



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

EVALUACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA DE ACEITES ESENCIALES DE CANELA (*Cinnamomum verum*), JENGIBRE (*Zingiber officinale*) Y CLAVO DE OLOR (*Syzygium aromaticum*) PARA APLICACIONES AGROINDUSTRIALES.

Autora

Jael Alejandra Jácome Jurado

Año
2019



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

EVALUACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA DE ACEITES ESENCIALES DE CANELA (*Cinnamomum verum*), JENGIBRE (*Zingiber officinale*) Y CLAVO DE OLOR (*Syzygium aromaticum*) PARA APLICACIONES AGROINDUSTRIALES.

“Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos para optar por el título de Ingeniera Agroindustrial y de Alimentos”

Profesor Guía

PhD. Janeth Fabiola Proaño Bastidas

Autora

Jael Alejandra Jácome Jurado

Año

2019

DECLARACION DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber guiado este trabajo, Determinar el efecto bactericida de aceites esenciales de canela (*Cinnamomum verum*), jengibre (*Zingiber officinale*) y clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), a través de reuniones periódicas con la estudiante Jael Alejandra Jácome Jurado, en el semestre 201910, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Janeth Fabiola Proaño Bastidas

Doctora en Ingeniería Industrial

C.C: 1706515564

DECLARACION DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, DETERMINAR EL EFECTO BACTERICIDA DE ACEITES ESENCIALES DE CANELA (*Cinnamomum verum*), JENGIBRE (*Zingiber officinale*) Y CLAVO DE OLOR (*Syzygium aromaticum*), de la estudiante Jael Alejandra Jácome Jurado, en el semestre 201910, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Bolívar Edmundo Silva López

Magister en Gestión de la Producción

C.C: 1706480694

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Jael Alejandra Jácome Jurado

C.C: 1717939415

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al universo por facilitarme la sabiduría, dedicación y esfuerzo en todo el proceso de la tesis.

DEDICATORIA

A mi madre que siempre me apoyado.

RESUMEN

La presente investigación se la realizó en el laboratorio de química de la Universidad de las Américas, con el propósito de evaluar la capacidad bactericida de los aceites esenciales de canela (*Cinnamomum verum*), jengibre (*Zingiber officinale*) y clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y sus mezclas diferenciándolos en seis tratamientos que son: T1 (AE de canela), T2 (AE de jengibre), T3 (AE de clavo de olor), T4 (AE de canela y jengibre), T5 (AE de canela y clavo de olor), T6 (AE de jengibre y clavo de olor), frente a bacterias patógenas que se encuentran en la boca, para esto, primero se extrajeron los aceites esenciales mediante el método de hidrodestilación, luego se realizó la evaluación microbiológica con bacterias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* de cepas ATTC en Mueller-Hinton Agar, posteriormente se efectuaron las pruebas físico-químicas como: medición de pH, densidad, concentración de sólidos solubles (css) y el efecto antioxidante. El análisis estadístico de los datos mostró que el tratamiento T1 (AE de canela) tuvo gran capacidad de inhibición con $42,33 \pm 0,95$ mm en sus halos frente a *S. aureus*, el que le sigue es *E. coli* con 29,89 mm en sus halos de inhibición y $22,33 \pm 2,83$ mm para *E. faecalis*. El rendimiento de los AE fue 1,67 % para canela, 0,5% para jengibre y 1,11% para clavo de olor. En la prueba del efecto antioxidante el clavo de olor tuvo 93,89%, jengibre 91,27% y canela 86,70% en su capacidad de absorbancia.

Palabras clave: aceite esencial, canela, jengibre, clavo de olor, antibacteriano.

ABSTRACT

The present investigation was carried out in the chemistry laboratory of the University of the Americas, with the purpose of evaluating the bactericidal capacity of the essential oils of cinnamon (*Cinnamomum verum*), ginger (*Zingiber officinale*) and clove (*Syzygium aromaticum*) and their mixtures differentiating them into six treatments that are: T1 (Cinnamon AE), T2 (Ginger AE), T3 (Clove AE), T4 (Cinnamon and Ginger AE), T5 (Cinnamon AE and Clove Nail). smell), T6 (AE of ginger and cloves), against pathogenic bacteria found in the mouth, for this first the essential oils were extracted by the hydrodistillation method, then the microbiological evaluation was carried out with bacteria: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* of ATTC strains in Mueller-Hinton Agar, subsequently the physicochemical tests were carried out as: pH measurement, density, concentration of soluble solids (css) and antioxidant affect. The statistical analysis of the data showed that the treatment T1 (AE of cinnamon) had great capacity of inhibition with 42.33 ± 0.95 mm in its halos compared to *S. aureus*, the next one is *E. coli* with 29, 89 mm in its inhibition zones and 22.33 ± 2.83 mm for *E. faecalis*. The yield of EAs was 1.67% for cinnamon, 0.5% for ginger and 1.11% for cloves. In the antioxidant effect test the clove had 93.89%, ginger 91.27% and cinnamon 86.70% in its absorbance capacity.

Keywords: essential oil, cinnamon, ginger, clove, antibacterial.

ÍNDICE

1. INTRODUCCION.....	1
1.1 Alcance	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo general.....	3
2.2 Objetivos específicos	3
3. MARCO TEÓRICO	3
3.1 Aceites Esenciales.....	3
3.2 Aceites Esenciales en la industria.....	8
3.3 Situación de Aceites Esenciales a nivel mundial.....	9
3.4 Canela (<i>Cinnamomum verum</i>).....	12
3.5 Jengibre (<i>Zingiber officinale</i>)	17
3.6 Clavo de Olor (<i>Syzygium aromaticum</i>)	22
3.7 Microorganismos de la boca.....	26
3.8.1 <i>Escherichia coli</i>	27
3.8.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	28
3.8.3 <i>Enterococcus faecalis</i>	28
4. METODOLOGÍA	29
4.1 Diseño experimental.....	29
4.2 Hipótesis.....	30
4.3 Obtención de los Aceites Esenciales.....	31
4.4 Variables de Estudio.....	37
4.4.1 Análisis Microbiológico.....	38
4.4.1.1 Procedimiento para prueba de difusión por disco.....	40
4.4.2 Análisis Fisicoquímico.....	46
4.4.2.1 PH.....	46
4.4.2.2 Densidad.....	47
4.4.2.3 Concentración de sólidos solubles.....	47

4.4.2.4 Medición del Efecto antioxidante de los aceites esenciales.....	49
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
5.1 Variables de Estudio	52
5.1.1 Análisis Microbiológico.....	52
5.1.1.1 <i>Eschericha Coli</i>	52
5.1.1.2 <i>Staphylococcus Aureus</i>	56
5.1.1.3 <i>Enterococcus Faecalis</i>	59
5.1.2 Análisis Fisicoquímico de los Aceites Esenciales	62
5.1.2.1 pH	62
5.1.2.2 Densidad.....	63
5.4.3.3 Concentración de Sólidos Solubles	64
5.4.3.4 Efecto Antioxidante	65
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	67
6.1 Conclusiones.....	67
6.2 Recomendaciones	68
REFERENCIAS	69
ANEXOS	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los aceites esenciales.....	4
Tabla 2. Importación de aceites esenciales a Ecuador, 2014-2017	10
Tabla 3. Clasificación taxonómica de la Canela	14
Tabla 4. Compuestos volátiles presentes en el aceite esencial de Canela	15
Tabla 5. Clasificación taxonómica del Jengibre.....	18
Tabla 6. Compuestos volátiles presentes en el aceite esencial de Jengibre....	20
Tabla 7. Clasificación taxonómica del Clavo de Olor	23
Tabla 8. Compuestos volátiles presentes en el aceite esencial de Clavo de Olor	25
Tabla 9. Descripción de los tratamientos aplicados a las cajas Petri	30
Tabla 10. Composición de Agar Mueller-Hinton	38
Tabla 11. ANOVA para E. coli.....	53
Tabla 12. Promedio y Tukey para E. coli.....	53
Tabla 13. ANOVA para S. Aureus	56
Tabla 14. Promedio y Tukey para S. Aureus.....	57
Tabla 15. ANOVA para E. Faecalis	59
Tabla 16. Promedio y Tukey para E. Faecalis.....	60
Tabla 17. pH de los AE	62
Tabla 18. Densidad de los AE	63
Tabla 19. Concentración de Sólidos Solubles de los AE.....	64
Tabla 20. Efecto Antioxidante de los AE	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplo de mono- y sesquiterpenos de origen natural.	5
Figura 2. Ejemplo de fenilpropanos que están en los aceites esenciales de origen natural.	6
Figura 3. Equipo Clevenger para procesos de hidrodestilación.	8
Figura 4. Treemap de las exportaciones de Aceites Esenciales a nivel mundial del año 2016.	12
Figura 5. Planta de canela.....	13
Figura 6. Planta de jengibre.	18
Figura 7. Tipos de cultivos de jengibre (<i>Z. officinale</i>).	20
Figura 8. Planta de Clavo de Olor (<i>Syzygium aromaticum</i>).....	23
Figura 9. Diagrama de flujo de la obtención del Aceite Esencial de Canela (<i>Cinnamomum verum</i>).....	32
Figura 10. Obtención del Aceite Esencial de Canela (<i>Cinnamomum verum</i>) por medio del método hidrodestilación.....	33
Figura 11. Diagrama de flujo de la obtención del Aceite Esencial de jengibre (<i>Zingiber officinale</i>).....	34
Figura 12. Obtención del Aceite Esencial de Jengibre (<i>Zingiber officinale</i>) por medio del método hidrodestilación.....	35
Figura 13. Diagrama de flujo de la obtención del Aceite Esencial de Clavo de Olor (<i>Syzygium aromaticum</i>).....	36
Figura 14. Obtención del Aceite Esencial de Clavo de Olor (<i>Syzygium aromaticum</i>) por medio del método hidrodestilación.....	37
Figura 15. Difco TM Agar Mueller Hinton.	39
Figura 16. Colonias aisladas de <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	41
Figura 17. Selección de colonias, suspensión y agitación del agente patógeno.....	42
Figura 18. Resultado de la escala de McFarland.	42
Figura 19. Cajas Petri con Agar Mueller-Hinton.	43
Figura 20. Cámara de Flujo Laminar SafeFAST Classic.....	43

Figura 21. Recolección del agente patógeno con el hisopo de algodón estéril.....	44
Figura 22. Frotado del inóculo a la caja Petri con Agar Mueller-Hinton.....	45
Figura 23. Colocación del disco en la caja Petri con Agar Mueller-Hinton.	45
Figura 24. Cajas Petri listas para la incubadora.	46
Figura 25. Determinación de pH en aceite esencial.	47
Figura 26. Pesaje del vidrio de reloj con aceite esencial.....	48
Figura 27. Muestras ya pesadas y mufla prendida con la temperatura adecuada.....	49
Figura 28. Colocación de la muestra de aceite esencial en la cubeta con DPPH.	51
Figura 29. Colocación de la cubeta en el Espectrofotómetro UV-Visible THERMO SCIENTIFIC.....	51
Figura 30. Tukey de la bacteria E. Coli.	54
Figura 31. Tukey de la bacteria S. Aureus.	58
Figura 32. Tukey de la bacteria E. Faecalis.	61

1. INTRODUCCION

1.1 Alcance

En tiempos actuales, existe una gran demanda de productos de origen natural procedentes de plantas, ya que el estilo de vida de las personas ha cambiado en varios aspectos como: la alimentación, higiene, deporte, etc. Cada vez más la industria desarrolla productos obtenidos de plantas que contrarrestan a los posibles patógenos en el ámbito alimenticio, farmacéutico y cosmetológico, sin embargo aunque la tecnología siga progresando, todavía no se logra reemplazar algunos componentes químicos con compuestos naturales en su totalidad.

Las plantas han sido siempre una fuente indispensable para la obtención de productos beneficiosos en la historia de la humanidad. El constante desarrollo tecnológico favoreció no solo a una mejor utilización de estos recursos, sino también un mayor conocimiento de sus virtudes y posibilidades. La tendencia actual en el aprovechamiento de estos productos naturales es procurar el mayor efecto con la menor injerencia en su sustentabilidad. La tecnología actual busca por un lado cada vez más especificidad y por el otro diversidad de efectos. (Arnaldo et al., 2009)

A partir de los años 2000 se encontró muy novedoso el uso de enjuagues bucales, ya que se realizaron investigaciones que después del cepillado seguían presentes dichas bacterias u organismos vivos depositados en los dientes, que ahora comúnmente se les llama placa bacteriana, se experimentó con ellas y se encontró que añadiendo vinagre o brandy se lograron inmovilizar, matando estos microorganismos presentes en la boca, pero no por mucho tiempo. Desde entonces el interés comercial por el enjuague ha sido intenso, y ha aumentado la demanda de productos para combatir la placa bacteriana y las infecciones que conlleva, como la gingivitis (Jenkins et al., 1994).

Diversos estudios han demostrado que los productos de higiene oral a base alcohol pueden resultar perjudiciales y manifestarse como un riesgo para la salud, trayendo consecuencias a largo plazo. Según el estudio del efecto local de los colutorios (enjuagues bucales) con contenido alcohólico por Lorca-Salañer y Carrasquer-Burguesa (2005), menciona que el alcohol viene siendo parte de la formulación de enjuagues bucales por más de 50 años y que no está libre de causar efectos secundarios en las células epiteliales, por esta razón no se lo recomiendan a pacientes con mucosas sensibles y lesiones, además a los colutorios con contenido de alcohol se le atribuyen posibles efectos en el desarrollo de lesiones de cáncer oral. Hasta hace poco tiempo la mayoría de enjuagues bucales contenían alcohol, en distintas proporciones, en su formulación. A finales de los años 70 aparecieron publicaciones científicas que sugerían una posible asociación entre el uso diario de enjuagues bucales con alto contenido de alcohol y la aparición de cáncer orofaríngeo y se empezó a cuestionar la seguridad del alcohol como componente de enjuagues bucales. Como medida de precaución, aunque de forma no justificada, la tendencia ha sido a la comercialización de productos que contienen cantidades relativamente bajas de alcohol y a la formulación de colutorios sin alcohol.

La presente investigación evalúa el efecto bactericida de aceites esenciales (canela, jengibre, clavo de olor y sus mezclas) mediante la metodología in vitro en Mueller-Hinton Agar, el cual es especializado para evaluar procedimientos de antibiosis, con el propósito de comprobar su capacidad inhibitoria frente a bacterias que se hallan en la mucosa bucal como: *Escherichia coli* (ATTC 35218), *Staphylococcus aureus* (ATTC BAA976) y *Enterococcus faecalis* (ATTC 29212).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar el efecto bactericida de aceites esenciales de canela (*Cinnamomum verum*), jengibre (*Zingiber officinale*) y clavo de olor (*Syzygium aromaticum*).

2.2 Objetivos específicos

1. Obtener los extractos de canela (*Cinnamomum verum*), jengibre (*Zingiber officinale*) y clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) por el método de hidrodestilación.
2. Evaluar la capacidad antimicrobiana de los extractos in vitro frente a bacterias presentes en la mucosa bucal.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Aceites Esenciales

Existen millones de plantas en el planeta Tierra y tan solo conocemos aproximadamente cuatro mil aceites esenciales, estos son extractos puros adquiridos de plantas aromáticas de los cuales se originan mezclas de compuestos de complicada composición química, que deben ser secretados y almacenados en diferentes sistemas del material vegetal (Ortuño, 2006). Tienen por nombre aceites esenciales, ya que por su aspecto físico y su solidez son un conjunto de células grasas o lipídicas, de origen volátil y consecuentemente poseen características aromáticas; el rendimiento y la constitución de cada aceite va depender de cada especie a extraer (Castaño, 2012).

Dependiendo específicamente del tipo de planta aromática para obtener aceites esenciales se pueden utilizar hojas, flores, frutos, raíces o toda la

estructura anatómica vegetal expuesta, ya que puede haber una mayor o menor concentración de compuestos fenólicos y fracciones volátiles (responsables de las actividades biológicas en las plantas) en cualquiera de sus partes, por esta razón los aceites esenciales son costosos, ya que se necesita una numerosa cantidad de materia prima para obtenerlos (Llambí, 2016). Se pueden clasificar como indica la tabla 1.

Tabla 1.

Clasificación de los aceites esenciales.

Clasificación	Descripción
Consistencia	Esencias fluidas
	Bálsamos
	Oleorresinas
Origen	Naturales
	Sintéticos
	Artificiales

Adaptado de Martínez, 2003.

Los compuestos químicos que se hallan inmersos en toda la parte anatómica del material vegetal se llaman aceites esenciales y conforme varias investigaciones se determinaron algunas semejanzas que los conformaron y clasificaron en familias dependiendo a su formulación molecular por ejemplo algunos presentaron átomos de carbono que en la mayoría de esa combinación eran múltiplo de 5, algunos de ellos siendo alcoholes o éteres, otros cetonas o aldehídos y también por la formación de anillos, uno o dobles enlaces que se disponen en su estructura (Ege, 2004).

Según Toledo (2005) los aceites esenciales están compuestos de mezclas de metabolitos que tienen características organolépticas, propiedades biológicas y como consecuencia efectos sedantes, estimulantes y equilibrantes, esto se debe a los miles de constituyentes que poseen y en cierta forma logró clasificar los aceites esenciales en once familias como:

- Ésteres (relajantes, sedativos, antifúngicos)
- Hidrocarburos Alifáticos (relajantes)
- Cetonas (relajantes, mucólitico)
- Sesquiterpenos (equilibrantes) y Monoterpenos (estimulantes)

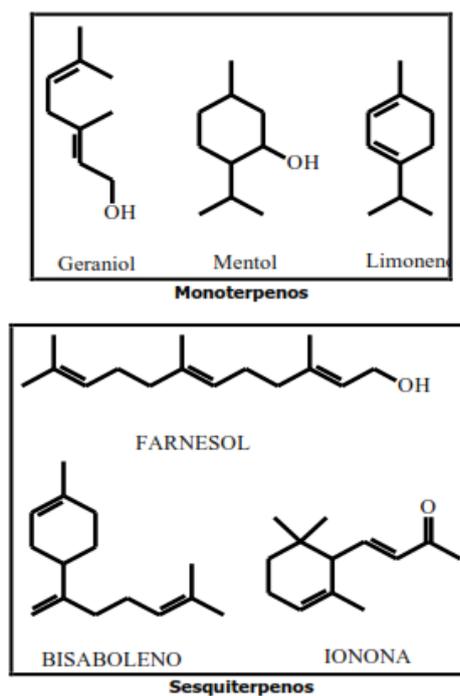


Figura 1. Ejemplo de mono- y sesquiterpenos de origen natural.

Tomado de (Martínez, 2003)

- Lactonas y Cumarinas (equilibrantes)
- Óxidos (ligeramente estimulantes)
- Ácidos (ligeramente estimulantes)
- Aromáticos (ligeramente estimulantes)

- Alcoholes (estimulantes)
- Fenilpropanos (estimulantes)

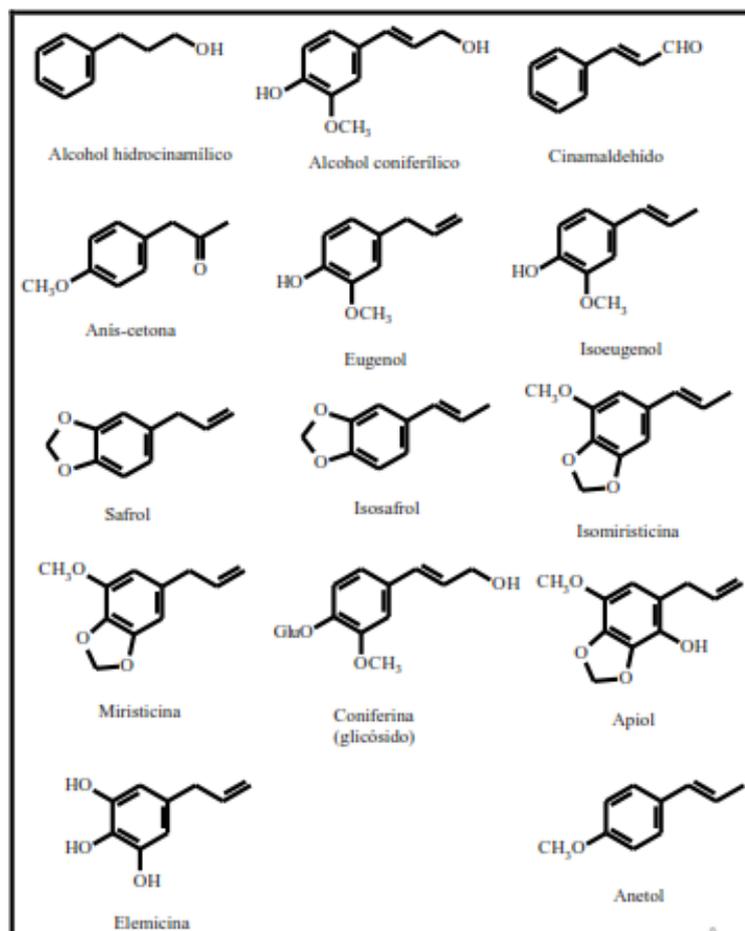


Figura 2. Ejemplo de fenilpropanos que están en los aceites esenciales de origen natural.

