuestos. Los componentes activos de los aceites esenciales varían según su composición.

2.8.1.1. Trifosfato de adenosina (ATD)

Es una molécula vital para el metabolismo de cualquier estilo de vida, para fines de este estudio se enfoca en el tipo de vida microbiológica (bacterias, mohos, levaduras). Por lo tanto, se define como la encargada de brindar la energía que los microorganismos necesitan para vivir y reproducirse en cualquier medio.

2.9. Extracción de aceites esenciales

La extracción de los aceites esenciales de materiales vegetales tiene distintas formas de realizarse, puede ser por hidrodestilación, destilación por arrastre de vapor, destilación previa maceración o destilación con agua y vapor (también llamada cohobación). Se escoge en base al tipo y calidad del aceite esencial que se quiere extraer.

Comúnmente la técnica para extraer los aceites esenciales es el método por arrastre de vapor, en términos generales el aceite esencial se obtiene colocando el material vegetal en contacto con vapor, para luego este arrastre el

aceite y se condense. Dando paso a la separación por diferencia de densidades.

2.10. Cromatografía

De acuerdo con el estado físico de las fases, pueden ser: Cromatografía de gases y cromatografía líquida.

2.10.1. Cromatografía de gases

Según Bandoni (2003) “La cromatografía de gases es una técnica de separación basada entre una fase móvil gaseosa y una fase estacionaria constituida por un líquido muy viscoso retenido en el interior de una columna cromatográfica” (p. 185).

La funcionalidad de un cromatógrafo de gases es determinar la concentración de todos los componentes existentes en una muestra, y consiste en inyectar con una micro jeringa la muestra a analizar en el puerto de inyección que también es llamado, Inlet. Un gas Carrier; que puede ser helio, nitrógeno o hidrogeno; transporta la muestra desde el inlet hasta el detector, al cual llega cada componente por separado.

Para llegar al detector la muestra pasa por el horno en donde se encuentra la columna cromatográfica, las cuales tienen un largo y diámetro definido, y lo que las distingue de otras es la fase estacionaria. La fase estacionaria es polímero que recubre las paredes internas, esta fase es la que interactúa con los compuestos presentes en la muestra, la temperatura del horno va aumentando y según los distintos puntos de ebullición de cada

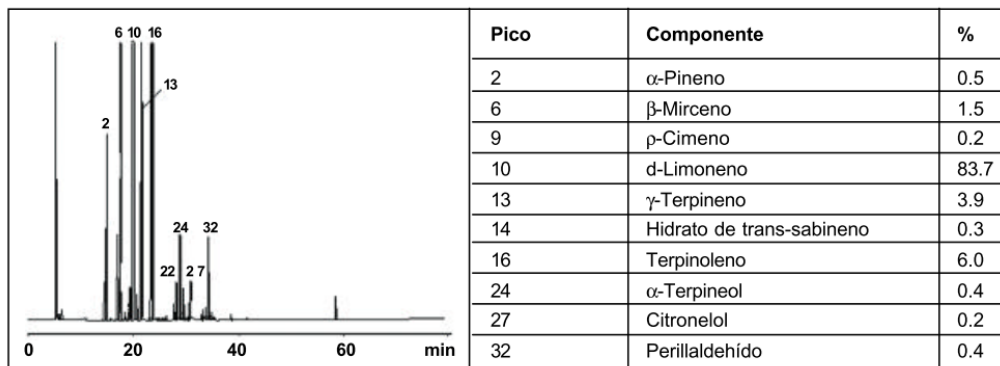
elemento se van evaporando. Ese vapor avanza por la columna y mediante los mecanismos de interacción, cada uno llega al detector a distinto tiempo.

El detector envía una señal cada vez que llega una sustancia, y mediante un software se registra el cromatograma que es una gráfica de señal vs tiempo, cada pico es un elemento que ha llegado al detector, llegando primero los más volátiles, a mayor altura en el pico y mayor área de este, mayor es la concentración del componente en la muestra.

En la figura 6, puede verse un cromatograma típico obtenido mediante una columna capilar.

Figura 6.

Cromatograma típico en columna capilar



Nota. Resultados del cromatograma típico en columna capilar del aceite esencial de mandarina. Obtenido de A. Bandoni (2003) *Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica*. (p. 186.) CYTED.

3. METODOLOGÍA

3.1. Localización

La experimentación del estudio fue realizada en el Laboratorio Clínico del Hospital El Pilar, Ciudad de Guatemala

3.2. Variables

A continuación, se detallan las variables dependientes e independientes de este estudio.

3.2.1. Variables independientes

- Tipo de aceite esencial
- Concentración del aceite esencial (mol/ml)
- Método de análisis microbiológico

3.2.2. Variables dependientes

- Concentración mínima inhibitoria (CMI)

3.3. Delimitación del campo de estudio

Este estudio es de carácter cuantitativo y cualitativo, se evaluará la actividad antimicrobiana que tiene los aceites esenciales del orégano y canela en el crecimiento de *Aspergillus niger* y *Candida albicans*, con el fin de

determinar la concentración mínima inhibidora de cada aceite esencial sobre el crecimiento de los hongos. Se utilizará la técnica de dilución y difusión en agar.

3.4. Diseño experimental

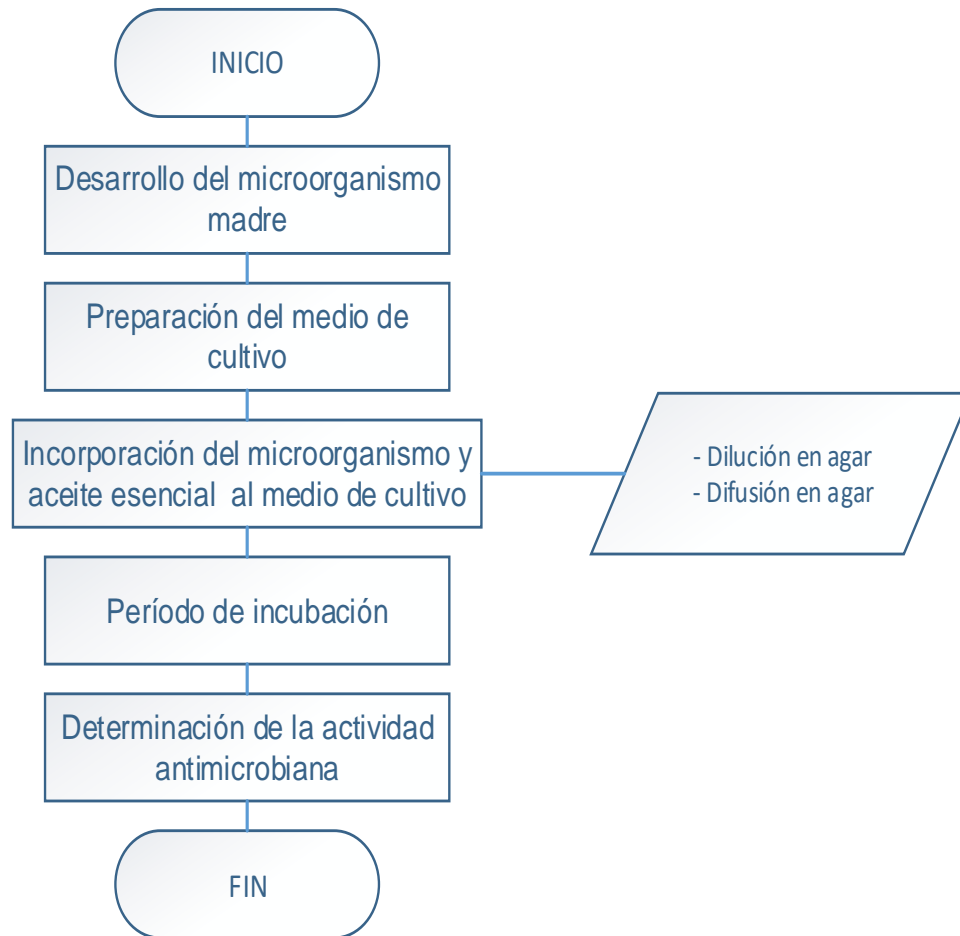
Se preparó por un periodo de quince días la formación del microorganismo madre de *Aspergillus niger* y *Candida albicans* dejando la fruta en un lugar aislado expuesto al aire en condiciones óptimas para el crecimiento fúngico.

Luego se preparó el medio de cultivo para el desarrollo de los microorganismos, diluyendo una cantidad de agar dextrosa y dejando solidificar en la caja Petri. Para el método de dilución en agar se diluyó con el aceite esencial antes de la solidificación, para el método de difusión en agar se inyectó el aceite esencial en el agar solidificado. Luego se incorporó el microorganismo.

Se procedió a dejar en un periodo de incubación de 6-10 días los cultivos de *Aspergillus niger* a una temperatura de 22.5°C, y por un periodo de incubación de 44-52 horas los cultivos de *Candida Albicans* a una temperatura de 22.5°C. Se determinó la actividad antimicrobiana por medio de la medición del radio de inhibición producido por el aceite esencial de orégano y canela.

Figura 7.

Diagrama de diseño experimental



Nota. Descripción de las fases del experimento. Elaboración propia, realizado con Microsoft Visio.

3.5. Recursos humanos

Investigadora:

Marleny Alejandra Alvarez Bolaños

Asesora:

Inga. Mercedes Esther Roquel Chávez

3.6. Recursos materiales disponibles

Material disponible para el desarrollo del estudio, especificando el equipo utilizado, cristalería utilizada, reactivos y materiales auxiliares.

3.6.1. Equipo

- Horno de incubación
- Balanza analítica
- Estufa
- Campana de extracción
- Mechero de bunsen

3.6.2. Cristalería

- Erlenmeyer 500ml
- Espátula
- Vidrio de reloj
- Beacker 200 ml
- Pipeta 10ml
- Succionador de pipeta
- Cajas Petri descartables (60)
- Asa de inoculación
- Aguja de inyección
- Varilla de agitación

3.6.3. Reactivos

- Extracto de aceite de Orégano

- Extracto de aceite de canela
- Agar Dextrosa Sabouraud
- Agua destilada
- Hongo *Aspergillus niger*
- Hongo *Candida albicans*

3.6.4. Materiales auxiliares

- Bata de laboratorio
- Algodón
- Computadora
- Impresora
- Hojas papel bond
- Objetos de escritura
- Masking tape
- Tijeras

3.7. Técnica cuantitativa y cualitativa

Las variables a medir corresponden a valores numéricos del porcentaje de inhibición de la actividad antimicrobiana que generan los aceites esenciales en el crecimiento de microorganismos y por ende la concentración mínima inhibitoria del crecimiento fúngico.

