



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE CUENCA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *Curcuma longa*,
Cymbopogon citratus, *Zingiber officinale* y *Ocotea quixos*, FRENTE A *Streptococcus mutans*

Trabajo de titulación previo a la obtención del
título de Ingeniero Biotecnólogo

AUTORES: ANA PAULA ORMAZA PINOS

EUGENIO ESTEBAN PARRA ROMÁN

TUTORA: DRA. MÓNICA JUDITH ESPADERO BERMEJO, MSc.

Cuenca - Ecuador

2024

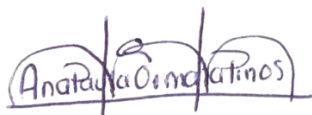
CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotros, Ana Paula Ormaza Pinos con documento de identificación N° 0350162947 y Eugenio Esteban Parra Román con documento de identificación N° 0302738836; manifestamos que:

Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Cuenca, 8 de agosto del 2024

Atentamente,



Ana Paula Ormaza Pinos
0350162947



Eugenio Esteban Parra Román
0302738836

CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

Nosotros, Ana Paula Ormaza Pinos con documento de identificación N° 0350162947 y Eugenio Esteban Parra Román con documento de identificación N° 0302738836, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del Trabajo experimental: “Determinación de la actividad antimicrobiana de *Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale* y *Ocotea quixos*, frente a *Streptococcus mutans*”, mismo que se ha desarrollado para optar el título de: Ingeniero Biotecnólogo, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 8 de agosto del 2024

Atentamente,



Ana Paula Ormaza Pinos
0350162947



Eugenio Esteban Parra Román
0302738836

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Mónica Judith Espadero Bermeo con documento de identificación N° 0703645412, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: “DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *CURCUMA LONGA*, *CYMBOPOGON CITRATUS*, *ZINGIBER OFFICINALE* Y *OCOTEA QUIXOS*, FRENTE A *Streptococcus mutans*”, realizado por Ana Paula Ormaza Pinos con documentación de identidad N° 0350162947 y por Eugenio Esteban Parra Román con documentación de identidad N° 0302738836, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 8 de agosto del 2024

Atentamente,



Dra. Mónica Judith Espadero Bermeo, MSc.

0103645412

DEDICATORIA

A mis padres, Andrés y Cristina, por su amor incondicional y constante apoyo, los cuales fueron fundamentales para concluir mis estudios. Por su confianza y optimismo que reflejaron en mí, en cada paso y decisión a lo largo de mis estudios. Y sin duda a mi persona, por el esfuerzo y sacrificio puestos en cada meta para lograr mis objetivos.

Ana Paula Ormaza Pinos

DEDICATORIA

Expreso mi gratitud a mis padres, quienes con su amor y apoyo constante han hecho posible este logro. Agradezco también a mis hermanos, Pamela y Juan David, y a mi pareja, por su presencia en mi vida. Finalmente, reconozco mi propio esfuerzo y dedicación, que me han permitido alcanzar esta meta.

Eugenio Esteban Parra Román

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por su amor y protección, que me permitieron concluir esta importante etapa de mi vida, siendo mi soporte en cada momento.

Expreso mi más profundo agradecimiento a mis padres por su paciencia, amor y aliento constante, los cuales fueron mi mayor motivación. Gracias por su confianza, sacrificios, enseñanzas y consejos que me han permitido seguir adelante. Gracias infinitas.

A mis hermanos, por su cariño e inspiración a superarme cada día más.

A nuestra tutora, Dra. Mónica por su guía y apoyo, de igual manera al personal de laboratorio en especial a Sandy, por su apoyo y su buena disposición.

Ana Paula Ormaza Pinos

AGRADECIMIENTO

Expreso mi sincero agradecimiento a mis padres, Eugenio y Alondra, que me han apoyado constantemente en este trayecto y cada etapa que he culminado en mi vida, a cada uno de mis familiares por brindarme ánimo y compañía en cada momento. De igual manera a todos los docentes, quienes con sus enseñanzas contribuyeron a mi formación académica y personal, a mis compañeros que no han dudado en solventar mis dudas, a nuestra tutora de tesis Dra. Mónica Espadero junto con el personal del laboratorio, con una mención especial a la Ingeniera Sandy Gavilanes quienes siempre nos han guiado en cada etapa de este proyecto. Finalmente, a mi enamorada Stephanie que siempre me ha estado apoyando en cada situación, con inigualable e incondicional cariño.

Eugenio Esteban Parra Román

ABREVIATURAS Y SINÓNIMOS

AE: Aceite esencial

CMI: Concentración mínima inhibitoria

Rf: Factor de retención (por sus siglas en inglés)

TLC: Cromatografía de capa fina (por sus siglas en inglés)

CL: *Curcuma longa*

CC: *Cymbopogon citratus*

ZO: *Zingiber officinale*

OQ: *Ocotea quixos*

DMSO: Dimetil sulfóxido

MTT: Azul de Tiazolil Tetrazolio Bromuro (por sus siglas en inglés)

CN: Control negativos

CP: Control positivo

UNIDADES

mL: Mililitro

mm: Milímetros

μl: Microlitro

nm: Nanómetros

RESUMEN:

Desde la antigüedad, el uso de plantas con propiedades terapéuticas ha sido una práctica global para tratar diversas afecciones y enfermedades. En Ecuador, la medicina tradicional ha perdurado en algunas regiones, incrementándose debido a la presencia de bioactivos utilizados por sus propiedades beneficiosas, lo que ofrece una oportunidad para su aplicación en la fabricación de productos cosméticos, alimenticios y medicamentos.

En esta investigación se evaluó la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale* y *Ocotea quixos* frente a la cepa *Streptococcus mutans* ATCC 25175, un patógeno relevante en la etiología de la caries dental. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada aceite esencial mediante el método de microdilución en caldo. Las microdiluciones de 0,1 y 0,05 $\mu\text{L/mL}$ del aceite esencial de *Curcuma longa* mostraron concentraciones mínimas inhibitorias efectivas. Para el aceite esencial de *Cymbopogon citratus*, las microdiluciones de 0,1 y 0,05 $\mu\text{L/mL}$ también fueron efectivas. El aceite esencial de *Zingiber officinale* demostró ser efectivo como agente antimicrobiano en cualquier microdilución. Finalmente, para el aceite esencial de *Ocotea quixos*, las microdiluciones de 0,8 y 0,1 $\mu\text{L/mL}$ mostraron concentraciones mínimas inhibitorias efectivas.

Se utilizó la técnica de bioautografía para identificar los compuestos bioactivos responsables de la actividad antimicrobiana en los aceites esenciales, y se evaluó la capacidad antimicrobiana de los aceites esenciales mediante el método de difusión en disco (Kirby-Bauer). Se demostró que el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* a una concentración del 100% logró el mayor halo de inhibición (31,00 mm), siendo 2,06, 1,57 y 1,12 veces mayor que los obtenidos por el aceite esencial de *Curcuma longa* al 75%, *Zingiber officinale* al 75% y *Ocotea quixos* al

100%, respectivamente. La bioautografía confirmó la presencia de varios componentes con potencial antimicrobiano significativo, capaces de inhibir el crecimiento y desarrollo del patógeno.

Palabras clave: aceites esenciales, *Streptococcus mutans*, microdilución en caldo, bioautografía, actividad antimicrobiana, difusión en disco, caries dental.

ABSTRACT:

Since ancient times, the use of plants with therapeutic properties has been a global practice for treating various ailments and diseases. In Ecuador, traditional medicine has endured in some regions, increasing due to the presence of bioactives used for their beneficial properties. This offers an opportunity for their application in the manufacture of cosmetic, food, and medicinal products.

This research evaluated the antibacterial activity of essential oils from *Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale*, and *Ocotea quixos* against the strain *Streptococcus mutans* ATCC 25175, a relevant pathogen in the etiology of dental caries. The minimum inhibitory concentration (MIC) of each essential oil was determined using the broth microdilution method. Microdilutions of 0.1 and 0.05 $\mu\text{L/mL}$ of *Curcuma longa* essential oil showed effective minimum inhibitory concentrations. For *Cymbopogon citratus* essential oil, microdilutions of 0.1 and 0.05 $\mu\text{L/mL}$ were also effective. The essential oil of *Zingiber officinale* proved to be effective as an antimicrobial agent in any microdilution. Finally, for *Ocotea quixos* essential oil, microdilutions of 0.8 and 0.1 $\mu\text{L/mL}$ showed effective minimum inhibitory concentrations.

The bioautography technique was used to identify the bioactive compounds responsible for the antimicrobial activity in the essential oils, and the antimicrobial capacity of the essential oils was evaluated using the disk diffusion method (Kirby-Bauer). *Cymbopogon citratus* essential oil at a 100% concentration achieved the largest inhibition zone (31.00 mm), which was 2.06, 1.57, and 1.12 times greater than those obtained by *Curcuma longa* essential oil at 75%, *Zingiber officinale* at 75%, and *Ocotea quixos* at 100%, respectively. Bioautography confirmed the presence of

several components with significant antimicrobial potential, capable of inhibiting the growth and development of the pathogen.

Keywords: essential oils, *Streptococcus mutans*, broth microdilution, bioautography, antimicrobial activity, disk diffusion, dental caries.

ÍNDICE

Contenido

CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA;Error! Marcador no definido.

RESUMEN:..... 11

ABSTRACT: 13

1. CAPÍTULO I.....22

INTRODUCCIÓN22

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA24

1.2. JUSTIFICACIÓN26

1.3. OBJETIVOS.....29

1.4. HIPÓTESIS.....30

2. CAPÍTULO II31

FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....31

2.1. ESTADO DEL ARTE31

2.2. MARCO TEÓRICO33

2.2.4. Patología Oral: Caries Dental50

2.2.5. Impacto global de la caries dental.....51

2.2.7. Actividad antimicrobiana de aceites esenciales.....52

2.2.7.1. Mecanismos de acción de los aceites esenciales frente a bacterias52

3. CAPÍTULO III.....57

MARCO METODOLÓGICO.....57

3.1. Nivel de investigación.....57

3.2. Diseño de investigación57

3.3. Unidad experimental59

3.4. Población y muestra59

3.5. Variables.....59

3.6. Técnicas de recolección de datos.....60

3.7. Técnicas de procesamiento de datos.....61

3.8. Procedimientos experimentales61

Fase dos:65

3.8.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana de metabolitos presentes en los aceites esenciales.....	65
Fase tres:.....	68
3.8.3. Determinación de la susceptibilidad de <i>Streptococcus mutans</i> frente a los aceites esenciales mediante el método de difusión en disco (Kirby-Bauer)	68
4. CAPÍTULO IV	70
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	71
4.1. Resultados.....	71
4.1.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los aceites esenciales mediante el método de microdilución en caldo	71
4.1.2. Comparación de la Efectividad Antibacteriana de Aceites Esenciales en Microdilución frente a <i>Streptococcus mutans</i>	74
4.1.3. Detección de compuestos con capacidades antimicrobianas del aceite esencial de <i>Curcuma longa</i> frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	76
4.1.4. Detección de compuestos con capacidades antimicrobianas del aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i> frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	78
4.1.5. Detección de compuestos con capacidades antimicrobianas del aceite esencial de <i>Zingiber officinale</i> frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	81
4.1.6. Detección de compuestos con capacidades antimicrobianas del aceite esencial de <i>Ocotea quixos</i> frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	84
4.1.7. Determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales y control positivo y negativo, frente a <i>Streptococcus mutans</i> mediante el método de difusión en disco....	87
4.1.8. Análisis estadístico.....	91
4.1.8.1. Comparación de la actividad antibacteriana de las concentraciones de cada aceite esencial mediante el método en difusión en discos.....	91
4.1.8.2. Comparación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales mediante el método de difusión en discos.....	99
5. CAPÍTULO V	104
CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES.....	104
5.1. CONCLUSIÓN	104
5.2. RECOMENDACIONES	105
REFERENCIAS	107
APÉNDICES Y ANEXOS	129

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Taxonomía de <i>Curcuma longa</i>	37
Tabla 2 Taxonomía de <i>Cymbopogon citratus</i>	40
Tabla 3 Taxonomía de <i>Zingiber officinale</i>	42
Tabla 4 Taxonomía de <i>Ocotea quixos</i>	45
Tabla 5 Taxonomía de <i>Streptococcus mutans</i>	49
Tabla 6 Tratamientos en la parte experimental	58
Tabla 7 Variable dependiente e independiente.....	60
Tabla 8 Fases móviles utilizadas por cada aceite esencial.....	65
Tabla 9 Análisis de Varianza (Anova) de los datos obtenidos de la concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales de <i>Curcuma longa</i> , <i>Cymbopogon citratus</i> , <i>Zingiber</i> <i>officinale</i> , <i>Ocotea quixos</i> frente a <i>Streptococcus mutans</i>	72
Tabla 10 Concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales de <i>Curcuma longa</i> , <i>Cymbopogon citratus</i> , <i>Zingiber officinale</i> , <i>Ocotea quixos</i> frente a <i>Streptococcus mutans</i>	73
Tabla 11 Valores Rf y distancia recorrida de cada compuesto con actividad antimicrobiana correspondiente al aceite esencial de <i>C. longa</i>	78
Tabla 12 Valores Rf y distancia recorrida de cada compuesto con actividad antimicrobiana correspondiente al aceite esencial de <i>C. citratus</i>	80
Tabla 13 Valores Rf y distancia recorrida de cada compuesto con actividad antimicrobiana correspondiente al aceite esencial de <i>Z. officinale</i>	83

Tabla 14 Valores Rf y distancia recorrida de cada compuesto con actividad antimicrobiana correspondiente al aceite esencial de <i>O. quixos</i>	86
Tabla 15 Diámetro de los halos de inhibición en mm con las distintas concentraciones de los aceites esenciales y los controles positivos (clorhexidina) y negativos (agua y DMSO) frente a <i>Streptococcus mutans</i>	87
Tabla 16 Análisis de Varianza (Anova) de los datos obtenidos de la actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Curcuma longa</i> a diferentes concentraciones frente a <i>Streptococcus mutans</i> .	92
Tabla 17 Supuestos del modelo de Varianza (Anova)	92
Tabla 18 Resultados de la actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Curcuma longa</i> a diferentes concentraciones y Control (+) frente a <i>Streptococcus mutans</i>	93
Tabla 19 Análisis de Varianza (Anova) de los datos obtenidos de la actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i> a diferentes concentraciones frente a <i>Streptococcus mutans</i>	94
Tabla 20 Supuestos del modelo Anova.....	95
Tabla 21 Resultados de la actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i> a diferentes concentraciones y Control (+) frente a <i>Streptococcus mutans</i>	95
Tabla 22 Análisis de Varianza (Anova) de los datos obtenidos de la actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Zingiber officinale</i> a diferentes concentraciones frente a <i>Streptococcus mutans</i>	96
Tabla 23 Supuestos del modelo Anova.....	97
Tabla 24 Análisis de Varianza (Anova) de los datos obtenidos de la actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Ocotea quixos</i> a diferentes concentraciones frente a <i>Streptococcus mutans</i> ...	97

Tabla 25 Resultados obtenidos de la actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Ocotea quixos</i> a diferentes concentraciones y Control (+) frente a <i>Streptococcus mutans</i>	98
Tabla 26 Datos obtenidos de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de <i>Curcuma longa</i> , <i>Cymbopogon citratus</i> , <i>Zingiber officinale</i> , y <i>Ocotea quixos</i> a diferentes concentraciones frente a <i>Streptococcus mutans</i>	99
Tabla 27 Análisis de Varianza (Anova) de los datos obtenidos de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de <i>Curcuma longa</i> , <i>Cymbopogon citratus</i> , <i>Zingiber officinale</i> , y <i>Ocotea quixos</i> a diferentes concentraciones frente a <i>Streptococcus mutans</i>	100
Tabla 28 Supuestos del modelo Anova.....	101
Tabla 29 Resultados de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de <i>Curcuma longa</i> , <i>Cymbopogon citratus</i> , <i>Zingiber officinale</i> , y <i>Ocotea quixos</i> a diferentes concentraciones frente a <i>Streptococcus mutans</i>	101

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1	36
Ilustración 2	39
Ilustración 3	42
Ilustración 4 Planta de <i>Ocotea quixos</i>	45
Ilustración 5 <i>Streptococcus mutans</i> en agar sangre.....	49
Ilustración 6	62
Ilustración 7 Preparación de la microplaca	64
Ilustración 8 Cromatogramas observados a una longitud de onda de 366 nm.	66
Ilustración 9 Colocación de discos impregnados en AE e incubación.....	69
Ilustración 10 Microplaca obtenida en el proceso de microdilución en caldo	71
Ilustración 11 Cromatografía en capa fina con aceite esencial de <i>C. longa</i> observada con longitudes de onda de 254 nm y 366 nm	76
Ilustración 12 Bioautografía de TLC de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana de <i>C. longa</i>	77
Ilustración 13 Cromatografía en capa fina con aceite esencial de <i>C. citratus</i> observada con longitudes de onda de 254 nm y 366 nm	79
Ilustración 14 Bioautografía de TLC de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana de <i>C. citratus</i>	80
Ilustración 15 Cromatografía en capa fina con aceite esencial de <i>Z. officinale</i> observada con longitudes de onda de 254 nm y 366 nm	82

Ilustración 16 Bioautografía de TLC de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana de <i>Z. officinale</i>	82
Ilustración 17 Cromatografía en capa fina con aceite esencial de <i>O. quixos</i> observada con longitudes de onda de 254 nm y 366 nm	85
Ilustración 18 Bioautografía de TLC de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana de <i>O. quixos</i>	85
Ilustración 19 Comparación de actividad antimicrobiana de cada aceite esencial frente a <i>Streptococcus mutans</i>	103

1. CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad, el uso de plantas con propiedades terapéuticas ha sido una práctica global para tratar diversas afecciones y enfermedades. En Ecuador, la medicina tradicional ha perdurado en algunas regiones; sin embargo, ha sido gradualmente desplazada por la medicina convencional. Esto se debe a la escasa información que valide científicamente su uso tradicional, la migración interna de las comunidades indígenas y la brecha de conocimiento entre las generaciones más jóvenes (Duman, et al., 2023).

Las partes de las plantas más utilizadas para fines curativos incluyen los rizomas, hojas y tallos. Estas partes se usan para tratar problemas digestivos, circulatorios, bucodentales, enfermedades respiratorias, inflamatorias e infecciones. Las propiedades beneficiosas de estas plantas se deben principalmente a los compuestos bioactivos como: terpenos, saponinas, lignanos, taninos, flavonoides y polifenoles presentes en diversas plantas medicinales; la extracción de los metabolitos se da en forma de aceites y extractos. (Gallegos-Zurita & Gallegos-Z, 2017), y estos compuestos bioactivos no solo contribuyen a sus características aromáticas, sino que también le confieren diversas propiedades terapéuticas como: antiinflamatorias, antioxidantes, anticancerígenas, antimicrobianas y antiespasmódicas (Acero-Godoy et al., 2019).

Los aceites esenciales poseen propiedades que son ampliamente utilizados en la industria farmacéutica, para el desarrollo de nuevos fitofármacos, cosméticos y nutracéuticos, (Armijo, et al., 2012). En particular, las plantas del género *Curcuma*, *Zingiber*, *Cymbopogon* y *Ocotea*, son ampliamente utilizadas como antimicrobianos debido a su gran potencial inhibitorio frente a bacterias Gram positivas (*Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*) y Gram negativas

(*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) (Adaramoye et al., 2009). La actividad antimicrobiana de aceites esenciales se evalúa mediante pruebas de microdilución en caldo, bioautografía, difusión de disco, entre otras, que permiten determinar la susceptibilidad de un microorganismo frente a distintos compuestos.

Según estudios realizados por Klein et al., (2015). Estos aceites esenciales, son efectivos en el tratamiento de infecciones bucodentales causadas por *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Candida albicans*, *Actinomyces*, entre otras, siendo la más predominante *S. mutans* (Chimenos-Küstner et al., 2017).