Tomado de (Martínez, 2003)

3.1 Métodos de extracción de los aceites esenciales

Cuando se procede a extraer inicialmente los aceites esenciales de material vegetal, se debe conocer que existen diferentes metodologías de extracción como dice Martínez (2003) son: expresión, extracción con fluidos supercríticos,

extracción con solventes volátiles, enfleurage en frío y por último hidrodestilación o arrastre con vapor de agua.

En la metodología de expresión se procede a exprimir la materia prima para sacar el aceite esencial, este pasa por un proceso de filtración y es bastante utilizado en el caso de los aceites esenciales cítricos. La más reciente metodología de extracción es por fluidos supercríticos, cada vez las industrias están aplicando esta técnica que tiene por ventaja no arruinar la composición del aceite, ni dejar ningún tipo de residualidad en el mismo y el rendimiento es bastante alto. En esta metodología se utilizan altas presiones y gases, lo que demanda un alto costo para su extracción (Ortuño, 2006). La extracción por solventes volátiles es manejada más en los laboratorios, ya que por la utilización de solventes orgánicos de origen volátil, no se emplean en las industrias, por su costo elevado y por el riesgo a explosiones. El proceso de enfleurage es más común para la extracción de esencias florales como su nombre lo indica, también es uno de los más antiguos y actualmente ya no es tan utilizado en la industria, consta que las plantas se sumerjan en aceite vegetal (sustancia extractora), se obtienen dos mezclas, para luego ser separadas mediante procesos físico-químicos (Martínez, 2003).

El proceso de hidrodestilación o arrastre del aceite esencial mediante vapor de agua, hidrofusión o hidroextracción, tiene varios nombres ya que depende del tipo de condición de vapor de agua al que se somete el material vegetal, también va a depender del equipo que se utilice para su extracción. El equipo más utilizado en los laboratorios es el Clevenger, se compone de un matraz que va conectado a un condensador que es en forma de D. Cuando la planta se encuentra en pleno contacto con el agua que está generando vapor saturado a presión atmosférica, se le denomina "hidrodestilación", el material vegetal (puede ser molido, cortado, troceado, seco, fresco, entero o la mixtura de éstos) que se encuentra a ebullición desprende un efluente interno de agua, ya que pasa por un proceso de condensación del vapor que está circulando y el aceite esencial va saliendo, arrastrado hacia arriba y pasa por un cuello de cisne, el cual va a ser enfriado a temperatura ambiente y condensado. Se va a

obtener una mezcla líquida estable de agua y aceite, para luego proceder a separar el aceite esencial puro (Rodríguez, Alcaráz y Real, 2012). Esta metodología es bastante aplicada en la industria farmacéutica, cosmetológica y alimentaria debido a su alto rendimiento y bajo costo, también al ser un proceso de fácil manipulación porque los equipos son sencillos (Ortuño, 2006).

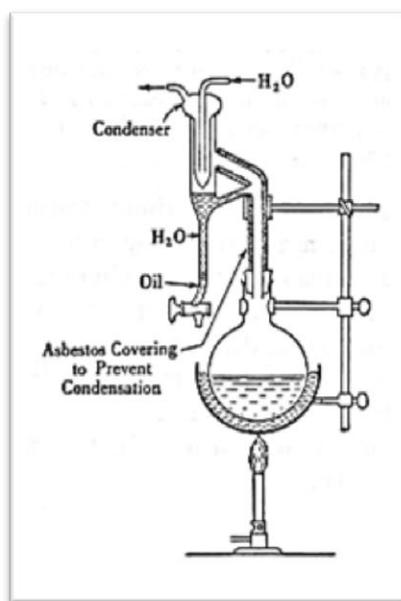


Figura 3. Equipo Clevenger para procesos de hidrodestilación.

Tomado de (Rodríguez et al., 2012)

3.2 Aceites Esenciales en la industria

A nivel mundial y actualmente los aceites esenciales han sido estudiados cada vez más, porque se ha evidenciado un cambio significativo en la población por optar consumir productos de origen natural, que sean seguros y de alta calidad (Reyes, Palou y López, 2012). Se conoce dado a varias investigaciones y actividades demostradas, que los aceites esenciales por su composición química y biológica, poseen propiedades antimicrobianas, fungicidas, antibacterianas, antioxidantes, etc. Siendo un compuesto altamente promisorio para la industria de perfumería, farmacéutica, alimenticia, cosmetológica y el sector agroindustrial (Bandoni, Retta, Di Leo Lira y Baren, 2009).

Los principales usos de los aceites esenciales es muy variado y tienen diferentes aplicaciones en rubros de la industria y la ciencia, comenzando en la industria de alimentos, que los más utilizados son: cilantro, naranja, menta, clavo, entre otros para la condimentación de cualquier derivado de carne de origen animal, también como aditivos de principio natural, saborizantes, colorantes e incluso antioxidantes en bebidas alcohólicas y no alcohólicas, quesos, además son empleados en la elaboración de chocolates y confites (Giraldo, Escobar, y Taborda, 2012). En tiempos actuales los AE son utilizados para disminuir y encubrir olores en la industria textil, producción de juguetes y papel, también en los artículos industriales como es el caucho, plásticos y pinturas que llevan precitado biodegradable como el compuesto limoneno. La industria del tabaco no se queda atrás con los tabacos mentolados en los cuales utilizan el aceite de menta. En productos de manejo veterinario el AE de *Chenopodium ambrosoides* es muy aprovechado ya que posee entre sus componentes ascaridol, que actúa como antiparasitario. En la industria farmacéutica y cosmetológica se emplean varios AE como: hinojo, menta, eucalipto (para las pastas dentales y colutorios bucales) gracias a su acción antiséptica y antiguamente utilizaban el de clavo por el eugenol que es un compuesto analgésico, lavanda, rosas, árbol de té, entre otros para la fabricación de jabones, shampoo, maquillaje, perfumes (brindar y fijar olores), colonias e inclusive se utilizan para anular algunos sabores repugnantes de los medicamentos como los AE de naranja, menta y otros de origen cítrico. Asimismo son usados como pesticidas y biocidas en el campo de la agricultura, los más utilizados contra insectos, bacterias y hongos son: tomillo, salvia, menta, anís, albahaca, lemongrass, ruda, citronela, romero, eneldo, comino, ajenjo, laurel, eucalipto, cardamomo, caléndula, entre otros han comprobado su acción en hormigas, pulgas, moscas, polillas, piojos, cucarachas, áfidos, entre otros (Bermúdez-Cañete, 2000).

3.3 Situación de Aceites Esenciales a nivel mundial

(Ege, 2004) Ecuador siendo un país reconocido por la flora abundante y la gran diversidad de plantas muy útiles para el ser humano, han sido vastamente estudiadas ya que por la posición geográfica del país, resulta muy promisorio para la siembra de cultivos de uso medicinal que datan de ser alrededor de 3000 especies de plantas en el país (Balslev, Navarrete, De la Torre, y Macía, 2008).

Las plantas origen medicinal en el Ecuador, han resultado recientemente muy populares para su exportación y uso. Al Ecuador todavía se lo cataloga como un país nuevo en la producción de aceites esenciales crudos, existen muy pocas industrias que elaboran aceites esenciales, además de las pequeñas industrias o emprendimientos que abastecen a las zonas locales, con el apoyo de sociedades comunitarias que fomentan el desarrollo rural. Los aceites esenciales que más se producen y comercializan son: menta, eucalipto, jengibre, pino, romero y los que se derivan de frutas como naranja, limón, entre otras (Del Valle y Zambrano, 2015).

Según Proecuador (2011) las importaciones de aceites esenciales a Ecuador ha tenido un volumen de aproximadamente 166 toneladas. Como indica en la tabla 2 se detallan los países que exportan aceites esenciales a Ecuador.

Tabla 2.

Importación de aceites esenciales a Ecuador, 2014-2017.

País	2014	2015	2016	2017
Exportador				
Estados Unidos	408.521	530.215	575.284	940.581
España	285.998	238.749	151.118	195.846
India	19.712	111.05	98.856	168.417

Corea del Sur	81.537	63.361	62.617	20.680
Alemania	45.193	65.675	39.777	93.653
Colombia	30.334	17.384	70.167	71.531
Bélgica	88.443	80.067	13.792	46.190
Canadá	13.479	48.830	68.856	35.660
México	1.803	6.336	16.731	3.393
Otros	130.352	183.148	162.105	206.337
Total	1.105.372	1.233.765	1.259.303	1.782.288

Adaptado de (Ecuador, 2017)

Nota: los valores son unidades exportadas equivalentes en ml.

La tabla 2 muestra que hasta la fecha los países que más han exportado AE a nuestro país son Estados Unidos y España, que se ha mantenido en aumento hasta la actualidad. En el mercado nacional la organización de los aceites esenciales va desde los que suministran al mercado local, los que utilizan los dichos aceites y los que exportan o los re-exportadores (Proecuador, 2011).

Según Verlet (1992) la producción de aceites esenciales en un 75% se origina de una variedad de plantas perennes leñosas a nivel universal y que la mayoría de esta obtención es de origen cítrico, el otro 25% de producción de aceite esencial se deriva de plantas herbáceas y lo faltante se lo atribuye a plantas silvestres que no asciende al 1%. Los aceites esenciales más producidos y utilizados a nivel mundial son: todos los de origen cítrico, naranja, lima, limón, eucalipto, may chang, limonaria, menta, lavandins, pinos, lavanda, bergamota, jazmín y citronela que llegan a formar el 85% de demanda en el mercado.

Según el valor FBO o libre a bordo indica que Estados Unidos lidera las exportaciones de aceites esenciales que ha tenido una alza hasta el año 2016 con (\$ 609 millones), la India (\$ 536 millones), al igual que China que ha tenido una evolución alta hasta el año 2015 y ha ido disminuyendo con (\$ 398 millones), siguiéndole Brasil con (\$ 327 millones), en total son \$ 4,75 miles de millones de exportaciones a nivel mundial como indica en la figura 12.

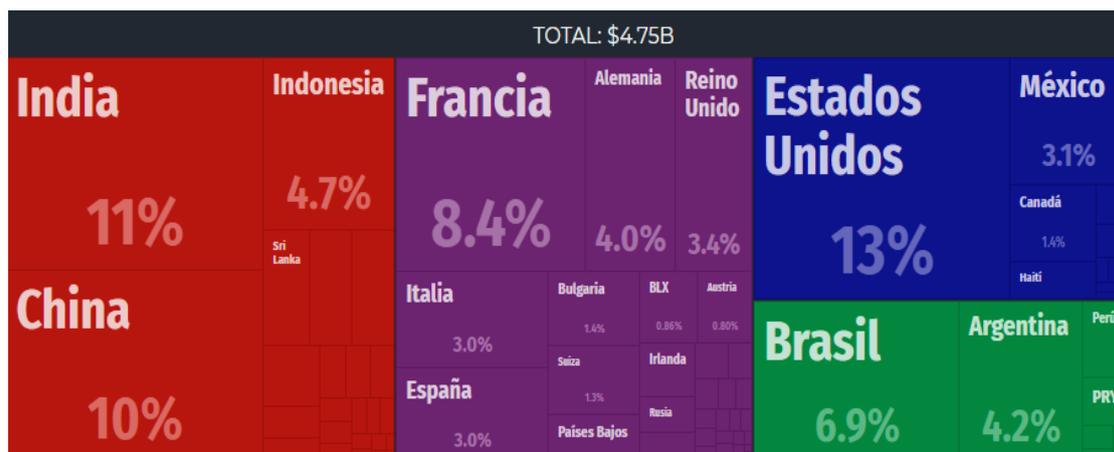


Figura 4. Treemap de las exportaciones de Aceites Esenciales a nivel mundial del año 2016.

Tomado de (Feenstra, 2005)

Las estimaciones estudiadas aseguran, que las remesas mundiales de aceites esenciales seguirán creciendo de manera exponencial. Es de gran importancia señalar que hace algunas décadas el consumo y producción de aceites esenciales ha crecido de una manera exponencial por parte de la industria de sabores y aromas naturales, al igual que los consumidores prefieren consumir productos naturales, orgánicos, que tengan trazabilidad, amables con el medio ambiente y que perduren en el tiempo (Forero-peñuela, Forero-peñuela, Deschamps, y Alves-porsse, 2017).

3.4 Canela (*Cinnamomum verum*)

Según Arango (2006) la expresión *Cinnamomum* proviene de la combinación *cina* (canela de origen chino) y *amos* (planta de la familia del jengibre con una semejanza de olor a la canela, que también quiere decir “caña pequeña”), la especia tiene una apariencia de bastoncitos envueltos de color café oscuro, que emanan un potente olor aromático al quebrarse y para uso industrial se utilizan las hojas, corteza seca del árbol y sus ramas.

Nombrada “la princesa de las especias”, la canela es una de las más comúnmente empleadas desde tiempos inmemorables para medicinas herbales, proveniente de la India, China y Sri Lanka (país que más exporta y produce la corteza y aceite de hoja de canela), se aloja en climas calientes y templados. La canela se obtiene del árbol de canelo, siendo un árbol perenne tropical, que puede llegar a medir de 2.5 m hasta 20 m de altura aproximadamente, que posee una corteza gruesa de color amarillo pálido siendo está muy fragante, dulce y con sabor picante con hojas ovaladas lanceoladas, sus flores son pequeñas que crecen en grupo y son hermafroditas, el fruto tiene una sola semilla y es de color índigo morado (Rosselló y Armitt, 2016).



Figura 5. Planta de canela.

Tomado de (The herb gardener, 2005)

Clasificación taxonómica de la Canela

Existen casi 250 especies de canela reconocidas en el mundo y solo 4 de ellas son aprovechadas como especia, las cuales son: *Cinnamomum burmannii* (Ness y T. Ness) proveniente de las islas de Indonesia es la variedad más comúnmente vendida en los Estados Unidos, *Cinnamomum loureiroi* Nees originaria de Vietnam y es muy parecida en composición a la canela encontrada en China, *Cinnamomum zeylanicum* Blume o *Cinnamomum verum* J. Presl, estas variedades son las más utilizadas para fines comerciales y de exportación provenientes de Sri Lanka y *Cinnamomum aromaticum* Nees o *Cinnamomum cassia* (L) J. Presl que se encuentran identificadas en China (Ribeiro-Santos et al., 2017).

En la clasificación de la canela se observa una igualdad en los nombres científicos, más los dos nombres son reconocidos y se utilizan como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3.

Clasificación taxonómica de la Canela

Clasificación	Descripción
Nombre científico	<i>Cinnamomum Zeylanicum</i> Nees
Sinonimia	<i>Cinnamomum verum</i> J. S. Presl
Nombre común	Canela, cinammon (inglés), canelo, canela de Ceilán (España)
Familia	Lauraceae
Clase	Magnoliophyta
Genero	<i>Cinnamomum</i>
Orden	Lurales
Reino	Plantae

Adaptado de (Fonnegra & Jiménez, 2007).

Condiciones de cultivo de Canela

Las zonas más propicias para cultivar el árbol de canelo, dependen de las buenas prácticas de cultivación, etapa de maduración y el clima debe ser tropical y subtropical, donde el ambiente sea cálido y húmedo, el suelo con buen drenaje debe estar regado, no empapado, ya que el sabor de la corteza se torna amargo. En estas condiciones se demora 3 años hasta la cosecha, en producción intensiva los árboles de canela tienden a crecer como arbustos, en la mayoría de los casos, por esta razón crecen hasta 3 m como máximo (Ribeiro-Santos et al., 2017).

Compuestos químicos de la Canela

En general los compuestos del aceite esencial de canela (*Cinnamomum verum* o *Zeylanicum*), posee muchas variables y va a depender en gran escala al método de extracción o proceso del mismo, geografía y tiempo del cultivo, edad de la planta y el trozo de material vegetal a extraer (Ribeiro-Santos et al., 2017), entre los compuestos químicos encontrados en el aceite esencial de la corteza están: cinamaldehído (60-80%) causante del sabor dulce de la canela, eugenol y metil eugenol (2%), cinamil acetato, cinamil alcohol y cumarinas como muestra en la tabla 4 más detalladamente (Fonnegra & Jiménez, 2007).

Tabla 4.

Compuestos volátiles presentes en el aceite esencial de Canela (Cinnamomum verum o Zeylanicum)

Compuesto	Extracto de la corteza
Alfa-Pineno	3.02%
Beta-Pineno	1.23%
P- Cimeno	0.81%
Limoneno	2.53%

Linalol	4.82%
Alfa-Terpineol	0.26%
Benzaldehído	1.80%
Cinamaldehído	64.49%
Eugenol	16.57%
Beta-Cariofileno	1.10%
Acetato de cinamilo	1.15%
Alfa-Humuleno	0.20%
Acetil Eugenol	0.48%
Benzoato de bencilo	0.49%
Canfeno	2.7%
Alfa-Felandreno	2.1%
Alfa-Terpineno	1.8%
Beta-Felandreno	6.3%
Alfa-Terpinoleno	0.2%
Óxido de cariofileno	0.5%
Cumarina	0.9%

Adaptado de (Ribeiro-Santos et al., 2017).

Aplicaciones de la Canela

A nivel mundial la canela es empleada en la industria alimenticia, ya que posee ese aroma y sabor dulce, picante para sazonar cualquier tipo de comida, también como saborizante, colorante, edulcorante y conservante en la mayoría de bebidas y comidas, además su uso es muy popular en medicina tradicional, medicina natural y herbaria, en productos de higiene oral, cosméticos, perfumes y producción de pesticidas. Debido a los principales compuestos del AE de canela que se encuentran en mayor proporción como el eugenol y el cinamaldehído (compuesto científicamente comprobado que reduce índices de colesterol) poseen altos niveles de actividad antioxidante debido los flavonoides y los antioxidantes fenólicos, de acuerdo a varias investigaciones dice que

eugenol y el cinamaldehído conjuntamente poseen propiedades bactericidas, nematocidas, fungicidas, antiinflamatorias, antitumoral, antivirales y anestésicas, ya que frena los radicales libres presentes en el cuerpo humano (Ribeiro-Santos et al., 2017).

3.5 Jengibre (*Zingiber officinale*)

(Berdonces i Serra, 2000) La planta de jengibre es muy venerada, ya que se la consideró un fósil que tiene vida y se la sembraba en las afueras de los santuarios e iglesias en China, Galeno la detallo como “rizoma de la Barbaria”, el termino *zingiber* proviene de la palabra zingibil del idioma hindi. Originaria del continente asiático tropical y los países como: China, Japón, India, Vietnam y Malasia. Se utilizan los rizomas o raíz deshidratada para especia por su sabor fuerte muy picoso y también sus hojas (Arango, 2006).

El jengibre es una planta perenne, con un olor muy característico aromático y su raíz toma un sabor picante y agrio, la planta puede llegar a medir de 80 cm a 2 m de altura, crece en forma de tubérculo horizontal grueso, succulento y articulado en forma de mano que se lo denomina rizoma, el cual posee nódulos de color café claro por fuera y blanquecino amarillento por dentro (Leyva, Ferrada, Martínez y Stashenko, 2007), su tallo es subterráneo y simple, de estos salen brotes aéreos transversales, con hojas ovaladas, dispuestas en forma lineal, la inflorescencia es muy vistosa de color amarillo que termina en violeta dispuesta en forma de una espiga, el fruto es seco en forma de píldora (Fonnegra & Jiménez, 2007).



Figura 6. Planta de jengibre.

Tomado de (Rothkranz, 2012)

Clasificación taxonómica del Jengibre

Según Zambrano-Blanco (2015) El jengibre es de género diploide ($2n=2$), la duplicación genética de esta planta es a partir de material vegetal o también llamada regeneración vegetativa, se lo considera un híbrido estéril por su variabilidad cromosómica de un cruce de especies muy remotas que no produce semilla, por esta razón se cree que su reproducción fue de evolución accidental y cabe recalcar que existen muy pocas variedades de jengibre, a pesar de esto en China y en India se han encontrado algunas variedades de jengibre de las cuales se han explotado para desarrollar variedades mejoradas.

En la tabla 5 se muestra la clasificación sistemática de la planta de jengibre.

Tabla 5.

Clasificación taxonómica del Jengibre

Clasificación	Descripción
Nombre científico	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe
Sinonimia	<i>Amomum zingiber</i> L, <i>Curmana</i>
Nombre común	<i>longifolia</i> Wall
Familia	Jengibre, gengibre, jengibre dulce, jengibre, ginger (inglés), raíz de jengibre Zingiberaceae
Clase	Liliopsida
Genero	<i>Zingiber</i>
Orden	Zingiberales
Reino	Plantae

Adaptado de (Arango, 2006).