3.8. Procedimiento para la determinación de la actividad antimicrobiana

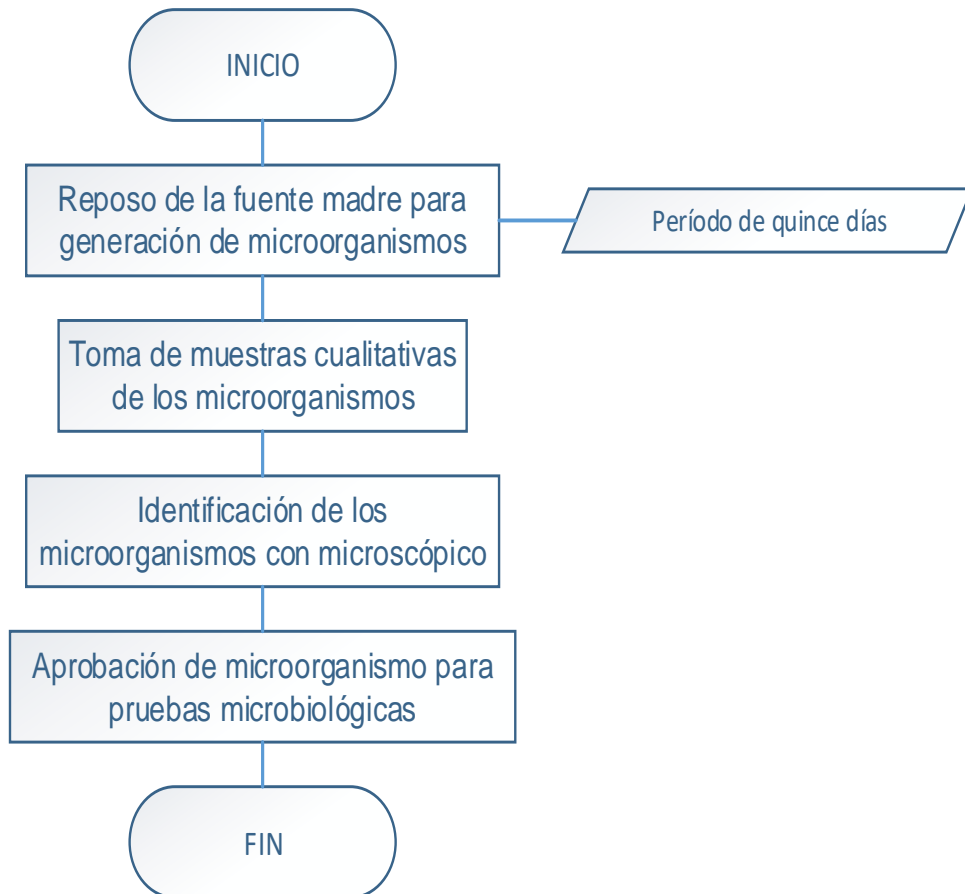
Se especifica el procedimiento del desarrollo de los microorganismos, preparación del medio de cultivo, inoculación de los hongos, y los métodos para la determinación de la actividad antimicrobiana.

3.8.1. Desarrollo del microorganismo madre para los microorganismos *Aspergillus niger* y *Candida albicans*

- Se dejó reposar en condiciones óptimas para el desarrollo de los microorganismos por un tiempo de quince días.
- Luego de la formación de los fúngicos se procedió a tomar muestras.
- Se determinó la identidad de los microorganismos con un microscópico.

Figura 8.

Diagrama de flujo de la generación de los microorganismos



Nota. Descripción de las etapas para la obtención de los microorganismos. Elaboración propia, realizado con Microsoft Visio.

3.8.2. Preparación del medio de cultivo para la inoculación de los microorganismos

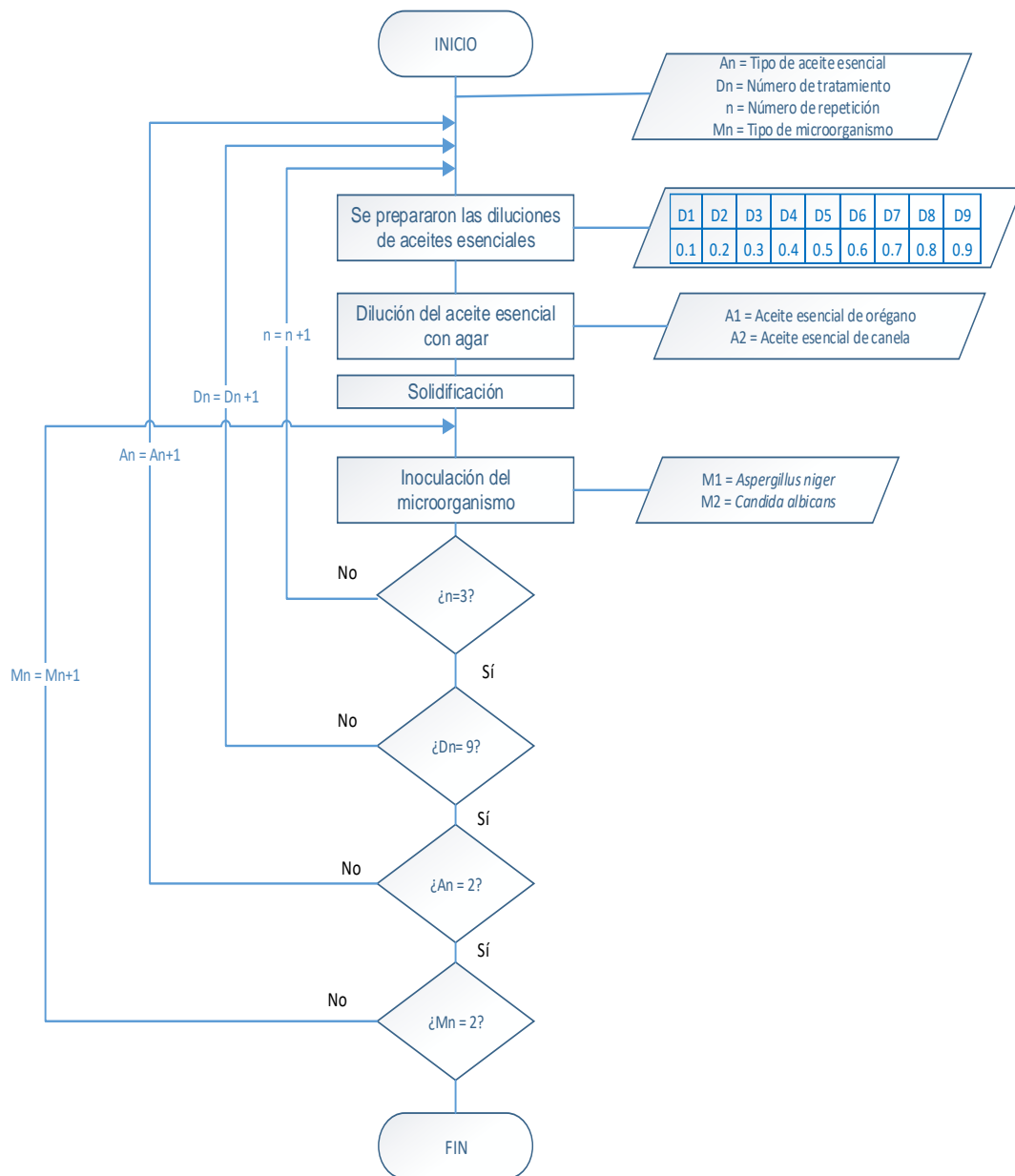
- Se agregó 65 gramos de medio deshidratado a un litro de agua destilada
- Se calentó y agitó hasta la disolución de los compuestos

3.8.3. Preparación de inóculos para la técnica de dilución en agar

- Se prepararon 9 diluciones de aceite esencial de orégano y canela
- Se agregó 65 gramos de medio deshidratado a un litro de agua destilada, calentando y agitando hasta la disolución de los compuestos.
- Se vertió el agar dextrosa junto con la dilución de aceite esencial para la solidificación en una caja Petri.
- Se inoculó el microorganismo.

Figura 9.