Streptococcus mutans, presente en la placa dental, actúa en la generación de caries junto a otras bacterias. Su potencial cariogénico genera glucosiltransferasa, que acelera la maduración de la placa dental y descompone carbohidratos y ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico que desmineralizan los dientes y generan las caries dentales favoreciendo la supervivencia y desarrollo de acidogénicos y organismos acidúricos. (Lemos et al., 2019). Según la OMS (Organización Mundial de la Salud), las afecciones bucodentales afectan a 3500 millones de personas en todo el mundo.

Ecuador posee una rica biodiversidad vegetal que ofrece oportunidades para la investigación y el desarrollo de productos terapéuticos, el presente estudio se enfoca en investigar las propiedades antibacterianas de los aceites esenciales de *Curcuma longa*, *Zingiber officinale*, *Cymbopogon citratus* y *Ocotea quixos* sobre *Streptococcus mutans*, buscando validar su potencial para futuras aplicaciones en diversas industrias que puede llevar al desarrollo de nuevos antimicrobianos naturales, ofreciendo alternativas eficaces y sostenibles frente a la resistencia microbiana.

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar del creciente interés en el uso de plantas medicinales para diversas problemáticas es necesario encontrar alternativas eficientes, que pueden ser abordadas por medio de estrategias terapéuticas de origen natural, como los aceites esenciales extraídos de las plantas; estos han demostrado tener un potencial control de diversas afecciones bucodentales ocasionada por microorganismos (Radu et al., 2023).

Los principales problemas de salud bucal han sido ocasionados por la presencia de bacterias como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis*, *Actinomyces israelii*, *Porphyromonas gingivalis*, entre otras; considerando que *Streptococcus mutans* es uno de los principales agentes patógenos en la cavidad bucal que contribuye al desarrollo de caries dentales. Así como también se encuentra implicado en otra afección como la endocarditis infecciosa, ocurre con mayor frecuencia en enfermedad periodontal que ocasionalmente contribuye a afecciones sistémicas como la endocarditis infecciosa y otros problemas cardíacos subyacentes (Montenegro Pangol et al., 2023)

Las caries dentales son una de las enfermedades más prevalentes a nivel global, afectando tanto a niños como a adultos. En Ecuador, la prevalencia de caries dental afecta alrededor del 85% de los niños entre 6 a 12 años y un alto porcentaje de la población adulta (Vélez-Vásquez et al., 2019). Esta situación representa un problema de salud pública significativo, dado que la salud bucal es esencial para el bienestar general de las personas. Entre los microorganismos implicados en el desarrollo de las caries, *Streptococcus mutans* juega un papel clave debido a su capacidad para producir ácido láctico a partir de carbohidratos disminuyendo el pH bucal por debajo del límite crítico (4.5-5), lo que provoca la desmineralización dental, además puede formar biofilms

junto a otras bacterias como: *Veillonella spp*, *Lactobacillus spp* y *Bifidobacterium spp*. (Forssten et al., 2010; Krzysciak et al., 2016).

Los tratamientos convencionales para prevenir y controlar las caries incluyen el uso de productos químicos como la clorhexidina y el fluoruro, a pesar de su efectividad antimicrobiana su uso prolongado puede causar efectos secundarios como decoloración dental, irritación de la mucosa, fluorosis dental y citotoxicidad a concentraciones elevadas (Liu et al., 2018). Además, los costos elevados de estos tratamientos limitan su accesibilidad para gran parte de la población ecuatoriana. A pesar de los avances tecnológicos e investigativos, la incidencia en la resistencia antimicrobiana sigue aumentando gradualmente y los efectos secundarios de los tratamientos convencionales han impulsado la búsqueda de alternativas fitoterapéuticas más seguras y eficaces (Valdés, 2017)

Según el ministerio de Salud Pública, (2019) basándose en el código ATC A01AB03 correspondiente a clorhexidina menciona que la concentración recomendada para líquidos bucales es del 0.12%. Adicionalmente, Brookes et al., (2020), detalla en su ensayo que la clorhexidina al ser utilizada como enjuague bucal e irrigante de conducto, llega a generar efectos secundarios no deseados como tinción dental, glosodinia, hipogeusia, etc.

Bajo este contexto, este estudio tiene como objetivo evaluar el potencial antimicrobiano de los aceites esenciales de *Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale* y *Ocotea quixos* frente a *Streptococcus mutans*, mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria y la identificación de los metabolitos secundarios responsables de esta actividad. Los resultados de esta investigación podrían contribuir al desarrollo de nuevos tratamientos más seguros para la prevención y el control de las caries dentales.

1.2. JUSTIFICACIÓN

Ecuador es un país con una gran diversidad biológica y cultural, donde las plantas medicinales juegan un papel fundamental en el sistema de salud. Estas especies vegetales son una fuente natural de compuestos biológicamente activos, pero por el desconocimiento, no se han valorado en su posible aprovechamiento sostenible (Mosquera, 2022). Por ello es necesario contar con un conocimiento más extenso y profundo sobre las plantas con uso medicinales en nuestro país, ya que con ello se puede llegar a generar alternativas para la producción de productos naturales que puedan ser incorporados en formulaciones con actividad antibacteriana para uso de la cavidad oral (Chinsebu, 2016).

Debido al constante desarrollo en procesos de investigación como en el surgimiento de la fitoquímica ha permitido identificar y aislar diversos compuestos activos de especies medicinales con actividades antifúngicas y antimicrobianas al igual que diversas propiedades curativas, las cuales podrían presentar relación con la biosíntesis de metabolitos biológicamente activos (Hernández et al., 2015) Las especies vegetales tales como *Curcuma longa* (cúrcuma) se usan para tratar enfermedades dentales, debido a su gran potencial inhibitorio sobre las cualidades antibacterianas (Adaramoye et al., 2009). Por lo que sus aceites esenciales han sido utilizados en la inhibición de microorganismos, en especial la curcumina ha sido efectiva contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Adamczak et al., 2020). Por otra parte, *Zingiber officinale* (jengibre) presenta numerosas actividades farmacológicas como antibacterianos, antiinflamatorios y antioxidantes (Zhang et al., 2022). Se caracteriza por su rizoma ampliamente utilizado en medicina tradicional ya que es la parte de donde extraen los aceites esenciales, tales como gingeroles y

shogaoles, terpenoides y flavonoides (Puente Contreras & Torres Casanova, 2018) los cuales actúan sobre las bacterias como *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus mutans* (Guanoluisa-Jami & Hidalgo-Araujo, 2017), así como, *Cymbopogon citratus* (hierba luisa), es una especie productora de aceites esenciales con capacidades antifúngicas y antibacteriana (Cimanga et al., 2002; Ambade & Deshpande, 2019) y el *Ocotea quixos* (ishpingo), un árbol nativo del Ecuador, es utilizado para preparar bebidas aromáticas con diversos beneficios para la salud, proporcionados por el aceite de sus cálices, rico en transcinamaldehído y cinamato de metilo (Noriega et al., 2018; Valarezo et al., 2021) Las esencias de las hojas y tallos de *O. quixos* contienen compuestos monoterpenos oxigenados, como el 1,8-cineol y el terpinen-4-ol, en concentraciones que no superan el 0,40% respectivamente; estos compuestos se han reportado como buenos moduladores de la actividad antibacteriana (Calderón et al., 2018).

Según estudios realizados por Figueroa-Gordon et al. (2009) la presencia de microorganismos involucrados a lesiones de caries dental están conformadas mayoritariamente por bacterias anaerobias facultativas Gram-positivas como: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Actinomyces* y *Bifidobacterium* y pueden adquirir la capacidad de producir biofilm en la superficie de los dientes, encías y en la superficie interna de la boca, que desencadenan en patologías como caries dental y periodontitis (Morón, 2021). Las bacterias del género *Streptococcus*, son residentes a la flora de la cavidad bucal, ocasionalmente pueden actuar como reservas genéticas y posteriormente transfieren genes de resistencia a bacterias transitorias, Por lo que se ha impulsado la búsqueda de alternativas naturales y efectivas para combatir esta bacteria, mejorando así la salud y el bienestar de la población (Barrientos Sánchez et al., 2015; Colina & Colina, 2022; Rezaei et al., 2023).

Considerando que la investigación sobre las propiedades antimicrobianas de *Curcuma longa*, realizada por Lee et al. (2011) demuestra que su aceite esencial inhibió el crecimiento y producción de ácido de *S. mutans*, en el caso de *Cymbopogon citratus*, Ortega-Cuadros et al., (2018) menciona que los efectos antibacterianos que le proporciona distintos fitoquímicos interactúan con las estructuras celulares de la bacteria afectando su funcionalidad y viabilidad, mientras que Lee, et al. (2021) determina que *Zingiber officinale* el cual contiene varios compuestos bioactivos, como los gingeroles y shogaoles, que tienen propiedades antimicrobianas. Estos compuestos han demostrado inhibir el crecimiento de diversas bacterias, incluyendo *S. mutans* interviniendo con su adhesión y actividad metabólica y *Ocotea quixos* en un estudio reciente realizado por Martinez et al., (2023) ha evaluado y encontrado que la actividad antimicrobiana de sus extractos es beneficioso para el control de la placa dental principalmente por *S. mutans*. El estudio de los aceites esenciales de estas especies aporta con nuevos avances en la búsqueda de compuestos que combaten patógenos como *S. mutans* sin contribuir al problema de la resistencia antimicrobiana.

Según Rezaei et al., (2023) al utilizar los aceites esenciales se busca desarrollar tratamientos preventivos y terapéuticos más efectivos para combatir distintas patologías, mejorando así la salud y el bienestar de la población. Además, la resistencia de los microorganismos frente a los antisépticos es un factor de suma importancia a tomar en cuenta (Brookes et al., 2020) y el uso prolongado de antisépticos está asociado a la irritación bucal, dolor gingival y pérdida temporal del gusto (Bascones & Morante, 2006)

Esta investigación abre las puertas a alternativas naturales y accesibles, relevantes especialmente para comunidades con recursos o acceso limitados a atención médica. La investigación no busca únicamente encontrar soluciones prácticas a problemas de salud específicos, sino también ampliar el entendimiento sobre las propiedades medicinales de estas plantas. Por lo que se considera importante el estudio de nuevas alternativas naturales que pueden ser utilizadas como posibles activos con actividad biológica beneficiosa para la formulación de nuevos productos

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. General

Comparar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales *Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale* y *Ocotea quixos*, frente a *Streptococcus mutans* mediante pruebas *in vitro*, identificando posibles candidatos a tratamientos en afecciones dentales.

1.3.2. Específicos

Establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los aceites esenciales mediante el método de microdilución en caldo, determinando la dosis más baja.

Identificar el metabolito secundario con actividad antibacteriana de los diferentes aceites esenciales mediante bioautografía, caracterizando los compuestos responsables de la actividad antibacteriana.

Comparar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales mediante el método de difusión de discos, determinando la sensibilidad de la bacteria a los compuestos.

1.4. HIPÓTESIS

La aplicación de diferentes aceites esenciales de *Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale* y *Ocotea quixos* exhiben actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans*.

2. CAPÍTULO II

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. ESTADO DEL ARTE

El uso de principios activos naturales para manejar patologías, incluso del tipo infeccioso, es una alternativa excelente en situaciones en las que no se dispone de tratamientos específicos para aliviar diferentes síntomas de las enfermedades. (Domingo & López-Brea, 2003). En los que respecta al uso de plantas medicinales, fundamentado en conocimientos ancestrales, ha incrementado debido a la resistencia generada por ciertas bacterias a tratamientos y medicamentos convencionales, además, son utilizadas como remedios preventivos ante distintas patologías. Hoy en día, esta resistencia antimicrobiana representa una amenaza para la salud pública, con cepas bacterianas para las cuales solo existe un tratamiento farmacológico efectivo, y en algunos casos, ninguno (Al-Haroni, 2008).

Shukla & Mehta (2015), en su estudio evaluó la capacidad antimicrobiana de extractos de *Curcuma longa* frente a *S. mutans* y determinó que tienen una actividad inhibidora considerable contra el microorganismo, demostrando así el potencial de esta especie como una alternativa de origen natural en la prevención de caries. No obstante, Naz et al. (2010) demuestra en sus resultados que la eficacia está ligada estrictamente a su concentración, especie microbiana y fracción del aceite esencial, pero mayoritariamente de su proceso de extracción. Además, los diferentes grados de sensibilidad de los microorganismos bacterianos evaluados pueden estar relacionados con su tolerancia intrínseca. Esto sugiere que la resistencia varía según las características específicas de cada cepa

Adicionalmente, Singh, et al., (2024) mencionan que el aceite esencial de *Curcuma longa* es más efectivo frente a cepas Gram-positivas como *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Actinomyces* y *Bifidobacterium*, en comparación con las cepas Gram-negativas como *Veillonella* y *Prevotella*. Sumado a esto, Lee et al., (2011) determina que el aceite esencial de *Curcuma longa* exhibe una inhibición relevante frente a *S. mutans* en concentraciones superiores a 0.5 mg/mL, además se analizaron los componentes del AE mediante distintas técnicas de cromatografía, demostrando que los principales componentes son: α -turmerona (35.59%), germacrona (19.02%), α -zingiberena (8.74%), α -turmerona (6.31%), trans- β -elemenona (5.65%), curlona (5.45%) y β -sesquipelandreno (4.73%)

Según, Mouta et al. (2022) el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* mostró actividad antimicrobiana significativa contra *Streptococcus mutans*, en el cual se determinó que la CMI es de 3.12 μ L/mL para este aceite esencial, además menciona que los compuestos que le confieren esta actividad son terpenos como el neral y el geranial. Mientras que Almeida, et al., (2013) en ensayos con *Cymbopogon citratus*, quedó en evidencia que existe actividad bacteriostática frente a cepas de *Streptococcus mutans* y otros microorganismos pertenecientes al microbiota de la cavidad oral en diferentes concentraciones. La concentración mínima inhibitoria para *S. mutans* del aceite esencial fue del 0.5mg/mL. Por otro lado, Tofiño-Rivera et al., (2016) estableció en su experimentación que la concentración mínima de erradicación de biofilm generados por *S. mutans* del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* fue de 0.1mg/100mL, 0.001 mg/mL con una efectividad del 95%.

Según estudios realizados por, Hasan et al., (2015), mencionan que investigaron la actividad *in vitro* e *in vivo* del extracto crudo frente a las propiedades patogénicas de *S. mutans*, se

descubrió que los extractos de *Zingiber officinale* inhibieron fuertemente una variedad de propiedades cariogénicas del microorganismo patogénico, en el que se identificaron algunos compuestos como zingibereno, β -bisaboleno, gingerol y shogaol. Se encontró que la formación de biofilm en *S. mutans* se redujo durante fases críticas de crecimiento.

Mostafa (2018), determinó que la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la nanoemulsión del aceite esencial de *Zingiber officinale* fue de 62.5 μ L/mL, equivalente a 0.61 μ L/mL de aceite esencial puro, frente *Streptococcus mutans*.

Mientras que Ríos Herrera et al., (2021) demuestra que en concentraciones de 100 mg/ml de aceite esencial de *Zingiber officinale* generó el mayor diámetro en los halos de inhibición, demostrando así ser la concentración mínima más efectiva. Siendo una de sus limitaciones las pruebas *in vitro* ya que no le permiten interactuar y observar su comportamiento en condiciones naturales y no controladas, lo que aportaría en la eficacia y seguridad del aceite esencial.

De otra manera, Noriega et al., (2018) empleó el método de difusión en disco que es comúnmente utilizado en la evaluación antimicrobiana de aceites esenciales, en este caso de *Ocotea quixos*, proyecto en el que se expresa el valor de la concentración mínima inhibitoria fue de 13.08 mg/mL frente a la bacteria Grampositiva *Streptococcus mutans*. De igual forma, Logroño (2021), menciona que la CMI de esta especie frente al agente patógeno es de 13.08 mg/mL.

2.2. MARCO TEÓRICO

Ecuador, a pesar de su rica biodiversidad y potencial para la producción de aceites esenciales, enfrenta varios desafíos que han llevado a una baja producción en este sector. Entre los factores principales se encuentran la falta de inversión en infraestructura adecuada, la carencia de tecnología moderna y las dificultades en la comercialización y exportación. En cuanto a la

infraestructura y tecnología, la producción de aceites requiere de instrumentación avanzada para la extracción y procesamiento que usualmente no se encuentra disponible en el país, inclusive en el aspecto de mercado y comercialización, la falta de estrategias de mercado favorable es una limitante significativa, ya que, los aceites esenciales no llegan a competir en el mercado internacional por problemas de marketing y reconocimiento (Gómez et al., 2022; López & Martínez, 2023)

2.2.1. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son compuestos naturales derivados de las fracciones volátiles del metabolismo secundario de las plantas. Estos compuestos pueden ser aislados por distintos métodos de extracción. Según la norma ISO 9235:2013, término 2.11, los aceites esenciales son un producto obtenido de materia vegetal a través de procesos como arrastre de vapor, procedimientos mecánicos o destilación en seco, seguidos de la separación de la fase acuosa por métodos físicos.

Estos aceites se extraen de partes de las plantas, como flores, hojas, tallos, raíces, frutos y corteza que proveen características biológicas y farmacéuticas. Por su naturaleza versátil, estos compuestos pueden usarse como agentes tóxicos de contacto, fumigantes e incluso para aplicaciones atractivas o repelentes (Sousa et al., 2022). Sumado a eso, su amplio espectro de actividad biológica, los aceites esenciales tienen aplicaciones en diversas áreas, incluyendo medicina, agricultura, cosmética, entre otras (Llorens Molina, 2021).

Además, poseen capacidades antimicrobianas que han sido evaluadas como fuentes potenciales de compuestos antibacterianos, antifúngicos y alternativas para el tratamiento de

enfermedades infecciosas, adicionalmente artículos respaldan que los aceites tienen capacidades antisépticas y antivirales. (Chouhan et al., 2017)

Sin embargo, existen diversos factores que afectan la composición química de los aceites esenciales, tales como: variación genética, tipo o variedad de plantas, nutrición, aplicaciones de fertilizantes, ubicación geográfica, clima, variaciones estacionales, estrés durante su maduración y crecimiento, de igual manera como el secado y almacenamiento post cosecha (Sousa et al., 2022). Estas características multifuncionales de los aceites esenciales los posicionan como un recurso valioso y versátil, fomentando su uso en múltiples sectores y promoviendo la investigación continua sobre sus propiedades y aplicaciones.

Los distintos compuestos de los aceites esenciales y extractos vegetales, tales como terpenos, flavonoides, flavonoles, alcaloides y fenilpropanoides, actúan atacando a la pared y membrana celular de las distintas bacterias siendo este su mecanismo de acción más común (Álvarez-Martínez et al., 2021), alterando la permeabilidad, algunas funciones básicas de la membrana y afectando en la liberación de algunos componentes intracelulares ocasionando la inhibición de las bacterias (Ali Hasan, 2012).

2.2.2. Extracción de aceites esenciales

La extracción de aceites esenciales es de suma importancia en la industria de cosméticos, fragancias y sobre todo en terapias naturales, existen distintas metodologías, tales como: destilación por vapor que consiste en el uso de vapor de agua que será el encargado de atravesar el material vegetal, arrastrando de esta manera los aceites esenciales, después el vapor es condensado en un líquido y el aceite es separado del agua (Croteau et al., 2000). La extracción con solventes es otra metodología utilizada en este aspecto, implica el uso de solventes en los aceites

esenciales que permitirán su correcta disolución, cabe recalcar que finalmente el solvente y el producto serán separados. Este método está enfocado en materiales vegetales los cuales no pueden ser destilados fácilmente por métodos más convencionales (Linstrom & Mallard, 2019). El enfleurage es una técnica principalmente utilizada en flores, las cuales no aportan resultados eficientes en el proceso de destilación, es menos común con relación a las técnicas ya mencionadas, debido a sus elevados costos y metodología compleja (Tisserand & Young, 2014).