Condiciones de cultivo del Jengibre

Para el cultivo de jengibre se precisa de un clima tropical a subtropical y puede llegar a desarrollarse hasta los 1000 msnm con temperaturas que ascienden desde los 17 grados como temperatura mínima hasta los 29 grados centígrados como máxima, el manejo del suelo para la preparación del cultivo se lo debe hacer en suelos franco arenosos y con buen desencantamiento, ya que en un suelo muy húmedo el tubérculo tiende a cambiar su sabor; la plantación de jengibre necesita de lluvias anuales entre 1500 y 2900 mm aproximadamente, por esta razón a la humedad relativa se la considera alta que va en rangos de 75-95% (Cevallos, 2012).

Como se mencionó anteriormente, esta especie se prolifera de forma asexual y presenta una extensa desigualdad genética entre los genotipos que se han sembrado en diferentes partes geográficas y en circunstancias ambientales diferentes (Zambrano-Blanco, 2015). En la figura 15 se observan los diferentes cultivos de jengibre (*Zingiber officinale*) en los países respectivos.

Pais	Cultivar
China	Chenggu Yellow, Dense-Ringed Delicate Fleshy, Fleshy, Fuzhou, Laifeng, Laiwu Big, Laiwu Slice, Maniyang, Red-bud, Red-claw, Sparse-Ringed Big, Fleshy, Tongling White, Xingguo, Xuancheng, Yellow-Claw, Yellow-heart, Yulin Round Fleshy, Yuxi Yellow, Zaoyang, Zunyi Big White
India	Amaravathy, Ambalavayalan, Assam, Athira, Baharica, Bhaise, Chekerella, Chernad, China, Ellakallan, Ernad Chernad, Gorubathani, Himachal, Himacha Local, Himgiri, Jorhat Hard Ermadan, Jorhat Local, Juggigan, Karakal, Karthika, Kerala Local, Kunduli, Kunnamangalam, Kuruppampadi, Mahima, Mananthody, Maran, Mowshom, Nadan, Nadia, Poona, Pullpally, Rejatha, Rio de Janeiro, Sabarimala, SG 692, SG61, Suprabha, Suravi, Suruchi, Swathing Pui, Thingladium, Thingpui, Thodupuzha, V3S1, Valluvanad, Varada, Wayanad, Wynad Kunnamangalam, Wynad Local, Zahirabad
Jamaica	Blue Turmeric, Bull Blue, China Blue, Red Eye, St. Mary
Japón	Kintoki, Oshoga, Sanshu, 4X Sanshu
Malasia	Halyia, Halyia Udang, Halyia Bara, Pink, White Skinned
Nigeria	Taffingiwa, Yasun Bari
Filipinas	Hawaiian, Native

Figura 7. Tipos de cultivos de jengibre (*Z. officinale*).

Tomado de (Zambrano-Blanco, 2015).

Compuestos químicos del Jengibre

Existen alrededor de 60-70 compuestos volátiles identificados aproximadamente del aceite esencial de jengibre (*Zingiber officinale*), entre los más se evidencian el zingibereno y el alfa-curcumeno (Vásquez Ribeiro, Alva y Valles, 2001) como se detalla en la tabla 6.

Tabla 6.

Compuestos volátiles presentes en el aceite esencial de Jengibre (Zingiber officinale)

Compuesto	Porcentaje	Porcentaje
Geranial	11.6–14.0 %	1.10 %
Neral	9.7–10.4 %	
Borneol	3.6-4.0 %	
Geraniol	1.2-3.5 %	

Citronelol	2.0-2.9 %	
Linalool	2.0-2.4 %	
Alfa-Zingibereno	1.8-2.3 %	22.22 %
Alfa-Pineno	7.7-8.4%	
Beta-sesquifelandreno	3.8-4.5 %	9.44 %
Beta-Bisaboleno	3.5-4.0 %	
E,E-alfa-Farneseno	3.2-3.6 %	
Ar-Curcumeno	2.8-3.3 %	13.11 %
Canfeno	5.4-6.4 %	
Mirceno	1.2-4.5 %	
Teraniol		3.33 %
Citral		1.25 %
Beta-Mirceno		1.47 %
No identificados		48.08 %
Referencias	(Leyva et al., 2017)	(Vásquez Ribeiro et al., 2001)

Adaptado de (Leyva et al., 2017).

Aplicaciones del Jengibre

Entre muchas especias el jengibre es una de las más utilizadas y comercializadas, entre los años 2010 y 2014 se evidenció un incremento en la producción de jengibre del 23,11% que contaba con 322.157 ha de cultivo, también se reflejó una industrialización elevada de jengibre en estado fresco, en polvo o deshidratado (proceso que más se comercializa a nivel mundial con un 70% de demanda), jugo de jengibre y en forma de pasta; de los usos que se le atribuye al jengibre están principalmente en forma de especia el desarrollo de oleorresinas, aceites esenciales y una variedad infinita de productos en la industria de alimentos (bebidas, sopas, condimentos, preservantes, etc.) debido a su acción antimicrobiana; para la fabricación de perfumes, en industria cosmetológica e incluso farmacéutica (Shukla, Goud y Das, 2019).

Debido a sus propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias, bactericidas, antieméticas e incluso por sus componentes químicos como el gingerol y shogaol que según Zambrano-Blanco (2015) dice que el jengibre cuenta con cualidades anticancerígenas.

3.6 Clavo de Olor (*Syzygium aromaticum*)

El clavo de olor, llamado así por su forma de clavo de metal, fue muy conocido debido a su gran aroma a picante que se empleaba como condimento y aplicaciones como medicinas herbarias (combatiendo el mal aliento y dolores de muelas), es oriundo del este de Indonesia, el cual también se lo encontró en las áreas remotas del Asia, en las llamadas Islas de las Especies o Molucas (Sánchez, 2013). Poco a poco se fue esparciendo su uso desde Malasia, India, hasta las islas del Océano Índico y finalmente hasta América por los conquistadores europeos alrededor del siglo XVII, (Geilfus, 1994).

Actualmente los mayores productores del cultivo de clavo son los países de Indonesia, Tanzania, Madagascar, Malasia, Sri Lanka e India y en la zona de América Latina en el único país que se siembra árboles de clavo es Brasil con 8000 ha y alrededor de 2450 a 2600 toneladas producidas anualmente según Cortés-Rojas, de Souza y Oliveira (2014).

El árbol de clavo llega a medir aproximadamente de 8 a 15 m, el tronco es llano de color plomizo y se extiende alrededor del suelo, sus hojas nuevas son prolongadas, relucientes y ovaladas-oblongas, los botones cuando son nuevos son rosados y ya maduros se tornan rojizos (estos se golpean, caen y pasan por un proceso de secado para su comercialización), si se los deja madurar se convierten en flores rojas y crecen agrupadas en racimos de tres y posteriormente desarrollan una baya larga de color amarillo o rojo con forma alongada (Ángeles y Veloz, 2011).



Figura 8. Planta de Clavo de Olor (*Syzygium aromaticum*).

Tomado de (McCormick, 2012)

Clasificación taxonómica del Clavo de Olor

En la tabla número 7 se detalla la clasificación sistemática de la planta de Clavo de Olor.

Tabla 7.

Clasificación taxonómica del Clavo de Olor

Clasificación	Descripción
Nombre científico	<i>Syzygium aromaticum</i> L. Merr.
Sinonimia	<i>Syzygium aromaticum</i> (sin. <i>Eugenia aromatic</i> , <i>Eugenia caryophylla</i>)
Nombre común	Clavo de olor, clavero de olor, clove
Familia	(ingles)

	Mirtáceas
Clase	Magnoliopsida
Genero	<i>Syzygium</i>
Orden	Myrtales
Reino	Plantae

Adaptado de (Geilfus, 1994).

Condiciones de cultivo del Clavo de Olor

Para cultivar el árbol de clavelero se necesita una altura de 200 msnm y un clima tropical húmedo (con lluvias anuales de 1.500 hasta 3.000 mm) con suelos ácidos de gran profundidad y que posean buen drenaje, el cultivo es de origen perenne y generalmente florece dos a tres veces en el año, desde su siembra se espera la cosecha cerca de los 4 años para que aparezcan los botones, estos son recolectados ya maduros antes de la etapa de florecimiento, manualmente o con un químico que utiliza una fitohormona que libera etileno, pues esta hormona es la que ayuda a la maduración temprana de los frutos (Cortés-Rojas et al., 2014). El tipo de propagación del árbol de clavelero es a través de semillas certificadas y algunas veces se las remoja en agua fría precedentemente de la siembra, en la India utilizan otros métodos de propagación que resultan muy difíciles y complicados como son los injertos con aproximación o enlaces de madera (Geilfus, 1994).

Compuestos químicos del Clavo de Olor

Entre los compuestos mayoritarios que posee el aceite esencial de clavelero de olor (*Syzygium aromaticum* L. Merr.) están: eugenol, acetato de eugenilo, alfa-humuleno y beta-cariofileno, , existen otros compuestos en menor proporción como: beta-pineno, limonene, farsenol, timol, carvacrol, benzaldehído, 2-heptanona y hexanoato de etilo (Cortés-Rojas et al., 2014).

El porcentaje y la concentración de estos compuestos van a depender de la zona de cultivo, ya que en India se encontraron 28 compuestos del AE y en Madagascar se registraron casi 35 compuestos del AE del botón seco (Aguilar-González y López-Malo, 2013). Se detallan en la tabla 8 los compuestos del aceite esencial de clavo extraído mediante el proceso de hidrodestilación.

Tabla 8.

Compuestos volátiles presentes en el aceite esencial de Clavo de Olor

Compuesto	Porcentaje	Porcentaje	Porcentaje
Eugenol	83.6 %	49-87 %	
Acetato de Eugenilo	11.6 %	0.5-21 %	2.1 %
Cariofileno	4.2 %	4-21 %	
Alfa-humuleno			1.9 %
(E) Alfa-bergamoteno			1.3 %
Iso-eugenol-I			0.8 %
y-cadineno			0.8 %
(E)-nero-lidol			0.1%
Alo-aromadendreno			0.3%
Selineno			0.1 %
Referencias	(Costa et al., 2011)	(Moura et al., 2012)	(Srivastava et al., 2005)

Adaptado de (Aguilar-González y López-Malo, 2013).

Aplicaciones del Clavo de Olor

Según Aguilar-González y López-Malo (2013) los usos y aplicaciones del clavo de olor han sido muy variados dentro de la industria, ya que se le atribuyen propiedades bactericidas, como antifúngicas e incluso antivirales, al aceite esencial y extractos de clavo de olor, los cuales han sido puestos a prueba con resultados muy favorables, el responsable de la actividad antimicrobiana es el

extracto etanólico y el eugenol del clavo de olor (*S. aromaticum*); por lo cual en la actualidad existe una gran producción y demanda de los botones de clavo en estado seco y molido, en la industria alimenticia se emplea como preservante y conservante natural extendiendo así la vida útil del producto ante patógenos, también se utilizan sus extractos como saborizantes y odoríferos, al igual que en la industria de perfumería y cosmetológica que se emplean sus aceites y extractos. En una investigación realizada por Phasomkusolsil y Soonwera (2011), en el campo agrícola se ha reportado el uso del aceite de clavo como repelente de insectos ante la presencia de la mosca de fiebre amarilla, mosquito vector de filariasis y mosquito vector de malaria que resultaron ser sensibles a las soluciones preparadas con especias entre ellas el clavo de olor.

Dentro de la medicina tradicional, odontólogos han utilizado el clavo desde el siglo XIII como analgésico, antiespasmódico en dolor de dientes, articulaciones, debido a que el eugenol activa los canales de calcio, sodio y cloruro, además de su efecto antagónico de la capsaicina. Por último la gran capacidad antioxidante que presenta esta especia por los compuestos antioxidantes y fenólicos, específicamente se encontraron ácidos fenólicos, glucósidos flavonólicos, aceites volátiles fenólicos (eugenol, acetil eugenol) y taninos como compuestos fenólicos de mayor presencia que previenen la oxidación de las células, ya que pueden reaccionar en cadena, produciendo radicales libres (Cortés-Rojas et al., 2014).

3.7 Microorganismos de la boca

La microbiota oral de las personas se dispone y varía muy independientemente de su diferenciación geográfica, de la dieta y generalmente conserva una relación de equilibrio con el individuo. Esta puede ser de ayuda en parte para el huésped, ya que evita que los probables patógenos colonicen la zona bucal en su superficie, la superficie oral se encuentra poblada de microorganismos bacterianos en todo momento, algunos de ellos se disponen en ecosistemas en la mucosa bucal y pueden tornarse dañinos para el huésped. Comúnmente

antes de nacer nuestra cavidad bucal es estéril nacimiento y después de 4 a 13 horas la cavidad oral empieza a contaminarse de *Streptococcus viridans*, a medida que pasa el tiempo las bacterias siguen mutando y aparecen algunas como: estafilococos aerobios, lactobacilos y algunos gramnegativos, estas se evidencian al primer y segundo mes de vida del individuo, luego posterior a la dentición empiezan a aflorar otras como: espiroquetas anaerobias, *Fusobacterium*, *Capnocytophaga* y *Rothia*, entre ellos algunos lactobacilos y anaerobios (Peña, Calzado da Silva, González, Cordero y Azahares, 2012).

Cruz, Díaz, Arias y Mazón (2017) comentan que debido a varias investigaciones se prueba que la microbiota oral es la responsable de las caries y las alteraciones periodontales que aquejan al hombre y además de esto contribuyen a dolencias más graves como tumores, diabetes mellitus y trastornos cardiovasculares. Es admitido también que los microorganismos bucales ocasionan afecciones simultáneamente y depende de las interacciones entre las especies que coexisten en la superficie bucal en los diferentes hábitats dentro de la boca, como asimismo de sus variables que son: cantidad de oxígeno, temperatura, existencias de nutrientes, las propiedades anatómicas y la exposición a causas inmunológicas, por esta razón la microbiota es de gran importancia y participa en el rol del estímulo, constitución y la inmunidad que posee el alojado o huésped. Dentro de la boca existen 6 mil millones de bacterias aproximadamente, la mayoría de ellas cambian para tomar provecho del hospedador y continuar su proceso de evolución.

3.7.1 *Escherichia coli*

La llamada bacteria *E. coli* es un anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*, del grupo *Escherichia*, se lo valora como microorganismo de flora normal, también se lo reconoce como un bacilo gram negativo, la bacteria a corto tiempo tras el nacimiento se desarrolla muy rápidamente en el intestino, existen cuatro tipos de *E. coli* que pueden tornarse patógenas y provocar enfermedades del tracto digestivo como la diarrea, gastroenteritis,

hasta incluso enfermedades renales (Guadalupe Rodriguez-Angeles, 2002), no obstante la bacteria también se aloja en el conducto bucal y allí puede presentar enfermedades periodontales (Maritza Peña Sisto et al., 2012).

El medio de contagio de esta bacteria es a través de alimentos contaminados o falta de higiene de los que manipulan dichos alimentos.

3.7.2 *Staphylococcus aureus*

Este tipo de microorganismo catalogado como uno de los primordiales patógenos existentes para el ser humano, es un anaerobio facultativo de la familia *Micrococcaceae*, del grupo *Staphylococcus*, la bacteria *Staphylococcus aureus* es un coco gram-positivo que no posee movilidad.

Esta especie tiene alto nivel de patogenicidad, con casi más de 30 especies que se localizan en la piel como hábitat natural, membranas mucosas (entre ellas la cavidad oral, nasal) que originan varias enfermedades como lesiones de la piel, abscesos, infecciones como: respiratorias, urinarias, osteomielitis y endocarditis, también produce intoxicación estomacal provocada por las enterotoxinas que se hallan en los alimentos contaminados (Bustos-Mártinez, Hamdan-Partida y Gutiérrez-Cárdenas, 2006). Se realizó un estudio con trabajadores del servicio de limpieza hospitalario que demuestra la detección de *S. aureus* en la cavidad bucal con una prevalencia del 20,6% de colonización, las infecciones por esta bacteria empiezan por la colonización de la misma por lo que es importante mencionar que debido a este patógeno en América Latina existe una tasa de 31% de pacientes con infecciones de piel y tejidos blandos, entre ellas mucosas (Almeida-Cruz, Pimenta, Hayashida, Eidt, y Gir, 2011).

3.7.3 *Enterococcus faecalis*

Al género *Enterococcus* se lo separó del género *Streptococcus* en el año 1970, ya que se demostró en estudios taxonómicos y de ácidos nucleicos que los géneros poseen una relación completamente distante, por ende en la actualidad pertenecen al grupo *Enterococcus* y es una bacteria gram-positiva, anaerobios facultativos, no formadores de endoesporas. La bacteria *Enterococcus faecalis* mora dentro del tracto digestivo o gastrointestinal de muchos organismos, abarcando al ser humano, también se localizan en el tracto genitourinario y en la saliva, ocasionando enfermedades como endocarditis, bacteriemias enterocóccicas, enfermedades neonatales, infecciones del tracto urinario, intraabdominales y pélvicas (Pérez, Martínez, y Zhurbenko, 2010).

Dentro de los microorganismos relacionados con la periodontitis apical asintomática o PAA, que engloba a un conjunto de enfermedades inflamatorias con patogénesis de origen complejo, que origina después de esta inflamación una necrosis pulpar debido a caries y según Ardila, Maggiolo, Dreyer, Armijo, y Silva (2014) que concluyó después de su investigación, de la cual participaron 18 pacientes con PAA, que la bacteria *Enterococcus faecalis* tuvo una prevalencia en las infecciones periodontales por lo tanto se recomendó tener una asepsia muy rigurosa en los procedimientos dentales y de endodoncias.

4. METODOLOGÍA

4.1 Diseño experimental

La presente investigación se la realizó en el laboratorio de química de la Universidad de las Américas. El diseño experimental se estableció a partir del número de repeticiones y consecuentemente a las pruebas complementarias al estudio a evaluar. Tuvo una duración de nueve meses, en los cuales se extrajeron los aceites esenciales de canela (*Cinnamomum verum*), jengibre (*Zingiber officinale*) y clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y se realizaron las pruebas bactericidas respectivas in vitro. Se realizó un diseño de bloques

completamente al azar para analizar el efecto bactericida de los tratamientos que se indican en la tabla 9. Se evaluaron seis tratamientos con tres réplicas.

Tabla 9.

Descripción de los tratamientos aplicados a las cajas Petri.

Tratamientos	Descripción	Bacterias
Tratamiento 1	Aceite esencial de canela.	E. coli S. aureus E. feacalis
Tratamiento 2	Aceite esencial de jengibre.	E. coli S. aureus E. feacalis
Tratamiento 3	Aceite esencial de clavo de olor.	E. coli S. aureus E. feacalis
Tratamiento 4	Aceite esencial de canela y jengibre.	E. coli S. aureus E. feacalis
Tratamiento 5	Aceite esencial de canela y clavo de olor.	E. coli S. aureus E. feacalis
Tratamiento 6	Aceite esencial de jengibre y clavo de olor.	E. coli S. aureus E. feacalis

4.2 Hipótesis

Hipótesis para *E. coli*

Ho= Halo inhibición *E. coli* T1 = Halo inhibición *E. coli* T2 = Halo inhibición *E. coli* T3 = Halo inhibición *E. coli* T4 = Halo inhibición *E. coli* T5 = Halo inhibición *E. coli* T6.

Ha= Halo inhibición *E. coli* T1 \neq Halo inhibición *E. coli* T2 \neq Halo inhibición *E. coli* T3 \neq Halo inhibición *E. coli* T4 \neq Halo inhibición *E. coli* T5 \neq Halo inhibición *E. coli* T6.

Hipótesis para *S. aureus*

Ho= Halo inhibición *S. aureus* T1 = Halo inhibición *S. aureus* T2 = Halo inhibición *S. aureus* T3 = Halo inhibición *S. aureus* T4 = Halo inhibición *S. aureus* T5 = Halo inhibición *S. aureus* T6.

Ha= Halo inhibición *S. aureus* T1 \neq Halo inhibición *S. aureus* T2 \neq Halo inhibición *S. aureus* T3 \neq Halo inhibición *S. aureus* T4 \neq Halo inhibición *S. aureus* T5 \neq Halo inhibición *S. aureus* T6.

Hipótesis para *E. faecalis*

Ho= Halo inhibición *E. faecalis* T1 = Halo inhibición *E. faecalis* T2 = Halo inhibición *E. faecalis* T3 = Halo inhibición *E. faecalis* T4 = Halo inhibición *E. faecalis* T5 = Halo inhibición *E. faecalis* T6.

Ha= Halo inhibición *E. faecalis* T1 \neq Halo inhibición *E. faecalis* T2 \neq Halo inhibición *E. faecalis* T3 \neq Halo inhibición *E. faecalis* T4 \neq Halo inhibición *E. faecalis* T5 \neq Halo inhibición *E. faecalis* T6.