Diagrama de flujo de la preparación de inóculos con dilución en agar



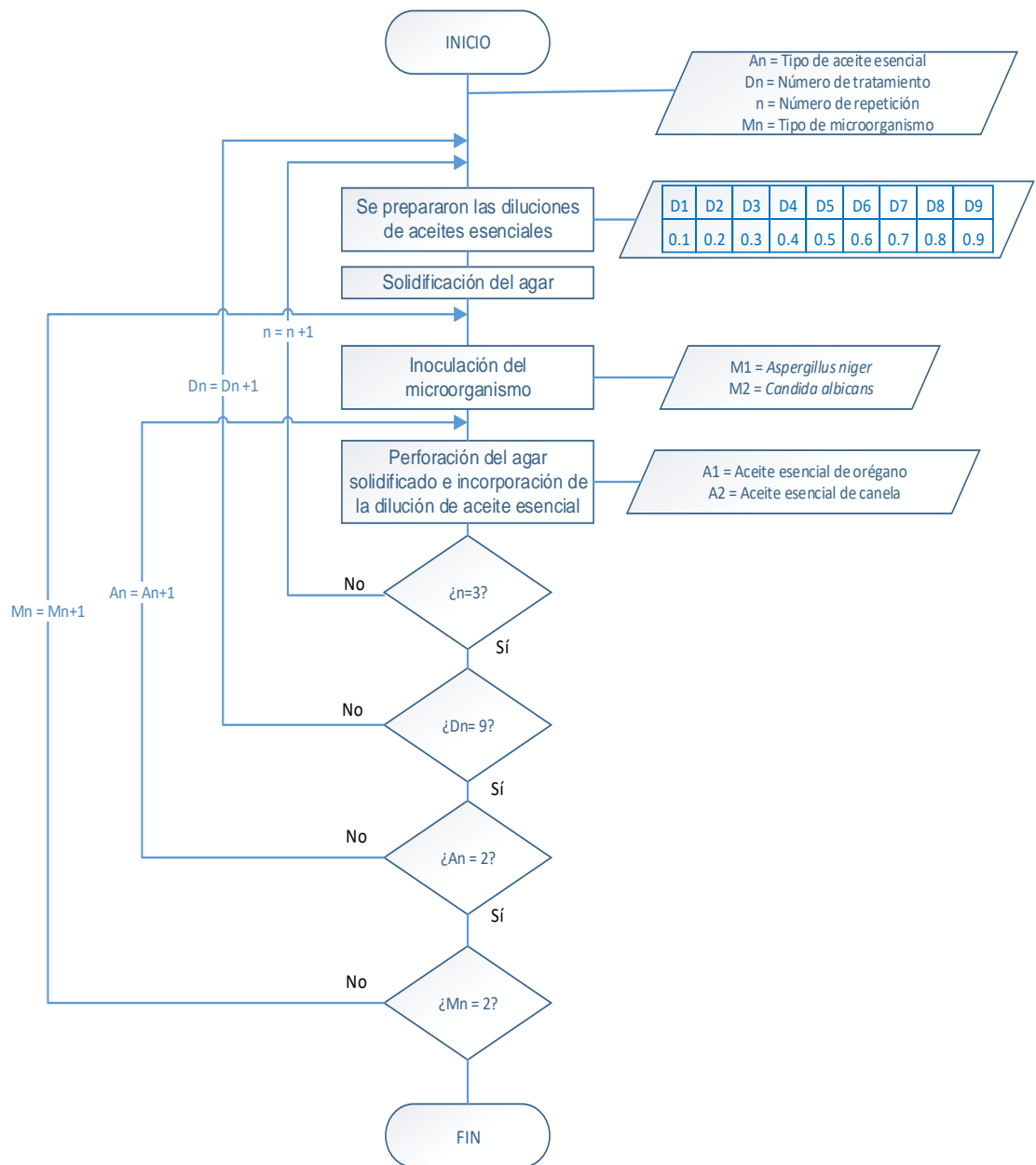
Nota. Descripción de la preparación de inóculos de cada microorganismo para la técnica de dilución en agar. Elaboración propia, realizado con Microsoft Visio.

3.8.4. Preparación de inóculos para la técnica de difusión en agar

- Se prepararon 9 diluciones de aceite esencial de orégano y canela
- Se agregó 65 gramos de medio deshidratado a un litro de agua destilada, calentando y agitando hasta la disolución de los compuestos.
- Se vertió el agar dextrosa para la solidificación en una caja Petri.
- Se inoculo el microorganismo.
- Se perforó el agar solidificado.
- Se vertió la solución de aceite esencial.

Figura 10.

Diagrama de flujo de la preparación de inóculos con difusión en agar



Nota. Descripción de la preparación de inóculos de cada microorganismo para la técnica de difusión en agar. Elaboración propia, realizado con Microsoft Visio.

3.8.5. Incubación de los microorganismos

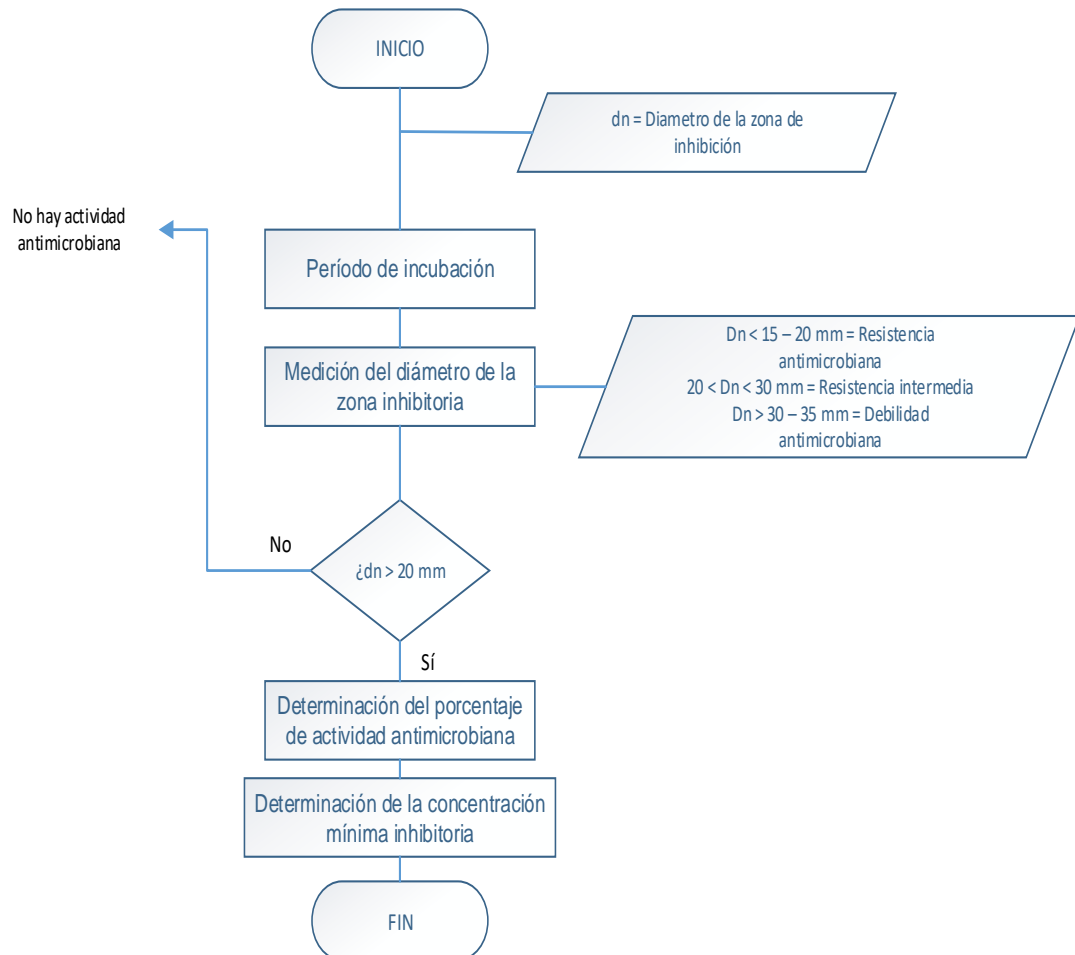
- Se introdujo el inóculo en el horno de incubación
- Se ajustó la temperatura óptima de incubación de 22.5 °C
- Se dejó reposar por un periodo de 8 días para *Aspergillus niger* y un periodo de incubación de 50 horas para *Candida albicans*.

3.8.6. Determinación de la actividad antimicrobiana

- Se observan las zonas de inhibición
- Se midió la susceptibilidad del microorganismo con el diámetro de la zona de inhibición en milímetros.
- Se determina la actividad antimicrobiana mediante.

Figura 11.

Diagrama de flujo de la determinación de la actividad antimicrobiana



Nota. Descripción de la determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales sobre los microorganismos, Elaboración propia, realizado con Microsoft Visio.

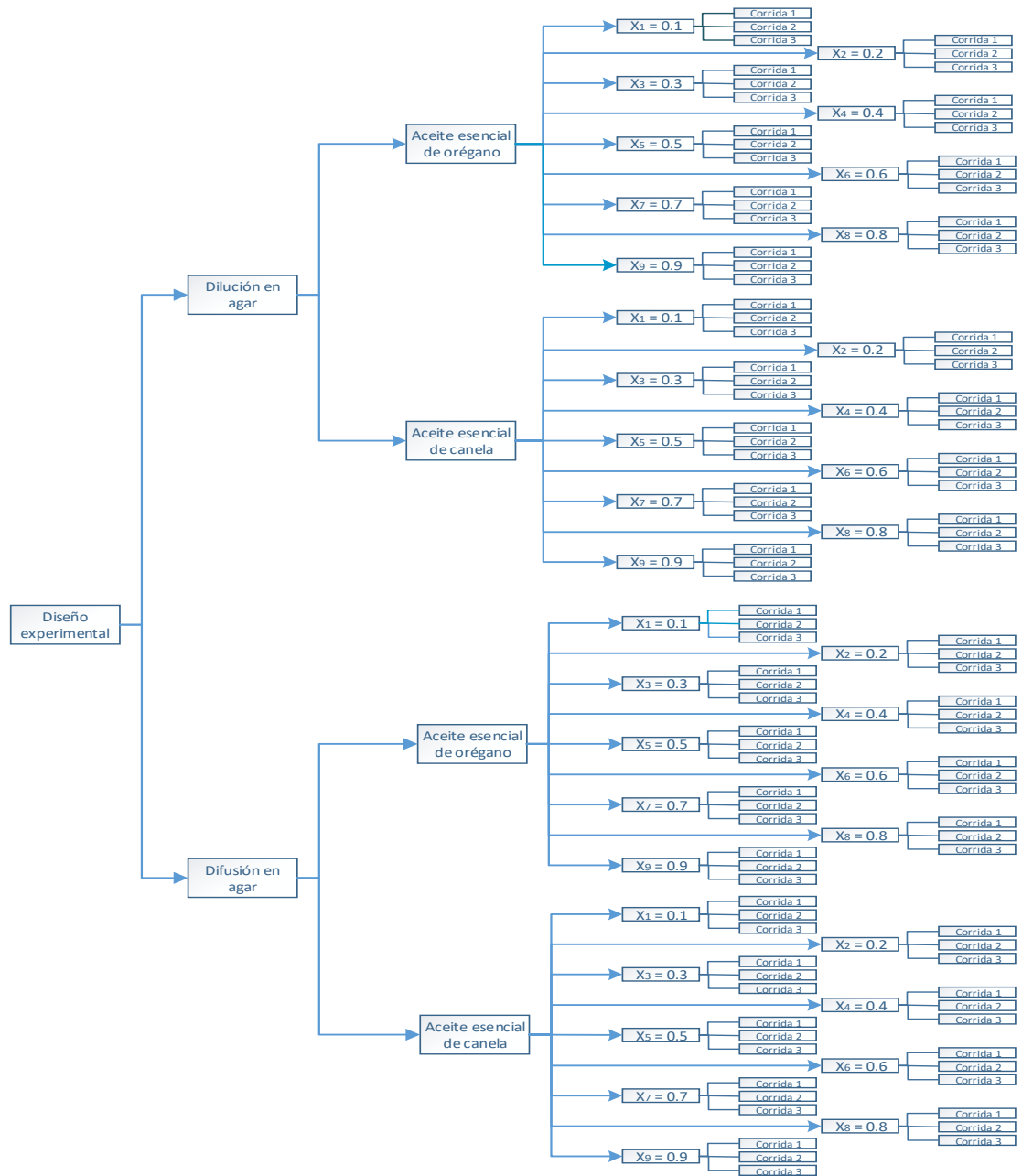
3.9. Diseño de tratamientos

- El diseño experimental se separó en dos metodologías
- Dilución en agar y difusión en agar

- Se analizaron dos aceites esenciales, aceite esencial de orégano y aceite esencial de canela.
- Para cada aceite esencial, se realizaron nueve diluciones con concentración desde 0.1 a 0.9.
- De las diferentes concentraciones de aceite esencial se realizaron tres repeticiones.