2.2.3. Descripción botánica de las especies vegetales

2.2.3.1. Curcuma longa

Curcuma longa, pertenece a la familia *Zingiberaceae*, está distribuida en regiones tropicales y subtropicales, generalmente cultivada en países asiáticos, principalmente en India y China (Chanda & Ramachandra, 2019), ampliamente utilizadas en medicina oriental para tratar enfermedades dentales, presenta un gran potencial inhibitorio sobre las cualidades cariogénicas de *Streptococcus mutans* (Adaramoye et al., 2009).

Ilustración 1

Planta de Curcuma longa



Fuente: (Leticia, 2011)

2.2.3.1.1. Clasificación taxonómica

Tabla 1

Taxonomía de Curcuma longa

<i>Nombre Científico</i>	<i>Curcuma longa</i>
Nombres comunes	<i>Cúrcuma, azufre de Indias</i>
Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Liliopsida</i>
Orden	<i>Zingiberales</i>
Familia	<i>Zingiberaceae</i>
Género	<i>Curcuma</i>
Especie	<i>Curcuma Longa L.</i>

Fuente: (Chanda & Ramachandra, 2019)

2.2.3.1.2. Características botánicas

Curcuma longa, conocida comúnmente como cúrcuma, es una planta herbácea perenne, puede medir hasta un metro de altura. Es una hierba sin tallo con rizoma grueso y aromático, sus hojas son lanceoladas y oblongas, de un profundo color púrpura ferruginoso. El pecíolo juntamente

con la vaina es largos, la espiga aparece antes de las hojas y la bráctea floral es verde con un matiz ferruginoso, la flor es de color amarillo pálido, con coloraciones rojizas en el borde exterior (Chanda & Ramachandra, 2019).

2.2.3.1.3. Características químicas

Hasta la fecha, han sido identificados por lo menos 235 compuestos, principalmente compuestos fenólicos y terpenoides, incluidos diarilheptenoides (curcuminoides) diarylpentanoides, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenoides, alcaloides y esteroides. Así como también se han identificado aceites esenciales, una variedad de vitaminas C y E, y minerales como K, P y Mg. (Li et al., 2011; Cos & Pérez-Urria, 2014). Estudios fitoquímicos realizados demuestran que la actividad antimicrobiana, antiinflamatoria y antioxidante del aceite esencial de cúrcuma se debe a la presencia de metabolitos secundarios como curcuminoides, en especial la curcumina, que son compuestos fenólicos, taninos y flavonoides (García Ariza et al., 2017; Dohude et al., 2023). *Curcuma longa*, es una planta cuyos rizomas contienen el aceite esencial que se encuentra constituido por metabolitos ya mencionados (Torres et al., 2014).

2.2.3.1.4. Aplicaciones de la planta

El polvo de cúrcuma es ampliamente utilizado en medicina tradicional contra enfermedades gastrointestinales, heridas diabéticas, reumatismo, inflamación, sinusitis, anorexia, catarro y tos (Chanda & Ramachandra, 2019). Su uso ancestral en la República Popular China era usado para la prevención y tratamiento de enfermedades relacionadas con molestias en el área del abdomen, mientras que, en la medicina ancestral hindú, era utilizada en la terapia para tratar esguinces e inflamación. Generalmente, en el territorio Oriental, ha sido utilizada como un excelente agente terapéutico, mayoritariamente como anti-inflamatorio (Ríos, et al., 2009). Varios

artículos respaldan la actividad antimicrobiana de *C. longa* frente a diversos patógenos, además de tener diversas aplicaciones, destaca su acción antifúngica y antibacteriana (Kumar, 2013).

2.2.3.2.Cymbopogon citratus

Es una planta aromática perteneciente a la familia de las gramíneas, conocida usualmente como hierba de limón. Esta hierba es nativa y ampliamente distribuida en Asia, África, Sur y Norte América. Destaca por su contenido considerable en flavonoides, aceites esenciales, compuestos fenólicos y una gran variedad de constituyentes fitoquímicos con acción antioxidantes, antiinflamatorias, antifúngicas, antibacteriales, etc. (Oladeji et al., 2019)

Además, es conocida como hierba de limón o hierba luisa, es una hierba ampliamente utilizada en países tropicales, especialmente en el sudeste asiático (*Shah et al., 2011*).

Ilustración 2

Planta de Cymbopogon citratus



Fuente: (Les Jardins de Lilou, 2023)

2.2.3.2.1. Clasificación taxonómica

Tabla 2*Taxonomía de Cymbopogon citratus*

<i>Nombre Científico</i>	<i>Cymbopogon citratus</i>
<i>Nombres comunes</i>	<i>Hierba de limón, hierba luisa o lemongrass</i>
<i>Reino</i>	<i>Plantae</i>
<i>División</i>	<i>Magnoliophyta</i>
<i>Clase</i>	<i>Liliopsida</i>
<i>Orden</i>	<i>Poales</i>
<i>Familia</i>	<i>Poaceae</i>
<i>Género</i>	<i>Cymbopogon Spreng</i>
<i>Especie</i>	<i>Citratus</i>

Fuente: (Shah et al., 2011)

2.2.3.2.2. Características botánicas

Cymbopogon citratus es un género de alrededor de 55 especies. Estas son gramíneas perennes en matas con numerosos tallos rígidos que se originan de un rizoma corto, presenta un

sabor cítrico, la hierba de limón crece en grupos densos que pueden alcanzar 1.8 m de altura y alrededor de 1.2 m de ancho. (Shah et al., 2011).

2.2.3.2.3. Características químicas

La composición química del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* puede variar según el origen geográfico de la materia prima. Se han identificado compuestos como terpenos hidrocarbonados, alcoholes, cetonas, ésteres y especialmente aldehídos.

Shah et al., (2011) menciona que, el aceite esencial, tiene una concentración del 0.2–0.5% en el limoncillo de las Indias Occidentales, está compuesto principalmente por citral; mezcla de dos aldehídos monoterpenos estereoisoméricos: el geranial (40–62% en su isómero trans) y el neral (25–38% en su isómero cis), con predominio del primero. El limoncillo contiene luteolina y sus glicósidos 6-C y 7-O, así como isoorientina 2'-O-ramnosida, extraída de sus partes aéreas. Además, se han identificado flavonoides como quercetina, kaempferol y apigenina en esta planta. Entre los compuestos fenólicos aislados se encuentran elimicina, catecol, ácido clorogénico, ácido cafeico e hidroquinona.

2.2.3.2.4. Aplicaciones de la planta

Esta especie ha sido ampliamente utilizada en la medicina tradicional, además, es comúnmente usada como suplementos en infusiones. En la población de krahô, pueblo originario de Brasil, es ampliamente utilizada por sus capacidades ansiolíticas, anticonvulsivas e hipnóticas, mientras que, en la medicina ancestral de la India, sus hojas eran utilizadas como estimulante y para combatir el catarro, adicionalmente, su aceite esencial es utilizado como agente sedante, analgesico, antimicrobiano, antipiretico, etc. (Laaz, 2022). La hierbaluisa ha sido utilizada en

diversos enjuagues bucales por sus componentes como el citral que presenta actividad antimicrobiana (Enríquez-Estrella et al., 2023).

2.2.3.3. *Zingiber officinale*

Zingiber officinale, conocida comúnmente como jengibre, es originaria del sur de Asia y se cultiva ampliamente en regiones tropicales y subtropicales. Debido a sus propiedades medicinales ha sido muy valorado en medicina, es conocido por su sabor picante y aromático. (Akgül & YÜKSEL, 2020).

Ilustración 3

Planta de Zingiber officinale



Fuente: (Shaman Australis Botanicals, 2024)

2.2.3.3.1. Clasificación taxonómica

Tabla 3

Taxonomía de Zingiber officinale

<i>Nombre Científico</i>	<i>Zingiber officinale</i>
<i>Nombres comunes</i>	<i>Jengibre, kion</i>
<i>Reino</i>	<i>Plantae</i>
<i>División</i>	<i>Magnoliophyta</i>
<i>Clase</i>	<i>Liliopsida</i>
<i>Orden</i>	<i>Zingiberales</i>
<i>Familia</i>	<i>Zingiber</i>
<i>Género</i>	<i>Zingiber</i>
<i>Especie</i>	<i>Zingiber officinale</i> R.

Fuente: (Akgül & YÜKSEL, 2020)

2.2.3.3.2. Características botánicas

Zingiber officinale, es una planta perenne, herbácea, llega hasta los 90 cm de altura. Sus rizomas son horizontales y presentan características aromáticas de sabor picante, gruesos lobulados, de color amarillo pálido, con hojas oblongas lanceoladas estrechas alternas en disposición distica (Akgül & YÜKSEL, 2020).

2.2.3.3.3. Características químicas

Zingiber officinale posee gran cantidad de contenido graso, carbohidratos, ceras, minerales y vitaminas. Contiene varios tipos de aceites volátiles, incluyendo bisaboleno, b-sesquifelandreno, farneseno (10%), curcumen (18%), principalmente zingibereno (35%), y hidrocarburos

sesquiterpenoides. Más de 40 hidrocarburos monoterpénicos diferentes están presentes en pequeñas proporciones, siendo 1,8-cineol, neral, geraniol, linalol y borneol los más abundantes, estos ingredientes activos le dan al jengibre su aroma y sabor característicos. El gingerol y el shogaol actúan como antimicrobianos (Akgül & YÜKSEL, 2020).

2.2.3.3.4. Aplicaciones de la planta

Zingiber officinale (jengibre) por su gran cantidad de componentes y sus beneficios es ampliamente usado en el tratamiento de enfermedades como artritis, dolores musculares, hipertensión, enfermedades infecciosas, también previene la generación de radicales libres por sus propiedades antioxidantes (Ali et al., 2008), así como sus extractos vegetales contiene compuestos monoterpenos, sesquiterpenos y compuestos fenólicos como gingeroles y shogaol que le aportan beneficios antibacterianos (Ali Hasan, 2012). El jengibre ha sido utilizado desde tiempos ancestrales, para tratar afecciones, aliviar náuseas, mejorar la circulación sanguínea, tratar resfriado, problemas digestivos (Ahmed et al., 2022)

2.2.3.4. *Ocotea quixos*

Ocotea quixos, una especie endémica característica del oriente ecuatoriano reside originalmente en América del sur, pertenece a la familia de las Lauraceae y crecen cuando se encuentran entre los 310 y 1250 msnm, se desarrolla en condiciones húmedas tropicales. Este árbol es valorado por sus propiedades aromáticas y medicinales. (Logroño, 2021).

Ilustración 4

Planta de Ocotea quixos

Ilustración 4

Planta de Ocotea quixos



Fuente: (Noriega & Dacarro, 2008)

2.2.3.4.1. Clasificación taxonómica

Tabla 4

Taxonomía de Ocotea quixos

<i>Nombre Científico</i>	<i>Ocotea quixos</i>
<i>Nombres comunes</i>	<i>Ishpingo, canela silvestre</i>
<i>Reino</i>	<i>Plantae</i>
<i>División</i>	<i>Magnoliophyta</i>
<i>Clase</i>	<i>Magnoliopsida</i>

Orden *Laurales*

Familia *Lauraceae*

Género *Ocotea*

Especie *Ocotea quixos (Lam.) Korsem*

Fuente: (Ulloa et al., 2018)

2.2.3.4.2. Características botánicas

Generalmente, un árbol de esta especie suele alcanzar su madurez a los seis años, con una altura que varía entre los 300 cm a 600 cm, presenta hojas lauroides, además de estambres de flores liguladas y cáliz de flor persistente son seis sépalos, los árboles adultos florecen y fructifican cada dos años (Noriega, 2016).

2.2.3.4.3. Características químicas

La composición de su aceite esencial está compuesta mayormente por fenilpropanoides (97.4%) que se caracteriza principalmente por proveer el sabor parecido al de la canela, incluyendo trans-cinamaldehído (36.70%) y trans-metil cinamato (43.60%). Además, los aceites esenciales provenientes de sus flores son ricos en compuestos como ácido trans-cinámico y el cinamato de metilo, los cálices secos contienen transcinamaldehído, mientras que la corteza las hojas contienen principalmente cinamato de metilo. (Calderón et al., 2018). El aceite esencial extraído de las hojas de *Ocotea quixos* contiene cariofileno, humuleno y eremofileno que le confiere su actividad antibacteriana (Noriega & Dacarro, 2008). Varios estudios realizados con aceites esenciales, relacionados con actividades anticoagulantes, antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas

(Calderón et al., 2018). Por otra parte, la actividad antibacteriana se debe a cinamaldehído, tanto bacterias Gram positivas como negativas se ven afectadas por este componente activo (Gilardoni et al., 2021).

2.2.3.4.4. Aplicaciones de la planta

Ocotea quixos, también conocida como canela silvestre o ishpingo, posee características y beneficios medicinales que son utilizados en aromaterapia y en el tratamiento de enfermedades por sus propiedades digestivas, antisépticas y analgésicas (Bruni et al., 2004). Los estudios de la actividad biológica de esta especie están centrados en sus aceites, los cuales se relacionan con propiedades anticoagulantes, antifúngicas, antibacterianas, antioxidantes y antiinflamatorias (Gilardoni et al., 2021). El ishpingo ha sido ampliamente utilizado en medicina ancestral por su actividad antibacterial y antifúngica del aceite esencial presente en las hojas y cálices, también ha sido utilizada en tratamiento de dolencias como dolor de huesos y dolor de cabeza (Noriega & Dacarro, 2008).

2.2.3.5. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son compuestos naturales derivados de las fracciones volátiles del metabolismo secundario de las plantas. Estos compuestos pueden ser aislados por distintos métodos de extracción. Según la norma ISO 9235:2013(en), término 2.11, los aceites esenciales son un producto obtenido de materia vegetal a través de procesos como arrastre de vapor, procedimientos mecánicos o destilación en seco, seguidos de la separación de la fase acuosa por métodos físicos.

Estos aceites pueden extraerse de distintas partes de las plantas, como sus flores, hojas, tallos, raíces, frutos y corteza que proveen diversas características biológicas y farmacéuticas,

además, debido a su naturaleza versátil, estos compuestos pueden usarse como agentes tóxicos de contacto, fumigantes e incluso para aplicaciones atractivas o repelentes (Sousa et al., 2022). Sumado a eso, su amplio espectro de actividad biológica, los aceites esenciales tienen aplicaciones en diversas áreas, incluyendo medicina, agricultura, cosmética, entre otras (Llorens Molina, 2021).

2.2.3.6. *Streptococcus mutans*

Bacterias del género *Streptococcus* orales conforman la flora microbiana de la cavidad bucal que llegan a generar el biofilm, entre estos se encuentra *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus cristatus*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis* (Figueroa Gordon et al., 2011). Uno de estos estreptococos orales más comúnmente aislados es *Streptococcus mutans*, que juega un papel importante en la aparición de enfermedades bucales como: caries y periodontitis; esta última patología presenta una sintomatología en la que destaca la inflamación e infección de las encías, el hueso alveolar, siendo este último el encargado de sostener las raíces en su lugar y el tejido conectivo subyacente (Rezaei et al., 2023).

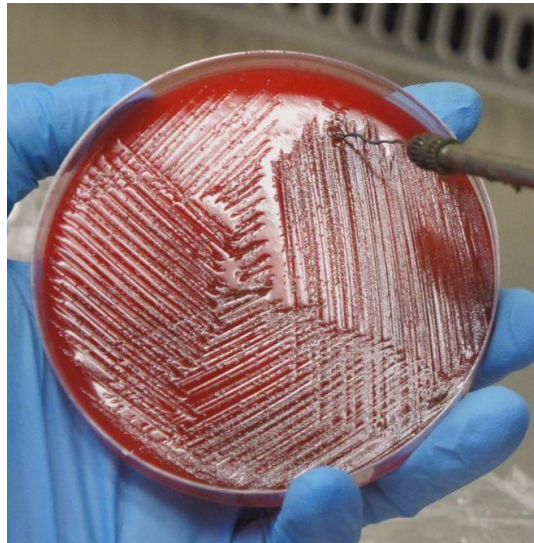
Streptococcus mutans es una de las bacterias que inducen a la caries dental, que, a su vez, es causada por desbalances en la microbiota de la placa dental. Su estudio en el ámbito de colonización de tejidos dentales, implantación con otros microbios es sumamente importante para llegar a comprender la formación del biofilm dental (Ojeda-Garcés et al., 2013). El hábitat natural de *S. mutans* es la cavidad oral humana, específicamente en la placa dental, un biofilm conformado por una gran variedad de especies formado en la superficie dura de los dientes (Lemos et al., 2019).

Las aglutininas que están presentes en la saliva están involucradas en el proceso de adhesión de la bacteria en la superficie dental, esto debido a la interacción con el antígeno I/II, que

es un adhesivo P1 multifuncional, también suele ser conocido como adhesina AgB, SpaP o Pac1, este está anclado en la pared celular bacteriana, codificado por el gen spaP (Krzyściak et al., 2014).

Ilustración 5

Streptococcus mutans en agar sangre



Fuente: Autores

2.2.3.6.1. Clasificación taxonómica

Tabla 5

Taxonomía de Streptococcus mutans

<i>Nombre Científico</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>Dominio</i>	<i>Bacteria</i>
<i>Filo</i>	<i>Bacillota</i>

	<i>Clase</i>	<i>Bacilli</i>	
	<i>Orden</i>	<i>Lactobacillales</i>	
	<i>Familia</i>	<i>Streptococcaceae</i>	
Fuente: (BacDive,	<i>Género</i>	<i>Streptococcus</i>	2019)
	<i>Especie</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	

2.2.4. Patología Oral: Caries Dental

La caries dental es una afección causada por bacterias presentes en la cavidad bucal, constituyendo una infección endógena. Estas bacterias producen ácidos que atacan la superficie del diente, o esmalte, formando pequeños orificios conocidos como caries. La caries dental es una patología multifactorial, resultado de un cambio ecológico en la interfase entre la biopelícula y la superficie dental, lo que genera un desequilibrio y pérdida de mineral (Núñez et al., 2010). La formación y desarrollo de caries dental se basa en el desequilibrio ecológico en la biopelícula de los dientes, una comunidad microbiana incrustada en una matriz de polímeros producida por las bacterias y la saliva. Esta biopelícula puede ser saludable o promotora de enfermedades. Los factores virulentos de *Streptococcus mutans*, que contribuyen al desarrollo de la caries, incluyen: acidogenicidad que consiste en la capacidad de fermentar carbohidratos y azúcares de los alimentos produciendo ácido láctico, la aciduricidad que consiste en la capacidad de generar ácido en un medio de pH bajo y la acidofilicidad que es la capacidad de resistir la acidez del medio expulsando protones fuera de la célula (Pérez Luyo, 2014).

2.2.5. Impacto global de la caries dental

La caries dental es una de las patologías más comunes a nivel mundial, afectando a aproximadamente 2.5 millones de adultos y 573 millones de niños (March Rosselló & Bratos Pérez, 2016). La transición bacteriana en la biopelícula dental evoluciona a medida que avanza la afección: las etapas Iniciales que predominan bacterias anaerobias facultativas Gram-positivas del género como *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Prevotella* y *Veillonella*, mientras que en las etapas avanzadas predominan bacterias anaerobias estrictas tanto Gram-positivas como Gram-negativas (Figuerola-Gordon et al., 2009). La caries dental, siendo una enfermedad multifactorial, requiere un enfoque integral para su prevención y tratamiento, incluyendo la comprensión de la dinámica bacteriana y los factores ecológicos involucrados.

2.2.6. Factores que incrementan la colonización de *Streptococcus mutans* en la cavidad oral

Los microorganismos pioneros de los individuos se adquieren en los tres primeros días de vida de un recién nacido, siendo *S. salivarius*, *S. mitis* y *S. oralis* los predominantes. Diversos factores que pueden alterar la estabilidad de la cavidad oral ya sean fuentes externas medioambientales como son el aire, los alimentos, el agua y el contacto con otros seres humanos, o internos como la perturbación de la homeostasis de la biopelícula dental, una alimentación inapropiada, hábitos de tabaquismo, uso prolongado de medicamentos o la mala higiene. La presencia de *Streptococcus mutans* es necesaria pero no suficiente para el desarrollo de la enfermedad; se debe considerar tanto las características del huésped como del agente.