4.3 Obtención de los Aceites Esenciales

Se extrajeron los aceites esenciales de canela (*Cinnamomum verum*), jengibre (*Zingiber officinale*) y clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) por el método de

hidrodestilación o destilación por arrastre de vapor de cada planta correspondientemente:

Canela: se extrajo el aceite esencial de canela a partir de las ramas secas del tronco del árbol *Cinnamomum verum* como muestra en el siguiente diagrama de flujo:

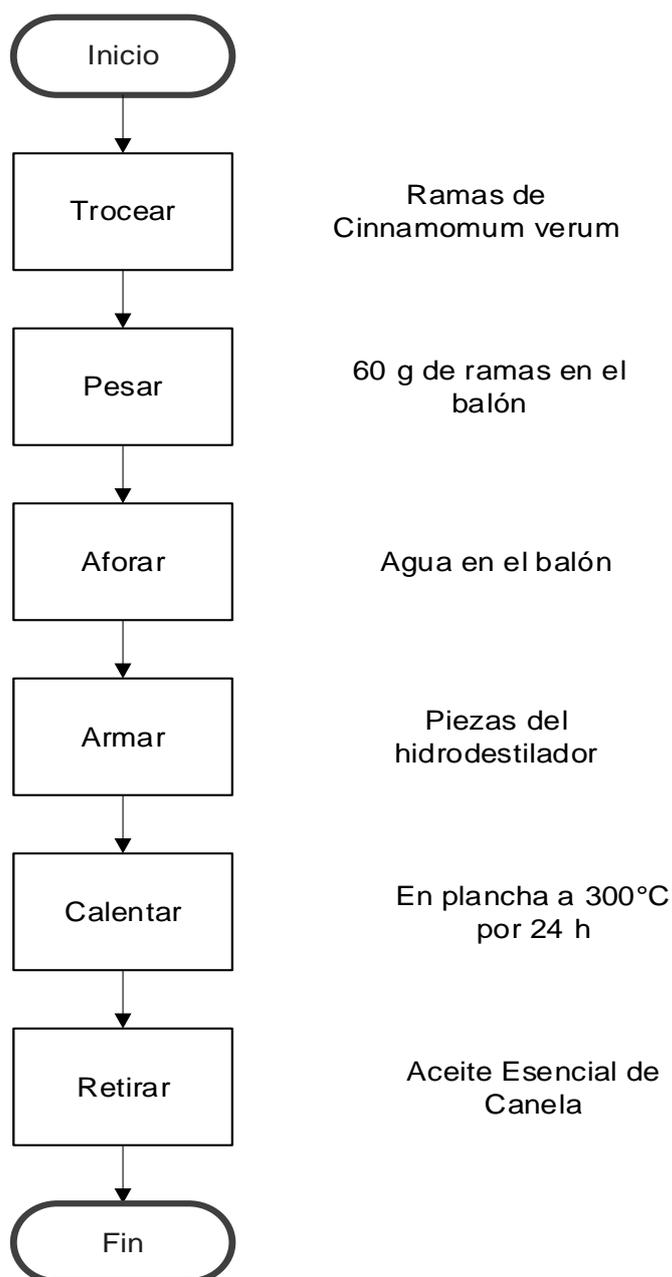


Figura 9. Diagrama de flujo de la obtención del Aceite Esencial de Canela (*Cinnamomum verum*).

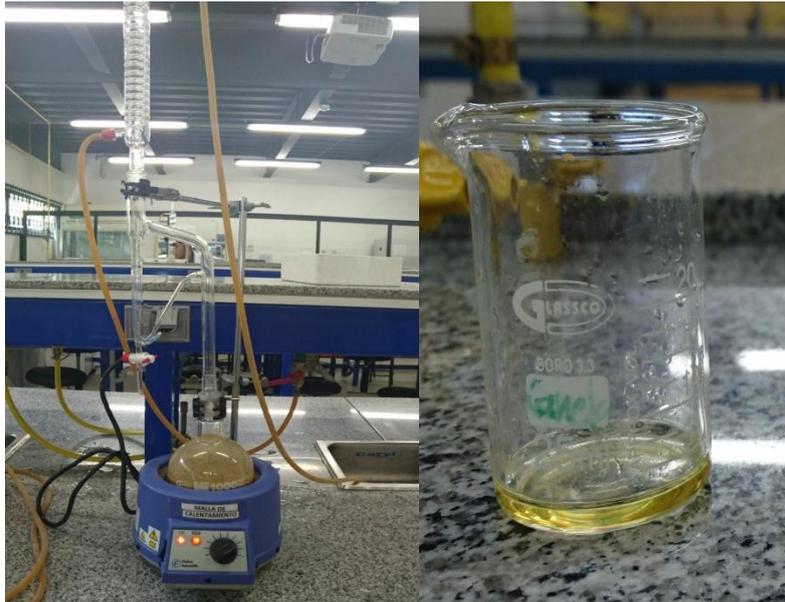


Figura 10. Obtención del Aceite Esencial de Canela (*Cinnamomum verum*) por medio del método hidrodestilación.

Para calcular el rendimiento del aceite esencial de canela (*Cinnamomum verum*) se utilizó la siguiente ecuación 1.

(Ecuación 1)

$$\% \text{ Rendimiento} = (\text{ml de aceite esencial}) / (\text{g de planta aromática}) * 100$$

$$\% \text{ Rendimiento} = 1 \text{ ml de aceite esencial de canela } (Cinnamomum \text{ verum}) / (60 \text{ g de ramas}) * 100$$

$$\% \text{ Rendimiento} = 1,67.$$

Jengibre: se extrajo el aceite esencial de jengibre (*Zingiber officinale*) a partir de su raíz como muestra en el siguiente diagrama de flujo:

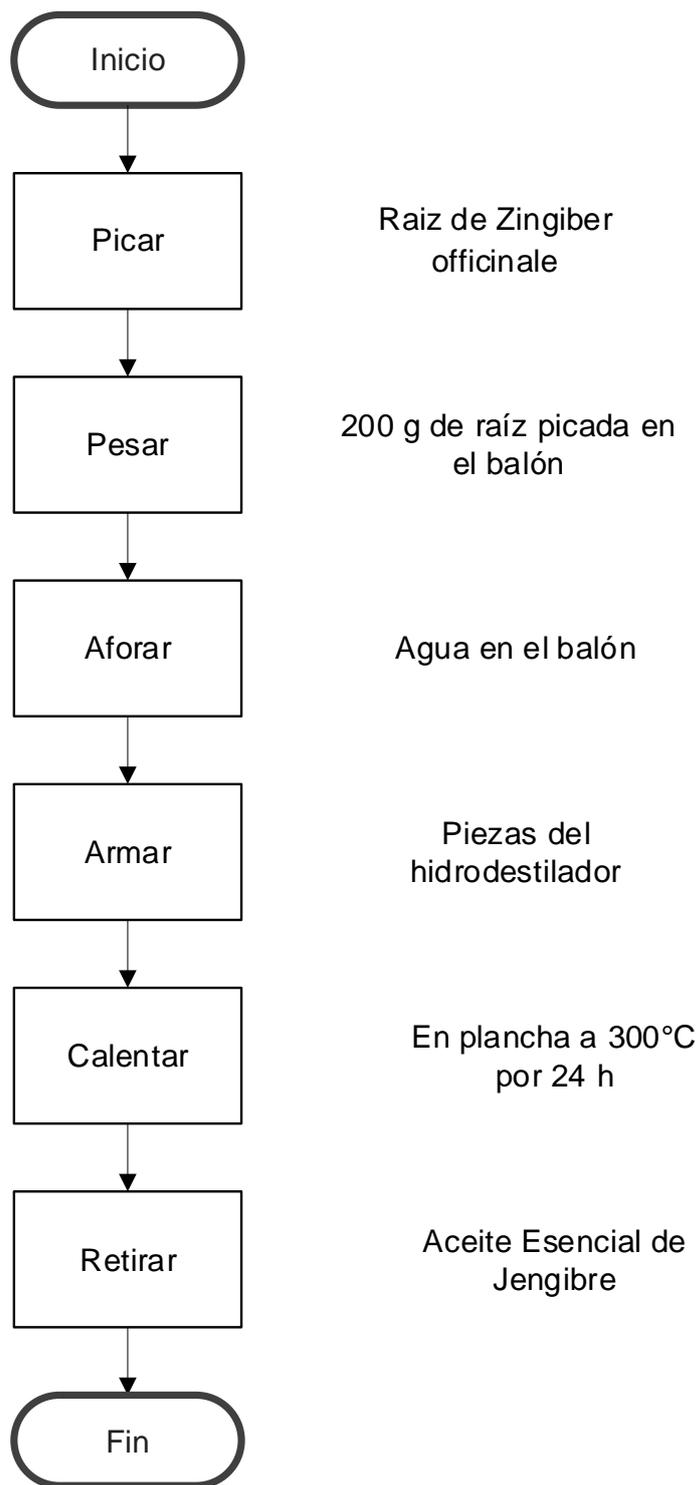


Figura 11. Diagrama de flujo de la obtención del Aceite Esencial de jengibre (Zingiber officinale).



Figura 12. Obtención del Aceite Esencial de Jengibre (*Zingiber officinale*) por medio del método hidrodestilación

Para calcular el rendimiento del aceite esencial de jengibre (*Zingiber officinale*) se utilizó la siguiente ecuación 2.

(Ecuación 2)

$$\% \text{ Rendimiento} = (\text{ml de aceite esencial}) / (\text{g de planta aromática}) * 100$$

$$\% \text{ Rendimiento} = 1 \text{ ml de aceite esencial de jengibre (Zingiber officinale)} / (200 \text{ g de raíz}) * 100$$

$$\% \text{ Rendimiento} = 0,5.$$

Clavo de olor: se extrajo el aceite esencial de clavo de olor a partir de sus botones secos (*Syzygium aromaticum*) como muestra el siguiente diagrama de flujo:

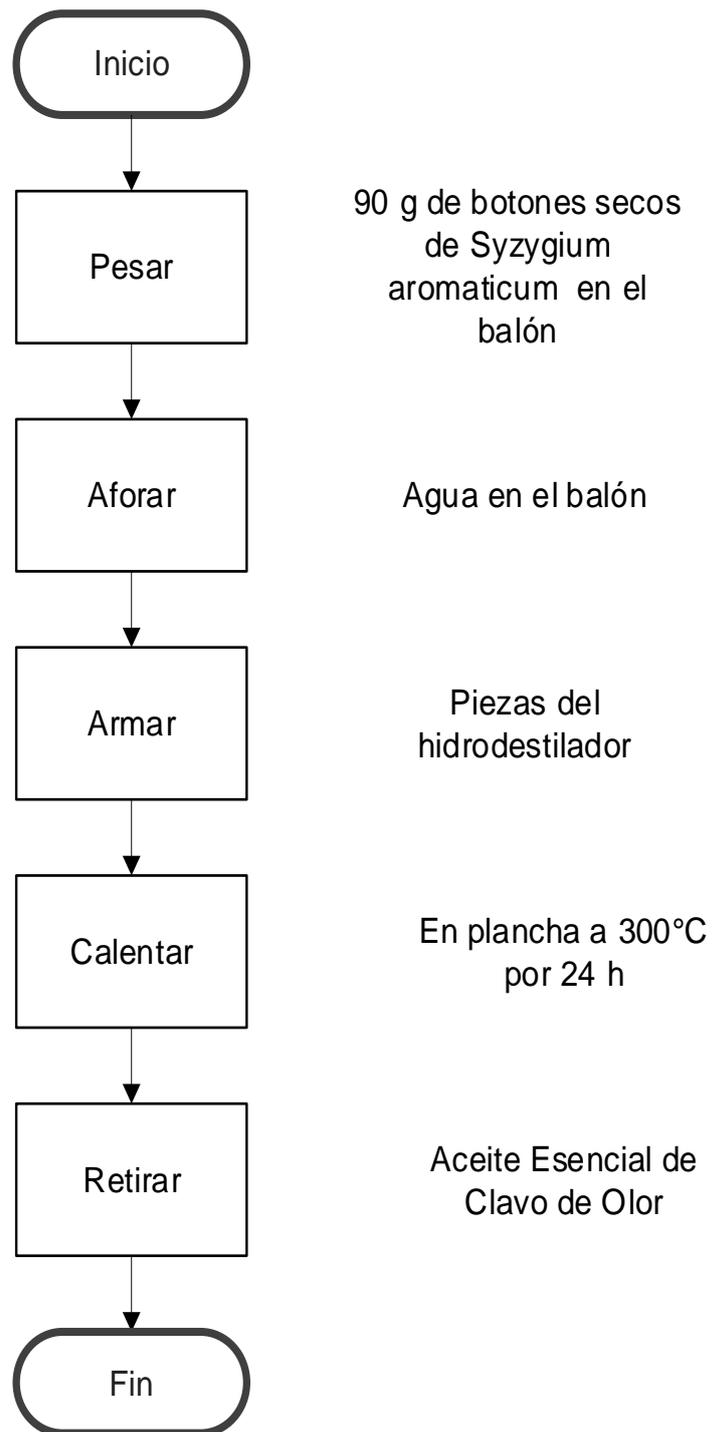


Figura 13. Diagrama de flujo de la obtención del Aceite Esencial de Clavo de Olor (*Syzygium aromaticum*).



Figura 14. Obtención del Aceite Esencial de Clavo de Olor (*Syzygium aromaticum*) por medio del método hidrodestilación.

Para calcular el rendimiento del aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) se utilizó la siguiente ecuación 3.

(Ecuación 3)

$$\% \text{ Rendimiento} = (\text{ml de aceite esencial}) / (\text{g de planta aromática}) * 100$$

$$\% \text{ Rendimiento} = 1 \text{ ml de aceite esencial de clavo de olor (} \textit{Syzygium aromaticum} \text{)} / (90 \text{ g de raíz}) * 100$$

$$\% \text{ Rendimiento} = 1,11.$$

4.4 Variables de Estudio

Se realizó pruebas físico-químicas además de las microbiológicas como: pH, densidad, concentración de sólidos solubles y la medición del efecto antioxidante de cada uno de los aceites esenciales previamente extraídos.

4.4.1 Análisis Microbiológico

Se aplicó la técnica de difusión en disco para procedimientos estandarizados cuantitativos para pruebas de sensibilidad antimicrobiana con Agar Mueller-Hinton, medio de cultivo general que fue reconocido por su fórmula y relativamente bueno en aspectos de reproducibilidad en el cual pueden crecer microorganismos fastidiosos como no fastidiosos (Bauer, A.W., W.M.M. Kirby, J.C. Sherris, 1966). Su composición esta detallada en la siguiente tabla.

Tabla 10.

Composición de Agar Mueller-Hinton.

Reactivos	Formula aproximada por litro de agua purificada
Hidrolizado ácido de caseína	17,5 g
Extracto de carne bovina	2,0 g
Almidón	1,5 g
Agar	17,0 g

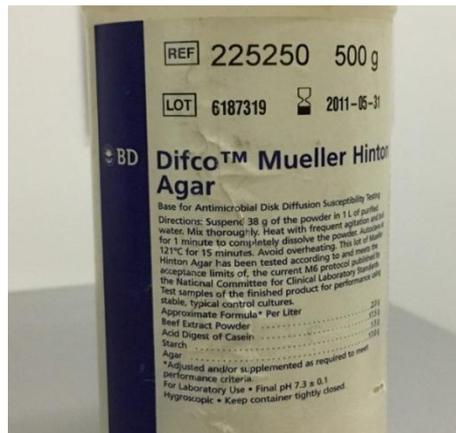


Figura 15. Difco TM Agar Mueller Hinton.

La técnica fue basada en las recomendaciones de El Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) que es una organización sin fines de lucro que brindan estándares y pautas de laboratorio.

Los microorganismos evaluados fueron de cepas puras y aisladas: *Escherichia coli* (ATTC 35218), *Staphylococcus aureus* (ATTC BAA976) y *Enterococcus faecalis* (ATTC 29212), que se obtuvieron del banco de bacterias del laboratorio de química de la Universidad de las Américas, y que fueron propuestas como bacterias que se encuentran en la mucosa bucal. Las instalaciones a utilizar del laboratorio de química fueron esterilizadas previamente a cada procedimiento realizado y de acuerdo a las recomendaciones de la CLSI se determinaron los materiales, equipos y técnica a aplicar para la investigación.

Materiales de laboratorio

- Cajas Petri con Agar Mueller-Hinton
- Hisopos
- Micropipeta BOECO SP SERIES de 0.5-10 μ l
- Puntas de micropipeta
- Gradilla
- Tubos de ensayo de vidrio
- Lámpara de alcohol

- Pinza de metal
- Agua de peptona
- Discos de papel filtro
- Asa de microbiología
- Vasos de precipitación de 25 ml

Equipos de laboratorio

- Refrigerador Hardman
- Balanza SHIMADZU TX 3202L
- Agitador BOECO PSU-10i
- Escala de MacFarland OXOID
- Incubadora INCUCCELL
- Contador de colonias BOECO Germany CC-1
- Autoclave Tuttnauer 3870
- Cámara de Flujo Laminar SafeFAST Classic

Reactivos

- *Escherichia coli* (ATTC 35218)
- *Staphylococcus aureus* (ATTC BAA976)
- *Enterococcus faecalis* (ATTC 29212)

4.4.1.1 Procedimiento para prueba de difusión por disco

La técnica para el procedimiento fue adaptada del manual de susceptibilidad, se procedió a seguir una serie de pasos como según indica en el manual.

1. Escoger las colonias.
2. Realizar una suspensión del agente patógeno.
3. Ajustar la suspensión del agente patógeno.
4. Transmitir en agente patógeno a la caja Petri.
5. Ubicar los discos de papel filtro en la caja Petri.

6. Colocar el antibiótico natural o aceite esencial en los discos de papel filtro.
7. Incubar las cajas Petri.
8. Medir halos de inhibición.
9. Explicar resultados.

Ya listas las colonias de bacterias aisladas que no excedan de 18-24 horas de aislamiento (figura 24).

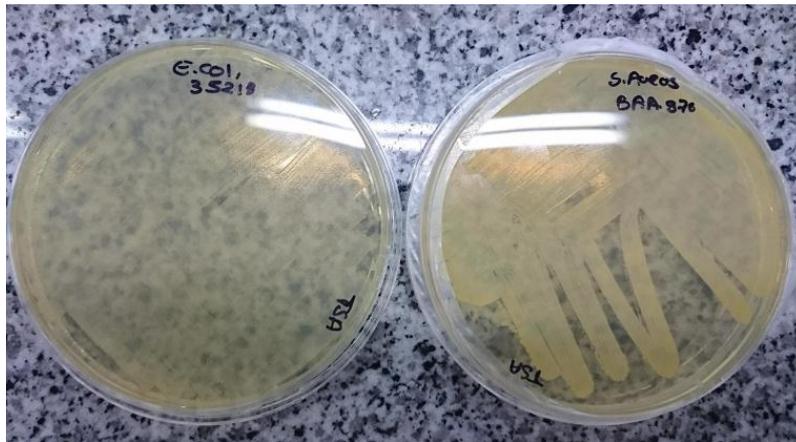


Figura 16. Colonias aisladas de *E. coli* y *S. aureus*.

Se recogió de dos a tres colonias bien aisladas con el asa de microbiología, procurando estar cerca del mechero prendido para evitar contaminación, se abrió el tubo de agua de peptona, que contenía nueve mililitros y se insertó el asa de microbiología con el inóculo dentro de la solución de agua de peptona, se tapó el tubo y se lo agitó en el agitador por un minuto (figura 25).

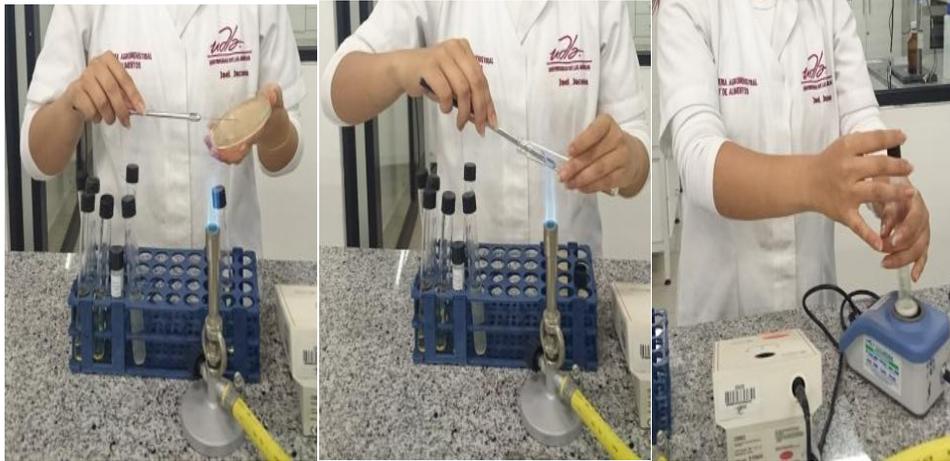


Figura 17. Selección de colonias, suspensión y agitación del agente patógeno.