Figura 12.

Clasificación de los tratamientos



Nota. Tratamientos del estudio de investigación. Elaboración propia, realizado Microsoft Visio.

4. RESULTADOS

Tabla 1.

Concentración mínima inhibitoria de aceite de orégano sobre Aspergillus niger

Método utilizado	Aceite esencial	Microorganismo	CMI
Dilución en agar	Orégano	<i>Aspergillus niger</i>	0.7 M
Difusión en agar		<i>Aspergillus niger</i>	0.5 M

Nota. Concentración mínima inhibitoria promedio del aceite esencial de orégano sobre *Aspergillus niger*. Elaboración propia, realizado con Excel.

Tabla 2.

Concentración mínima inhibitoria de aceite de canela sobre Aspergillus niger

Método utilizado	Aceite esencial	Microorganismo	CMI
Dilución en agar	Canela	<i>Aspergillus niger</i>	de0.5 M
Difusión en agar		<i>Aspergillus niger</i>	0.5 M

Nota. Concentración mínima inhibitoria promedio del aceite esencial de canela sobre *Aspergillus niger*. Elaboración propia, realizado con Excel.

Tabla 3.

Concentración mínima inhibitoria de aceite de orégano sobre Candida albicans

Método utilizado	Aceite esencial	Microorganismo	CMI
Dilución en agar	Orégano	<i>Candida albicans</i>	0.9 M
Difusión en agar		<i>Candida albicans</i>	0.7 M

Nota. Concentración mínima inhibitoria promedio del aceite esencial de orégano sobre *Candida albicans*. Elaboración propia, realizado con Excel.

Tabla 4.

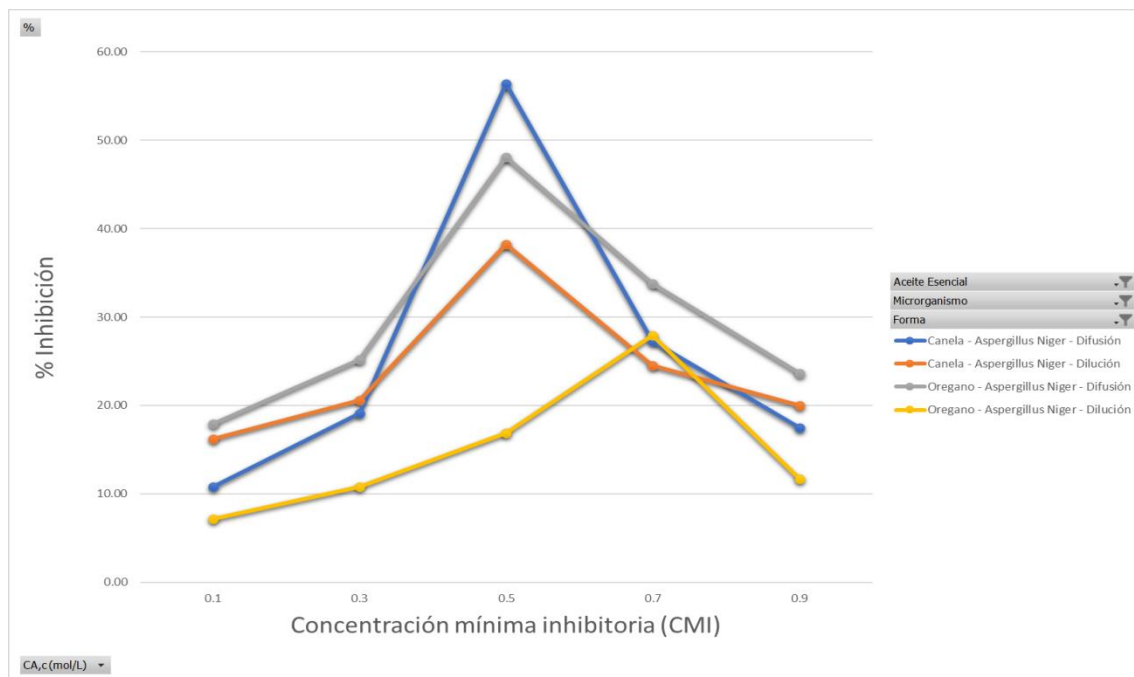
Concentración mínima inhibitoria de aceite de canela sobre Candida albicans

Método utilizado	Aceite esencial	Microorganismo	CMI
Dilución en agar	Canela	<i>Candida albicans</i>	0.5 M
Difusión en agar		<i>Candida albicans</i>	0.7 M

Nota. Concentración mínima inhibitoria promedio del aceite esencial de canela sobre *Candida albicans*. Elaboración propia, realizado con Excel.

Figura 13.

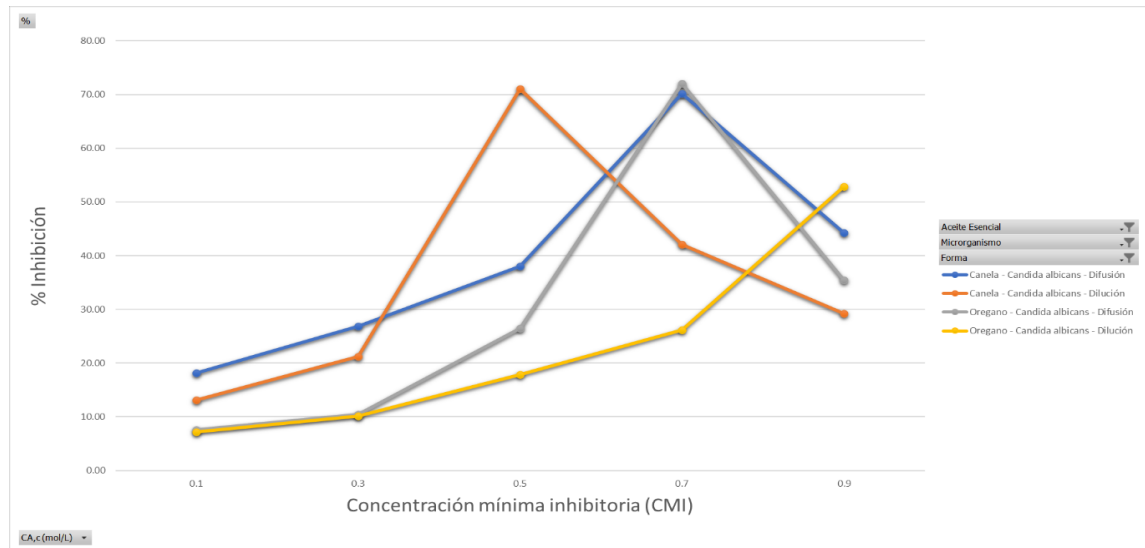
Actividad inhibitoria de los aceites sobre Aspergillus niger con difusión y dilución



Nota. Análisis de la actividad inhibitoria del aceite esencial de canela y aceite esencial de orégano sobre *Aspergillus niger* con el método de difusión y dilución en agar. Elaboración propia, realizado con Excel.

Figura 14.

Actividad inhibitoria de aceites sobre Candida albicans con difusión y dilución



Nota. Análisis de la actividad inhibitoria del aceite esencial de canela y orégano sobre *Candida albicans* con el método de difusión y dilución en agar. Elaboración propia, realizado con Excel.

Tabla 5.

Aceite esencial más efectivo para cada microorganismo

Microrganismo	CMI	Mayor porcentaje inhibición	Aceite esencial
<i>Aspergillus niger</i>	0.5	56.38	Canela
<i>Candida albicans</i>	0.7	72.01	Orégano

Nota. Aceite esencial más efectivo por microorganismo en base a su porcentaje de inhibición. Elaboración propia, realizado con Excel.

Tabla 6.

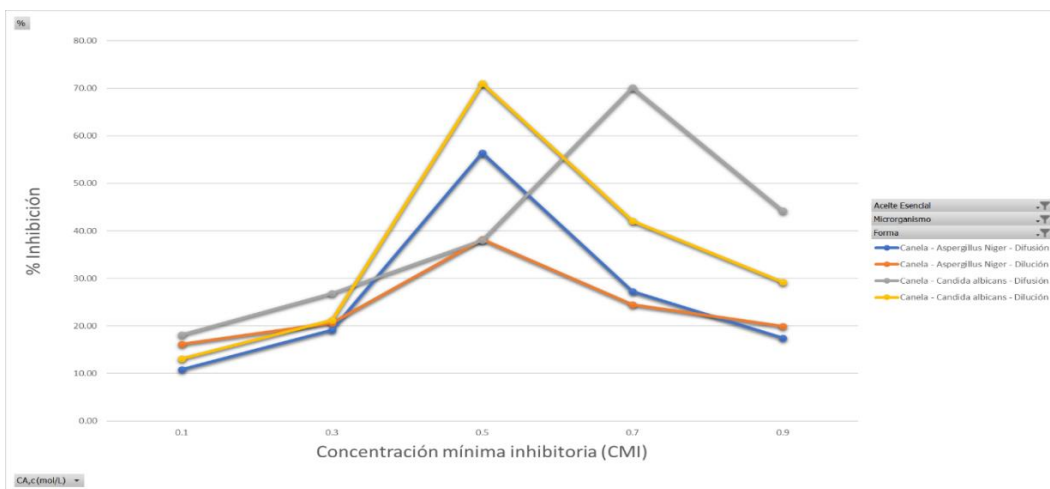
Método más efectivo para cada microorganismo

Microorganismo	Método más efectivo
<i>Aspergillus niger</i>	Difusión en agar
<i>Candida albicans</i>	Difusión en agar

Nota. Método de determinación de actividad antimicrobiana más efectivo para cada microorganismo. Elaboración propia, realizado con Excel.