Con el tiempo, la actividad metabólica de esta comunidad pionera transforma el ambiente, creando condiciones favorables para la colonización de otras poblaciones bacterianas. También se

ha determinado que la adquisición temprana de *S. mutans* es un factor de riesgo importante en el desarrollo de caries de aparición temprana y la futura generación de caries. Esto se puede explicar por el estado inmunológico del huésped y el momento de la infección, ya que los niveles más altos de patogenicidad y virulencia suelen observarse en etapas muy tempranas, cuando los mecanismos inmunes son muy inmaduros.

Se ha estipulado que la adquisición de este microorganismo ocurre por transmisión vertical, es decir de la madre al infante, como por transmisión horizontal, es decir entre miembros de un grupo, sin embargo, está asociado a distintos factores, como el tamaño del inóculo, la frecuencia de la inoculación y la dosis mínima de la infección (Pérez Luyo, 2014).

2.2.7. Actividad antimicrobiana de aceites esenciales

2.2.7.1. Mecanismos de acción de los aceites esenciales frente a bacterias

La actividad antimicrobiana de los distintos aceites esenciales se debe a los compuestos metabólicos que contiene y estos actúan sobre microorganismos como las bacterias a través de distintos mecanismos de acción, como el daño a la estructura y afección al funcionamiento de la membrana, ya que los extremos lipofílicos de la membrana celular de las bacterias Gram positivas tienen afinidad por los compuestos hidrofóbicos de los aceites esenciales, generando una desorganización de los lípidos, sin embargo en bacterias Gram negativas se genera una resistencia a la entrada de los aceites esenciales por la presencia de proteínas extrínsecas en la membrana o por los lipopolisacáridos de la pared celular lo que limita la velocidad de difusión de compuestos hidrofóbicos, inducción de la coagulación de los componentes citoplasmáticos, inhibición de la biosíntesis, funcionamiento de los ácidos nucleicos e interferencia de los procesos metabólicos

esenciales, al existir una alteración en la permeabilidad de la membrana, el transporte de iones y otras moléculas que provocan un desequilibrio intracelular generando la coagulación del citoplasma, desnaturalización de enzimas y proteínas. Interrupción en la comunicación normal celular, se puede ver alterada por las características propias de la bacteria, condiciones ambientales y fisicoquímicas (B. Zhang et al., 2021).

2.2.7.2. Determinación de la capacidad antimicrobiana

En la actualidad, existen diversas pruebas estandarizadas *in vitro*, tales como bioensayos de susceptibilidad antimicrobiana, cuyas técnicas son de suma importancia en lo que respecta a la búsqueda de bioactivos de origen natural. Dentro de los métodos principales destacan los métodos de dilución, bioautografía y métodos de difusión en disco, entre otros, (Ramirez & Marin Castaño, 2009). Por medio de estos procedimientos se determina de manera cualitativa o cuantitativa el efecto antimicrobiano de los extractos o aceites esenciales evaluados frente al microorganismo, de otra manera, los métodos de dilución son los más adecuados para determinar de manera cuantitativa la actividad antimicrobiana, siendo así la técnica más representativa la denominada Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), se encarga de definir la concentración más baja para inhibir el crecimiento visible del microorganismo. Mientras tanto, la técnica usada con mayor frecuencia para la determinación del compuesto responsable de la inhibición bacteriana o fúngica es la bioautografía, considerando que es una técnica que combina la cromatografía con pruebas biológicas. (Sánchez-García et al., 2016)

2.2.7.2.1. Método de microdilución en caldo (MIC)

La microdilución en caldo es una técnica crucial en microbiología para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC por sus siglas en inglés) de compuestos antimicrobianos. La MIC está conceptualizada como la concentración más baja de un compuesto, que será el encargado de inhibir el crecimiento visible del microorganismo con el que se procederá el ensayo después de haber sido incubado por un periodo de 24 horas. Esta técnica es ampliamente utilizada en diagnóstico para verificar y evaluar la actividad *in vitro* de nuevos agentes antimicrobianos o antifúngicos (Ramirez L & Marin D, 2009) Cabe recalcar, que no en todos los casos una CMI baja define una mayor actividad del compuesto antimicrobiano, dado que, las concentraciones mínimas inhibitorias que determinan la sensibilidad son distintas para diferentes microorganismos (Cercenado & Saavedra-Lozano, 2009; Mills et al., 2022).

2.2.7.2.2. Cromatografía de capa fina (TLC)

La cromatografía está catalogada como una técnica biofísica esencial que permite la separación, identificación y purificación de componentes de una mezcla, además, de proporcionar el análisis cuantitativo y cualitativo de la misma. Esta técnica se basa en el principio en el cual, las moléculas constituyentes de una mezcla están sobre la superficie o en la fase estacionaria sólida, mientras que la fase móvil permite la separación por capilaridad en la fase estacionaria (Coskun, 2016).

Las aplicaciones de la cromatografía se extienden significativamente en el análisis de aceites esenciales que son aplicados en el área de ciencias de la vida especialmente en el área de la botánica y la fitoquímica, permitiéndonos identificar y cuantificar los compuestos presentes en

los aceites esenciales, la caracterización y comprensión de sus propiedades químicas (Kowalska & Sajewicz, 2022).

2.2.7.2.3. Actividad antimicrobiana mediante la técnica de bioautografía

La combinación de la tecnología de separación y análisis de cromatografía en capa fina (TLC) con la detección de actividad biológica se conoce como bioautografía (Wang et al., 2021). Esta técnica se aplica mediante el uso de cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía en capa fina de alto rendimiento (HPTLC) y electrocromatografía plana. Sin embargo, el concepto de bioautografía se utiliza mayoritariamente cuando las propiedades antimicrobianas de los principios activos se miden en placas de TLC (Choma & Jesionek, 2015).

Existen varios métodos de bioautografía, tales como: bioautografía directa, de difusión en agar y por inmersión.

La bioautografía directa es el método más utilizado y sencillo en la actualidad. Esta técnica ha sido de gran importancia para la búsqueda de nuevas moléculas antimicrobianas y ha direccionado el aislamiento de principios activos frente a una gran diversidad de microorganismos (Jaramillo, et al., 2015). Consiste en la utilización de una placa TLC, sobre la que se aplica una suspensión de microorganismos junto con una solución nutritiva o colocación directa de la placa sobre la suspensión y la observación de los resultados luego de la incubación pueden realizarse directamente o con reactivos colorantes. Este tratamiento realiza la separación, pretratamiento, incubación y desarrollo en la misma placa (Wang et al., 2021). Mientras que el método de difusión en agar, consiste en la utilización de un medio agar inoculado con el microorganismo y la placa TLC con los compuestos, la cual se coloca boca abajo en contacto directo con la superficie del medio, posterior a la incubación se realiza la bioautografía y la bioautografía por inmersión,

consiste en el recubrimiento de la placa TLC con agar y se deja incubar, posterior a este proceso se realiza la tinción con un agente revelador (Wang et al., 2021; Nuthan et al., 2020).

2.2.7.2.4. Método de difusión en discos

El método de difusión en disco, también conocido como Kirby Bauer, es una técnica cuyo objetivo es determinar la sensibilidad o resistencia de bacterias aerobias y anaerobias facultativas frente a distintos compuestos antimicrobianos, siendo una de las técnicas más utilizadas en la investigación y desarrollo de nuevos antibacterianos y antifúngicos (Hudzicki, 2009). Cabe recalcar que los resultados que se obtienen al medir el diámetro de los halos de inhibición, es decir, las zonas donde no hubo crecimiento por parte de los microorganismos debido a la acción del extracto o aceite esencial son cruciales para evaluar la actividad antimicrobiana (Sánchez-García et al., 2016). Este procedimiento se basa en un estudio fenotípico que permite observar la susceptibilidad o sensibilidad de una cepa bacteriana en presencia de los compuestos bioactivos (Zhang et al., 2022).

3. CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1. Nivel de investigación

La investigación se basó en una metodología experimental, que ha permitido determinar la actividad antimicrobiana de aceites esenciales de *Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale* y *Ocotea quixos*, frente a la bacteria *Streptococcus mutans*.

3.2. Diseño de investigación

Para identificar el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de las distintas especies vegetales, se plantea una investigación de un diseño de carácter experimental con corte transversal.

Los experimentos se realizaron por triplicado

1. Factor de entrada: Tratamientos (bacteria + discos impregnados con aceites esenciales)
2. Niveles: 1
3. Modelo: Anova

Unidad experimental: 4 cajas Petri (bacteria + discos impregnados con controles + discos impregnados con aceites)

1. Resultados: mediante gráficas y tablas
2. Factor Salida: Actividad antimicrobiana (halos de inhibición)

[4 (aceites) + 2 (controles)] x 1 (tipo de bacteria) x 3 (repeticiones biológicas independientes) =
18 Tratamientos

Tabla 6*Tratamientos en la parte experimental*

<i>Tratamiento</i>	<i>Factores de entrada</i>			<i>Factores de salida</i>
	<i>A</i>	<i>S</i>	<i>B</i>	<i>Actividad Antimicrobiana</i>
<i>1</i>	<i>A1</i>	<i>DMSO</i>	<i>S. mutans</i>	<i>Halo de inhibición en mm</i>
<i>2</i>	<i>A2</i>	<i>DMSO</i>	<i>S. mutans</i>	<i>Halo de inhibición en mm</i>
<i>3</i>	<i>A3</i>	<i>DMSO</i>	<i>S. mutans</i>	<i>Halo de inhibición en mm</i>
<i>4</i>	<i>A4</i>	<i>DMSO</i>	<i>S. mutans</i>	<i>Halo de inhibición en mm</i>
<i>t5 (CP)</i>	<i>Clorhexidina</i>		<i>S. mutans</i>	<i>Halo de inhibición en mm</i>
<i>t6 (CN)</i>	<i>DMSO</i>		<i>S. mutans</i>	<i>Halo de inhibición en mm</i>

Nota: A1: Aceite esencial de *Curcuma longa*, A2: Aceite esencial de *Cymbopogon citratus*, A3: Aceite esencial de *Ocotea quixos*, A4: Aceite esencial de *Zingiber officinale*, t5: Control positivo clorhexidina, t6: Control negativo DMSO, S: Solvente (DMSO), B: Bacteria (*Streptococcus mutans*).

Fuente: Autores

3.3.Unidad experimental

La unidad experimental considerada para este proyecto son los crecimientos controlados en cajas Petri en medio de agar Mueller Hinton, con cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, sometidas a los aceites esenciales de *Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale* y *Ocotea quixos*.

3.4. Población y muestra

Las muestras de los aceites esenciales de *Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale* y *Ocotea quixos* se obtuvieron de la fundación Chankuap. Se compraron 50 mL de cada aceite, ubicado en la ciudad de Macas, Ecuador.

3.5.Variables

En este proyecto se presentan dos tipos de variables.

Una variable de tipo dependiente que miden los efectos y cambios con carácter cuantitativo. En este caso es la actividad antibacteriana de los aceites esenciales que se evalúan mediante difusión en disco, la determinación de la concentración mínima inhibitoria mediante microdilución en caldo y la presencia de los metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana.

Por otra parte, la variable independiente es aquella que los investigadores manipulan. En este estudio, la variable independiente son los aceites esenciales (*Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale* y *Ocotea quixos*). Como se puede observar en la Tabla 7.

Tabla 7

Variable dependiente e independiente

Variable	Tipo	Dimensiones
Actividad antibacteriana de los aceites esenciales	Dependiente	Difusión en disco (kirby-Bauer) Concentración mínima inhibitoria Presencia de metabolitos secundarios
Aceites esenciales	Independiente	

Fuente: Autores

3.6.Técnicas de recolección de datos

En el proyecto de investigación, inicialmente se llevó a cabo una exhaustiva búsqueda y revisión bibliográfica acerca de los metabolitos secundarios, propiedades y beneficios de los aceites esenciales de *Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale* y *Ocotea quixos*, explorando cómo estos contribuyen a la actividad antibacteriana de cada planta. Se utilizaron diversos métodos para recopilar información y datos, incluyendo artículos científicos, libros y bases de datos, todos ellos debidamente citados y referenciados según las normas APA de la séptima edición.

En la fase experimental, se evaluó la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale* y *Ocotea quixos* mediante técnicas

como microdilución en caldo, bioautografía y difusión en disco, con el objetivo de obtener su concentración mínima inhibitoria e identificar metabolitos secundarios responsables de su actividad. Los siguientes resultados fueron analizados y recolectados de forma manual

3.7. Técnicas de procesamiento de datos

Los datos obtenidos se procesaron en el programa Excel, se realizaron estadísticas descriptivas, posteriormente se evaluó la normalidad mediante el test de Shapiro-Wilk; Box-Cox para mejorar la normalidad de los datos; análisis de varianza ANOVA para determinar la significancia entre tratamientos, prueba de Durbin-Watson implementada para evaluar la independencia de los residuos del modelo estadístico y prueba de Levene para verificar la homogeneidad de las varianzas, mediante el software estadístico Rstudio.

3.8. Procedimientos experimentales

El procedimiento experimental consta de la evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales y detección de compuestos bioactivos, fundamentados con revisión bibliográfica que se desarrolló en tres fases: la fase uno consiste en el desarrollo del método de Concentración Mínima Inhibitoria de los aceites esenciales de *Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale* y *Ocotea quixos* frente a la bacteria *Streptococcus mutans*. En la fase dos, se desarrolló la técnica de bioautografía con los aceites esenciales frente a *Streptococcus mutans*. Y en la fase tres se evaluó el porcentaje de halo de inhibición de los aceites esenciales frente a la bacteria estudiada

Fase uno:

3.8.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria mediante microdilución en caldo

Para la realización del método de microdilución en caldo se siguió el protocolo establecido por Picazo, (2000).

3.8.1.1.Preparación del inóculo

Inicialmente, en la preparación del inóculo se transfieren alrededor de 3 colonias (Ilustración 6) a un tubo con caldo nutritivo, se incuba a 37°C por 24 horas hasta obtener una turbidez similar al estándar 0.5 de McFarland, el cultivo se ajustó con caldo nutritivo consiguiendo un inóculo final de un rango entre $3-7 \times 10^5$ UFC/mL, el cual se verificó a través de un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 625 nm. El proceso de inoculación en la placa se realizó lo más pronto posible con la finalidad de evitar un incremento innecesario de microorganismos

Ilustración 6

Inoculación en medio líquido (caldo nutritivo)



Fuente: Autores

3.8.1.2.Preparación de soluciones y controles

Las placas de microdilución contienen 96 pocillos (12 x 8), en los cuales se añaden distintas concentraciones de aceites esenciales (*Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale* y *Ocotea quixos*). Se preparó las diluciones de cada aceite utilizando como solvente DMSO hasta obtener un rango de 6.4 a 0.05 $\mu\text{L/mL}$, en los pocillos del 1-8. Posteriormente, se añadieron 10 μL de inóculo con la concentración adecuada según el estándar 0.5 de McFarland, resultando en un volumen final de 110 μL por pocillo.

Se realizó la preparación de los demás pocillos con el control positivo (clorhexidina al 0.12%), controles negativos (DMSO), blanco y control de crecimiento bacteriano.

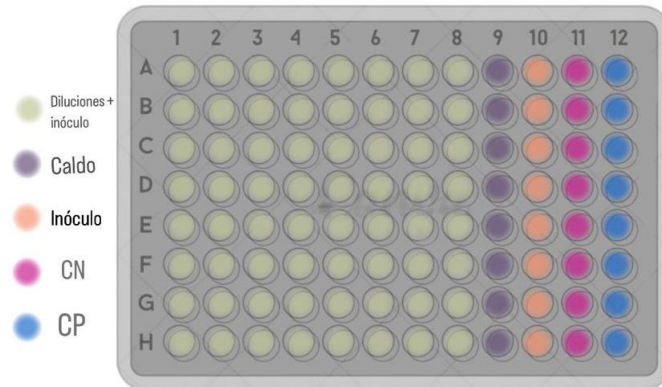
3.8.1.3.Preparación de la placa

Para la preparación de la placa se colocó 100 μL de caldo nutritivo (Ilustración 7) en los pocillos del uno al ocho de todas las filas, donde se procedió a realizar las soluciones seriadas homogeneizando en cada paso 100 μL de solución inicial, posteriormente se inocularon con 10 μL de bacteria *S. mutans* al estándar aproximado de McFarland a 5×10^5 UFC/mL.

En la fila 9 se colocó el blanco, en el pocillo 10 se colocó caldo más inóculo y en los pocillos 11 y 12 se colocaron los controles negativos (DMSO más inóculo y caldo) y controles positivos (clorhexidina más caldo e inóculo). Obteniendo un volumen final de 110 μL por pocillo, como se observa en la Ilustración.

Ilustración 7

Preparación de la microplaca



Nota: Preparación de la microplaca, concentraciones desde 6.4, 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1 y 0.05 $\mu\text{L}/\text{mL}$ desde el pocillo 1 -8-.

Fuente: Autores

3.8.1.4. Incubación y lectura de resultados

Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas en condiciones anaeróbicas. Los datos se interpretan comparando el crecimiento con los controles negativos. Además, en cada pocillo se agregaron 20 μL de una mezcla de colorante TTC (20mg/mL) con Triton X-100 al 0.1%, luego se incubó durante una hora para observar la coloración y posterior lectura de resultados mediante el lector de microplacas. (Khan & Khan, 2015).

Fase dos:

3.8.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana de metabolitos presentes en los aceites esenciales

3.8.2.1. Cromatografía de capa fina

En la placa de gel sílica con dimensiones de 3x10 cm se realizó la cromatografía de capa fina, señalando el inicio y fin del corrido del solvente. Con ayuda de un capilar se colocaron los aceites esenciales de *Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale* y *Ocotea quixos*, posterior a esto se eluyó la placa de sílica en la cámara de desarrollo saturada con la fase móvil correspondiente a cada aceite esencial, como se muestra en la Tabla 8.

Adicionalmente, es crucial considerar el frente de disolvente, que se refiere a la altura máxima alcanzada por el disolvente en la placa. Esta medida se utiliza para calcular la distancia relativa recorrida por los componentes de la mezcla. Además, el factor de retención (Rf) se define como la relación entre la distancia recorrida por un compuesto y la distancia recorrida por el disolvente en el mismo tiempo (Skoog, et al., 2013)

Tabla 8

Fases móviles utilizadas por cada aceite esencial

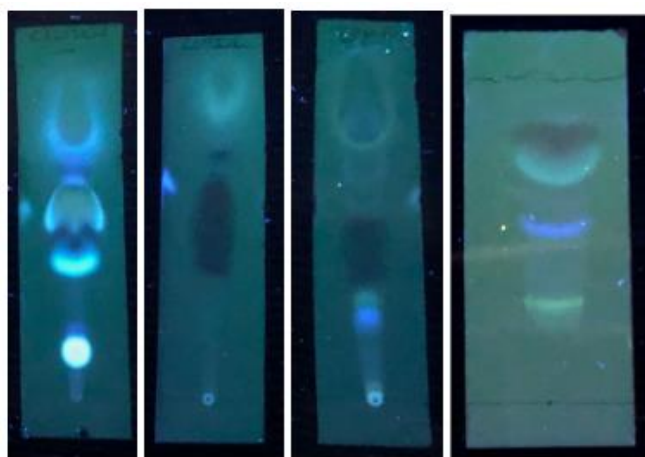
Aceite esencial	Fase móvil	Relación
<i>Curcuma longa</i>	Cloroformo y metanol	95:5
<i>Cymbopogon citratus</i>	Tolueno/ acetato de etilo/ éter de petróleo	93:7:20
<i>Zingiber officinale</i>	Tolueno, acetato de etilo	95:5

(Yustinianus et al., 2019; Guerrini et al., 2023; El-baky et al., 2010; Noriega et al., 2018)

Los solventes avanzaron hasta 1 cm antes de llegar al final de la placa, se dejó secar hasta la evaporación de sus solventes y se observó por fluorescencia la separación de los componentes a longitudes de onda de 254 y 366 nm. Seguido a esto se realizó la bioautografía (Ilustración 8).