Se procedió a analizar la muestra del agua de peptona en el equipo escala de MacFarland, el cual es un mecanismo de suspensión directa del agente patógeno que va a medir el grado de turbidez de la muestra, que debe estar igual a 0,5 de MacFarland (que quiere decir $1,50 \times 10^8$ CFU/ml) (Cavalieri et al., 2009). Como muestra en la figura 26.

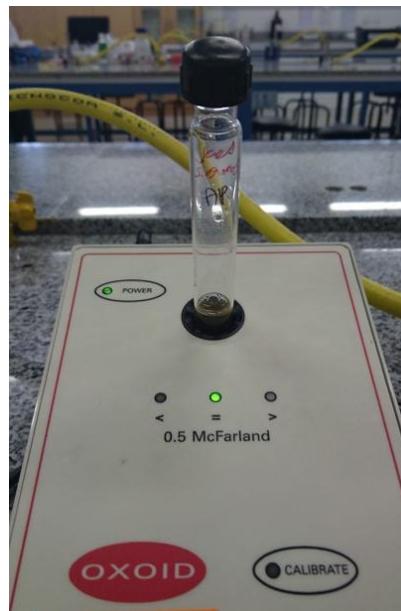


Figura 18. Resultado de la escala de McFarland.

Para el paso de inoculación de las cajas Petri con Agar Mueller-Hinton, se sacó las cajas Petri con Agar Mueller-Hinton previamente del congelador para bajar los niveles de condensación por unas dos horas a temperatura ambiente y así se previene que la humedad llegue a dañar las cajas con el agar, se verificó que las placas tengan cuatro mm de profundidad y se las rotuló con la fecha, bacteria y tratamiento (Figura 27).

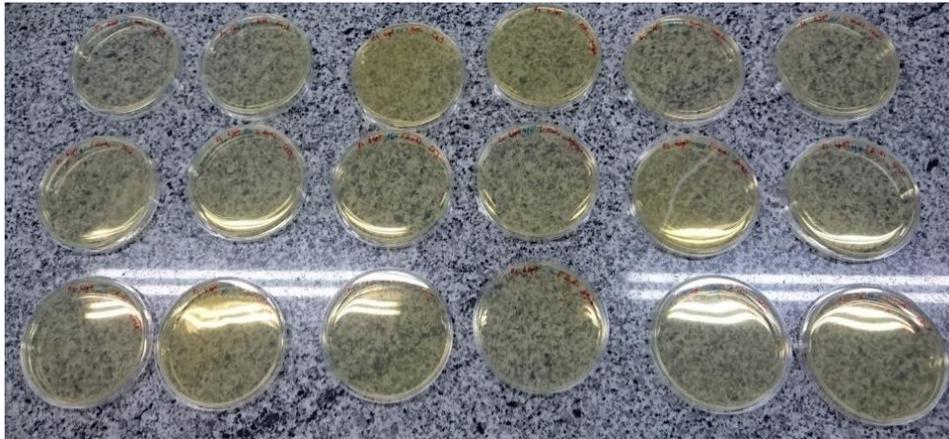


Figura 19. Cajas Petri con Agar Mueller-Hinton.

El procedimiento de siembra, se efectuó en la Cámara de Flujo Laminar SafeFAST Classic, por cada muestra se esterilizó el asa de microbiología, la pinza y se desechó las puntas de la micropipeta (Figura 28).



Figura 20. Cámara de Flujo Laminar SafeFAST Classic.

Se procedió a la siembra de bacterias (*E. coli*, *S. aureus* y *E. fecalis*) respectivamente en cada placa con Agar Mueller-Hinton, se insertó un hisopo de algodón estéril en el agua de peptona con el agente patógeno y se lo presionó a un lado del tubo para eliminar el excedente (Figura 29).



Figura 21. Recolección del agente patógeno con el hisopo de algodón estéril.

Se inoculó desde la parte de arriba de la placa con el hisopo, barriendo ida por vuelta, desde el extremo de la placa al otro, hasta llegar a la mitad, luego se gira la placa 35° aproximadamente y se repitió el mismo barrido hasta la mitad. Se giró nuevamente la placa 35° y se frotó la placa por última vez (Figura 30).

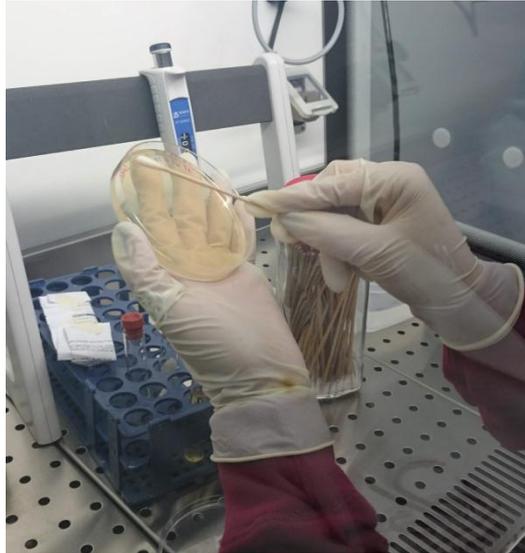


Figura 22. Frotado del inóculo a la caja Petri con Agar Mueller-Hinton.

Se colocó tres discos de papel filtro estériles con la pinza dentro de cada caja Petri con Agar Mueller-Hinton y con la micropipeta BOECO SP SERIES de 0,5-10 μ l se sustrajo del vaso de precipitación 5 μ l de aceite esencial y se colocó en cada disco, se repitió este proceso tres veces por cada disco respectivamente (Figura 31).



Figura 23. Colocación del disco en la caja Petri con Agar Mueller-Hinton.

Se ubicó las cajas Petri ya inoculadas en posición invertida en la incubadora Incucell a 35°C por 16 a 18 horas como indica la técnica (figura 32).

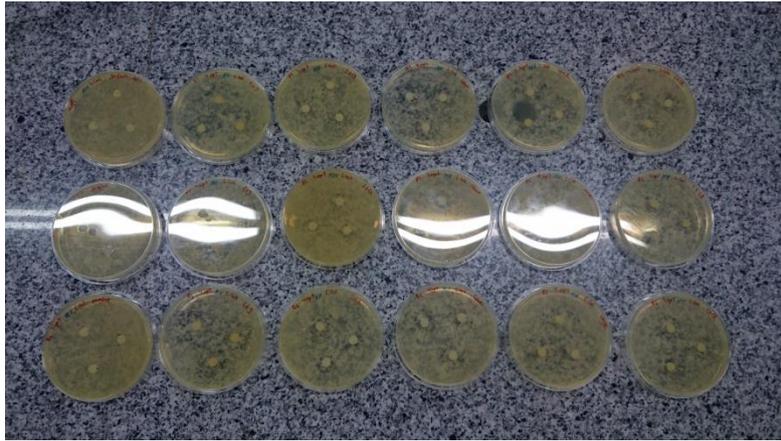


Figura 24. Cajas Petri listas para la incubadora.

Finalmente se autoclavó todas las cajas Petri contaminadas.

4.4.2 Análisis Físicoquímico

4.4.2.1 PH

El pH mide la acidez o alcalinidad de una manera estandarizada, ya que cuantifica la concentración de hidrógenos de una muestra o en este caso de los aceites esenciales. Para este procedimiento se siguió una serie de pasos:

- a) Se transfirió los aceites esenciales a vasos de precipitación de 25 ml.
- b) Se utilizó tiras medidoras pH-Fix 0-14.
- c) Se introdujo una tira dentro de cada aceite esencial como fue: canela (*Cinnamomum verum*), jengibre (*Zingiber officinale*), clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y sus mezclas por 20 segundos, repitiendo el procedimiento tres veces.
- d) La tira mostró el valor del pH del aceite esencial (figura 33).



Figura 25. Determinación de pH en aceite esencial.

4.4.2.2 Densidad

Para determinar la densidad de los aceites esenciales de canela (*Cinnamomum verum*), jengibre (*Zingiber officinale*) y clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) en el laboratorio se pesó una masa en g y se pesó 100 ml (como peso estándar para todos los aceites).

Se utilizó la siguiente ecuación 4 para el cálculo de la densidad.

(Ecuación 4)

$$\text{Densidad} = \text{masa} / \text{volumen}$$

4.4.2.3 Concentración de sólidos solubles

Para calcular la materia seca de cada uno de los aceites esenciales (canela (*Cinnamomum verum*), jengibre (*Zingiber officinale*) y clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y sus mezclas), se adaptó la técnica estandarizada que según Yáñez et al., (2012) procede con los siguientes materiales y metodología.

Materiales y Equipos

- Vidrios de reloj
- Micropipeta BOECO SP SERIES de 10-100 μ l
- Puntas de micropipeta
- Mufla THERMOLYNE
- Balanza analítica SHIMADZU

4.4.2.3.1 Obtención de materia seca

Se pesó cada vidrio de reloj en la balanza analítica y se rotuló cada vidrio respectivamente, se sustrajo con la micropipeta BOECO SP SERIES de 10-100 μ l del vaso de precipitación 100 μ l de aceite esencial y se colocó en el vidrio de reloj, se pesó nuevamente el vidrio de reloj con el aceite esencial en la balanza analítica (figura 34).



Figura 26. Pesaje del vidrio de reloj con aceite esencial.

Se introdujo las muestras a la mufla a 105°C por 24 horas como indica la técnica (figura 35), al siguiente día se tomó resultados pesando finalmente cada vidrio de reloj en la balanza analítica.

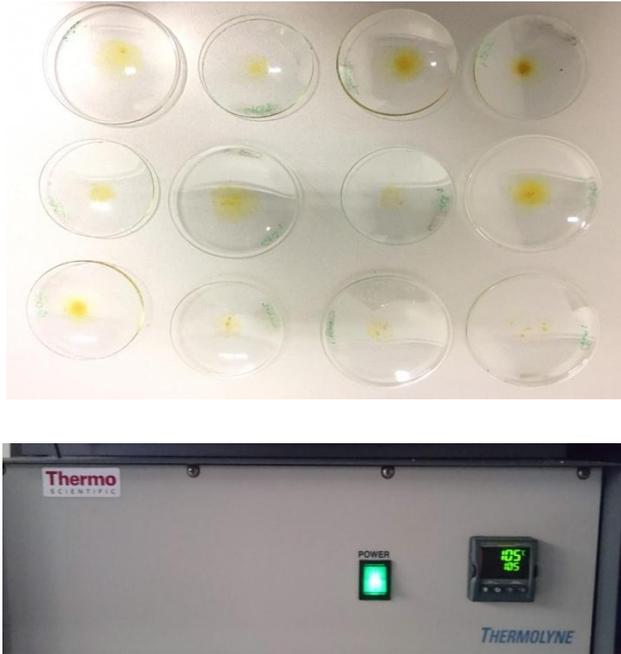


Figura 27. Muestras ya pesadas y mufla prendida con la temperatura adecuada.

Para calcular el porcentaje de sólidos solubles se utilizó la siguiente ecuación 5.

(Ecuación 5)

$$\% \text{ CSS} = [(P_o - P_f) / P] \times 100$$

P_o= peso del vidrio de reloj + Peso de la muestra.

P_f= peso después de las 24 horas.

P= peso del aceite esencial.

4.4.2.4 Medición del Efecto antioxidante de los aceites esenciales

Este método refleja la habilidad de los compuestos antioxidantes, capaces de donar hidrogeno, para secuestrar el radical DPPH que quiere decir 2,2-difenil-1-picrilhidrazil en los aceites esenciales. La capacidad antioxidante determina si

una solución antioxidante puede neutralizar los radicales libres que existen en su composición, a través del DPPH y se calcula con la concentración inicial y la final mediante espectrofotometría (Sharma, Yadav y Bhardwaj, 2013).

Este procedimiento es estandarizado para todas las soluciones y se siguió la siguiente metodología Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier y C. Berset (1995) con algunas modificaciones que se basa en con sus respectivos materiales, equipos y reactivos.

Materiales y Equipos

- Espectrofotómetro UV-Visible THERMO SCIENTIFIC
- Refrigerador Hardman
- Balanza analítica
- Micropipeta BOECO SP SERIES de 100-1000 μ l
- Puntas de micropipeta
- Matraz de 100 ml
- Papel aluminio

Reactivos

- Agua destilada
- Metanol
- 2,2-difenil-1-picrilhidrazil o DPPH
- Aceites esenciales

4.4.2.4.1 Procedimiento para la medición del efecto antioxidante de los aceites esenciales

- a) Se preparó una solución DPPH en metanol 0,25 mg/ml.
- b) Se sustrajo con la micropipeta 2000 μ l de la solución y 50 μ l de aceite esencial o muestra (Figura 36).



Figura 28. Colocación de la muestra de aceite esencial en la cubeta con DPPH.

- c) Se calibró la absorbancia de la muestra con aceite esencial a 515 nm longitud de onda.
- d) Las cubetas con las muestras se ubicaron en el Espectrofotómetro UV-Visible THERMO SCIENTIFIC (figura 37).



Figura 29. Colocación de la cubeta en el Espectrofotómetro UV-Visible THERMO SCIENTIFIC.

- e) Se leyó la absorbancia a 515 nm durante 25 minutos, cada minuto, hasta que se anuló el radical libre de la reacción.
- f) Se calculó el porcentaje de la capacidad antioxidante en base a la ecuación 6.

(Ecuación 6)

$$\% \text{ DPPH} = \frac{[(\text{Abs a } 515 \text{ nm inicial}) - (\text{Abs a } 515 \text{ nm final}) / (\text{Abs } 515 \text{ nm inicial})] \times 100}$$

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Variables de Estudio

Para la recolección de resultados, se tomó los datos de los halos de inhibición de las bacterias *E. coli*, *S. aureus* y *E. faecalis*, estos datos fueron tratados en el programa estadístico Infostat por medio de un ANOVA con diseño de bloques completamente al azar para la comprobación de las hipótesis y el parámetro estadístico Tukey, para identificar las diferencias significativas para cada uno de los tratamientos y para comprobar la efectividad bactericida de los aceites esenciales o tratamientos frente a las bacterias.

5.1.1 Análisis Microbiológico

Se realizó un análisis microbiológico que constó de tres repeticiones por cada uno de los seis tratamientos las bacterias *Escherichia coli* (ATTC 35218), *Staphylococcus aureus* (ATTC BAA976) y *Enterococcus faecalis* (ATTC 29212) en el medio Mueller-Hinton agar que es especializado en pruebas de sensibilidad antimicrobiana.

5.1.1.1 *Escherichia Coli*

En la tabla 11 se puede observar que el P-valor para los tratamientos es menor que 0,0001 lo que significa que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos.

Tabla 11.

ANOVA para E. coli

Fuente de Variación	gl	SC	CM	P-valor
Modelo.	7	988,09	141,16	<0,0001
Tratamientos	5	985,27	197,05	<0,0001
Repeticiones	2	2,83	1,41	0,3000
Error	10	10,38	1,04	
Total	17	998,47		

Para determinar las diferencias significativas de los tratamientos el parámetro Tukey debe tener diferentes letras como se muestra en la tabla 12. Esto quiere decir que todos los tratamientos son significativamente diferentes, lo que significa que no tienen el mismo efecto de inhibición de los halos formados en el agar con la bacteria *E. coli*.

El tratamiento T1 (AE de canela) presentó un halo de inhibición ($29,89 \pm 0,00$ mm) mayor que el resto de tratamientos y el tratamiento T2 (AE de jengibre) fue el que menor efecto de inhibición presentó en su halo ($9,22 \pm 0,44$ mm).

Tabla 12.

Promedio y Tukey para E. coli

Tratamientos	$\bar{X} \pm S$ (mm)	Tukey
T1	$29,89 \pm 0,00$	d
T2	$9,22 \pm 0,44$	a
T3	$17,00 \pm 0,38$	c
T4	$27,11 \pm 0,22$	d
T5	$12,33 \pm 0,22$	b
T6	$19,44 \pm 0,22$	c

Nota: \bar{X} promedio y S desviación estándar.

La figura 38 representa las diferencias significativas de Tukey de los tratamientos, en orden ascendente según los halos de inhibición presentados por la bacteria *E.coli*.

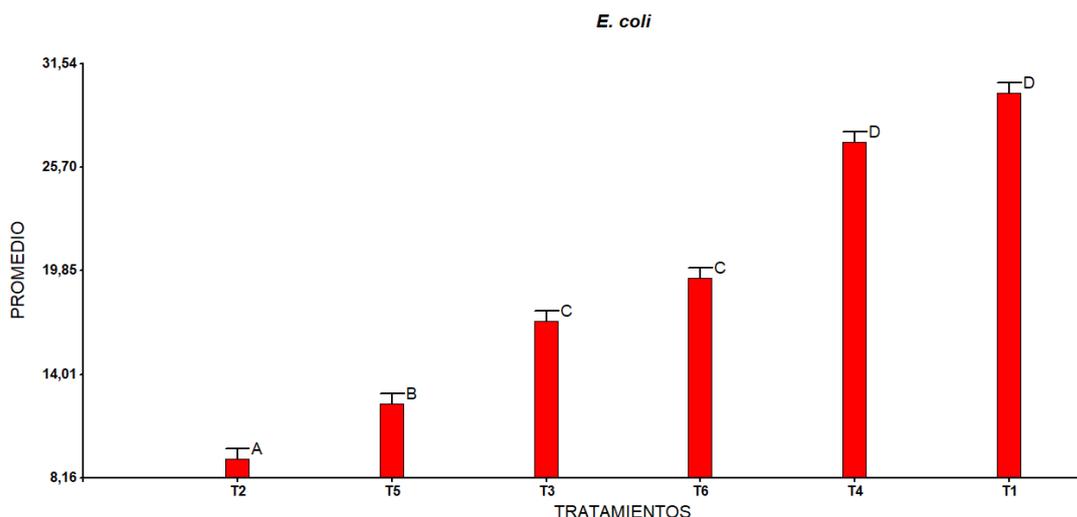


Figura 30. Tukey de la bacteria *E. Coli*.

Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Pastrana-Puche, Durango-Villadiego y Acevedo-Correa (2017) en el que emplearon aceite esencial de canela y clavo de olor para determinar el efecto antimicrobiano con cepas de *Escherichia Coli*, que fueron concentradas en la escala de McFarland a 0,5 de patrón y realizando una difusión en agar en los discos, se realizó una mezcla de los dos aceites esenciales en concentraciones de 150, 100, 50 y 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, que posteriormente se incubó a 37°C por 24 horas; los resultados presentaron un efecto bactericida para *E. Coli* con la máxima concentración de aceite que fue 150 mg/ml , que mostró 15 mm en el halo de inhibición, esto concuerda con el tratamiento 5 (AE de canela y clavo de olor) de la presente investigación que se encuentra dentro del rango de similitud con 12,33 mm en su halo, esto concuerda con Lu et al., que menciona que la mezcla de los aceites baja la capacidad bactericida, ya que el clavo y la canela poseen diferencias significativas en su estructura, en el lugar de recolección, la parte

de material vegetal a utilizar y la etapa vegetativa de la planta; que en el caso que fueran cosechadas durante o seguido de la etapa de floración gozan de mayor capacidad antimicrobiana (Pastrana-Puche, Durango-Villadiego, y Acevedo-Correa, 2017).

El AE de canela tanto como el de clavo de olor, poseen en su composición alcaloides y oxhidrilos fenólicos responsables de la actividad microbiana y en el caso del clavo de olor, el componente mayoritario es el eugenol, que cumple con esta función y como principal componente antibacteriano de la canela es el aldehído cinámico y el ometoxicinamaldehído componentes que no posee el clavo (Hitokoto, Morozumi, Wauke y Kurata, 1980).

Al igual que en la investigación hecha por Andrade, Cardoso, Batista, Texeira, Mallet y Fernandes (2012) donde se realizó ensayos biológicos con aceites esenciales diluidos en varias concentraciones de canela y jengibre en agar Mueller-Hinton para comprobar actividad bactericida con *E. Coli*, dio como resultado que esta bacteria es la más resistente, ya que no se evidenció un efecto bactericida con el aceite esencial de jengibre, como se demostró en la investigación actual con el tratamiento 2 con $(9,22 \pm 0,44 \text{ mm})$.

Según Goñi et al., (2009) citado por (Sado-Kamdem et al., 2015) realizó una investigación por contacto directo de varios aceites esenciales entre ellos la canela, en la fase de vapor se estudió y observó que los halos de inhibición fueron más grandes con 18 mm para *E. Coli*, que se acerca más al dato realizado en la presente investigación en el tratamiento 1 con halos de 29,89 mm, solamente para el AE de canela que en este caso se empleó puro y sin dilución.