Figura 15.

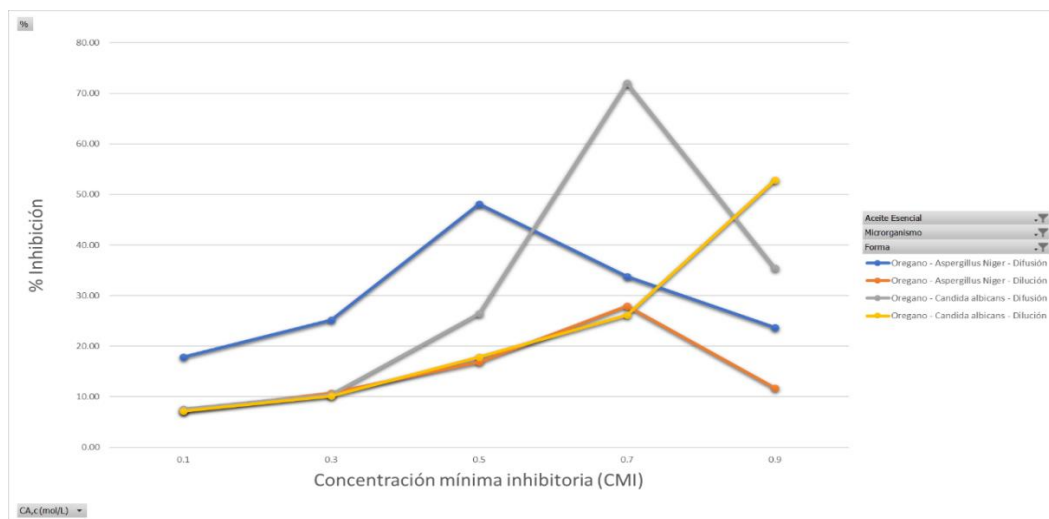
Análisis de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de canela



Nota. Actividad inhibitoria del aceite esencial de canela sobre *Aspergillus niger* y *Candida albicans*. Elaboración propia, realizado con Excel.

Figura 16.

Análisis de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano



Nota. Actividad inhibitoria del aceite esencial de orégano sobre *Aspergillus niger* y *Candida albicans*. Elaboración propia, realizado con Excel.

Tabla 7.

Combinación más efectiva de método y microorganismo

Aceite esencial	Método	Microrganismo
Aceite esencial de canela	Dilución en agar	<i>Candida albicans</i>
Aceite esencial de orégano	Difusión en agar	<i>Candida albicans</i>

Nota. Combinación de método más efectivo y microorganismo para cada aceite esencial. Elaboración propia, realizado con Excel.

5. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El análisis de este trabajo de investigación inicia en el microorganismo *Aspergillus niger* obteniendo así la figura 13, donde las variables: aceite esencial (canela y orégano) y las técnicas (dilución y difusión en agar), están involucradas para este microorganismo. Si se visualiza la presencia de aceite esencial de canela en este microorganismo, se determina que ambos porcentajes de inhibición presentan su punto máximo a una concentración de 0.5M, para la técnica de difusión en agar, el aceite esencial de canela tiene 56.38 % de inhibición y para la técnica de dilución en agar tiene 38.26 % de inhibición, la mejor técnica para determinar la actividad antimicrobiana para el *Aspergillus niger* utilizando aceite esencial de canela como inhibidor es difusión en agar.

Para el aceite esencial de orégano se observa un comportamiento similar con la técnica de difusión en agar mostrando un 48.07 % de inhibición a una concentración de 0.5M, mientras que con la técnica de dilución en agar el porcentaje de inhibición lo muestra al tener una concentración de 0.7M siendo este el valor de 27.89 %. Determinando que la mejor técnica al evaluar la actividad inhibitoria utilizando aceite esencial de orégano fue difusión en agar.

En la evaluación de la actividad antimicrobiana de ambos aceites, el mejor método resultó ser la técnica de difusión en agar, por presentar mayor porcentaje de inhibición; esta ventaja se debe a que el extracto vegetal se aplica de manera directa al microorganismo, por lo tanto los componentes activos de los aceites esenciales actúan en la membrana celular de los hongos sin factores externos que influyan en su mecanismo de acción, como lo que ocurre

en el método de dilución en agar, que influye la manera en la que el extracto vegetal se distribuye en el medio de cultivo; aun así ambas miden el efecto fungicida de buena manera.

En el análisis del microorganismo *Candida albicans* que se muestra en la figura 14, para el aceite esencial de canela se visualiza para la técnica de difusión en agar un 69.8 % de inhibición a una concentración de 0.7M, y para la técnica de dilución en agar 71.2 % de inhibición a una concentración de 0.5M

Si se visualiza la presencia de aceite esencial de orégano en el hongo *Candida albicans*, se determina que ambos % de inhibición presentan su punto máximo a una concentración de 0.7M, obteniendo que, para la técnica de difusión en agar tiene 72.01 % de inhibición y para la técnica de dilución en agar tiene 70 % de inhibición, por lo que se determina que la mejor técnica para el aceite esencial de orégano para el *Candida albicans* es difusión en agar.

Si se sigue analizando las figuras 13 y 14, para determinar cuál es el mejor aceite esencial (para cada microorganismo), mediante la comparación gráfica, donde el mejor aceite esencial es aquel que, cuyas graficas (cada grafica representa la técnica de difusión y dilución en agar), representen mayor porcentaje de inhibición en toda la curva respecto a la concentración molar; se determina que, el mejor aceite esencial para cada hongo es aquel que luego del periodo de incubación presenta menor diámetro (es decir, menor crecimiento del microorganismo), lo que equivale a mayor porcentaje de inhibición.

A través de la comparación gráfica de la figura 13 se determina que el mejor inhibidor para el microorganismo *Aspergillus niger* es el aceite esencial de canela; los compuestos activos principales a los que se le atribuyen la actividad inhibitoria del aceite esencial de canela son cinamaldehído y eugenol, el

mecanismo de acción que tienen estos compuestos se desarrolla en la membrana celular, estos compuestos afectan la estabilidad estructural de la membrana del microorganismo uniéndose a la pared y alterándola, provocando la liberación de componentes celulares al exterior de la célula, lo cual provoca la muerte del microorganismo, obteniendo como resultado un porcentaje de inhibición arriba del 70 %.

Mientras que en la comparación grafica de la figura 14, donde se analiza el microorganismo *Candida albicans* se determina que el mejor inhibidor es el aceite esencial de orégano; al igual que aceite anterior, el aceite esencial de orégano contiene compuestos activos a los que se les atribuye la actividad antifúngica, estos son, el timol, cuyo mecanismo inhibitorio es alterar de igual manera la pared celular del microorganismo provocando así su destrucción; y el carvacrol, que es capaz de inhibir las enzimas que producen trifosfato de adenosina (ATP), compuesto vital para el metabolismo del microorganismo.

Continuando con el análisis de las figuras 13 y 14, para determinar cuál es la mejor técnica (para cada microorganismo) mediante la comparación gráfica, donde la mejor técnica es aquella que, cuyas graficas (cada grafica representa el aceite esencial de canela y orégano), representen mayor porcentaje de inhibición en toda la curva respecto a la concentración molar.

Para la figura 13, se determina que la mejor técnica para determinar la actividad antimicrobiana sobre *Aspergillus niger* es mediante difusión en agar. Y para *Candida albicans* analizado en la figura 14, se determina que la mejor técnica que determina la actividad antimicrobiana es difusión en agar. El método de difusión en agar se basa en la relación entre la concentración de los aceites esenciales y el diámetro de inhibición, y no influye de manera

significativa el utilizarlo para analizar diferentes microorganismos, por lo que se determina que la aplicación directa es el factor que lo hace ser más efectivo.

Analizando la figura 15, que relaciona ambas técnicas y ambos microorganismos con el aceite esencial de canela se determina que la mejor combinación es difusión en agar para *Aspergillus niger*, esto se puede atribuir a que el método tiene afinidad de evaluación antifúngica con compuestos apolares, y en combinación con cualquier microorganismo.

Así mismo, analizando la figura 16, que relaciona ambas técnicas y ambos microorganismos con el aceite esencial de orégano se determina que la mejor combinación es difusión en agar para *Candida albicans*, atribuyéndole las mismas características por ambos aceites contener compuestos aromáticos.

CONCLUSIONES

1. La evaluación de la concentración mínima inhibitoria que presentó el aceite esencial de orégano para *Aspergillus niger* fue de 0.5M, evaluado con la técnica de dilución.
2. El aceite esencial de orégano obtuvo una CMI de 0.5M al ser evaluado sobre *Aspergillus niger* utilizando la técnica de difusión en agar.
3. El aceite esencial de canela obtuvo una CMI de 0.5M al ser aplicado sobre *Aspergillus niger* utilizando el método de dilución en agar.
4. El aceite esencial de canela muestra con el método de difusión en agar una CMI de 0.5M en su evaluación con *Aspergillus niger*.
5. La concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de orégano sobre el hongo *Candida albicans* utilizando el método de dilución en agar fue de 0.9M.
6. Utilizando el método de dilución en agar para evaluar la CMI del aceite esencial de canela sobre *Candida albicans* se obtuvo un resultado de 0.5M.
7. El hongo *Candida albicans* en su evaluación con el aceite esencial de orégano y el método de difusión en agar muestra una CMI de 0.7M.

8. El método de difusión en agar empleado con el aceite esencial de canela para *Candida albicans* mostró una CMI de 0.7M.
9. Al evaluar el hongo *Aspergillus niger* se determinó que el aceite que mejor inhibe su crecimiento es el aceite esencial de canela, el cual presenta una CMI de 0.5M con un 56.38 % de inhibición; y el método más efectivo para evaluarlo es el de difusión en agar.
10. Para el hongo *Candida albicans* se determinó que el aceite que mejor inhibe su crecimiento es el aceite esencial de orégano, el cual presenta una CMI de 0.7M con un 72.01 % de inhibición y el método más efectivo para evaluarlo es el de difusión en agar.