Ilustración 8

Cromatogramas observados a una longitud de onda de 366 nm.



1.

2.

3.

4.

Nota: Placas TLC 1. *Ocotea quixos*, 2. *Cymbopogon citratus*, 3. *Zingiber officinale* y 4.

Curcuma longa

Fuente: Autores

3.8.2.2. Bioautografía de contacto

Para la realización del método de bioautografía de contacto se siguió el protocolo establecido por Dewanjee et al., (2015).

Este tipo de bioautografía se realiza mediante el uso del cromatograma de cada aceite esencial (*Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale* y *Ocotea quixos*), es decir las placas ya preparadas, se colocan el lado impregnado directamente sobre la capa de agar inoculado y se deja incubar a 37°C durante unas horas, para optimizar la difusión. Pasado este tiempo, se retira el cromatograma y se incuba durante 18 a 24 horas. Luego, se realiza una tinción con MTT (Azul de Tiazolil Tetrazolio Bromuro) (0.6 mg/mL) + Triton X-100 al 0.1% y se incuba por una hora. Finalmente, se sumergieron en etanol al 70% por 10 segundos

Luego, se observó la tinción y los halos de inhibición generados, que indicaron la presencia de compuestos bioactivos con capacidad antimicrobiana. Se determinó el factor Rf de cada compuesto separado presente en la zona en la que la bacteria no ha logrado proliferar (Choma & Jesionek, 2015).

El Rf se calculó mediante la ecuación 1.:

Ecuación 1

Determinación del factor de retención (Rf)

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}}$$

Fuente: (de Olavide, 2011)

Fase tres:

3.8.3. Determinación de la susceptibilidad de *Streptococcus mutans* frente a los aceites esenciales mediante el método de difusión en disco (Kirby-Bauer)

En la realización de pruebas de sensibilidad antimicrobiana mediante la técnica de difusión en disco (Kirby-Bauer), se consideró el protocolo establecido por Medina et al. (2005).

Se activó la bacteria en un medio de agar sangre en condiciones de anaerobiosis, mediante un asa estéril se tomaron dos colonias que fueron inoculadas en un medio adecuado, luego se procedió a incubar la bacteria para que esta pueda ser utilizada en fase exponencial.

Se realizó métodos de recuento estimados basados en la turbidez para realizar la estimación del número de bacterias totales (viables y no viables). Para este proceso se utilizó el método de estándares de turbidez de McFarland. Se ajustan los parámetros de absorbancia tal como mencionan Sato & Ishikawa (2006), la dilución se ajustó a 0.5 siguiendo la escala de McFarland, también se procedió a medir mediante un espectrofotómetro UV-Vis con una absorbancia de 0.125 con una longitud de onda 550 nm, asegurando la concentración bacteriana (4×10^7 UFC/mL) para la siembra en cajas Petri con agar Mueller Hinton mediante siembra masiva (Sato & Ishikawa, 2006).

Se procedió a impregnar los discos de papel en cada uno de los controles positivos (clorhexidina 0.12%) y negativos (DMSO 1%) y los aceites esenciales en distintas concentraciones (25%, 50%, 75% y 100%), los cuales se sumergieron durante dos minutos, posteriormente se colocaron los discos en la caja Petri. Finalmente, se incubaron las placas a 37°C en la estufa en condiciones anaeróbicas mediante un recipiente de anaerobiosis durante 24 horas. El porcentaje del

efecto inhibitorio se midió mediante la Ecuación 2, tomando como referencia el diámetro de la zona de inhibición del control positivo y medición del halo de inhibición de los aceites esenciales

Ilustración 9

Colocación de discos impregnados en AE e incubación.



Nota: Incubación de cajas Petri en condiciones anaeróbicas

Fuente: Autores

Ecuación 2

Determinación del porcentaje de efecto de inhibición

$$\% \text{ inhibición} = \frac{(\text{halo AE} - \text{halo blanco})}{(\text{halo control positivo} - \text{halo blanco})} \times 100$$

Fuente: (Corzo Barragán, 2012)

4. CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

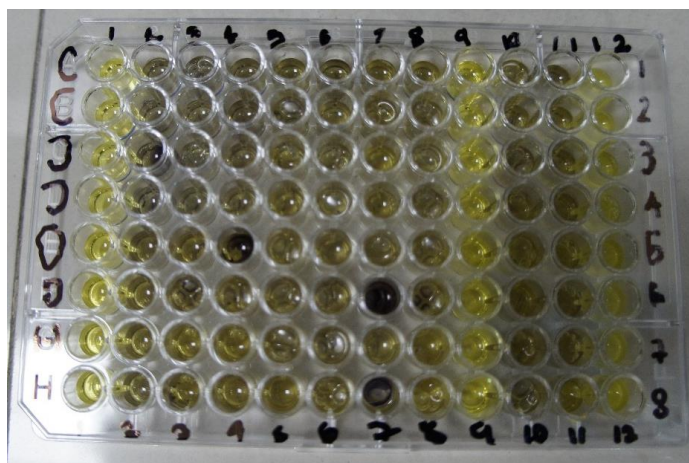
4.1.Resultados

4.1.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los aceites esenciales mediante el método de microdilución en caldo

Los aceites esenciales de *Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale*, *Ocotea quixos* en concentraciones de 0.1, 0.05, 6.4 y 0.8 $\mu\text{L/mL}$ respectivamente, inhiben el crecimiento visible de *Streptococcus mutans* como se puede observar en la Ilustración 10.

Ilustración 10

Microplaca obtenida en el proceso de microdilución en caldo



Nota: Cambio de color de acuerdo con las diferentes concentraciones de A.E. colocadas en el pocillo.

Fuente: Autores

El análisis estadístico para determinar la concentración mínima inhibitoria se realizó con RStudio y se detallan en la siguiente tabla, los valores correspondientes de P, para cada aceite esencial a las diferentes concentraciones. Se realizó análisis de varianza para cada uno de los aceites esenciales

de *Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale*, *Ocotea quixos* frente a *Streptococcus mutans*. Los análisis de los datos obtenidos para el análisis de varianza se encuentran en el anexo

Tabla 9

Análisis de Varianza (Anova) de los datos obtenidos de la concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales de Curcuma longa, Cymbopogon citratus, Zingiber officinale, Ocotea quixos frente a Streptococcus mutans.

	Grados de Libertad	Valor P
<i>Curcuma longa</i>	7	4,76e-05
<i>Cymbopogon citratus</i>	7	0,0868
<i>Zingiber officinale</i>	7	0,05812
<i>Ocotea quixos</i>	7	0,0452

Nota: los tratamientos con el aceite esencial de *Curcuma longa* y *Ocotea quixos* presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$).

Fuente: Autores

Tabla 10

Concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales de *Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale*, *Ocotea quixos* frente a *Streptococcus mutans*.

<i>Streptococcus mutans</i>	
Aceite esencial	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) $\mu\text{L/mL}$
<i>Curcuma longa</i>	0.1
<i>Cymbopogon citratus</i>	0.05
<i>Zingiber officinale</i>	6.4
<i>Ocotea quixos</i>	0.8

Nota: Los valores de CMI se expresan en $\mu\text{L/mL}$, se consideraron las concentraciones correspondientes al análisis de varianza.

Fuente: Autores

4.1.2. Comparación de la Efectividad Antibacteriana de Aceites Esenciales en Microdilución frente a *Streptococcus mutans*

4.1.2.1. Aceite esencial de *Curcuma longa*

En la experimentación efectuada, la concentración de 0,1 $\mu\text{L/mL}$ del aceite esencial de *Curcuma longa* mostró su CMI efectiva contra *Streptococcus mutans*. Sin embargo, Lee et al. (2011) determinaron que el aceite esencial de *Curcuma longa* exhibe una inhibición relevante frente a *S. mutans* en concentraciones superiores a 0,5 mg/mL. Esta discrepancia podría deberse a variaciones en las metodologías empleadas, tales como diferencias en las técnicas de dilución, las condiciones de cultivo o incluso en la composición química del aceite esencial, que puede variar según la región y las condiciones de cultivo de la planta.

4.1.2.2. Aceite esencial de *Cymbopogon citratus*

Para el aceite esencial de *Cymbopogon citratus*, los datos obtenidos en experimentación muestran que a 0,05 $\mu\text{L/mL}$ inhibió el crecimiento de la bacteria. En contraste, Mouta et al. (2022) reportaron una CMI de 3,12 $\mu\text{L/mL}$, y Almeida et al. (2013) encontraron una CMI de 0,5 mg/mL, mientras que Tofiño-Rivera et al. (2016) estableció una concentración mínima de erradicación de biofilm de 0,1 mg/100 mL (0,001 mg/mL). Estas diferencias pueden reflejar variaciones en la pureza del aceite esencial, la técnica de preparación, o diferencias en las cepas de *S. mutans* utilizadas en los experimentos. También podrían influir los diferentes métodos de determinación de la CMI, como la microdilución en caldo frente al método de erradicación de biofilm.

4.1.2.3. Aceite esencial de *Zingiber officinale*

En el caso del aceite esencial de *Zingiber officinale*, los datos obtenidos a partir de la experimentación indican que en concentraciones menores a 6.4 $\mu\text{L/mL}$ la bacteria no presenta inhibición. Por otro lado, Mostafa (2018) determinó que la CMI de la nanoemulsión del aceite esencial fue de 62,5 $\mu\text{L/mL}$, equivalente a 0,61 $\mu\text{L/mL}$ de aceite esencial puro. Esta variación significativa puede deberse al uso de nanoemulsiones, que pueden alterar la biodisponibilidad y la eficacia del aceite esencial. La diferencia también puede deberse a las distintas técnicas de preparación y evaluación utilizadas en los estudios.

4.1.2.4. Aceite esencial de *Ocotea quixos*

Finalmente, para el aceite esencial de *Ocotea quixos*, los resultados obtenidos tras la experimentación indicaron que a la concentración de 0,8 $\mu\text{L/mL}$ presentó concentraciones mínimas inhibitorias efectivas. En contraste, Noriega et al. (2018) y Logroño (2021) reportaron una CMI de 13,08 mg/mL utilizando el método de difusión en disco. La discrepancia notable entre los valores obtenidos puede ser atribuible a las diferencias en los métodos de evaluación utilizados, ya que la concentración del inóculo bacteriano utilizado es mucho menor en la técnica de microdilución en caldo comparado con la difusión en disco.

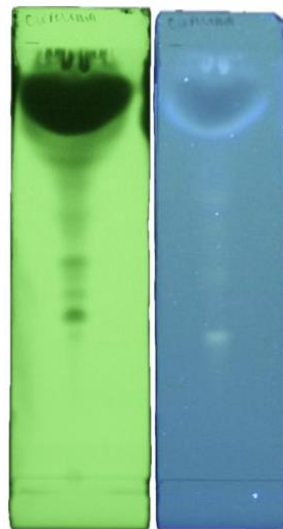
4.1.3. Detección de compuestos con capacidades antimicrobianas del aceite esencial de *Curcuma longa* frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175, mediante el ensayo de bioautografía.

El ensayo de bioautografía de contacto nos permite observar a simple vista las ilustraciones a continuación, las cuales destacan los halos de inhibición generados por cada compuesto separado en la placa de TLC.

Mediante esta técnica (Ilustración 11 y 12), se detectan los supuestos componentes responsables de inhibir el crecimiento y desarrollo de la bacteria al observar coloraciones blancas a lo largo de la placa de TLC.

Ilustración 11

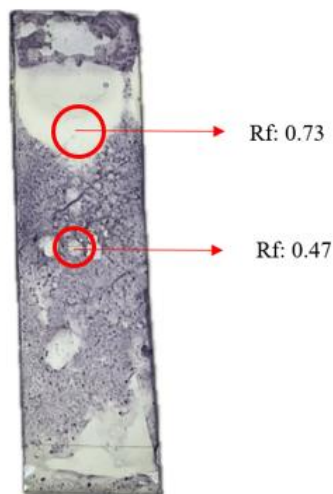
Cromatografía en capa fina con aceite esencial de C. longa observada con longitudes de onda de 254 nm y 366 nm



Fuente: Autores

Ilustración 12

Bioautografía de TLC de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana de C. longa



Nota: Las circunferencias señalan los halos de inhibición generados por el aceite esencial de *Curcuma longa* frente *S. mutans*, evidenciando el *Rf*

Fuente: Autores

Con los valores obtenidos de *Rf* 0.73 y 0.47 en el ensayo de bioautografía de *Curcuma longa*, se identifican dos compuestos con actividad antimicrobiana. Según Kushwaha et al. (2021), los valores de $Rf \approx 0.70$ y $Rf \approx 0.45$ corresponden a ar-turmerona, antimicrobiano efectivo contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas; y curcumina que de igual manera inhibe bacterias Gram-positivas (*S. aureus*) y Gram-negativas (*E. coli*), respectivamente como se visualiza en la Tabla 11. Estos compuestos contribuyen a la actividad antibacteriana del aceite esencial. Los valores obtenidos son aproximados y guardan relación con los componentes mencionados en la literatura.

Tabla 11

Valores R_f y distancia recorrida de cada compuesto con actividad antimicrobiana correspondiente al aceite esencial de C. longa

	Distancia	Frente de	Compuesto	Color detectado
	recorrida (cm)	referencia (RF)		a 366 nm
1	4	0.73	Curcumina	Amarillo
2	6.2	0.47	Ar-turmerona	Azul

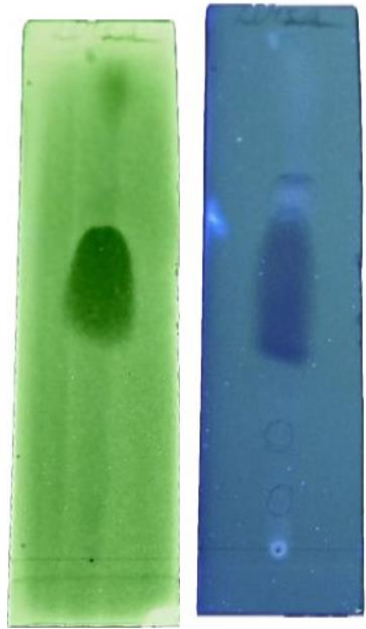
Fuente: Autores

4.1.4. Detección de compuestos con capacidades antimicrobianas del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Por medio de la técnica de bioautografía directa (Ilustración 13 y 14) se detectaron metabolitos con actividad antimicrobiana que se observan a simple vista posterior a su tinción con el uso del colorante MTT.

Ilustración 13

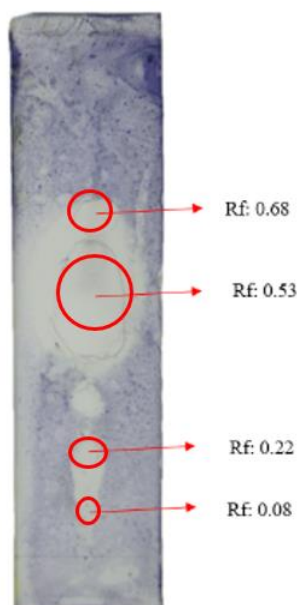
Cromatografía en capa fina con aceite esencial de C. citratus observada con longitudes de onda de 254 nm y 366 nm



Fuente: Autores

Ilustración 14

Bioautografía de TLC de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana de C. citratus



Fuente: Autores

Nota: Las circunferencias señalan los halos de inhibición generados por el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* frente *S. mutans*, evidenciando el Rf

Fuente: Autores

Se obtuvieron valores Rf: 0.68, 0.53, 0.22 y 0.08 que al ser comparados con el artículo expuesto por Kushwaha et al., (2021) sugiere que los componentes principales incluyen citral (con sus isómeros geranial y neral), geraniol, y α -terpineol, entre otros.

Tabla 12

Valores Rf y distancia recorrida de cada compuesto con actividad antimicrobiana correspondiente al aceite esencial de C. citratus

	Distancia recorrida	Frente de referencia	Compuesto	Color detectado a
	(cm)	(Rf)		366 nm
1	0.7	0.08	γ -Cadinene	Azul claro
2	1.9	0.22	α -Terpineol	Azul oscuro
3	4.6	0.53	Citral	Azul claro
4	5.2	0.68	Geraniol	Azul claro

Fuente: Autores

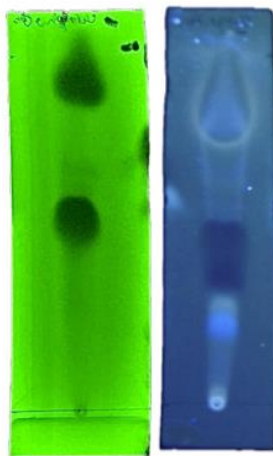
- Geraniol ($R_f \approx 0.68$): Es un monoterpeno con propiedades antimicrobianas frente a *S. aureus* (gram-positiva). Su valor de R_f obtenido en el presente estudio está en concordancia con los reportados en la literatura.
- Citral ($R_f \approx 0.53$): Principal compuesto del aceite esencial, conocido por su fuerte actividad antimicrobiana frente a *E. coli*. El valor de R_f obtenido coincide con los valores reportados en estudios previos.
- α -Terpineol ($R_f \approx 0.22$): Otro monoterpeno con propiedades antimicrobianas frente a *Bacillus cereus*. El valor de R_f obtenido es consistente con la literatura disponible.
- γ -Cadinene ($R_f \approx 0.08$): Compuesto sesquiterpénico con menor volatilidad y antimicrobiano contra *Bacillus cereus*. Aunque menos estudiado, su presencia se sugiere por el valor de R_f obtenido.

4.1.5. Detección de compuestos con capacidades antimicrobianas del aceite esencial de *Zingiber officinale* frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Posterior a la tinción como etapa final de la bioautografía (Ilustración 15 y 16) destacan a simple vista los componentes del aceite esencial con capacidad de inhibir el crecimiento de la bacteria.

Ilustración 15

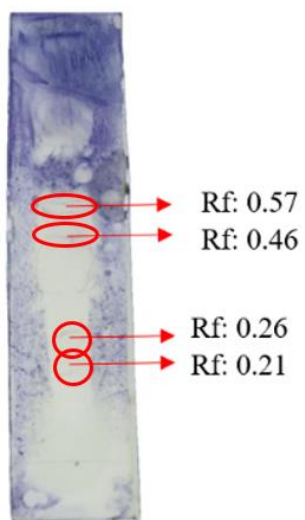
Cromatografía en capa fina con aceite esencial de Z. officinale observada con longitudes de onda de 254 nm y 366 nm



Fuente: Autores

Ilustración 16

Bioautografía de TLC de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana de Z. officinale



Nota: Las circunferencias señalan los halos de inhibición generados por el aceite esencial de *Zingiber officinale* frente *S. mutans*, evidenciando el Rf

Fuente: Autores

En este caso, los valores que se obtuvieron en este proceso con la especie *Z. officinale*, fueron Rf: 0.57, 0.46, 0.26, 0.21. Estos resultados se comparan con los reportados en la literatura para identificar y discutir los compuestos presentes en el aceite esencial.