Smith-Palmer, Stewart y Fyfe (1998), mencionan en su investigación de aceites esenciales frente a cinco patógenos de importancia alimentaria que el aceite esencial de canela y el de clavo tuvieron una concentración mínima inhibitoria bactericida (CMI) de 0,075% o menos contra patógenos, entre ellos *E. Coli*, de los cuales podrían funcionar como conservantes naturales en la industria alimentaria y estos resultados también coinciden con la investigación realizada

por López, Sánchez, Battle, y Nerin (2005) en la cual comparó la efectividad en fase de vapor y en contacto directo o en fase líquida de seis AE que son canela, clavo, romero, albahaca, eneldo y jengibre contra cuatro bacterias gram-positivas y gram-negativas entre ellas la bacteria *Escherichia Coli*; los resultados revelaron que el aceite esencial de canela y clavo de olor manifestaron una mayor actividad en los dos métodos (Reyes, Palou y López, 2012).

5.1.1.1.1 Comprobación de Hipótesis *E. coli*

Se comprobó la hipótesis alterna debido que el p-valor es menor que 0.05, por lo tanto los tratamientos son significativamente diferentes, cada uno de ellos inhibe la bacteria de *E. coli* con diferentes diámetros en las cajas Petri.

5.1.1.2 *Staphylococcus Aureus*

En la tabla 13 se puede observar que el P-valor para los tratamientos es menor que 0,0001 lo que significa que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos.

Tabla 13.

ANOVA para S. Aureus

Fuente de Variación	gl	SC	CM	P-valor
Modelo.	7	2791,30	398,76	<0,0001
Tratamientos	5	2787,80	557,56	<0,0001
Repeticiones	2	3,50	1,75	0,5759
Error	10	30,01	3,00	
Total	17	2821,32		

En efecto los resultados indicaron las diferencias significativas de los tratamientos y el parámetro Tukey complementa el resultado del análisis y se obtuvo diferentes letras como se muestra en la tabla 14. Esto quiere decir que todos los tratamientos son significativamente diferentes, lo que significa que no tienen el mismo efecto de inhibición de los halos formados en el agar con la bacteria *S. Aureus*.

El tratamiento T1 (AE de canela) presentó un halo de inhibición ($42,33 \pm 0,95$ mm) totalmente mayor que el resto de tratamientos y el tratamiento T4 (AE de canela con jengibre) muestra una eficacia bastante cercana al T1, que conlleva a suponer que la mezcla de estos tienen un gran poder bacteriostático con ($40,33 \pm 0,85$) en su halo de inhibición.

Tabla 14.

Promedio y Tukey para S. Aureus

Tratamientos	$\bar{X} \pm S$	Tukey
T1	$42,33 \pm 0,95$	d
T2	$10,44 \pm 0,28$	a
T3	$16,89 \pm 0,28$	b
T4	$40,33 \pm 0,85$	d
T5	$14,22 \pm 0,77$	a b
T6	$25,00 \pm 0,83$	c

Nota: \bar{X} promedio y S desviación estándar.

La figura 39 representa las diferencias significativas de Tukey de los tratamientos, en orden ascendente según los halos de inhibición presentados por la bacteria *S. Aureus*.

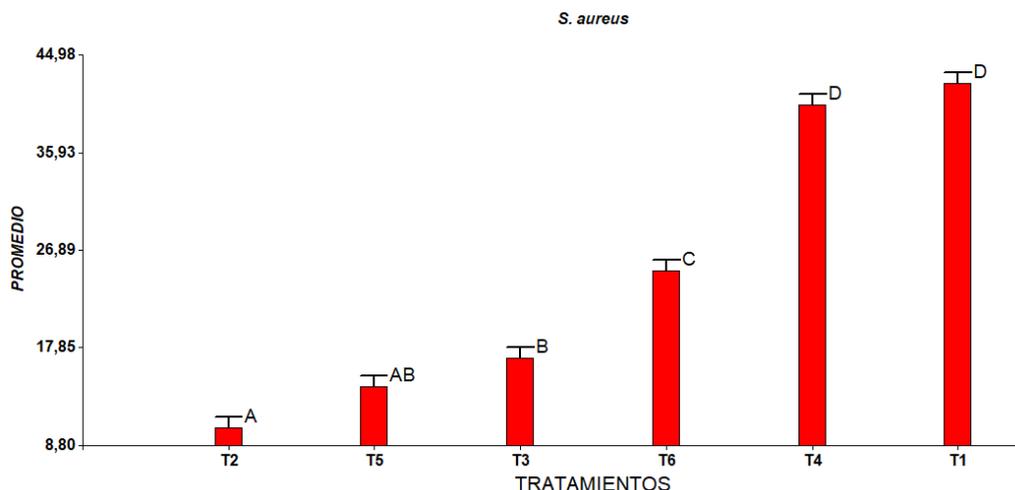


Figura 31. Tukey de la bacteria *S. Aureus*.

Silva, Ushimaru, Barbosa, Cunha y Fernandes (2009) mencionan en su investigación sobre la actividad antibacteriana de varios aceites esenciales entre ellos canela, jengibre y clavo frente a linajes de *S. aureus* aislados de casos clínicos humanos, en la cual se procedió a utilizar dos modelos de pruebas de sensibilidad bacteriana, el primero fue basado en una dilución de los AE en agar para la (CMI) y el otro para la verificación del desarrollo bacteriano en la presencia de AE en función del tiempo y la determinación de la curva de supervivencia en Mueller-Hinton Agar, en los que se demostraron que el AE de canela fue el de mayor eficacia sobre las especies de *S. Aureus* con (0,047% v/v) en sus valores de (CMI). La investigación menciona que los compuestos del AE de canela interfieren en la síntesis de las enzimas en las bacterias y que provoca daños en la pared bacteriana. En base a la presente investigación se observó una similitud bastante alta con el tratamiento 4 (AE de canela y jengibre) y el tratamiento 1 (AE de canela) en sus halos de inhibición, una posible explicación para esto es que algunos aceites esenciales pueden tener sustancias que penetren la capa lipídica de las células bacterianas de una manera más fácil, lo cual impide la acción sobre el desarrollo del mismo (Bertini et al., 2005).

Los halos de inhibición en la actual investigación presentan diferencias altamente significativas entre las bacterias *E. Coli* y *S. Aureus* para el tratamiento 1 (AE de canela) con 29,89 mm y 42,33 mm respectivamente, lo

cual concuerda con la investigación de Arias, García y Rico (2006) en la que menciona que el extracto de canela tiene promedios superiores en los halos de inhibición para la bacteria *Staphylococcus Aureus*, lo que significa que esta bacteria por ser gram-positiva tiende a ser más susceptible frente a las gram-negativas para este tipo de extractos que contengan altas cantidades de cinamaldehído (77,72%) (Andrade et al., 2012). También lo menciona Mandal, DebMandal, Saha y Pal, (2011) en su estudio en el que se reportó la actividad antibacteriana del AE o extracto de canela que dice que es mucho más potente que otros extractos de plantas como el comino y el clavo de olor.

5.1.1.2.1 Comprobación de Hipótesis de *S. aureus*

Se comprobó la hipótesis alterna debido que el p-valor es menor que 0.05, por lo tanto los tratamientos son significativamente diferentes, cada tratamiento presentó un halo de inhibición de diferente diámetro de la bacteria de *S. aureus* con diferentes diámetros de medición en las cajas Petri.

5.1.1.3 *Enterococcus Faecalis*

En la tabla 15 se puede observar que el P-valor para los tratamientos es menor que 0,0151 lo que significa que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos.

Tabla 15.

ANOVA para *E. Faecalis*

Fuente de Variación	gl	SC	CM	P-valor
Modelo.	7	380,34	54,33	<0,0151
Tratamientos	5	341,63	68,33	<0,0091

Repeticiones	2	38,71	19,36	0,2415
Error	10	117,77	11,78	
Total	17	498,12		

En

efecto los resultados del cuadro anterior indicaron que existen diferencias significativas en los tratamientos, por lo que es necesario aplicar el análisis funcional con el parámetro Tukey, para conocer cuál es el tratamiento más efectivo y en la tabla 16 se muestran las diferentes letras.

El tratamiento T1 (AE de canela) presentó un halo de inhibición mayoritario, aunque con efecto bactericida relativamente menor comparado con las otras bacterias con $(22,33 \pm 2,83 \text{ mm})$ en su halo de inhibición y el tratamiento que le sigue es el T6 (AE de jengibre con clavo) que presentó $(19,33 \pm 0,24 \text{ mm})$ que quiere decir que la mezcla posee una capacidad bactericida mayor que el resto de tratamientos y que todos los tratamientos son significativamente diferentes, lo que significa que no tienen el mismo efecto de inhibición de los halos formados en el agar con la bacteria *E. Faecalis*.

Tabla 16.

Promedio y Tukey para E. Faecalis

Tratamientos	$\bar{X} \pm S$	Tukey
T1	$22,33 \pm 2,83$	b
T2	$8,44 \pm 0,48$	a
T3	$15,00 \pm 0,49$	a b
T4	$17,00 \pm 1,08$	a b
T5	$14,11 \pm 0,91$	a b
T6	$19,33 \pm 0,24$	b

Nota: \bar{X} promedio y S desviación estándar.

La figura 40 representa las diferencias significativas de Tukey de los tratamientos, en orden ascendente según los halos de inhibición presentados por la bacteria *E. Faecalis*.

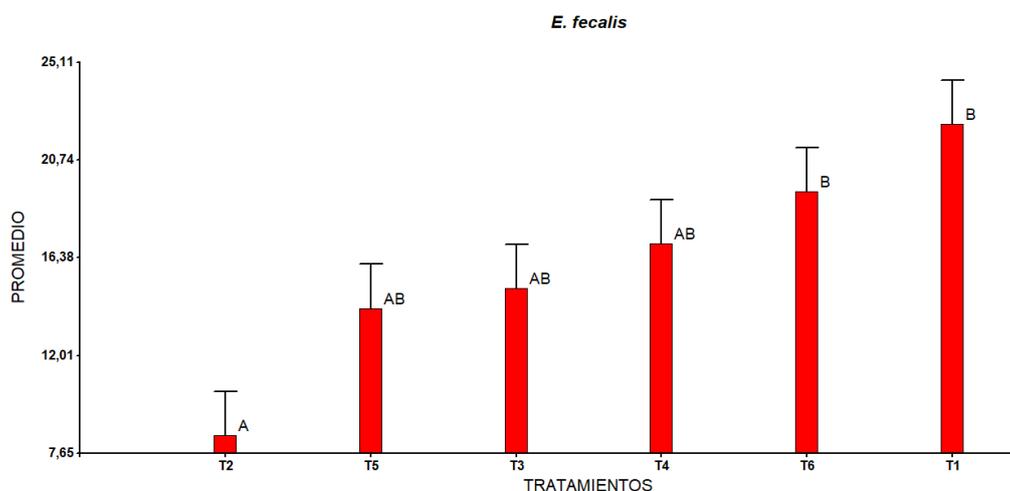


Figura 32. Tukey de la bacteria *E. Faecalis*.

Los datos recolectados de la presente investigación coinciden con García (2016) en el estudio del efecto antibacteriano del AE de canela (*Cinnamomun zeylanicum*) frente a *Enterococcus Faecalis* in vitro, donde se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) bacteriana, se realizaron 16 repeticiones a varias concentraciones partiendo desde 0%, 25%, 50%, 75% y 100%, posteriormente se evaluó la sensibilidad de *E. faecalis*, la cual presentó dentro del parámetro sensibilidad y resistencia en la media 28,75 y en su desviación estándar 2,24 en la concentración máxima del 100%, de tal manera que tiene relación con la investigación actual con 22,33 en su media y 2,83 en la desviación estándar del tratamiento 1 (AE de canela) extracto al 100%, dato que se encuentra dentro del rango de similitud, lo que significa que el AE de canela tiene efecto bacteriostático frente a la cepa de *E. faecalis*.

López, Sánchez, Battle y Nerin (2007) mencionan en su investigación con tres tipos de AE de canela, tomillo y orégano; que la función antibacteriana y antifúngica que poseen estos aceites son ricos en fenoles obtuvieron una (CMI) de 52,4 $\mu\text{L/L}$ de la bacteria gram-positiva *E. faecalis*, lo que indica que posee mayor eficacia antimicrobiana.

En el estudio realizado por Jami y Araujo (2017) sobre el efecto antimicrobiano del extracto de jengibre (*zingiber officinale*) frente a cepas de *Enterococcus*

faecalis realizado in vitro demostró mediante el análisis estadístico que el AE de jengibre no presentó un efecto bactericida significativo frente a la cepa *E. faecalis*, a pesar de que la literatura menciona que el extracto de jengibre tiene efecto antibacteriano frente a bacterias gram-positivas, que concuerda con el presente estudio, ya que los halos de inhibición presentados del T2 (AE de jengibre) fue $(8,44 \pm 0,48 \text{ mm})$, quiere decir que el AE de jengibre puede ser un prometedor agente terapéutico profiláctico para caries dental.

En base al estudio realizado por Gupta, Garg, Uniyal, y Gupta, (2009) en el que emplearon el AE de clavo de olor y extracto etanólico de *S. aromaticum* frente a bacterias gram positivas, se demostró en base a los resultados que el aceite esencial de clavo tuvo efecto contra casi todas las bacterias y recalca que los valores de (CMI) del AE fueron más elevados comparados con los del extracto etanólico, que coincide con el presente estudio, ya que el T6 (AE de jengibre y clavo de olor) se mostró como segundo con capacidad bactericida.

5.1.1.3.1 Comprobación de Hipótesis de *E. faecalis*

Se comprobó la hipótesis alterna debido que el p-valor es menor que 0.05, por lo tanto los tratamientos son significativamente diferentes, los tratamientos inhibe la bacteria de *E. faecalis* con diferentes diámetros en las cajas Petri.

5.1.2 Análisis Fisicoquímico de los Aceites Esenciales

5.1.2.1 pH

Se realizaron seis tratamientos para esta muestra con tres repeticiones cada uno para posterior al procedimiento sacar la desviación estándar y el promedio de cada uno de ellos, lo que se observa en la tabla 17 con respectivas diferencias entre los tratamientos.

Tabla 17.

pH de los AE

Tratamientos	$\bar{X} \pm S$
T1 (AE de canela)	6,33 \pm 0,47
T2 (AE de jengibre)	7,00 \pm 0,00
T3 (AE de clavo)	4,50 \pm 0,00
T4 (AE de canela y jengibre)	5,00 \pm 0,00
T5 (AE de canela y clavo)	5,00 \pm 0,00
T6 (AE de jengibre y clavo)	6,00 \pm 0,00

Nota: \bar{X} promedio y S desviación estándar.

Los resultados demuestran que el pH de los aceites van desde una escala acida a neutra, lo que significa que los tratamientos 1, 3, 4 y 5 son de característica acida, por lo tanto estos extractos pueden tener una buena actividad como antibacterianos (Van Helvoirt y Van Dijk, 2009).

5.1.2.2 Densidad

Los AE de las tres especies vegetales extraídas de igual forma presentaron características físicas comunes como: olor fuerte aromático y característico, líquido a temperatura ambiente, insolubles en agua y arrastrables en ella, color que puede entrar en un rango transparente hasta amarillo intenso.

En la tabla 18 se encuentra la densidad de cada uno de los aceites esenciales principales que son: canela (*Cinnamomum verum*), jengibre (*Zingiber officinale*), clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) respectivamente, que se calculó mediante la fórmula, en base a las cantidades extraídas.

Tabla 18.

Densidad de los AE

Tratamientos	Densidad (g/ml)
T1 (AE de canela)	0,81

T2 (AE de jengibre)	0,94
T3 (AE de clavo)	0,99

Según Góra y Lis (2017) la densidad del aceite esencial de jengibre se encuentra en un rango de 0,87 – 0,89 g/ml, esto varía independientemente de que lugar específico proviene la planta, en este caso se mostró dos lugares que son África y Jamaica, de igual manera el aceite esencial de canela proveniente de Ceylan o Sri Lanka con 1,01 g/ml de densidad y según Hernández p., (2011) la densidad del aceite de clavo de olor oscila entre 1.03-1.06 g/ml lo que se encuentra dentro del parámetro de la densidad que resultó de la presente investigación, lo que permite deducir que los AE extraídos son puros de acuerdo a los resultados presentados.

5.4.3.3 Concentración de Sólidos Solubles

En base a la fórmula se calculó los resultados para la concentración de sólidos (css), se realizó tres repeticiones por cada tratamiento como se detalla en la tabla 19.

Tabla 19.

Concentración de Sólidos Solubles de los AE

Tratamientos	$\bar{X} \pm S$
T1 (AE de canela)	0,10 \pm 0,01
T2 (AE de jengibre)	0,23 \pm 0,03
T3 (AE de clavo)	0,18 \pm 0,16
T4 (AE de canela y jengibre)	0,17 \pm 0,02
T5 (AE de canela y clavo)	0,11 \pm 0,02
T6 (AE de jengibre y clavo)	0,12 \pm 0,02

Nota: \bar{X} promedio y S desviación estándar.

Los sólidos solubles es la concentración del aceite esencial, de acuerdo a los resultados obtenidos en la concentración de sólidos soluble se puede concluir que mientras más sólidos solubles tenga el aceite, más concentrado va a ser el aceite y por ende va a ser más puro.

5.4.3.4 Efecto Antioxidante

El método DPPH o de decoloración en el cual se emplea 2,2-difenil-1-picrilhidrazil nos da la posibilidad de delimitar la capacidad antioxidante de los aceites esenciales, puesto que ellos poseen radicales libres dentro de su composición y tienen el propósito de estabilizarse electroquímicamente por la atracción de un electrón y de esta forma se genera más cantidad de radicales libres. En la tabla 20 se detallan los porcentajes de los principales tratamientos que son: canela (*Cinnamomum verum*), jengibre (*Zingiber officinale*), clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) respectivamente, los cuales se calcularon mediante la fórmula de los datos recolectados por el Espectrofotómetro UV-Visible THERMO SCIENTIFIC.

Tabla 20.

Efecto Antioxidante de los AE

Tratamientos	%
T1 (AE de canela)	86,70
T2 (AE de jengibre)	91,27
T3 (AE de clavo)	93,89

Nota: ver ecuación 6 escrita en la metodología.

El estudio presente concuerda con la investigación realizada por Hamid, Abdullah, y Al-haiqi, (2016) en el que hace una relación entre el DPPH determinado utilizando la maquina llamada espectrofotómetro que mostró valores que oscilan entre 80-83% para canela y 90-94% para clavo de olor, lo que quiere decir que el extracto de clavo posee más capacidad antioxidante y de captar radicales libres, también lo menciona Silvestri et al., (2010), ellos se basaron en la medida de desaparición de la absorbancia del radical 2,2-difenil-

1-picrilhidrazil (DPPH), lo que demostró en los resultados que el porcentaje de antioxidante va progresivamente en aumento distribuyéndose a la concentración del aceite, alcanzando un pico máximo en sus concentraciones, por esta razón el extracto de clavo de olor es de uso promisorio en la industria alimenticia y en el diseño y desarrollo de nuevos productos por su actividad antioxidante.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

Los aceites esenciales extraídos mediante el método de hidrodestilación obtuvieron un rendimiento de 1,67 % para canela, 0,5% para jengibre y 1,11% para clavo de olor.

Para la inhibición en el crecimiento de la bacteria *E. coli*, el mejor tratamiento que produjo el halo de inhibición más grande, fue el T1 (AE de canela) con 29,89 mm de diámetro.

Para la bacteria *S. aureus* el mejor tratamiento fue el T1 (AE de canela) con $42,33 \pm 0,95$ mm de diámetro y seguido del tratamiento T4 (AE de canela y jengibre) con $40,33 \pm 0,85$ mm que fueron los que más capacidad inhibitoria presentaron en sus halos.

Para la inhibición de la bacteria *E. faecalis* el tratamiento más efectivo con poder bacteriostático fue el T1 (AE de canela) presentando diferencias significativas al resto de tratamientos con $22,33 \pm 2,83$ mm en su halo de inhibición.

Dentro de los análisis físico-químicos se evaluó el pH, el cual desplegó en sus resultados que los tratamientos 1, 3, 4 y 5 extraídos por la metodología de hidrodestilación se consideran bactericidas y son de carácter ácido y los tratamientos 2 y 6 son neutros.

La densidad de los aceites esenciales extraídos por el proceso de hidrodestilación fue de 0,81 g/ml para canela, 0,94 g/ml para jengibre y 0,99 g/ml para clavo de olor.

La concentración de sólidos solubles del tratamiento T2 (AE de jengibre) con 0,23 de promedio y 0,03 en su desviación estándar fue el mayor.

El efecto antioxidante de aceites esenciales mostró que el clavo de olor obtuvo 93,89%, jengibre 91,27% y canela 86,70% en su capacidad de absorbancia.

6.2 Recomendaciones

Se recomienda en las próximas investigaciones emplear otras metodologías de extracción de aceites esenciales.