RECOMENDACIONES

1. Dar seguimiento a este estudio con diferentes aceites esenciales y con diferentes microorganismos, con el fin de ampliar el campo de los aceites esenciales como inhibidores de microorganismos.
2. Ampliar el estudio utilizando otras metodologías de evaluación de actividad antimicrobiana como fase vapor, caja petri invertida o dilución y micro – dilución en caldo, para estos aceites esenciales y estos microorganismos.
3. Evaluar el procedimiento en diferentes frutas y ampliar el estudio hacia la evaluación de la inhibición en las hortalizas.
4. Utilizar y evaluar la información de la CMI de los aceites evaluados de este estudio para aplicación en repelentes para huertos o siembras de frutas cítricas.
5. Sugerir este trabajo de investigación para que sea utilizado en una práctica de laboratorio del curso de microbiología o extracciones industriales, con el fin de enseñanza a los estudiantes de la Escuela de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, USAC.
6. Realizar el estudio con aceites esenciales extraídos por el investigador, utilizando métodos como la extracción por medio de destilación por arrastre de vapor.

7. Extender la investigación para analizar la actividad antimicrobiana que tienen los aceites esenciales sobre las bacterias y levaduras.
8. Continuar esta investigación para la estudiar el tema en el campo de utilización en películas con actividad antimicrobiana.

REFERENCIAS

- Aguilar R. (2014). Planta de orégano. Archivo digital. <https://tropical.theferns.info/image.php?id=Lippia+graveolens>
- Argote, F., Suarez, Z., Tobar, M., Perez, J., Hurtado, A., & Delgado, J. (2017). Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. *Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustria*, 15(2), 52-60. <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v15nspe2/1692-3561-bsaa-15-spe2-00052.pdf>
- Bandoni, A. (2003). *Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica*. CYTED.
- Corleto, C. (1995). *Efecto inhibitorio de la infusión de orégano (Lippia graveolens HBK) sobre el crecimiento de microorganismos cariogénicos. Lactobacillus acidophilus y Streptococcus mutans in vitro*. [Tesis de pregrado, Universidad de San Carlos de Guatemala]. Repositorio institucional.
- Cueto, M. (2010). *Determinación del efecto inhibitorio del aceite esencial y diferentes extractos de orégano (Lippia berlandieri Schauer) sobre el crecimiento de Fusarium oxysporum tanto in vitro como en plántula de tomate*. [Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Nuevo León]. Archivo digital. <http://eprints.uanl.mx/2099/1/1080177206.pdf>

Frazier, W. y Westhoff, D. (1993). *Microbiología de los alimentos*. ACRIBIA, S.A.

Guerra, C., y Robles, L. (2014). *Actividad antibacteriana de los extractos supercríticos del ajo, chichipin, orégano y té de limón sobre el crecimiento in vitro de Staphylococcus aureus, Helicobacter pylori, Escherechia coli y Pseudomonas aureginosa*. [Tesis de pregrado, Universidad de San Carlos de Guatemala]. Archivo digital. http://www.repositorio.usac.edu.gt/1556/1/05_9414.pdf

Köhler, F. (2007). *Planta de canela Cinnamomum zeylanicum o Cinnamomum verum en floración*. Archivo digital. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/24/Cinnamomum_verum_-_K%C3%B6hler%E2%80%93s_Medizinal-Pflanzen-182.jpg

Kon, K. (2018). *Ilustración digital de hongos Aspergillus niger, moho negro, que producen aflatoxinas, causan infección pulmonar aspergilosis*. Shutterstock. Archivo digital. <https://www.shutterstock.com/image-illustration/digital-illustration-fungi-aspergillus-niger-black-308094836>

National Oceanic and Atmospheric Administration (2008). Método de difusión en agar, también conocido como método Kirby-Bauer. KB test [Prueba de Kirby Bauer] Archivo digital. <https://oceanexplorer.noaa.gov/explorations/04etta/background/antimicrobial/media/antimicrobial2.html>

Piddock, L. (1990). Techniques used for determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 68(4), 307-318. <https://academic.oup.com/jambio/article/68/4/307/6725326>

- Pitarch, C. (2000). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales. *Natura Medicatrix*, (58), 26-31.
<file:///C:/Users/marle/Downloads/Dialnet-EvaluacionDeLaActividadAntimicrobianaDeLosAceitesE-4989220.pdf>
- Ramirez, L.S., y Marin, D. (2009). Metodologías para la evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia Et Technica*, 15(42), 263-268.
<https://www.redalyc.org/pdf/849/84916714049.pdf>
- Ray, B., y Bhunia, A. (2010). *Fundamentos de microbiología de los alimentos*. Mc Graw Hill Interamericana Editores, S.A.
- Reyes, F., Palou, E., & López, A. (2014). Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 8(1), 68-78.
- Rodríguez, E. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*, 7(1), 153-170.
- Ruilova, A. (2007). *Determinación de la concentración inhibitoria mínima de aceites esenciales ante bacterias y hongos fitopatógenos*. [Tesis de pregrado, Universidad del Azuay, Ecuador]. Archivo digital.
<http://dspace.uazuay.edu.ec/handle/datos/455>
- Shiva, C. (2007). *Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento*. [Tesis doctoral, Universidad

Autónoma de Barcelona]. Archivo digital.

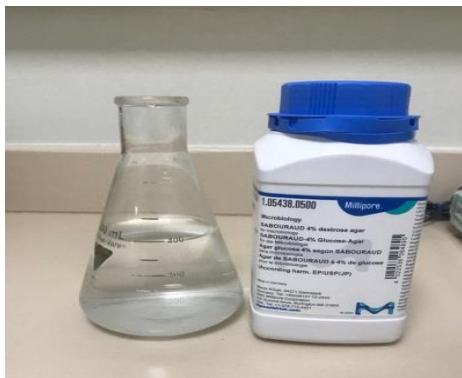
<http://hdl.handle.net/10803/5606>

Quezada, A. (2008). *Evaluación del rendimiento de extracción del aceite esencial crudo de orégano (Lippa graveolens) proveniente de dos zonas de distinta altitud, por medio del método de arrastre de vapor a nivel planta piloto*. [Tesis de pregrado, Universidad de San Carlos de Guatemala]. Repositorio institucional.

APÉNDICES

Apéndice 1.

Reactivos a utilizar para el medio de cultivo



Nota. Del lado derecho Agar Dextrosa Sabouraud, del lado izquierdo agua destilada.
Elaboración propia.

Apéndice 2.

Aceites esenciales utilizados



Nota. Del lado izquierdo aceite esencial de canela, lado derecho aceite esencial de orégano.
Elaboración propia.

Apéndice 3.

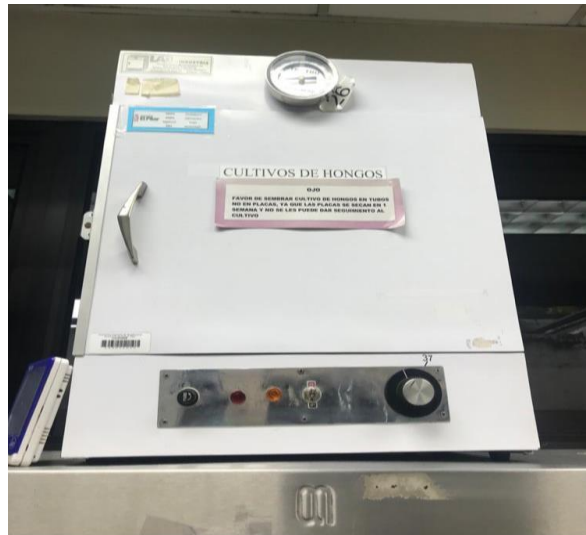
Equipo utilizado



Nota. Balanza analítica del lado izquierdo campana de extracción en el medio y estufa al lado derecho. Elaboración propia.

Apéndice 4.

Incubadora de hongos



Nota. Incubadora donde se cultivaron hongos a 22-25 °C. Elaboración propia.

Apéndice 5.

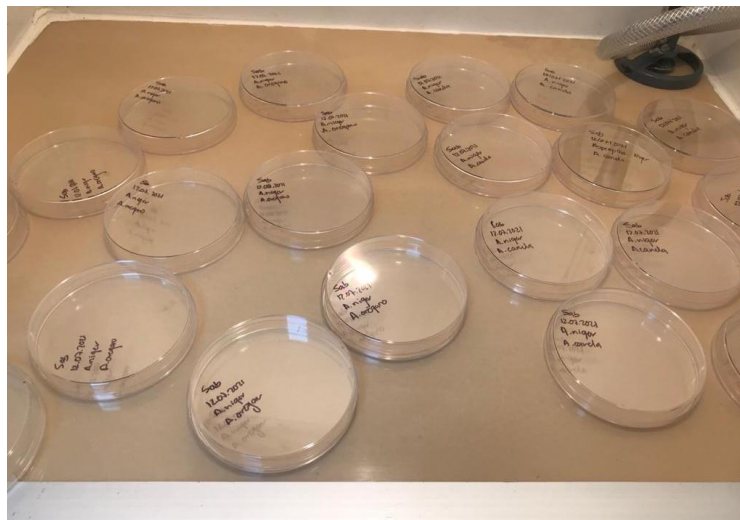
Preparación del medio de cultivo



Nota. Preparación del medio de cultivo Agar Dextrosa Sabouraud. Elaboración propia.

Apéndice 6.

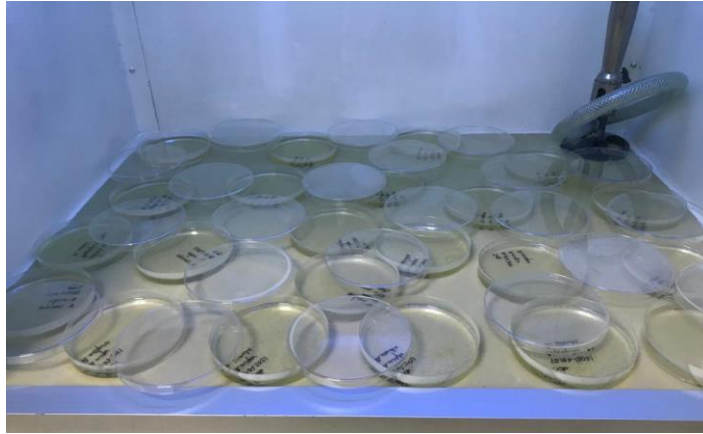
Rotulación de cajas Petri



Nota. Identificación de caja petri con medio, fecha, cultivo y aceite esencial. Elaboración propia.