Tabla 13

Valores Rf y distancia recorrida de cada compuesto con actividad antimicrobiana correspondiente al aceite esencial de Z. officinale

	Distancia recorrida	Frente de referencia	Compuesto	Color detectado a
	(cm)	(RF)		366 nm
1	1.8-2.2	0.21	Shogaol	Azul claro
2		0.26		Azul claro
3	3.9	0.46	Gingerol	Amarillo
4	4.9	0.57	Zingibereno	Azul claro

Fuente: Autores

Como se describe en la Tabla 24 el valor de Rf (0.57) se encuentra en el rango superior reportado para zingibereno, un sesquiterpeno con capacidades antimicrobianas que inhibe *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* típicamente muestra Rf en el rango de 0.4 a 0.6 en diversos sistemas de solventes (Kawanishi & Ohyama, 2012). El Rf (0.46) está cerca del rango reportado para gingerol, siendo este un compuesto bioactivo eficaz contra varias bacterias Gram-

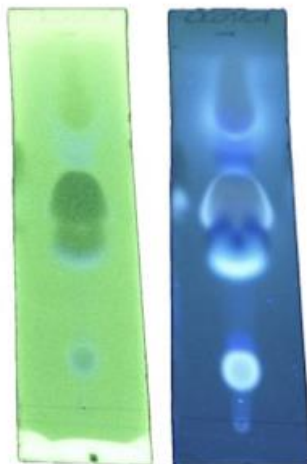
positivas y Gram-negativas, que suele estar en 0.3 a 0.5 en diferentes sistemas de solventes y no solo en el que fue utilizado en este caso (Liu & Zhang, 2017). Finalmente, los Rf (0.26 y 0.21) Estos valores se encuentran en el rango reportado para shogaol, con Rf típicamente entre 0.2 y 0.4 en sistemas similares (Nair & Turner, 2004). Estos valores pueden indicar la presencia de shogaol, catalogado como un antimicrobiano presente en extractos que inhiben el crecimiento de bacterias gram-positivas o gram-negativas, o bien, diferentes isómeros o variantes del compuesto (Liu & Zhang, 2017).

4.1.6. Detección de compuestos con capacidades antimicrobianas del aceite esencial de *Ocotea quixos* frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Finalmente, en este apartado relacionado a bioautografía con la última especie en el desarrollo del ensayo, se observan en la placa de TLC las zonas de inhibición (Ilustración 17 y 18).

Ilustración 17

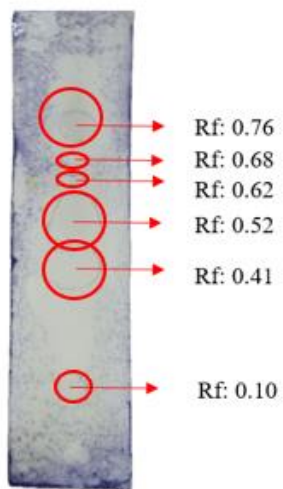
Cromatografía en capa fina con aceite esencial de O. quixos observada con longitudes de onda de 254 nm y 366 nm



Fuente: Autores

Ilustración 18

Bioautografía de TLC de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana de O. quixos



Nota: Las circunferencias señalan los halos de inhibición generados por el aceite esencial de *Ocotea quixos* frente *S. mutans*, evidenciando el *R_f*

Fuente: Autores

Tabla 14

Valores R_f y distancia recorrida de cada compuesto con actividad antimicrobiana correspondiente al aceite esencial de O. quixos

	Distancia recorrida (cm)	Frente de referencia (RF)	Compuesto	Color detectado a 366 nm
1	0.9	0.10	linalool	Azul claro
2	3.5	0.41	eugenol	Blanquecino
3	4.5	0.52	cinamaldehído	Blanquecino
4	5.3-5.8	0.62	Safrol	Azul claro
		0.68		
5	6.5	0.76	No identificado	Azul claro

Fuente: Autores

Los valores *R_f* obtenidos en este caso fueron: 0.76, 0.68, 0.62, 0.52, 0.41 y 0.10. Estos resultados se comparan con bibliografía que menciona que el aceite esencial está compuesto por los siguientes componentes:

Safrol: Reportado típicamente con un Rf en el rango de 0.60 a 0.70 en sistemas de solventes como hexano-acetato de etilo, y conocido por su actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* (Balakrishnan et al., 2012).

Cinamaldehído: Generalmente tiene un Rf en el rango de 0.50 a 0.60 en sistemas de solventes polares, conocido por su potente actividad antimicrobiana frente a *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus* (Yeh et al., 2013).

Eugenol: Reportado con un Rf alrededor de 0.41, conocido por su actividad antioxidante y antimicrobiana frente a *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* (Rao et al., 2014).

Linalool: Puede tener un Rf bajo (alrededor de 0.10), conocido por sus propiedades sedantes y antimicrobianas que inhiben *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (Rao et al., 2014).

El valor de Rf (0.76) está fuera del rango de los compuestos mencionados, sugiriendo la posible presencia de otro compuesto bioactivo no identificado en la literatura disponible.

4.1.7. Determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales y control positivo y negativo, frente a *Streptococcus mutans* mediante el método de difusión en disco

La medición de halos de inhibición se realizó a las 24 horas de incubación, en la Tabla 15 se detalla el diámetro de los halos de inhibición con las distintas concentraciones de los aceites esenciales, así como los halos con los controles positivos y negativos. Para dichos cálculos utilizó la Ecuación 2.

Tabla 15

Diámetro de los halos de inhibición en mm con las distintas concentraciones de los aceites

esenciales y los controles positivos (clorhexidina) y negativos (agua y DMSO) frente a *Streptococcus mutans*

AE	Concentración	Promedio	Diámetro del halo de control +	Porcentaje de inhibición (%)
<i>Curcuma longa</i>	100%	12.33	25	49.32
	75%	15		60
	50%	14.67		58.68
	25%	13		52
<i>Cymbopogon citratius</i>	100%	31	25	124
	75%	22		88
	50%	21		84
	25%	23		92
<i>Zingiber officinale</i>	100%	16.33	25	65.32
	75%	19.67		78.68
	50%	16.33		65.32

	25%	12.33		49.32
<i>Ocotea quixos</i>	100%	25.67	25	102.68
	75%	18.33		73.32
	50%	19.67		78.68
	25%	20.33		81.32
Fuente: Autores				

La tabla 15 indica los halos de inhibición generados por los aceites esenciales de *Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale* y *Ocotea quixos* a distintas concentraciones frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175, y los promedios obtenidos de cada uno de ellos.

El halo de inhibición generado por *Curcuma longa* presentó la mayor actividad es en la concentración al 75% con un halo de 15 mm, seguida de la concentración al 50% generando un halo de 14.67 mm. A pesar de que la concentración al 100% presentó menor actividad de 12.33 mm, se evidencia que todas las concentraciones exhibieron halos de inhibición contra *Streptococcus mutans*. Al igual que A. Mohammed, (2015), indica en su estudio la eficacia de *Curcuma longa* a una concentración del 2% contra *S. mutans*. El halo de inhibición observado fue de 9.7 mm.

Mientras que los resultados obtenidos en *Cymbopogon citratus* demuestran un potencial efecto inhibitorio. Se observó una mayor efectividad en concentraciones elevadas 100% generando un halo de inhibición de 31 mm, sin embargo, incluso a concentraciones menores, el AE mantuvo una actividad considerable. Estudios realizados por Chaudhari et al. (2012) se observó concordancia

en cuanto a la eficacia de *Cymbopogon citratus* a altas concentraciones, ya que obtuvo un halo de inhibición de 10.07 mm con AE al 100%, mientras que ensayos realizados por Oliveira et al. (2008), menciona que el AE de *Cymbopogon citratus* al 5% presenta un halo de inhibición de 6.5 mm y 6 mm, cuyas variaciones podrían deberse a los métodos de extracción.

Con el aceite esencial de *Zingiber officinale* se observó una mayor actividad antimicrobiana en la concentración de 75% con halos de inhibición de 19.67 mm, en las concentraciones de 100% y 50% se obtuvieron resultados similares de 16.33 mm y la de menor actividad se observó al 25% con un halo de 12.33 mm. Por otra parte, Lukita et al. (2021) demuestra en sus ensayos utilizando AE de *Z. officinale* al 75% mediante su actividad formando un halo de 23.43 mm frente a la bacteria.

Sin embargo, el aceite esencial de *Ocotea quixos* mostró ser altamente efectiva contra la bacteria, a concentraciones del 100% se observó una inhibición de 24.67 mm, mientras que en las concentraciones de 75% mostró una variabilidad significativa entre réplicas generando un promedio de 18.33 mm, a concentraciones de 50% se obtuvo un halo de 13.67 y al 25% se observó una inhibición de 13.67 mm. Mientras que, un ensayo realizado por Noriega et al. (2018), se reporta que el aceite esencial de *Ocotea quixos* mostró halos de inhibición significativos contra *Streptococcus mutans*, con un valor de 13,08 mm utilizando el método de difusión en disco.

La inclusión de clorhexidina al 0.12% como control positivo permitió validar la metodología empleada y confirmar la sensibilidad del microorganismo a agentes antimicrobianos. El halo de inhibición promedio de 25 mm obtenido con este compuesto se encuentra dentro del rango esperado según la literatura. Por otro lado, los controles negativos no mostraron actividad, como

se esperaba. Estos estudios son coherentes con estudios previos, como el de Pazmiño et al. (2024), que demostraron que clorhexidina es usada al 0.12% generando un halo de inhibición de 15 mm.

Para una determinación de mayor precisión de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales sobre la bacteria *Streptococcus mutans*, se calculó el porcentaje de inhibición. En el cual se consideró el promedio obtenido del diámetro de inhibición de cada AE y el diámetro del control positivo (clorhexidina).

4.1.8. Análisis estadístico

Con los datos obtenidos se procedió a realizar un análisis estadístico en donde se desarrolló un análisis de varianza en cada uno de los aceites esenciales estudiados estadístico, seguido de la implementación de pruebas de Durbin-Watson para determinar la independencia de los residuos, además de la implementación de la prueba de Shapiro-Wilk para evaluar la normalidad y finalmente la prueba de Levene, la cual permite determinar la homogeneidad de las varianzas.

4.1.8.1.Comparación de la actividad antibacteriana de las concentraciones de cada aceite esencial mediante el método en difusión en discos.

El análisis estadístico para determinar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales mediante el método de difusión en disco, se realizó con Rstudio y se detallan en la siguiente tabla 20, , los valores correspondientes de P, para cada aceite esencial a las diferentes concentraciones. Se realizó análisis de varianza para cada uno de los aceites esenciales de *Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale*, *Ocotea quixos* frente a *Streptococcus mutans*.

4.1.8.1.1. Análisis de varianza del aceite esencial de *Curcuma longa*

En la siguiente tabla se detalla el valor obtenido de P después de realizar el análisis de varianza de las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Curcuma longa*. los resultados indicaron diferencia significativa entre los tratamientos (valor P = 0,000856) (Tabla 16). No se presentaron desviaciones severas a los supuestos del modelo Anova. Independencia, normalidad y homogeneidad de varianzas (Tabla 17). Los mismos fueron 12,33, 15,00, 14,66, 13,00, y 25,00 mm, respectivamente. El control positivo logró el mayor halo de inhibición, entre las diferentes concentraciones de del aceite esencial de *Curcuma longa* destaca el t2 (concentración 50%) con un halo de inhibición de 15,00 mm.

Tabla 16

Análisis de Varianza (Anova) de los datos obtenidos de la actividad antibacteriana del aceite esencial de Curcuma longa a diferentes concentraciones frente a Streptococcus mutans

	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Valor F	Valor P
Tratamientos	4	4,34e ⁻⁰⁵	1,086e ⁻⁰⁵	11,73	0,00085
Residuos	10	9,26e ⁻⁰⁶	9,260e ⁻⁰⁷		6

Fuente: Autores

Tabla 17

Supuestos del modelo de Varianza (Anova)

Independencia	Normalidad	Homogeneidad de varianzas
---------------	------------	---------------------------

Prueba de Durbin-Watson	Prueba de Shapiro-Wilk	Prueba de Levene
DW = 2,01, valor P = 0,2167	W = 0,89444, valor P = 0,0783	valor P = 0,972

Nota: Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para comparar la actividad antibacteriana del aceite esencial de cúrcuma a diferentes concentraciones de 100, 75, 50, 25% y Control (+) 0,12% frente a *Streptococcus mutans*.

Fuente: Autores

Tabla 18

Resultados de la actividad antibacteriana del aceite esencial de Curcuma longa a diferentes concentraciones y Control (+) frente a Streptococcus mutans

Descripción	Tratamientos	n	Halo de inhibición (mm) [Datos transformados]	Halo de inhibición (mm) [Datos originales]	Grupos
Aceite esencial de <i>Curcuma longa</i>	t1	3	0,0066 ± 0,0013	12,33 ± 1,15	b
	t2	3	0,0044 ± 0,0005	15,00 ± 1,00	b
	t3	3	0,0047 ± 0,0010	14,66 ± 1,52	b
	t4	3	0,0059 ± 0,0009	13,00 ± 1,00	b

Clorhexidina (Control +)	t5	3	0,0017 ± 0,0007	25,00 ± 5,00	a
-----------------------------	----	---	-----------------	-----------------	---

Nota: Los resultados son expresados como promedio del halo de inhibición (mm) ± DS, n = 3. Tratamientos con una letra en común no difieren significativamente al 5%, de acuerdo con la prueba DSH de Tukey.

Fuente: Autores

4.1.8.1.2. Análisis de varianza del aceite esencial de *Cymbopogon citratus*

El Anova mostró diferencia significativa entre los tratamientos (valor P = 0,0323) (Tabla 18). No se presentaron desviaciones severas a los supuestos del modelo Anova. Independencia, normalidad y homogeneidad de varianzas (Tabla 20). El t1 (concentración 100%) logró el mayor halo de inhibición 31,00 mm, siendo 1,40 y 1,14 veces mayor que el t2 (concentración 50%) y t5 (Control +), respectivamente.

Tabla 19

Análisis de Varianza (Anova) de los datos obtenidos de la actividad antibacteriana del aceite esencial de Cymbopogon citratus a diferentes concentraciones frente a Streptococcus mutans

	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Valor F	Valor P
Tratamiento	4	189,6	47,4	4,086	0,0323
Residuos	10	116,0	11,6		

Fuente: Autores

Tabla 20*Supuestos del modelo Anova*

Independencia	Normalidad	Homogeneidad de varianzas
Prueba de Durbin-Watson	Prueba de Shapiro-Wilk	Prueba de Levene
DW = 2,49, valor P = 0,8824	W = 0,95015, valor P = 0,5268	valor P = 0,7324

Nota: se observó el promedio de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* en concentraciones 100, 75, 50, 25% y Control (+) 0,12% frente a *Streptococcus mutans*, los mismos fueron 31,00, 22,00, 21,00, 23,00, y 25,00 mm, respectivamente.

Fuente: Autores

Tabla 21

Resultados de la actividad antibacteriana del aceite esencial de Cymbopogon citratus a diferentes concentraciones y Control (+) frente a Streptococcus mutans

Descripción	Tratamientos	n	Halo de inhibición (mm)	Grupos
Aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i>	t1	3	31,00 ± 3,60	a
	t2	3	22,00 ± 2,00	ab
	t3	3	21,00 ± 1,73	b
	t4	3	23,00 ± 3,60	ab

Clorhexidina	t5	3	25,00 ± 5,00	ab
--------------	----	---	--------------	----

(Control +)

Nota: Los resultados son expresados como promedio del halo de inhibición (mm) ± DS

Fuente: Autores

4.1.8.1.3. Análisis de varianza del aceite esencial de *Zingiber officinale*

El análisis ANOVA reveló diferencias significativas entre los tratamientos (valor P = 0,0304) (Tabla 22). No se observaron desviaciones severas de los supuestos del modelo ANOVA, como la independencia, normalidad y homogeneidad de varianzas (Tabla 23). El tratamiento t5 (control positivo) presentó el mayor halo de inhibición, y entre las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Curcuma longa*, se destacó el tratamiento t2 (concentración al 50%) con un halo de inhibición de 19,66 mm.

Tabla 22

Análisis de Varianza (Anova) de los datos obtenidos de la actividad antibacteriana del aceite esencial de Zingiber officinale a diferentes concentraciones frente a Streptococcus mutans

	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Valor F	Valor P
Tratamientos	4	268,3	67,07	4,174	0,0304
Residuos	10	160,7	16,07		

Fuente: Autores

Tabla 23*Supuestos del modelo Anova*

Independencia	Normalidad	Homogeneidad de varianzas
Prueba de Durbin-Watson	Prueba de Shapiro-Wilk	Prueba de Levene
DW = 2,1701, valor P = 0,3835	W = 0,93909, valor P = 0,371	valor P = 0,9512

Nota: Se evaluó la actividad antibacteriana promedio del aceite esencial de *Zingiber officinale* a concentraciones de 100%, 75%, 50%, 25% y del control positivo al 0,12% frente a *Streptococcus mutans*, obteniendo halos de inhibición de 16,33, 19,66, 16,33, 12,33, y 25,00 mm, respectivamente.

Fuente: Autores

4.1.8.1.4. Análisis de varianza del aceite esencial de *Ocotea quixos*

El Anova no mostró diferencia significativa entre los tratamientos (valor P = 0,186) (Tabla 24). Por ende, se podría considerar cualquier concentración de aceite esencial de *Ocotea quixos* como agente antimicrobiano.

Tabla 24

*Análisis de Varianza (Anova) de los datos obtenidos de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ocotea quixos* a diferentes concentraciones frente a *Streptococcus mutans**

Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Valor F	Valor P
--------------------	-------------------	------------------	---------	---------

Tratamientos	4	131,7	32,93	1,907	0,186
Residuos	10	172,7	17,27		

Nota: se observó el promedio de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ocotea quixos* en concentraciones 100, 75, 50, 25% y Control (+) 0,12% frente a *Streptococcus mutans*, los mismos fueron 25,67, 18,33, 19,66, 20,33, y 25,00 mm, respectivamente.

Fuente: Autores

Tabla 25

Resultados obtenidos de la actividad antibacteriana del aceite esencial de Ocotea quixos a diferentes concentraciones y Control (+) frente a Streptococcus mutans

Descripción	Tratamiento	n	Halo de inhibición (mm)	Grupos
	s			
Aceite esencial de <i>Ocotea</i>	t1	3	25,67 ± 2,08	a
<i>quixos</i>	t2	3	18,33 ± 6,65	a
	t3	3	19,66 ± 3,51	a
	t4	3	20,33 ± 0,57	a
Clorhexidina	t5	3	25,00 ± 5,00	a
(Control +)				

Nota: Los resultados se expresan como promedio del halo de inhibición (mm) ± DS, n = 3. Tratamientos con una letra en común no difieren significativamente al 5%, de acuerdo con la prueba DSH de Tukey.

Fuente: Autores

4.1.8.2.Comparación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales mediante el método de difusión en discos.

Para determinar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale*, y *Ocotea quixos* frente a *Streptococcus mutans* se realizó el análisis estadístico considerando los mejores tratamientos previamente analizados, se detalla a continuación:

Los datos considerados fueron los expuestos en la Tabla 26, el análisis de Varianza presentó diferencias significativas entre los tratamientos ($p=0,00053$) como se detalla en la Tabla 27, y los supuestos del modelo estadístico se muestran en la tabla 28.

Tabla 26

Datos obtenidos de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de Curcuma longa, Cymbopogon citratus, Zingiber officinale, y Ocotea quixos a diferentes concentraciones frente a Streptococcus mutans

Aceite esencial	Concentración (%)	Tratamientos	Halo de inhibición (mm)
<i>Curcuma longa</i>	75	t1	16
	75	t1	14
	75	t1	15
<i>Cymbopogon citratus</i>	100	t2	35
	100	t2	30

	100	t2	28
<i>Zingiber officinale</i>	75	t3	23
	75	t3	16
	75	t3	20
<i>Ocotea quixos</i>	100	t4	28
	100	t4	24
	100	t4	25

Fuente: Autores

Tabla 27

Análisis de Varianza (Anova) de los datos obtenidos de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de Curcuma longa, Cymbopogon citratus, Zingiber officinale, y Ocotea quixos a diferentes concentraciones frente a Streptococcus mutans

	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Valor F	Valor P
Tratamientos	3	438,3	146,11	19,06	0,00053
Residuos	18	61,3	7,67		1

Fuente: Autores

Tabla 28*Supuestos del modelo Anova*

Independencia	Normalidad	Homogeneidad de varianzas
Prueba de Durbin-Watson	Prueba de Shapiro-Wilk	Prueba de Levene
DW = 2,8714, valor P = 0,4411	W = 0,96735, valor P = 0,8812	valor P = 0,6329

Fuente: Autores

En la Tabla 29, se observó el promedio de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale*, y *Ocotea quixos* en concentraciones 75, 100, 75, y 100% frente a *Streptococcus mutans*, los mismos fueron 15,00, 31,00, 19,66, y 25,66 mm, respectivamente. El aceite esencial de *Cymbopogon citratus* concentración 100% logró el mayor halo de inhibición 31,00 mm. Siendo 2,06, 1,57 y 1,12 veces mayor que el aceite esencial de *Curcuma longa* concentración 75%, el aceite esencial de *Zingiber officinale* concentración 75% y el aceite esencial de *Ocotea quixos* concentración 100%, respectivamente.