Se recomienda probar con otros aceites esenciales en futuras investigaciones sobre inhibición de patógenos que dañan la mucosa bucal.

Se recomienda emplear diferentes concentraciones de aceites esenciales en investigaciones sobre el efecto de antibiosis.

REFERENCIAS

- Aguilar-González, A. E., y López-Malo, A. (2013). Extractos y aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y su potencial aplicación como agentes antimicrobianos en alimentos. *Temas Selectos de Ingería de Alimentos*.
- Alexandra, S., Jami, G., Daniela, P., y Araujo, H. (2017). Efecto antimicrobiano del extracto , aceite esencial de jengibre (*zingiber officinale*) sobre cepas de *enterococcus faecalis* : Estudio in vitro, 19, 89–97.
- Almeida-Cruz, E., Pimenta, F., Hayashida, M., Eidt, M., y Gir, E. (2011). Detección de *Staphylococcus aureus* en la boca de trabajadores de la limpieza hospitalaria. *Latino-Am Enfermagem*, 19(1), 1–8. Recuperado el 15 de noviembre del 2018 de <https://doi.org/10.1590/S0104-11692011000100013>
- Andrade, M. A., Cristina, A., y Mallet, T. (2012). *Óleos essenciais de Cymbopogon nardus , Cinnamomum zeylanicum e Zingiber officinale : composição , atividades antioxidante e officinale : composition , antioxidant and antibacterial activities Material e métodos*, 399–408.
- BANDONI, Arnaldo L., RETTA, Diana, Di LEO LIRA, Paola M., BAREN, Catalina M. van. (2009). ¿Son realmente útiles los aceites esenciales?. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. Recuperado el 10 de octubre del 2018 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85611977001>> ISSN 0717-7917
- Ángeles, T. D. (2011). Eficacia in-vitro de un colutorio elaborado con aceite esencial de la hoja de ishpingo *Ocotea quixos* (Lam .) Kostern . ex O . C . Schmidt y clavo de olor *Syzygium aromaticum* (L .) Merr . & L . M . Perry. *La Granja*, 31-41.

- Arango, M. (2006). *Plantas medicinales: botanica de interest medico*. Colombia: María Cristina Arango Mejía.
- Ardila, C., Maggiolo, S., Dreyer, E., Armijo, J., y Silva, N. (2014). Enterococcus faecalis en dientes con periodontitis. *Revista Archivo Médico de Camagüey*, 415-423.
- Balslev, H., Navarrete, H., De la Torre, L., y Macía, M. (2008). Introducción. *Enciclopedia de Plantas Útiles Del Ecuador*, 1–3. Recuperado el 05 de noviembre del 2018 de <https://www.puce.edu.ec/portal/wr-resource/blobs/1/PUB-QCA-PUCE-2008-Enciclopedia.pdf>
- Bauer, A.W., W.M.M. Kirby, J.C. Sherris, and M. T. (1966). BBL™ Mueller Hinton Broth. *Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method.*, (June), 1–2. Recuperado el 05 de noviembre del 2018 de <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8774>
- Bustos-Mártinez, J; Hamdan-Partida, A. G.-C. (2006). Staphylococcus aureus: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *IV Congreso Mundial de Educación Infantil*, pp. 287–305.
- Berdonces i Serra, J. L. (2000). *Gran enciclopedia de las plantas medicinales*. España: Tikal ediciones.
- Bermúdez-Cañete, M. P. (2000). *Open Course Ware*. Recuperado el 26 de Octubre de 2018, de Uso Industrial de Plantas Aromáticas y Medicinales. Recuperado el 05 de noviembre del 2018 de <http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales/contenidos/material-de-clase/tema7.pdf>
- Bertini, L. e. (2005). Perfil de sensibilidad de bacterias frente a aceites esenciales de algunas plantas do nordeste de Brasil. *Revista Infarma*, 80-3.
- Castaño, M. (2012). Evaluación de la capacidad conservante de los aceites esenciales de clavo, 1–81.

- Cavalieri, S. J., Harberk, R. J., McCarter, Y. S., Ortez, J. H., Rankin, I. D., Sautter, R. L., Spiegel, C. a. (2009). *Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiano*. Recuperado el 05 de noviembre del 2018 de <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Manual+de+Pruebas+de+Susceptibilidad+Antimicrobiana#0>
- Cevallos, K. (2012). Obtención de aceite esencial crudo de jengibre (*Zingiber Officinale*) mediante los métodos Soxhlet y arrastre de vapor. *Trabajo de titulación*, 11.
- Cortés-Rojas, D. F., de Souza, C. R. F., y Oliveira, W. P. (2014). Clove (*Syzygium aromaticum*): A precious spice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. Recuperado el 05 de noviembre del 2018 de [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(14\)60215-X](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(14)60215-X)
- Cruz Quintana, S. M., Díaz Sjostrom, P., Arias Socarrás, D., y Mazón Baldeón, G. M. (2017). Microbiota of oral cavity ecosystems. *Revista Cubana de Estomatología*, 54(1), 84–99. Recuperado el 05 de noviembre del 2018 de <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85019844032&partnerID=40&md5=33fe8cbd1d5e75ed5a0284f96b2507f1>
- Díaz, V. (2016). Efecto inhibitor del aceite esencial de clavo de olor “*Syzygium aromaticum*” como agente antimicrobiano, sobre cepas de *Streptococcus mutans*. Estudio in vitro. *Repositorio UCE*, 12-15.
- Del Valle, Héctor y Zambrano, J. (2016). Universidad Técnica De Manabí. Recuperado el 05 de noviembre del 2018 de http://repositorio.utm.edu.ec/bitstream/123456789/1133/1/TESIS_FINAL_IMPRIMIR.pdf
- Ege, S. (2004). *Química orgánica: estructura y reactividad, Volumen 2*. Barcelona: Reverté S.A.

- File:Cloves-penang-zanzibar. (2012). McCormick and company. Recuperado de https://es.wikipedia.org/wiki/Syzygium_aromaticum#/media/File:Clove_s-penang-zanzibar.png
- Feenstra, R. C., et al. (2005). World Trade Flows, 1962–2000. NBER working paper 11040. Recuperado de https://atlas.media.mit.edu/es/visualize/geo_map/hs92/export/show/all/3301/2016/
- Fonnegra, R., y Jiménez, S. L. (2007). *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*. Medellín: Universidad de Antioquia.
- Forero-peñuela, L. Y., Forero-peñuela, Z. L., Deschamps, C., y Alves-porsse, A. (2017). Análisis exploratorio de las exportaciones de aceites esenciales en Brasil: evidencia desde 2000 hasta 2015, 61–70. Recuperado el 30 de noviembre del 2018 de <https://doi.org/10.4067/S0718-34292017005000301>
- Geilfus, F. (1994). *El árbol al servicio del agricultor: Guía de especies*. Santo Domingo, Republica Dominicana: Enda-caribe.
- Giraldo, L., Escobar, J., y Taborda, C. (2012). *SENA*. Recuperado el 27 de Octubre de 2018, de Introducción a la Industria de los Aceites Esenciales Extraídos de Plantas Medicinales Y Aromáticas. Recuperado el 30 de noviembre del 2018 de https://repositorio.sena.edu.co/sitios/introduccion_industria_aceites_esenciales_plantas_medicinales_aromaticas/#
- Góra, J., y Lis, A. (2017). *Los más valiosos Aceites Esenciales Parte I*. Lódz, Polonia: Quick-Pruck.
- Gupta, C., Garg, A., Uniyal, R., y Gupta, S. (2009). Comparison of antimicrobial activities of clove oil y its extract on some food borne microbes. *The internet journal of microbiology*, 7(1).
- Garc, K. (2016). *Cinnamomum zeylanicum* (canela) frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 in vitro ., 2(1), 9–15.

- Guadalupe Rodriguez-Angeles, M. (2002). Metabolismo de nutrientes del *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, 44(5), 464–475. Recuperado el 30 de noviembre del 2018 de <https://doi.org/10.1590/S0036-36342002000500011>
- Hernández, P. (2011). Encapsulación de Aceite Esencial de Clavo para su Aplicación en la Industria Alimentaria. Tesis Doctoral, Universidad Católica San Antonio, Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición. Recuperado el 02 de Enero del 2019 de <http://repositorio.ucam.edu/jsp/bitstream/10952/260/1/Tesis%20Pilar%20Hern%C3%A1ndez.pdf>
- Hitokoto, H., Morozumi, S., Wauke, S., y Kurata, H. (1980). *Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi*. *Appl. Environ. Microbiol*, 818-822.
- Hamid, K., Abdullah, A., y Al-haiqi, A. (2016). *Determination of DPPH free radical scavenging activity: Application of artificial neural networks*. *Food Chemistry*, 194, 705–711. Recuperado el 02 de Enero del 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.038>
- Llambí, M. S. (2016). *Los Aceites Esenciales: La Perfecta Medicina De La Naturaleza*. Bloomington: Balboa Press.
- LEYVA, M. A. P. J. F. I. J. R. M. Q. (2007). RENDIMIENTO Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Zingiber officinale* EN FUNCIÓN DEL DIÁMETRO DE PARTÍCULA ELENA E. STASHENKO. *Scientia et Technica*, 1(33), 187–188. Recuperado el 02 de Enero del 2019 de <http://revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/view/6041/3331>
- López, P., Sánchez, C., Battle, R., y Nerin, C. (2005). *Solid-and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected*

foodborne bacterial and fungal strains. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 6939-6946.

López, P., Sánchez, C., Battle, R., y Nerin, C. (2007). Vapor-Phase activities of cinnamon, thyme, and orégano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4348-4356.

Mandal, S., DebMandal, M., Saha, K., y Pal, N. K. (2011). Vitro antibacterial activity of three indian spices against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Oman Medical Journal*, 319-323. .

Maritza Peña Sisto, M., Milagros Calzado da Silva, D., Milagros González Peña, L., y Sandra Cordero García Hernay Azahares Argüello, D. (2012). jARTÍCULO DE REVISIÓN Patógenos periodontales y sus relaciones con enfermedades sistémicas Periodontal pathogens and their relationships with systemic diseases. *Medisan*, 16(7).

Meléndez, Lilia; Rodríguez, Margarito; Real, S. (2012). Procedimientos para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas.

Ortuño, M. F. (2006). *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes*. España: AIYANA.

PASTRANA-PUCHE, Y., DURANGO-VIIIADIEGO, A., & Acevedo-Correa, D. (2017). EFECTO ANTIMICROBIANO DEI CIAVO y IA CANEIA SOBRE PATÓGENOS ANTIMICROBIAI EFFECT OF CIOVES AND CINNAMON ON PATHOGENS EFEITO ANTIMICROBIANO DE CRAVO E, 15(1), 56–65.

Pérez, M. D., Martínez, C. R., y Zhurbenko, R. (2010). Aspectos fundamentales sobre el género enterococcus como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 48(2), 147–161. Recuperado el 07 de Enero del 2019 de [https://doi.org/48\(2\)147-161](https://doi.org/48(2)147-161)

- Puedes curar la diabetes con canela. (2005). The herb gardener. Recuperado de <http://theherbgardener.blogspot.com/2013/02/can-you-treat-diabetes-with-cinnamon.html>
- Rothkranz. (2012). Edible plant guide. Recuperado de https://encyclopedia2.thefreedictionary.com/_/viewer.aspx?path=plants&name=ginger&url=https%3A%2F%2Fencyclopedia2.thefreedictionary.com%2Fzingiber%2Bofficinale
- Reyes, F; Palou, E; López, A. (2012). VAPORES DE ACEITES ESENCIALES ALTERNATIVA DE ANTIMICROBIANOS NATURALES.pdf, 29–39.
- Ribeiro-Santos, R., Andrade, M., Madella, D., Martinazzo, A. P., de Aquino Garcia Moura, L., de Melo, N. R., y Sanches-Silva, A. (2017). Revisiting an ancient spice with medicinal purposes: Cinnamon. *Trends in Food Science and Technology*, 62, 154–169. Recuperado el 02 de Enero del 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.011>
- Rosselló, J., y Armit, J. (2016). Manual práctico de plantas medicinales. Barcelona: Reedbook Ediciones.
- SADO, S., BELLETTI, N., TCHOUMBOUGNANG, F., ESSIA-NGANG, J., MONTANARI, C., TABANELLI, G., y otros. (2015). *Effect of mild heat treatments on the antimicrobial activity of essential oils of Curcuma longa, Xylopiya aethiopyca, Zanthoxylum xanthoxyloides and Zanthoxylum leprieurii against Salmonella enteritidis. Journal of Essential Oil Research*, 52-60.
- Sánchez, M. (2013). Bazar de Especies. Estados Unidos: Palibrio.
- Sharma, R., Yadav, A., y Bhardwaj, R. (2013). *DPPH FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF PHENOLIC COMPOUNDS IN ARGEMONE*. *Internacional Journal Of Pharmacy Sciencies*, 20-25.
- Silvestri, J., Paroul, N., Czyewski, E., Lerin, L., Rotava, I., Cansian, R., y otros. (2010). Perfil de composición química y actividades antibacterianas y antioxidantes del AE de clavo de la india. *Revista Ceres*, 589-594.

- Shukla, A., Goud, V. V., y Das, C. (2019). *Antioxidant potential and nutritional compositions of selected ginger varieties found in Northeast India. Industrial Crops and Products*, 128, 167–176. Recuperado el 09 de Enero del 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.086>
- Vásquez Ribeiro, O., Alva, A., y Valles, J. M. (2001). EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE JENGIBRE (*Zingiber officinale*). *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria*, 1(1), 38–42.
- Van Helvoirt, G., y Van Dijk, A. (2009). Aceites esenciales y ácidos orgánicos contra *E. coli*. *Nutricion*, 255.
- Zambrano-Blanco, E. (2015). Diversidad genética del jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe .) A nivel molecular: Avances de la última década. *Entramado*, 11(2), 190–199. Recuperado el 27 de diciembre del 2018. <https://doi.org/10.18041/entramado.2015v11n2.22239>

ANEXOS

Anexo 1: Datos del análisis microbiológico de los halos de inhibición en mm, su promedio y desviación estándar.

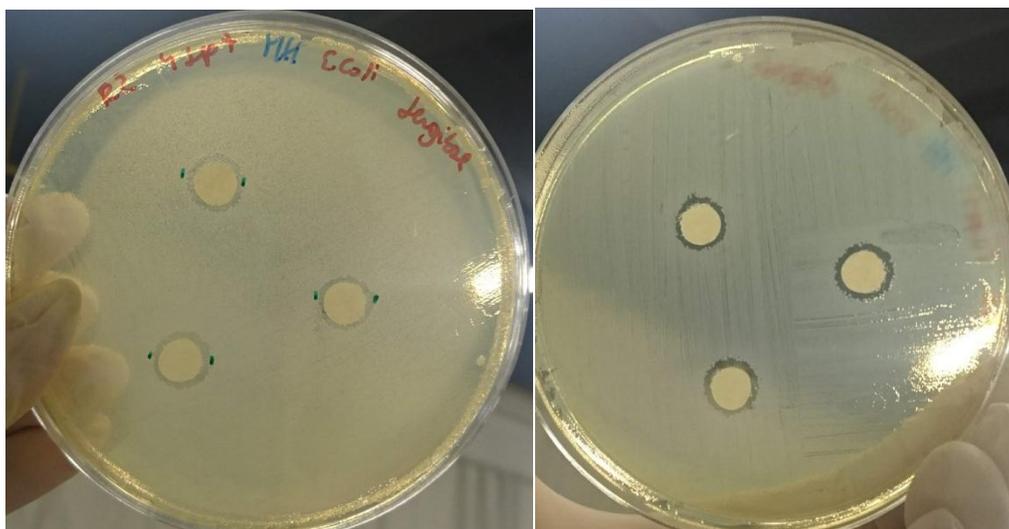
T	BACTERIAS														
	E. COLI					S. AUREUS					E. FAECALIS				
R	1	2	3	PM	DE	1	2	3	PM	DE	1	2	3	PM	DE
T1	31	30	31	30,67	0,47	38	40	41	39,67	1,25	20	10	10	13,33	4,71
T2	10	8	8	8,67	0,94	9	10	11	10,00	0,82	7	8	7	7,33	0,47
T3	18	18	18	18,00	0,00	15	16	16	15,67	0,47	15	15	15	15,00	0,00
T4	27	28	28	27,67	0,47	40	38	38	38,67	0,94	17	11	17	15,00	2,83
T5	12	12	12	12,00	0,00	14	15	17	15,33	1,25	15	16	16	15,67	0,47
T6	20	20	18	19,33	0,94	26	26	27	26,33	0,47	17	19	18	18,00	0,82
T1	29	28	29	28,67	0,47	47	44	44	45,00	1,41	23	30	25	26,00	2,94
T2	10	10	10	10,00	0,00	11	10	11	10,67	0,47	10	8	11	9,67	1,25
T3	15	15	15	15,00	0,00	16	17	16	16,33	0,47	16	15	15	15,33	0,47
T4	27	28	27	27,33	0,47	40	38	50	42,67	5,25	15	15	15	15,00	0,00
T5	11	12	11	11,33	0,47	14	13	14	13,67	0,47	13	13	13	13,00	0,00
T6	19	19	20	19,33	0,47	23	25	23	23,67	0,94	20	20	20	20,00	0,00
T1	31	30	30	30,33	0,47	41	41	45	42,33	1,89	28	30	25	27,67	2,05
T2	9	9	9	9,00	0,00	11	10	11	10,67	0,47	11	7	7	8,33	1,89
T3	17	18	19	18,00	0,82	18	19	19	18,67	0,47	14	15	15	14,67	0,47
T4	27	25	27	26,33	0,94	40	36	43	39,67	2,87	16	25	22	21,00	3,74
T5	14	13	14	13,67	0,47	14	11	16	13,67	2,05	13	14	14	13,67	0,47
T6	20	20	19	19,67	0,47	25	25	25	25,00	0,00	20	20	20	20,00	0,00

Nota: T para tratamientos y R para repeticiones.