Apéndice 7.

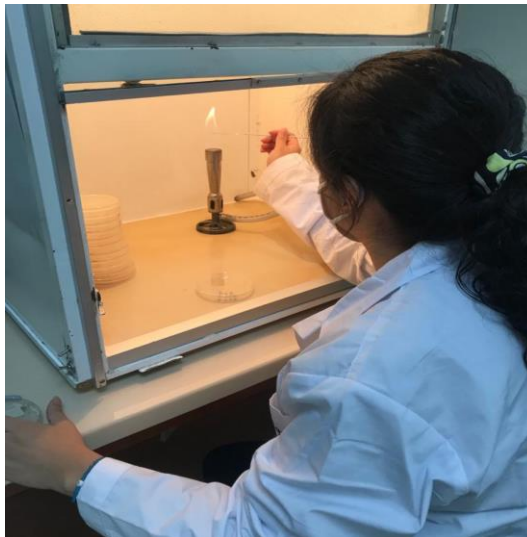
Llenado y secado de cajas petri



Nota. Llenado de cajas petri con el medio de cultivo y secado en campana de extracción para solidificar el agar. Elaboración propia.

Apéndice 8.

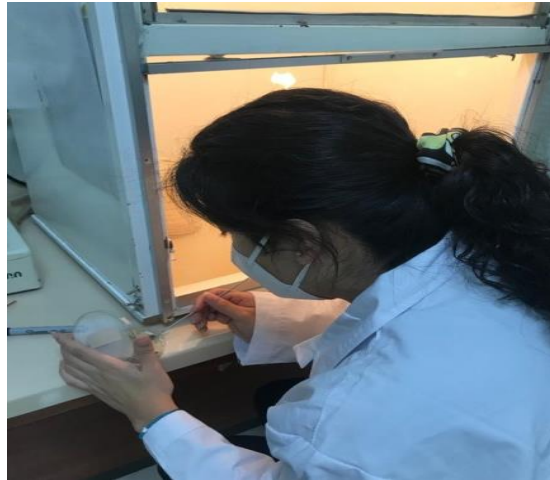
Procedimiento. Inoculación del asa de inoculación



Nota. Inoculación del asa de inoculación con mechero de bunsen. Elaboración propia.

Apéndice 9.

Procedimiento. Recolección del hongo



Nota. Recolección del hongo madre con el asa de inoculación. Elaboración propia.

Apéndice 10.

Procedimiento. Incubación del hongo



Nota. Incubación de los microorganismos en las cajas petri rotuladas. Elaboración propia.

Apéndice 11.

Periodo de incubación en la incubadora de hongos



Nota. Periodo de incubación de los hongos en la incubadora de 5-7 días. Elaboración propia.

Apéndice 12.

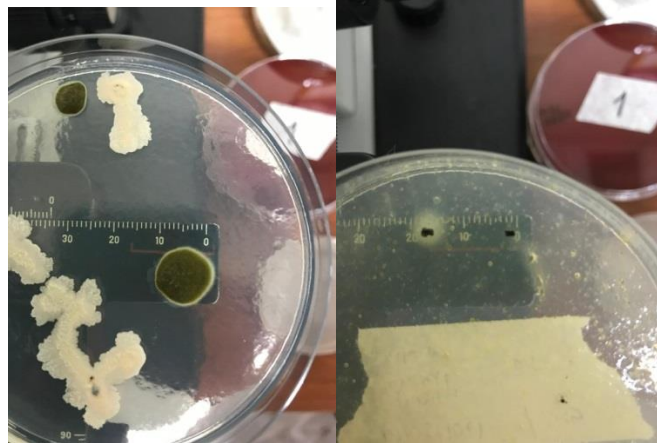
Obtención de resultados



Nota. Obtención de resultados de actividad antimicrobiana luego del periodo de incubación. Elaboración propia.

Apéndice 13.

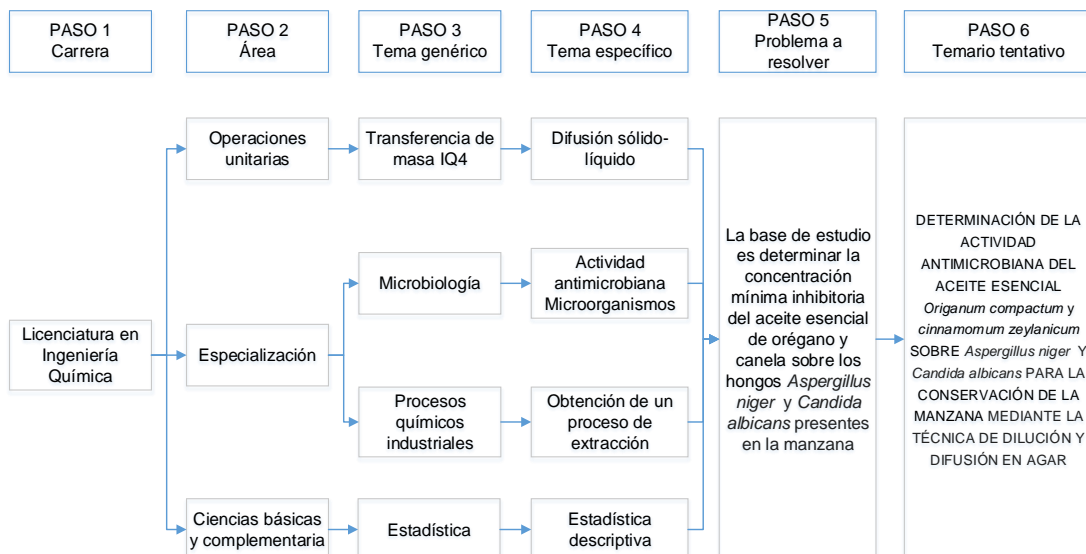
Diámetro de inhibición



Nota. Medición del diámetro de inhibición luego del periodo de incubación. Elaboración propia.

Apéndice 14.

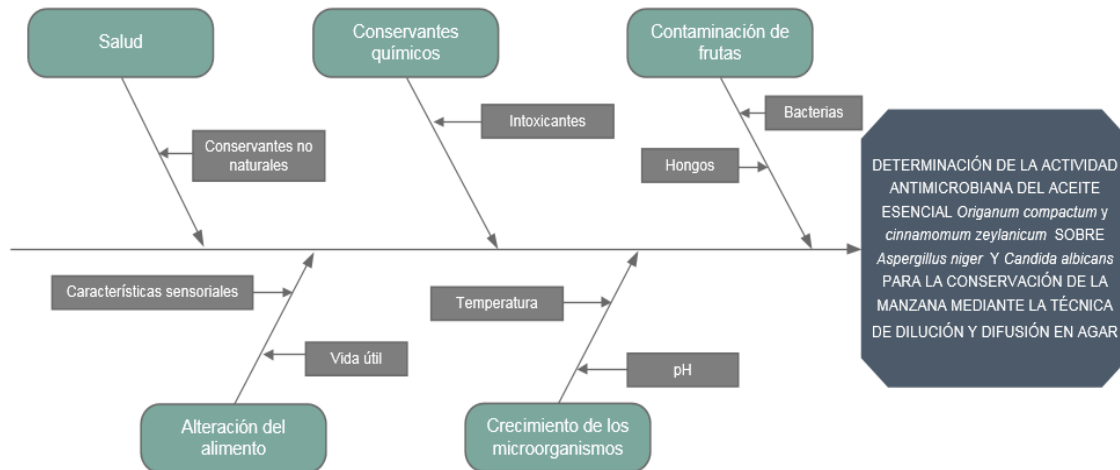
Diagrama de requisitos académicos



Nota. Requisitos académicos involucrados. Elaboración propia, realizado con Microsoft Visio.

Apéndice 15.

Diagrama de Ishikawa



Nota. Diagrama de Ishikawa del título de la investigación. Elaboración propia, realizado con Microsoft Visio.

Apéndice 16.

Muestra de cálculo

A.16.1 Diluciones del aceite esencial

$$C_c V_c = C_d V_d$$

Ecuación No.1

Donde:

- C_c : Concentración del aceite esencial puro (M)
- V_c : Volumen de aceite esencial puro (ml)
- C_d : Concentración del aceite esencial diluido (MI)
- V_d : Volumen de aceite esencial diluido (ml)

Continuación del apéndice 16.

Ejemplo: determinar la cantidad en el que se debe diluir 5ml de aceite esencial de orégano, para lograr una dilución a una concentración del 10 %, si se tiene una sustancia pura a una concentración de 99 % M.

$$V_{d,A,o} = \frac{0.1 * 5}{0.99} = 0.5ml$$

Nota: Se realizaron diluciones del aceite esencial de orégano y canela de 0.1 a 0.9 M

A.16.2 Preparación del medio de cultivo

Difusión de agar: se rehidratan 65 gramos del medio de cultivo (Agar Dextrosa Sabouraud) en 1000ml de agua destilada, calentando y agitando para luego colocarlo en caja Petri y dejarlo reposar 15 minutos para la solidificación.

Dilución en agar: se rehidratan 65 gramos del medio de cultivo en 1000ml de agua destilada, calentando y agitando para luego colocarlo en caja Petri y agregar la dilución n del aceite esencial, dejando reposar 15 minutos para la solidificación.

A.16.3 Determinación del área de inhibición

$$A_I = \frac{\pi D_I^2}{4}$$

Ecuación No.2

Continuación del apéndice 16.

Donde:

- A_I : Área de inhibición (mm^2)
- D_T : Diámetro de inhibición (mm)

Ejemplo: determinar el área de inhibición obtenida en una muestra evaluada *Aspergillus niger* con aceite esencial de orégano a una concentración de 0.5M, si se obtuvo como resultado medido 8mm de diámetro de inhibición.

$$A_I = \frac{\pi(8mm)^2}{4}$$

$$A_I = 6.28 mm^2$$

A.16.4 Evaluación del porcentaje de inhibición

$$\%_I = \frac{D_c - D_T}{D_c} * 100$$

Ecuación No.3

Donde:

- D_c : Diámetro del crecimiento del control
- D_T : Diámetro del crecimiento de los tratamientos

Continuación del apéndice 16.