Tabla 29

Resultados de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de Curcuma longa, Cymbopogon citratus, Zingiber officinale, y Ocotea quixos a diferentes concentraciones frente a Streptococcus mutans

Aceite esencial	Concentración (%)	Tratamientos	n	Halo de inhibición (mm)	Grupos
<i>Curcuma longa</i>	75	t1	3	15,00 ± 1,00	c

<i>Cymbopogon</i>	100	t2	3	31,00 ± 3,60	a
<i>citratus</i>					
<i>Zingiber</i>	75	t3	3	19,66 ± 3,51	bc
<i>officinale</i>					
<i>Ocotea quixos</i>	100	t4	3	25,66 ± 2,08	ab

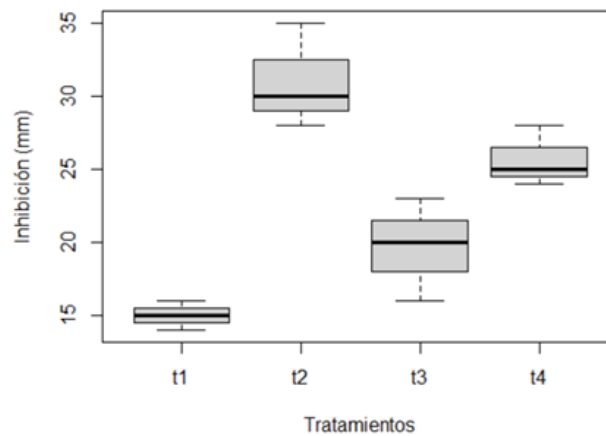
Nota: Los resultados son expresados como promedio del halo de inhibición (mm) ± DS, n = 3. Tratamientos con una letra en común no difieren significativamente al 5%, de acuerdo con la prueba DSH de Tukey.

Fuente: Autores

La actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale*, y *Ocotea quixos* a diferentes concentraciones frente a *Streptococcus mutans* (Ilustración 19). Los resultados son expresados como promedio del halo de inhibición (mm). Siendo el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* al 100% el mejor tratamiento para inhibir el crecimiento de *Streptococcus mutans*.

Ilustración 19

Comparación de actividad antimicrobiana de cada aceite esencial frente a *Streptococcus mutans*



Nota: Actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Curcuma longa* (t1), *Cymbopogon citratus* (t2), *Zingiber officinale* (t3), y *Ocotea quixos* (t4) a diferentes concentraciones frente a *Streptococcus mutans*.

Fuente: Autores

5. CAPÍTULO V

CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES

5.1.CONCLUSIÓN

Una vez concluido el trabajo de investigación respecto a Determinación de la actividad antimicrobiana de *Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale* y *Ocotea quixos*, frente a *Streptococcus mutans* se establece que:

Mediante el método de microdilución en caldo se logró establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada uno de los aceites esenciales (*Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale* y *Ocotea quixos*) frente a *Streptococcus mutans*. En el caso de *C. longa*, Anova mostró diferencia significativa entre los tratamientos (valor $P = 4,76e^{-05}$), de igual manera para *O. quixos*, mediante el Anova se demostró una diferencia significativa entre sus tratamientos (valor $P = 0,0452$). Mientras que en el caso de *C. citratus* (valor $P = 0,0868$) y *Z. officinale* (valor $P = 0,0868$), el Anova no mostró diferencias significativas entre sus tratamientos.

Por medio de la técnica de bioautografía, al obtener los valores de Rf de cada placa, se lograron caracterizar y determinar los compuestos responsables de la actividad antibacteriana en los aceites esenciales (*Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale* y *Ocotea quixos*).

En lo que respecta a la técnica de difusión en disco (Kirby Bauer), permitió la comparación de los aceites esenciales (*Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale* y *Ocotea quixos*) frente *Streptococcus mutans*. Estadísticamente, se observó el promedio de los halos de inhibición de los aceites esenciales de *Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale*, y *Ocotea quixos* en concentraciones 75, 100, 75, y 100% frente a *Streptococcus mutans*, los

mismos fueron 15,00, 31,00, 19,66, y 25,66 mm, respectivamente, la prueba de Anova mostró diferencia significativa entre los aceites (valor $P = 0,000531$). El aceite esencial de *Cymbopogon citratus* concentración 100% logró el mayor halo de inhibición 31,00 mm. Siendo 2,06, 1,57 y 1,12 veces mayor que el aceite esencial de *Curcuma longa* concentración 75%, aceite esencial de *Zingiber officinale* concentración 75% y aceite esencial de *Ocotea quixos* concentración 100%, respectivamente.

La concentración al 100% de aceite esencial de *Ocotea quixos* utilizado en la técnica de difusión en discos (Kirby Bauer) presentó un mayor halo de inhibición en comparación con el control positivo, considerándolo, así como un potencial antibacteriano que puede ser utilizado en diversas formulaciones en productos de uso bucal.

Concluyendo de esta manera, se establece que los datos obtenidos a partir de los aceites esenciales de *Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale* y *Ocotea quixos*, demuestran actividad bioactiva frente a *Streptococcus mutans*, cumpliendo así, la hipótesis del proyecto.

5.2. RECOMENDACIONES

Es muy importante considerar en todos los ensayos antimicrobianos el estándar de McFarland de 0.5, ya que, con esto, se obtienen resultados con mayor precisión, evitando así concluir con datos erróneos.

De la misma manera, se recomienda mantener condiciones estériles en todas las áreas de trabajo; caso contrario, los resultados afectarán por la contaminación de otros microorganismos presentes en el entorno.

En el ámbito de cromatografía de capa fina previo al proceso de bioautografía, es recomendable conocer con exactitud los solventes a ocuparse en la separación de los compuestos que poseen los extractos o aceites de estudio, de esta manera se logra optimizar el tiempo y el uso de reactivos.

Se recomienda realizar estudios más profundos sobre el aceite esencial de *Ocotea quixos*, dado su bajo valor de CMI, para explorar su potencial en aplicaciones terapéuticas y su posible desarrollo como agente antibacteriano natural. Estudios adicionales deberían enfocarse en la evaluación de su seguridad, eficacia y posible toxicidad en modelos in vivo.

REFERENCIAS

Revista Peruana de Química e Ingeniería Química, 15(2), 19–27.

<https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/quim/article/view/4967>

Adamczak, A., Ożarowski, M., & Karpiński, T. M. (2020). Curcumin, a natural antimicrobial agent with strain-specific activity. *Pharmaceuticals*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/ph13070153>

Adaramoye, O. A., Anjos, R. M., Almeida, M. M., Veras, R. C., Silvia, D. F., Oliveira, F. A., Cavalcante, K. V., Araújo, I. G., Oliveira, A. P., & Medeiros, I. A. (2009). Hypotensive and endothelium-independent vasorelaxant effects of methanolic extract from *Curcuma longa* L. in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 124(3). <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.05.021>

Ahmed, N., Karobari, M. I., Yousaf, A., Mohamed, R. N., Arshad, S., Basheer, S. N., Peeran, S. W., Noorani, T. Y., Assiry, A. A., Alharbi, A. S., & Yean, C. Y. (2022). The Antimicrobial Efficacy Against Selective Oral Microbes, Antioxidant Activity and Preliminary Phytochemical Screening of *Zingiber officinale*. *Infection and Drug Resistance*, 15. <https://doi.org/10.2147/IDR.S364175>

Akgül, H., & YÜKSEL, M. (2020). Theory and Research in Science and Mathematics II. 187-197. Obtenido de https://www.gecekitapligi.com/Webkontrol/uploads/Fck/science_4.pdf#page=193

Al-Haroni, M. (2008). Bacterial resistance and the dental professionals' role to halt the problem. *Journal of Dentistry*, 36(2), 95–103. <https://doi.org/10.1016/J.JDENT.2007.11.007>

Ali Hasan, H. (2012). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Crude Extracts Isolated from *Zingiber Officinale* by Different Solvents. *Pharmaceutica Analytica Acta*, 03(09). <https://doi.org/10.4172/2153-2435.1000184>

Ali, B. H., Blunden, G., Tanira, M. O., & Nemmar, A. (2008). Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A review of recent research. In *Food and Chemical Toxicology* (Vol. 46, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.085>

Almeida, R. B. A., Akisue, G., Cardoso, L. M. L., Junqueira, J. C., & Jorge, A. O. C. (2013). Antimicrobial activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. on *Staphylococcus* spp., *Streptococcus mutans* and *Candida* spp. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 15(4), 474–482. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000400002>

Álvarez-Martínez, F. J., Barrajon-Catalán, E., Herranz-López, M., & Micol, V. (2021). Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. *Phytomedicine*, 90, 153626. <https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2021.153626>

Ambade, S. V., & Deshpande, N. M. (2019). Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Essential Oil of *Cymbopogon citratus* against Oral Microflora Associated with Dental Plaque. *Turkey. Original Research Article Ambade and Deshpande*, 28(4), 1–11. <https://doi.org/10.9734/EJMP/2019/v28i430143>

Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48 Suppl 1(SUPPL. 1), 5–16. https://doi.org/10.1093/JAC/48.SUPPL_1.5

Armijo, J., Vicuña, E., Romero, P., Condorhuamán, C., Hilario, B.(2012). Modelamiento y simulación del proceso de extracción de aceites esenciales mediante la destilación por arrastre con vapor

Balakrishnan, N., et al. (2012). Analysis of safrol and related compounds in plants by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1234, 45-50.

Barrientos Sánchez, S., Serna Varona, F. S., Díez Ortega, H., & Rodríguez Ciódaro, A. (2015). Resistencia a la amoxicilina de cepas de *Streptococcus mutans* aisladas de individuos con antibioticoterapia previa y sin esta / Amoxicillin Resistance of *Streptococcus mutans* Isolated from Individuals with and without Antibiotic Therapy. *Universitas Odontologica*, 34(72).
<https://doi.org/10.11144/javeriana.uo34-72.racs>

Bascones, A., & Morante, S. (2006). Antisépticos orales: Revisión de la literatura y perspectiva actual. *Avances En Periodoncia e Implantología Oral*, 18(1).
<https://doi.org/10.4321/s1699-65852006000100004>

Bermúdez, A., Oliveira-Miranda, M. A., & Velázquez, D. (2005). La Investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia*, 30(8), 453–459. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442005000800005&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Brookes, Z. L. S., Bescos, R., Belfield, L. A., Ali, K., & Roberts, A. (2020). Current uses of chlorhexidine for management of oral disease: a narrative review. *Journal of Dentistry*, 103.
<https://doi.org/10.1016/J.JDENT.2020.103497>

Bruni, R., Medici, A., Andreotti, E., Fantin, C., Muzzoli, M., Dehesa, M., Romagnoli, C., & Sacchetti, G. (2004). Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a

traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chemistry*, 85(3). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.019>

Calderón, F. G. O., García, P. L. G., & Ortiz, Y. L. S. (2018). Chemical composition and antioxidant and antibacterial activity of *Ocotea quixos*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 23(4). <https://revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/562/333>

Cercenado, E., & Saavedra-Lozano, J. (2009). El antibiograma. Interpretación del antibiograma: conceptos generales (I). In *Anales de Pediatría Continuada* (Vol. 7, Issue 4). [https://doi.org/10.1016/S1696-2818\(09\)71927-4](https://doi.org/10.1016/S1696-2818(09)71927-4)

Chanda, S., & Ramachandra, T. V. (2019). *Phytochemical and Pharmacological Importance of Turmeric (Curcuma longa): A Review*. 16–23. www.stmjournals.com

Chaudhari, L. K. D., Jawale, B. A., Sharma, S., Sharma, H., Kumar, H. S. C. M., & Kulkarni, P. A. (2012). Antimicrobial activity of commercially available essential oils against streptococcus mutans. *Journal of Contemporary Dental Practice*, 13(1). <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-1098>

Chen, Y., & Schwack, W. (2014). High-performance thin-layer chromatography screening of multi class antibiotics in animal food by bioluminescent bioautography and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1356. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.06.043>

Chimenos-Küstner, E., Giovannoni, M. L., & Schemel-Suárez, M. (2017). Dysbiosis as a determinant factor of systemic and oral pathology: Importance of micorbiome. *Medicina Clínica (English Edition)*, 149(7). <https://doi.org/10.1016/j.medcle.2017.05.023>

Chinsebu, K. C. (2016). Plants and other natural products used in the management of oral infections and improvement of oral health. In *Acta Tropica* (Vol. 154).

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.10.019>

Choma, I. M., & Jesionek, W. (2015). TLC-Direct Bioautography as a High Throughput Method for Detection of Antimicrobials in Plants. *Chromatography 2015*, Vol. 2, Pages 225-238,

2(2), 225–238. <https://doi.org/10.3390/CHROMATOGRAPHY2020225>

Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines 2017*, Vol. 4, Page 58, 4(3), 58.

<https://doi.org/10.3390/MEDICINES4030058>

CIMANGA, K.; KAMBU, K; TONA, L; APERS, S.; BRUYNE, T.; HERMANS, N.

Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 213-220, 2002.

Colina, J. A. D., & Colina, M. D. (2022). La resistencia antimicrobiana, un problema sanitario que necesita abordaje integral y urgente solución. *Medimay*, 29(2).

Colorado, J., Galeano, E., & Martínez, A. (2007). DESARROLLO DE LA BIOAUTOGRAFÍA DIRECTA COMO MÉTODO DE REFERENCIA PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA GENTAMICINA CONTRA *Escherichia coli*. *Vitae*, 14(1).

Corzo Barragán, D. C. (2012). Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 43(3).

Cos, P. S. de, & Pérez-Urria, E. (2014). Cúrcuma I (*Curcuma longa* L.). *REDUCA (Biología)*, 7(2), 84–99. <https://www.revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/1738>

Coskun, O. (2016). Separation techniques: Chromatography. *Northern Clinics of Istanbul*, 3(2), 156. <https://doi.org/10.14744/NCI.2016.32757>

Daboor, S. M., Syed, F., Masood, S., Al-Azab, M. S., & Nori, E. (2015). A Review on *Streptococcus Mutans* With Its Diseases Dental Caries, Dental Plaque and Endocarditis. *Teaching Assistant of Microbiology*, 2(2).

David, V., Andrea, A. N., Aleksandr, K., Lourdes, J. A., Eugenia, P., Nancy, C., Isabel, W., Jessica, C., & León-Tamariz, F. (2021). Validation of a method of broth microdilution for the determination of antibacterial activity of essential oils. *BMC Research Notes*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13104-021-05838-8>

de Olavide, P. (2011). Cromatografía líquida de adsorción en columna y capa fina. *Universidad Pablo de Olavide, Cc.*

Del Valle Pérez, L. O., Socarrás Ferrer, B. B., Macías Abraham, C., Marsán Suárez, V., Sánchez Segura, M., Lam Díaz, R. M., & Merlín Linares, J. C. (2010). Efecto *di* de una solución de *Zingiber officinale* Rosc. (jengibre) sobre la respuesta de linfocitos humanos de donantes sanos y enfermos con inmunodeficiencia celular. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 26(3).

Dellacassa, E., Lorenzo, D., & Paz, D. (2004). *ESTUDIOS EN DOMESTICACIÓN Y CULTIVO DE ESPECIES MEDICINALES Y AROMÁTICAS NATIVAS*. <http://inia.org.uy>

Dohude, G. A., Isnandar, I., Siregar, I. B., & Tanzia, A. (2023). Antimicrobial Assessment of *Curcuma longa* L Against *Streptococcus mutans* Growth. *Journal of Syiah Kuala Dentistry Society*, 8(1). <https://doi.org/10.24815/jds.v8i1.33031>

Domingo, D., & López-Brea, M. (2003). Revisión Plantas con acción antimicrobiana. *Diciembre*, 16(4), 385–393.

Duman C. Castillo B. (2023). *Universidad católica de cuenca unidad académica de salud y bienestar carrera de enfermería practica de la medicina ancestral en la comunidad de cachi del cantón el tambo enero-agosto del 2023*

El-baky, H. H. A., Farag, R. S., & Saleh, M. a. (2010). Characterization of antioxidant and antimicrobial compounds of cinnamon and ginger essential oils. *African Journal of Biochemistry Research*, 4(6).

Enríquez-Estrella, M. Á., Poveda-Díaz, S. E., & Alvarado-Huatatoca, G. I. (2023). Bioactivos de la hierbaluisa utilizados en la industria. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 14(1). <https://doi.org/10.29312/remexca.v14i1.3249>

European Comunitte for Antimicrobial Susceptibility. (2003). Determination of minimum inhibitory concentration (MICs) of antibacterial agents bt brith dilution. En *Clinical Microbiology and Infection*. Obtenido de [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)64063-5/pdf](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)64063-5/pdf)

Figueroa Gordon, M., Alonso, G., & Acevedo, A. (2011). Microorganismos Presentes En Las Diferentes Etapas De La Progresión De La Lesión De Caries Dental. In *Acta Odontológica Venezolana* (Vol. 47, Issue 1).

Figueroa-Gordon, M., Acevedo, A., & Alonso, G. (2009). Microorganismos presentes en las diferentes etapas de la progresión de la lesión de Caries dental. *Acta Odontológica Venezolana*, 47(1), 227–240. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-63652009000100026&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Forssten, S. D., Björklund, M., & Ouwehand, A. C. (2010). Streptococcus mutans, caries and simulation models. In *Nutrients* (Vol. 2, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/nu2030290>

García Ariza, L. L., Olaya Montes Quim, J. H., Sierra Acevedo, J. I., & Padilla Sanabria, L. (2017). Actividad biológica de tres Curcuminoides de Curcuma longa L. (Cúrcuma) cultivada en el Quindío-Colombia. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 22(1).

García Rodríguez, J. A., Cantón, R., García Sánchez, J. E., Gómez-Lus, M. L., Martínez Martínez, L., & Rodríguez-A, C. (2000). *Procedimiento de microdilución en caldo para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos*. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

Gilardoni, G., Montalván, M., Vélez, M., & Malagón, O. (2021). Chemical and enantioselective analysis of the essential oils from different morphological structures of ocotea quixos (Lam.) kosterm. *Plants*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/plants10102171>

Giono-Cerezo, S., Santos-Preciado, J. I., Morfín-Otero, M. del R., Torres-López, F. J., & Alcántar-Curiel, M. D. (2020). Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gaceta Médica de México*, 156(2). <https://doi.org/10.24875/gmm.20005624>

Gómez, A., Pérez, M., & Ruiz, F. (2022). *Tecnologías y desafíos en la industria de aceites esenciales en América Latina*. *Journal of Essential Oils Research*, 34(2), 125-136.

Guanoluisa-Jami, S. A., & Hidalgo-Araujo, P. D. (2017). Efecto antimicrobiano del extracto, aceite esencial de jengibre (*zingiber officinale*) sobre cepas de *enterococcus faecalis*: Estudio *in vitro*. *Odontología*, 19(1).

Guerrini, A., Tacchini, M., Chiocchio, I., Grandini, A., Radice, M., Maresca, I., Paganetto, G., & Sacchetti, G. (2023). A Comparative Study on Chemical Compositions and Biological Activities of Four Amazonian Ecuador Essential Oils: *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae), *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, (Poaceae), *Ocimum campechianum* Mill. (Lamiaceae), and *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae). *Antibiotics*, 12(1).

<https://doi.org/10.3390/antibiotics12010177>

Harris, D. C. (2015). *Quantitative Chemical Analysis* (9th ed.). W.H. Freeman and Company.