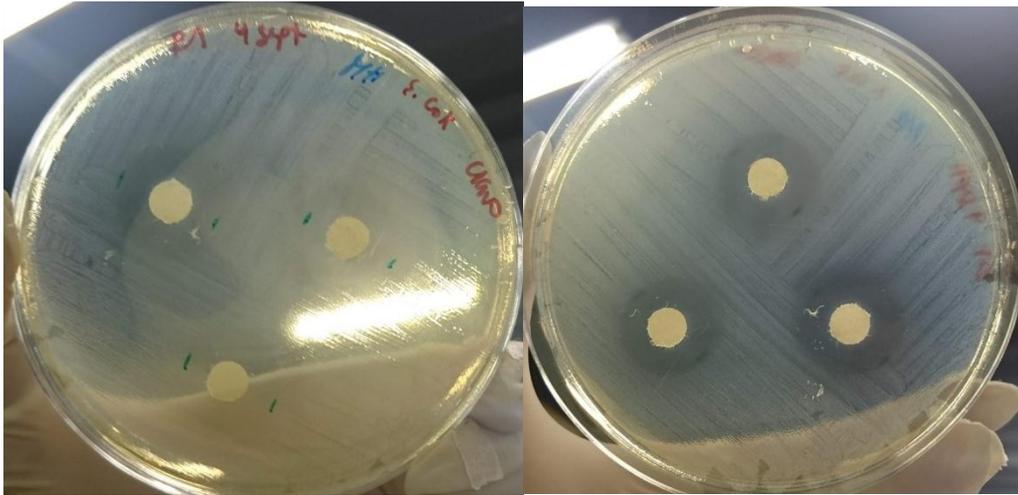
Anexo 2: Formación de halos de inhibición de la bacteria *E. coli* para cada tratamiento



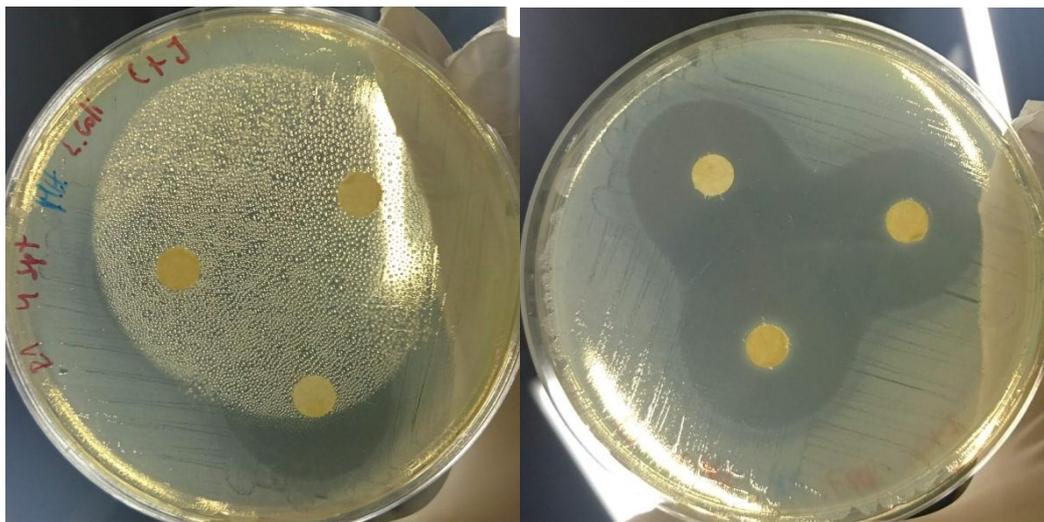
Tratamiento 1 (AE de canela)



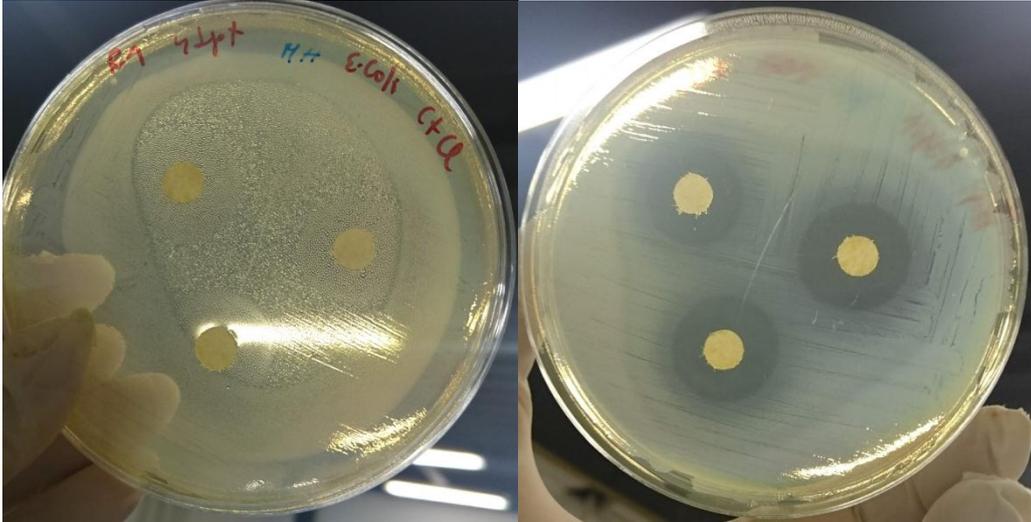
Tratamiento 2 (AE de jengibre)



Tratamiento 3 (AE de clavo de olor)



Tratamiento 4 (AE de canela y jengibre)

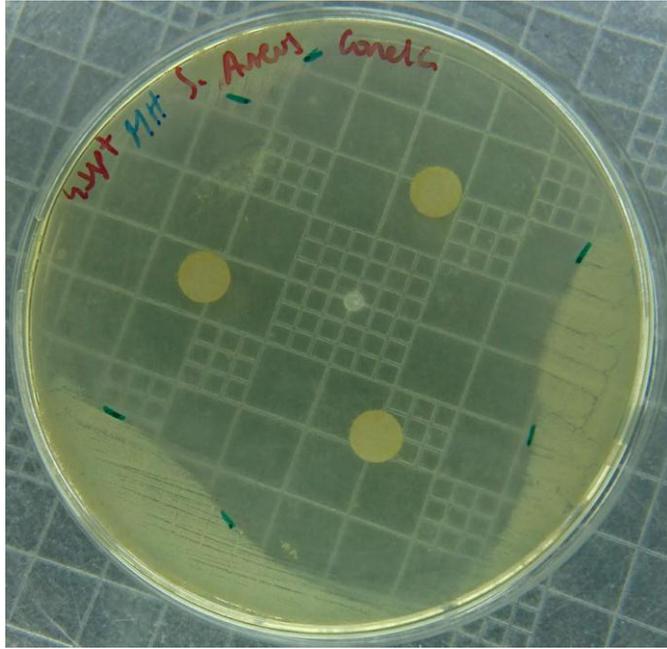


Tratamiento 5 (AE de canela y clavo de olor)

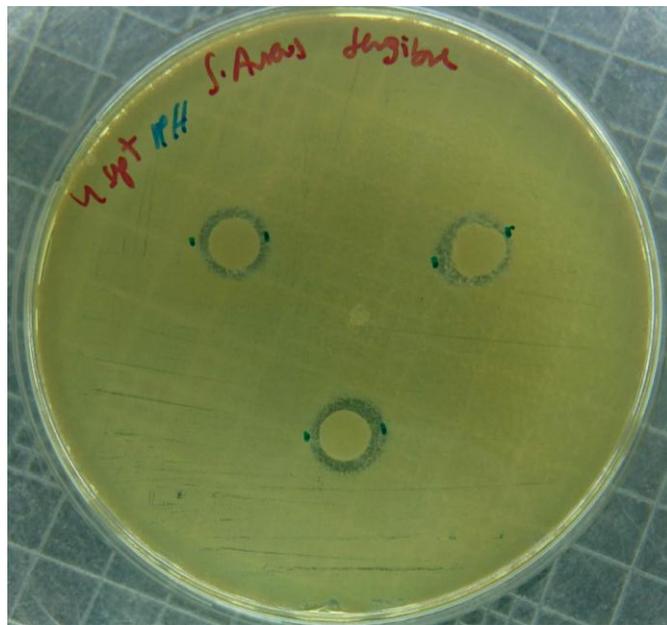


Tratamiento 6 (AE de jengibre y clavo de olor)

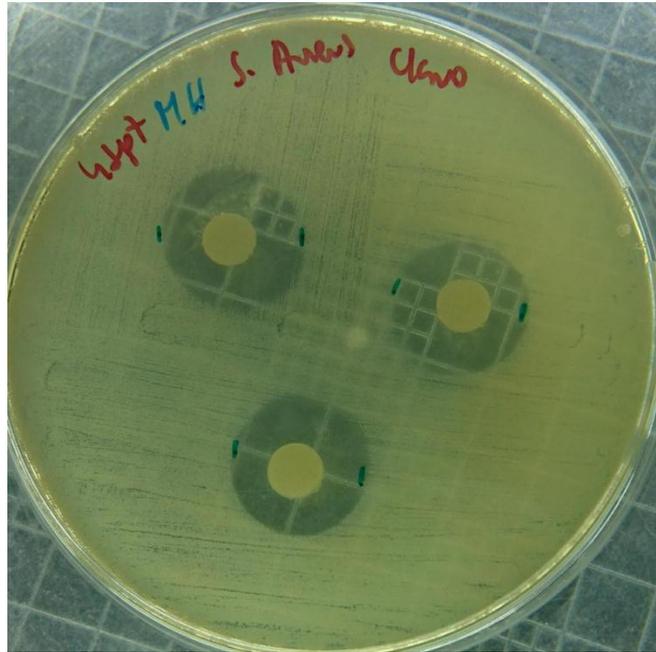
Anexo 3: Formación de halos de inhibición de la bacteria *S. aureus* para cada tratamiento



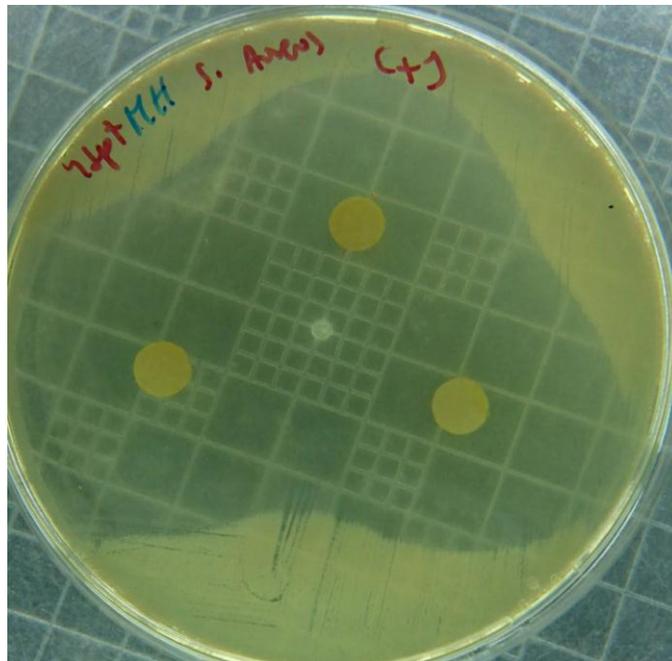
Tratamiento 1 (AE de canela)



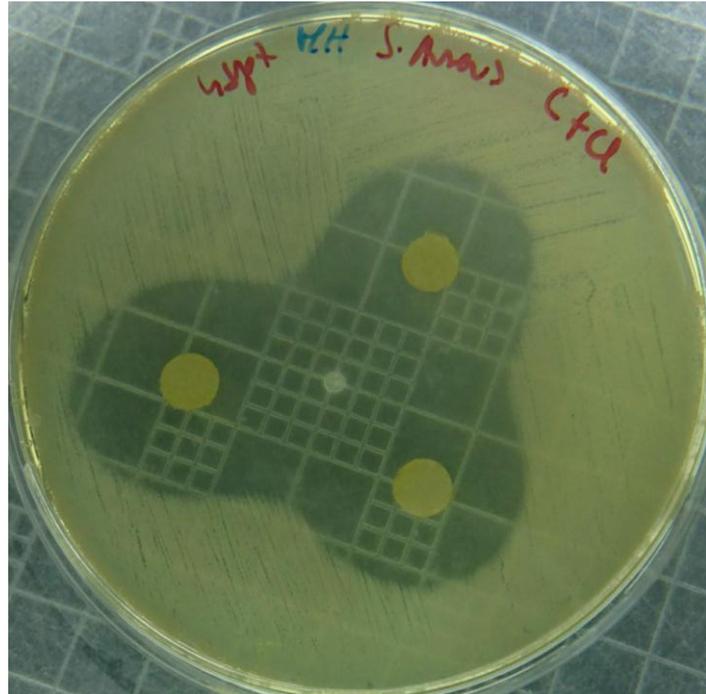
Tratamiento 2 (AE de jengibre)



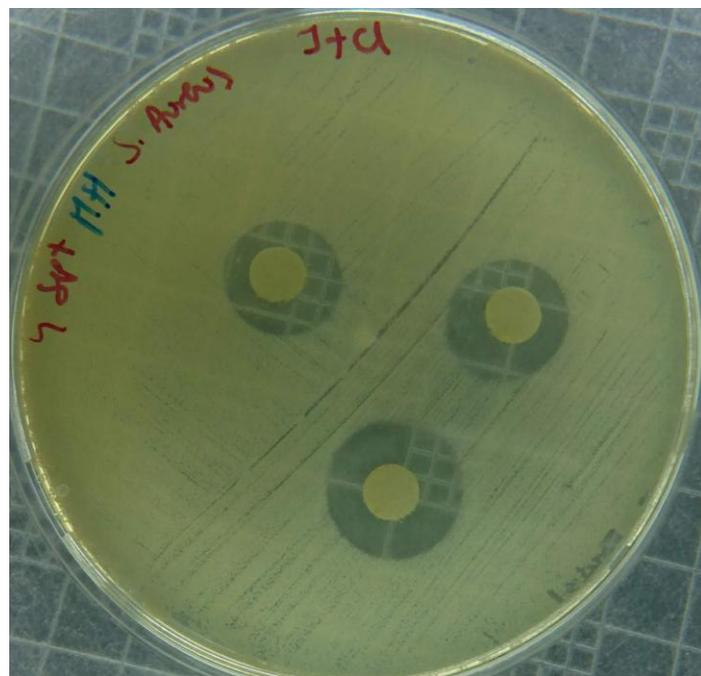
Tratamiento 3 (AE de clavo de olor)



Tratamiento 4 (AE de canela y jengibre)

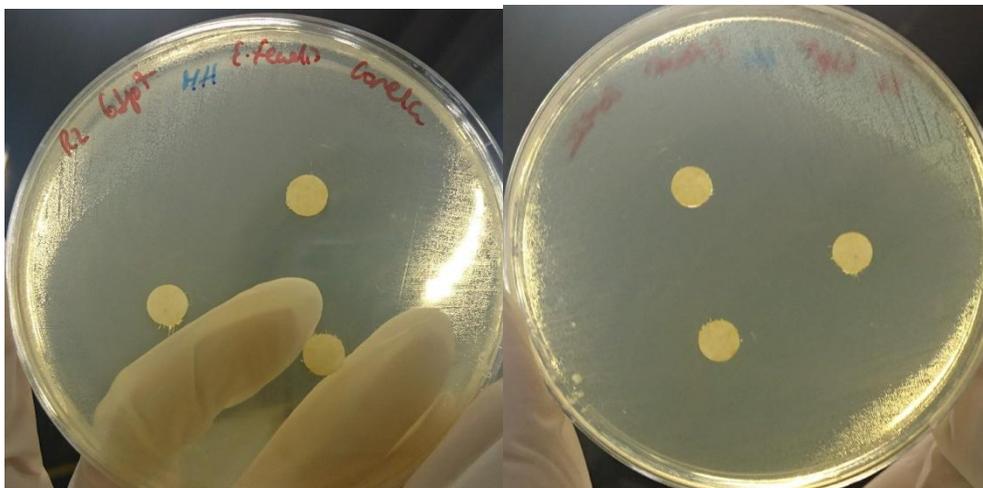


Tratamiento 5 (AE de canela y clavo de olor)



Tratamiento 6 (AE de jengibre y clavo de olor)

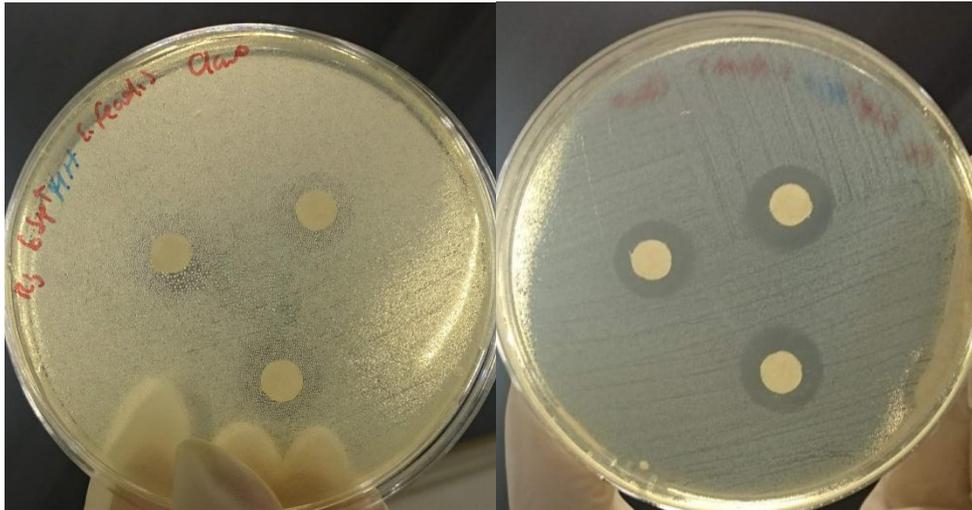
Anexo 4: Formación de halos de inhibición de la bacteria *E. faecalis* para cada tratamiento



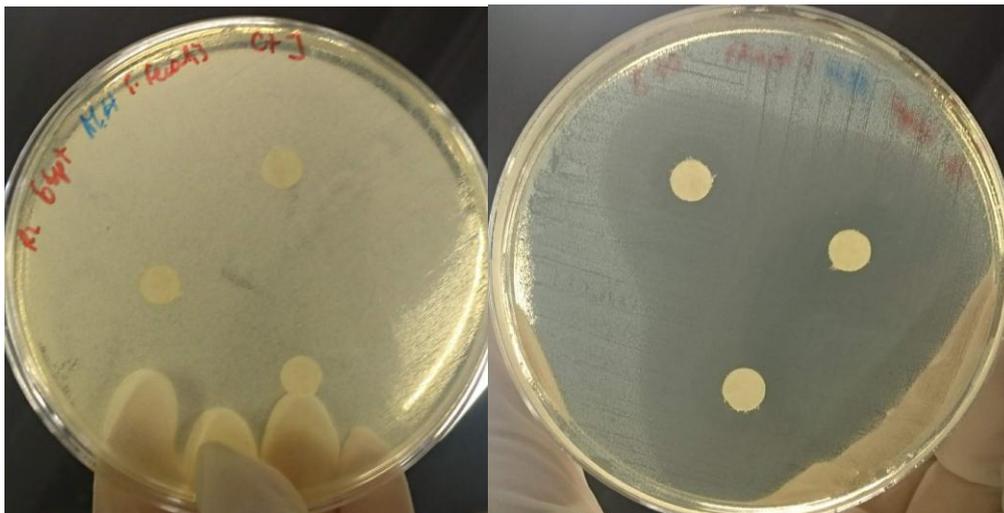
Tratamiento 1 (AE de canela)



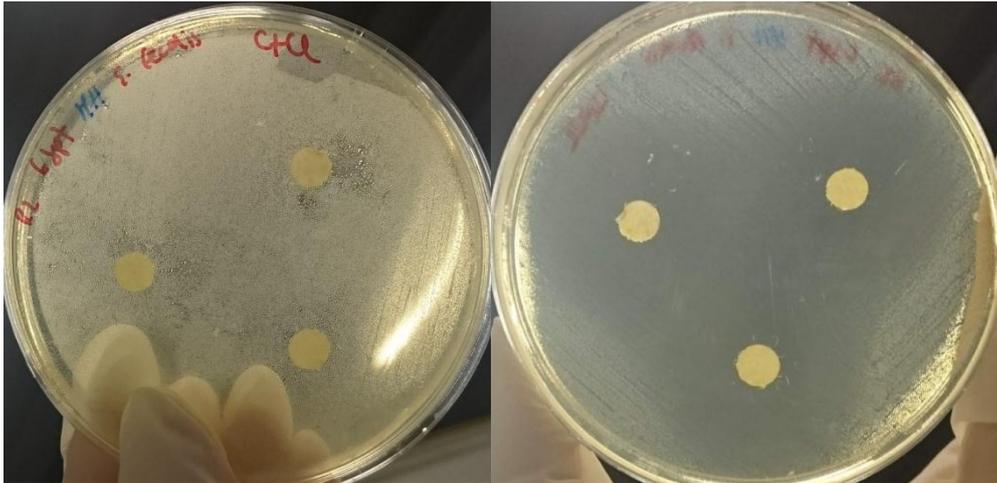
Tratamiento 2 (AE de jengibre)



Tratamiento 3 (AE de clavo de olor)



Tratamiento 4 (AE de canela y jengibre)



Tratamiento 5 (AE de canela y clavo de olor)



Tratamiento 6 (AE de jengibre y clavo de olor)

Anexo 5: Datos de la concentración de sólidos solubles de los aceites esenciales, su promedio y desviación estándar.

T	R AE	R VACIO	R 24H	TOTAL	PM	DE
T1	16,42	16,34	16,35	12,5%	0,11	0,01
T2	16,33	16,23	16,24	10,0%	0,19	0,07
T3	17,05	16,6	16,97	82,2%	0,34	0,34
T4	16,57	16,5	16,51	14,3%	0,15	0,04
T5	16,69	16,64	16,65	20,0%	0,13	0,05
T6	12,38	12,33	12,34	20,0%	0,14	0,04
T1	17,64	17,54	17,55	10,0%	0,10	0,00
T2	16,57	16,48	16,5	22,2%	0,24	0,01
T3	17,04	16,94	16,95	10,0%	0,10	0,00
T4	16,73	16,64	16,65	11,1%	0,16	0,04
T5	14,3	14,2	14,21	10,0%	0,10	0,00
T6	14,31	14,21	14,22	10,0%	0,11	0,01
T1	12,41	12,31	12,32	10,0%	0,10	0,00
T2	14,36	14,28	14,3	25,0%	0,25	0,00
T3	14,45	14,35	14,36	10,0%	0,10	0,00
T4	16,33	16,23	16,25	20,0%	0,20	0,00
T5	14,26	14,16	14,17	10,0%	0,10	0,00
T6	14,44	14,35	14,36	11,1%	0,11	0,00

Anexo 6: Evaluación de efecto antioxidante de aceites esenciales. Datos de los tratamientos 1, 2 y 3.

T1		T2		T3	
t/ (min)	ABS	t/ (min)	ABS	t/ (min)	ABS
1	0.188	1	0.516	1	0.459
2	0.030	2	0.432	2	0.148
3	0.026	3	0.377	3	0.072
4	0.026	4	0.348	4	0.054
5	0.025	5	0.306	5	0.043
6	0.025	6	0.302	6	0.036
7	0.025	7	0.282	7	0.033
8		8	0.262	8	0.031
9		9	0.241	9	0.030
10		10	0.214	10	0.029
11		11	0.196	11	0.028
12		12	0.174	12	0.028
13		13	0.168	13	0.028
14		14	0.160	14	
15		15	0.146	15	
16		16	0.137	16	
17		17	0.127	17	
18		18	0.045	18	
19		19	0.045	19	
20		20	0.045	20	