Ejemplo: determinar el porcentaje de inhibición que se obtuvo en la muestra descrita en el ejemplo anterior, siendo el diámetro de control es 2mm.

$$\%_I = 1 - \frac{8mm - 2mm}{8mm} * 100$$

$$\%_I = 75\%$$

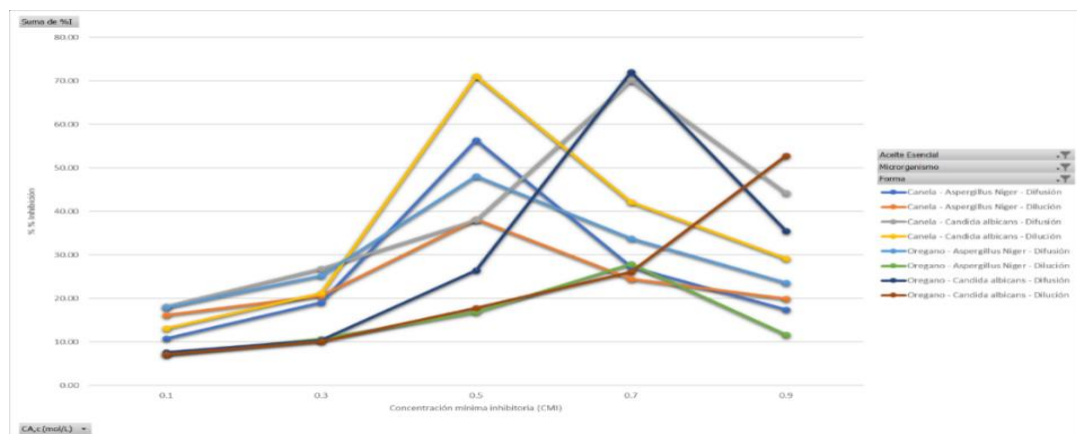
A.16.5 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se determinó la CMI, como la menor concentración que inhibió el crecimiento de los microorganismos de todas las concentraciones evaluadas.

Nota. Diagrama de Ishikawa. Elaboración propia, realizado con Word.

Apéndice. 17.

Método y aceite esencial más efectivo



Nota. Combinación de método de actividad antimicrobiana y aceite esencial más efectivo. Elaboración propia, realizado con Excel.

ANEXOS

Anexo 1.

Condiciones de cultivos para la preparación de inóculos

Tabla 2. Condiciones de Cultivo para la Preparación de Inóculos

Organismo	Medio Apropriado	Temperatura de Incubación	Inóculo Tiempo de Incubación	Recuperación Microbiana Tiempo de Incubación
<i>Escherichia coli</i> (ATCC N° 8739)	Caldo Digerido de Caseína y Soja; Agar Digerido de Caseína y Soja	32,5 ± 2,5°	18 a 24 horas	3 a 5 días
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC N° 9027)	Caldo Digerido de Caseína y Soja; Agar Digerido de Caseína y Soja	32,5 ± 2,5°	18 a 24 horas	3 a 5 días
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC N° 6538)	Caldo Digerido de Caseína y Soja; Agar Digerido de Caseína y Soja	32,5 ± 2,5°	18 a 24 horas	3 a 5 días
<i>Candida albicans</i> (ATCC N° 10231)	Agar Sabouraud Dextrosa; Caldo Sabouraud Dextrosa	22,5 ± 2,5°	44 a 52 horas	3 a 5 días
<i>Aspergillus niger</i> (ATCC N° 16404)	Agar Sabouraud Dextrosa; Caldo Sabouraud Dextrosa	22,5 ± 2,5°	6 a 10 días	3 a 7 días

Nota. Condiciones de cultivos para la preparación de inóculos de los microorganismos estudiados. Obtenido de la Guía para la redacción de monografías de la FEUM (2007). *Farmacopea de los Estados Unidos de América, Formulario nacional.* (<https://www.farmacopea.org.mx/Repositorio/Preguntas/Guia%20de%20redaccion/Guia%20de%20Redaccion%20final%2020131010.pdf>), consultado el 1 de junio de 2022. De dominio público.

Anexo 2.

Ficha técnica de Agar Dextrosa Sabouraud



Certificate of Analysis

1.05438.0500 SABOURAUD 4% dextrose agar for microbiology (According harm. EP/
USP/JP)
Batch VM942138

	Spec. Values	Batch Values
Appearance (clearness)	clear	clear
Appearance (color)	yellowish-brown	yellowish-brown
pH-value (25 °C)	5.4 - 5.8	5.4

Typical composition (g/litre): Peptone from casein 5.0; Peptone from meat 5.0; D(+)-Glucose 40.0; Agar-agar 15.0.

	Spec. Values	Batch Values
Growth (Trichophyton mentagrophytes ATCC 18748)	fair to very good	moderately
Growth (Trichophyton rubrum ATCC 28188)	fair to good	moderately
Growth (Trichophyton ajelloi ATCC 28454)	fair to good	good
Growth (Microsporum gallinae ATCC 12108)	fair to very good	good
Growth (Microsporum canis ATCC 36299)	good to very good	very good
Growth (Geotrichum candidum DSM 1240)	good to very good	very good
Growth (Penicillium commune ATCC 10428)	good to very good	very good

Incubation: 7 days; 28°C

	Spec. Values	Batch Values
Growth promotion test in accordance with the harmonised method of EP, USP and JP.		
Inoculum on reference medium (Candida albicans ATCC 10231 (WDCM 00054))	10 - 100	49
Inoculum on reference medium (Aspergillus brasiliensis (formerly A. niger) ATCC 16404 (WDCM 00053))	10 - 100	34
Colony count (Candida albicans ATCC 10231 (WDCM 00054))		38
Colony count (Aspergillus brasiliensis (formerly A. niger) ATCC 16404 (WDCM 00053))		27
Recovery on test medium (Candida albicans ATCC 10231 (WDCM 00054))	≥ 70 %	78 %
Recovery on test medium (Aspergillus brasiliensis (formerly A. niger) ATCC 16404 (WDCM 00053))	≥ 50 %	79 %

Incubation: C. albicans and A. brasiliensis up to 5 days at 20-25°C.
The information above is current at this time of publication and is subject to change without notice (except for customers holding a change control agreement with our company). The information/format can be altered at any time and in any way if internal company matters or Standard Regulations do say so.

Date of release (DD.MM.YYYY) 24.09.2020
Expiry date (DD.MM.YYYY) 31.08.2025

Nota. Certificado de análisis composición de Agar Dextrosa Sabouraud. Obtenido de SOLMER (2021). Merckmillipore. (https://www.merckmillipore.com/GT/es/product/SABOURAUD-40-0-dextrose-agar.MDA_CHEM-105438), consultado el 5 de mayo de 2022. De dominio público.

Anexo 3.

Ficha técnica del aceite esencial de canela

FICHA TÉCNICA	EXTRACT, S.A. NATURALMENTE ESENCIAL	
NOMBRE	ACEITE ESENCIAL DE CANELA CORTEZA	
NOMBRE BOTÁNICO	Cinnamomum zeylanicum, Blume.	
USOS	Materia Prima de uso industrial.	
CAS	8015-91-6	
EINECS	283-479-0	
FEMA	2291	

PARÁMETRO	ESPECIFICACIONES
Apariencia	Líquido Translucido
Color	Amarillo claro a marrón
Olor	Característico de canela
Sabor	---
Gravedad Específica	1.033 - 1.053
Índice de Refracción	1.529 - 1.537
Rotación Óptica	-2.0º a +1.0º
Solubilidad	Insoluble en agua
Presión a vapor	No determinada
Otras Solubilidades	Soluble en todas las diluciones entre 2.5 y 5 volúmenes de etanol al 70%

ESTABILIDAD Y ALMACENAJE

SE RECOMIENDA GUARDAR, ALEJADO DE LA LUZ DIRECTA, EN RECIPIENTES BIEN CERRADOS EN UN LUGAR FRESCO Y VENTILADO.

www.cardamomoil.com atencionalcliente@cardamomoil.com PBX: +502 2204-9400 24 Ave. Calzada Atanasio Tzul 42-85, zona 12, Guatemala

Nota. Especificaciones y datos técnicos del aceite esencial de canela *Cinnamomum Zeylanicum Blume*. Adaptado de EXTRACT, S.A. (2021). *Listado de materia prima de abril 2020*. p. 1.

Anexo 4.

Ficha técnica del aceite esencial de orégano

FICHA TÉCNICA	EXTRACT, S.A. NATURALMENTE ESENCIAL	
NOMBRE	ACEITE ESENCIAL DE OREGANO	
NOMBRE BOTÁNICO	Origanum vulgare Hirtum	
USOS	Materia Prima de uso industrial.	
CAS	84012-24-8	
EINECS	281-670-3	
FEMA	N.A.	

PARÁMETRO	ESPECIFICACIONES
Apariencia	Líquido translucido
Color	Amarillo a marrón
Olor	Terpénico fresco
Sabor	---
Gravedad Específica	0.910 a 0.980
Índice de Refracción	1.4850 – 1.525
Rotación Óptica	-4.0° a +4.0°
Solubilidad	Insoluble en agua
Presión a vapor	No determinada
Otras Solubilidades	Soluble en etanol al 90%, puede presentar ligera opalescencia.

ESTABILIDAD Y ALMACENAJE

SE RECOMIENDA GUARDAR, ALEJADO DE LA LUZ DIRECTA, EN RECIPIENTES BIEN CERRADOS EN UN LUGAR FRESCO Y VENTILADO.

www.cardamomoiil.com atencionalcliente@cardamomoiil.com PBX: +502 2204-9400 24 Ave. Calzada Atanasio Tzul 42-85, zona 12, Guatemala

Nota. Especificaciones y datos técnicos del aceite esencial de orégano *Origanum vulgare Hirtum*. Adaptado de EXTRACT, S.A. (2021). *Listado de materia prima de abril 2020*. p. 2.