Hasan, S., Danishuddin, M., & Khan, A. U. (2015). Inhibitory effect of zingiber officinale towards *Streptococcus mutans* virulence and caries development: *In vitro* and in vivo studies. *BMC Microbiology*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0320-5>

Hernández, T., García-Bores, A. M., Serrano, R., Ávila, G., Dávila, P., Cervantes, H., Peñalosa, I., Flores-Ortiz, C. M., & Lira, R. (2015). FITOQUÍMICA Y ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE PLANTAS DE IMPORTANCIA EN LA MEDICINA TRADICIONAL DEL VALLE DE TEHUACÁN-CUICATLÁN. *TIP*, 18(2). <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2015.09.003>

HORNA QUINTANA, G., SILVA DIAZ, M., VICENTE TABOADA, W., & TAMARIZ ORTIZ, J. (2012). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Revista Médica Herediana*, 16(1). <https://doi.org/10.20453/rmh.v16i1.862>

Horváth, G., Jám bor, N., Végh, A., Böszörményi, A., Lemberkovics, É., Héthelyi, É., Kovács, K., & Kocsis, B. (2010). Antimicrobial activity of essential oils: The possibilities of TLC-bioautography. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(3), 178–182. <https://doi.org/10.1002/FFJ.1993>

Hudzicki J., (2009). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. American Society for Microbiology

Hygiene : JDH / American Dental Hygienists' Association, 87(1). Pałka, Ł., Nowakowska-Toporowska, A., & Dalewski, B. (2022). Is Chlorhexidine in Dentistry an Ally or a Foe? A Narrative Review. *Healthcare* 2022, Vol. 10, Page 764, 10(5), 764. <https://doi.org/10.3390/HEALTHCARE10050764>

J. E. Martínez, et al. (2023). "Inhibition of *Streptococcus mutans* by Extracts from *Ocotea quixos*: Potential Applications in Dental Health". *Phytotherapy Research*, 37(4), 1012-1021. DOI: 10.1002/ptr.7668.

Jaramillo, L., Rojas D. (2015). *Determinación de actividad antimicrobiana por el método de bioautografía a partir de extractos de bacterias halófilas* Presentado como requisito parcial para optar por el título de MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/57920/TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Jones, R.N., A.L. Barry, T.L. Gavan and J.A.II. Washington. 1985. Microdilution and macrodilution broth procedures. *Manual of Clinical Microbiology*, 972-977.

K. L. M. Lee, et al. (2021). "Antimicrobial and Anti-inflammatory Activities of Ginger (*Zingiber officinale*) and Its Potential Role in Oral Health". *Journal of Oral Biosciences*, 63(3), 314-322. DOI: 10.1016/j.job.2021.06.005.

Kawanishi, K., & Ohyama, H. (2012). Analysis of gingerol and related compounds in ginger (*Zingiber officinale*) by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(26), 6746-6752.

Klein, M. I., Hwang, G., Santos, P. H. S., Campanella, O. H., & Koo, H. (2015). *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 5, Issue FEB). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00010>

Kowalska, T., & Sajewicz, M. (2022). Thin-Layer Chromatography (TLC) in the Screening of Botanicals—Its Versatile Potential and Selected Applications. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 19). <https://doi.org/10.3390/molecules27196607>

Kowalska-Krochmal, B., & Dudek-Wicher, R. (2021). The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens* 2021, Vol. 10, Page 165, 10(2), 165. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10020165>

Krzysciak, W., Jurczak, A., & Piątkowski, J. (2016). The Role of Human Oral Microbiome in Dental Biofilm Formation. In *Microbial Biofilms - Importance and Applications*. <https://doi.org/10.5772/63492>

Krzyściak, W., Jurczak, A., Kościelniak, D., Bystrowska, B., & Skalniak, A. (n.d.). *The virulence of Streptococcus mutans and the ability to form biofilms*. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-1993-7>

Kumar, H. (2013). An *in vitro* evaluation of the antimicrobial efficacy of *Curcuma longa*, *Tachyspermum ammi*, chlorhexidine gluconate, and calcium hydroxide on *Enterococcus faecalis*. *Journal of Conservative Dentistry : JCD*, 16(2), 144. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.108197>

Kushwaha, P., Shukla, B., Dwivedi, J., & Saxena, S. (2021). Validated high-performance thin-layer chromatographic analysis of curcumin in the methanolic fraction of *Curcuma longa* L. rhizomes. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences* 2021 7:1, 7(1), 1–7.
<https://doi.org/10.1186/S43094-021-00330-3>

Laaz A. (2022). “Fertilización orgánica del cultivo de hierbaluisa (*Cymbopogon citratus*) en la provincia de Los Ríos, Ecuador”. Universidad Técnica de Cotopaxi. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales.

Lee, K. H., Kim, B. S., Keum, K. S., Yu, H. H., Kim, Y. H., Chang, B. S., Ra, J. Y., Moon, H. D., Seo, B. R., Choi, N. Y., & You, Y. O. (2011). Essential Oil of *Curcuma longa* Inhibits *Streptococcus mutans* Biofilm Formation. *Journal of Food Science*, 76(9).
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02427.x>

Lemos, J. A., Palmer, S. R., Zeng, L., Wen, Z. T., Kajfasz, J. K., Freires, I. A., Abranches, J., & Brady, L. J. (2019). The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiology Spectrum*, 7(1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0051-2018>

LEWINSOHN, E., DUDAI, N., TADMOR, Y.; KATZIR, I.; RAVID, U.; PUTIEVKY, E.; JOEL, D.M. Histochemical localization of citral accumulation in lemongrass leaves *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.. *Annals of Botany*, 81, 35-39, 1998.

Li, S., Yuan, W., Deng Ping Wang, G., & Yang, P. (n.d.). *Chemical composition and product quality control of turmeric* *Chemical composition and product quality control of turmeric (Curcuma longa L.) (Curcuma longa L.) Repository Citation Repository Citation*. Retrieved May 8, 2024, from https://scholarworks.sfasu.edu/agriculture_facultypubs/1

Linstrom, P. J., & Mallard, W. G. (2019). "NIST Chemistry WebBook: Data, Standard Reference Data, and Computer Models". National Institute of Standards and Technology.

Liu, J. X., Werner, J., Kirsch, T., Zuckerman, J. D., & Virk, M. S. (2018). Cytotoxicity evaluation of chlorhexidine gluconate on human fibroblasts, myoblasts, and osteoblasts. *Journal of Bone and Joint Infection*, 3(4). <https://doi.org/10.7150/jbji.26355>

Llorens Molina, J. A. (2021). Los aceites esenciales y su actividad biológica: Una propuesta didáctica. *Anales de Química de La RSEQ*, ISSN 1575-3417, ISSN-e 2792-5250, N°. 2, 2021, Págs. 165-170, 2.

Llorens Molina, J. A. (2021). Los aceites esenciales y su actividad biológica: Una propuesta didáctica. *Anales de Química de La RSEQ*, ISSN 1575-3417, ISSN-e 2792-5250, N°. 2, 2021, Págs. 165-170, 2.

Logroño J. (2021). ISHPINGO (*Ocotea quixos*) COMO FUENTE DE ACEITE ESENCIAL PARA SU USO EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA. *Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de ciencias pecuarias*.

Logroño Logroño, Johanna Estefanía. (2021). Ishpingo (*Ocotea quixos*) como fuente de aceite esencial para su uso en la industria alimentaria. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba.

López, C., & Martínez, R. (2023). *Estrategias de mercado para aceites esenciales: Un análisis del contexto ecuatoriano*. *Economía y Desarrollo Sostenible*, 18(1), 89-104.

Lukita, S., Winda Khosasi, Chandra Susanto, & Florenly. (2021). The Antibacterial Effectiveness of Red Ginger (*Zingiber Officinale* Roscoe) Essential Oil in Inhibiting The Growth of

Staphylococcus Aureus and *Streptococcus Mutans*. *Biomedical Journal of Indonesia*, 7(2).

<https://doi.org/10.32539/bji.v7i2.305>

March Rosselló, G. A., & Bratos Pérez, M. Á. (2016). Antibiograma rápido en Microbiología Clínica. In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 34, Issue 1, pp. 61–68). Elsevier Doyma. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.11.014>

Marsh, P. D. (2006). Dental plaque as a biofilm and a microbial community - Implications for health and disease. *BMC Oral Health*, 6(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1186/1472-6831-6-S1-S14>

Martins, S., Álvarez, E., Abanto, J., Cabrera, A., López, R. A., Masoli, C., Echevarría, S. A., Mongelos, M. G., Guerra, M. E., & Amado, A. R. (2014). Relatorios de la mesa de representantes de sociedades de Odontopediatría de los países Latinoamericanos. *Revista de Odontopediatría Latinoamericana*, 4.

Maya, J. J., Ruiz, S. J., Pacheco, R., Valderrama, S. L., & Villegas, M. V. (2011). Papel de la clorhexidina en la prevención de las infecciones asociadas a la atención en salud. *Infectio*, 15(2). [https://doi.org/10.1016/s0123-9392\(11\)70749-4](https://doi.org/10.1016/s0123-9392(11)70749-4)

Mills, E., Sullivan, E., & Kovac, J. (2022). Comparative Analysis of *Bacillus cereus* Group Isolates' Resistance Using Disk Diffusion and Broth Microdilution and the Correlation between Antimicrobial Resistance Phenotypes and Genotypes. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(6). <https://doi.org/10.1128/aem.02302-21>

Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (2019). *Medicamentos que no constan en el CNMB vigente autorizados para su adquisición período 2017-2019 AM 108 y 158A hasta 28-02-2019*.

Mohammed, N. (2015). Evaluation of Antimicrobial Activity of Curcumin Against Two Oral Bacteria. *Automation, Control and Intelligent Systems*, 3(2).

<https://doi.org/10.11648/j.acis.s.2015030201.14>

Montenegro Pangol, O. E., Villacrés Granda, B. H., Armas Vega, A. del C., & Lara Castillo, D. A. (2023). Influencia a nivel sistémico del *Streptococcus mutans* presente en caries y prótesis dentales: una revisión bibliográfica. *Odontología Activa Revista Científica*, 8(1).

<https://doi.org/10.31984/oactiva.v8i1.747>

Morón, M. (2021). Los biofilms orales y sus consecuencias en la caries dental y enfermedad periodontal. *Ciencia e Innovación en Salud*. <https://doi.org/10.17081/innosa.134>

Mosquera Tayupanta, T. D. L. A. (2015). La Investigación en la Cosmética Natural. Editorial Universitaria Abya-Yala.

Mouta, L. F. G. L., Marques, R. S., Koga-Ito, C. Y., Salvador, M. J., Giro, E. M. A., & Brighenti, F. L. (2022). Cymbopogon citratus Essential Oil Increases the Effect of Digluconate Chlorhexidine on Microcosm Biofilms. *Pathogens*, 11(10).

<https://doi.org/10.3390/pathogens11101067>

Nair, M. G., & Turner, T. B. (2004). Evaluation of the antimicrobial activity of ginger (*Zingiber officinale*) and its constituents. *Journal of Food Science*, 69(5), 464-468.

Nassar, Y., & Brizuela, M. (2023). The Role of Fluoride on Caries Prevention. In *StatPearls*.

Naz, S., Ilyas, S., Aslam, F., & Ali, A. (n.d.). *Antibacterial activity of Curcuma longa varieties against different strains of bacteria*. Retrieved May 7, 2024, from

<https://www.researchgate.net/publication/216321183>

Noriega, P. (2016). *Ishpink, ocotea quixos (lam.) kosterm. history, traditional uses, chemical, pharmacological properties and the economic potential of its essentials oils present within this amazonian species*. <https://www.researchgate.net/publication/304540401>

Noriega, P., & Dacarro, C. (2008). Aceite foliar de Ocotea quixos (Lam.) Kosterm.: actividad antimicrobiana y antifúngica. *La Granja*, 7(1). <https://doi.org/10.17163/lgr.n7.2008.01>

Noriega, P., Mosquera, T., Paredes, E., Parra, M., Zappia, M., Herrera, M., Villegas, A., & Osorio, E. (2018). Antimicrobial and antioxidant bioautography activity of bark essential oil from ocotea quixos (lam.) kosterm. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 31(2). <https://doi.org/10.1556/1006.2018.31.2.11>

Noriega, J., Salazar, J., & Gutiérrez, S. (2018). *Actividad antimicrobiana de aceites esenciales de plantas tropicales*. *Revista de Ciencias Farmacéuticas*, 45(3), 225-234. [doi:10.1016/j.rcf.2018.03.007](https://doi.org/10.1016/j.rcf.2018.03.007)

Núñez, D. P., Lourdes, L., & Bacallao, G. (2010). Bioquímica de la caries dental Biochemistry of dental caries. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 9(2).

Nuthan, B. R., Rakshith, D., Marulasiddaswamy, K. M., Yashavantha Rao, H. C., Ramesha, K. P., Mohana, N. C., Siddappa, S., Darshan, D., Kumara, K. K. S., & Satish, S. (2020). Application of optimized and validated agar overlay tlc-bioautography assay for detecting the antimicrobial metabolites of pharmaceutical interest. *Journal of Chromatographic Science*, 58(8). <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmaa045>

Od, R. M. A., Carlos, L., Od, M. C., Constanza, M., Od, V. R., & C, S. J. G. (2005).

Estudio comparativo de medios de cultivo para crecimiento y recuperación del *Streptococcus mutans* ATCC 25175 “*in vitro*.” *Nova*, 3(3).

Ojeda-Garcés, J. C., Oviedo-García, E., & Salas, L. A. (2013). *Streptococcus mutans* y caries dental. *CES Odontología*, 26(1), 44–56.

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-971X2013000100005&lng=en&nrm=iso&tlng=es

Oladeji, O. S., Adelowo, F. E., Ayodele, D. T., & Odelade, K. A. (2019). Phytochemistry and pharmacological activities of *Cymbopogon citratus*: A review. *Scientific African*, 6, e00137.

<https://doi.org/10.1016/J.SCIAF.2019.E00137>

Oliveira, S. M. M., Lorscheider, J. A., & Nogueira, M. A. (2008). In vitro evaluation of a tooth gel containing essential oils on cariogenic bacteria. *Latin American Journal of Pharmacy*, 27(2).

Organización Mundial de la Salud. (2022). *Informe sobre la situación mundial de la salud bucodental*. OMS.

Ortega-Cuadros, M., Tofiño-Rivera, A. P., Merini, L. J., Martínez-Pabón, M. C., Ortega-Cuadros, M., Tofiño-Rivera, A. P., Merini, L. J., & Martínez-Pabón, M. C. (2018). Antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* (Poaceae) on *Streptococcus mutans* biofilm and its cytotoxic effects.

Revista de Biología Tropical, 66(4), 1519–1529. <https://doi.org/10.15517/RBT.V66I4.33140>

Osso, D., & Kanani, N. (2013). Antiseptic mouth rinses: an update on comparative effectiveness, risks and recommendations. *Journal of Dental*

Parveen, Z., Nawaz, S., Siddique, S., & Shahzad, K. (2013). Composition and antimicrobial activity of the essential oil from leaves of *Curcuma longa* L. Kasur variety. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(1). <https://doi.org/10.4103/0250-474X.113544>

Pazmiño, M. F., Jácome, L. M., Estrada, A. G., & Carvajal, D. M. (2024). *Actividad antibacteriana del aceite esencial de Ocotea quixos contra Streptococcus mutans y Streptococcus sobrinus*.

Pérez Luyo, A. G. (2014). ¿Es la caries dental una enfermedad infecciosa y transmisible? *Revista Estomatológica Herediana*, 19(2). <https://doi.org/10.20453/reh.v19i2.1832>

Prueba de Susceptibilidad de Disco Kirby-Bauer. (2022, octubre 29). LibreTexts Español; Libretexts.

[https://espanol.libretexts.org/Biologia/Microbiolog%C3%ADa/Libro%3A_Microbiolog%C3%ADa_\(Sin_1%C3%ADmites\)/13%3A_Medicamentos_antimicrobianos/13.5%3A_Medici%C3%B3n_de_la_susceptibilidad_a_los_medicamentos/13.5B%3A_Prueba_de_Susceptibilidad_de_Disco_Kirby-Bauer](https://espanol.libretexts.org/Biologia/Microbiolog%C3%ADa/Libro%3A_Microbiolog%C3%ADa_(Sin_1%C3%ADmites)/13%3A_Medicamentos_antimicrobianos/13.5%3A_Medici%C3%B3n_de_la_susceptibilidad_a_los_medicamentos/13.5B%3A_Prueba_de_Susceptibilidad_de_Disco_Kirby-Bauer)

Picazo, J. (2000). Procedimientos en Microbiología Clínica: Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. *Human and Veterinary Medicine*, 4(2).

Puente Contreras, E. E., & Torres Casanova, S. J. (2018). Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de las raíces de zingiber officinale roscoe (kion) y cúrcuma longa l. (palillo) frente a cepas de staphylococcus aureus [Universidad Inca Garcilaso De Lavega]. In *Universidad Inca Garcilaso de la Vega*.

<http://repositorio.uigv.edu.pe/handle/20.500.11818/2859#.YGZnUEvXpv0.mendeley>

Radu, C.-M., Radu, C. C., Bochiş, S.-A., Arbănaşi, E. M., Lucan, A. I., Murvai, V. R., & Zaha, D. C. (2023). Revisiting the Therapeutic Effects of Essential Oils on the Oral Microbiome.

Pharmacy, 11(1). <https://doi.org/10.3390/pharmacy11010033>

Ramirez L, & Marin D. (2009). Metodologías Para Evaluar *in Vitro* La Actividad Antibacteriana De Compuestos De Origen Vegetal. *Scientia Et Technica*, 15(42).

Ramirez, L. S., & Marin Castaño, D. (2009). Methodologies for evaluating the *In vitro* antibacterial activity of natural compounds of plant origin. *Scientia et Technica*, 42.

Rao, P. V., et al. (2014). Eugenol and its role in chronic diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 829, 447-459.

Rezaei, T., Mehramouz, B., Gholizadeh, P., Yousefi, L., Ganbarov, K., Ghotaslou, R., Taghizadeh, S., & Kafil, H. S. (2023). Factors Associated with *Streptococcus mutans* Pathogenicity in the Oral Cavity. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 13(4).
<https://doi.org/10.33263/BRIAC134.368>

Rios E., Duque A., Leon D. (2009) *Caracterización espectroscópica y cromatográfica de curcumina extraída de los rizomas de Cúrcuma (cúrcuma longa L.) Cultivada en el departamento del Quindío*. Maestría en Química, Universidad del Quindío, Avenida Bolívar calle 12 norte, Armenia Quindío.

Ríos Herrera, E. N., García-Munguía, A. M., Hernández-Bautista, O., & García-Munguía, C. A. (2021). Actividad antimicrobiana de extractos de *Zingiber officinale* y *Maclura pomifera* sobre *Pseudomonas syringae*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12(2).
<https://doi.org/10.29312/remexca.v12i2.2446>

Salomé-Abarca, L. F., Soto-Hernández, R. M., Cruz-Huerta, N., & González-Hernández, V. A. (2015). CHEMICAL COMPOSITION OF SCENTED EXTRACTS OBTAINED FROM CALENDULA OFFICINALIS BY THREE EXTRACTION METHODS. *Botanical Sciences*, 93(3), 633–638. <https://doi.org/10.17129/botsci.143>

Sánchez-García, E., Castillo Castillo Hernández, S. L., & García Palencia, P. (2016). Actividad antimicrobiana. *Investigación En Plantas de Importancia Médica*, 2016, ISBN 9788494467370, Págs. 77-100, May 2017, 77–100.

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8595966&info=resumen&idioma=SPA>

Sato, T., & Ishikawa, H. (2006). *Method for evaluating the antibacterial activity of essential oils against Streptococcus mutans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(4), 751-756.

Sepúlveda Jiménez, A., Ducoing, P., & Sosa, R. (2003). *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21, 355–363. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221317>

Shah, G., Shri, R., Panchal, V., Sharma, N., Singh, B., & Mann, A. S. (2011). Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass). In *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research* (Vol. 2, Issue 1). <https://doi.org/10.4103/2231-4040.79796>

Shukla, S., & Mehta, A. (2015). "In vitro evaluation of antimicrobial activity of *Curcuma longa* extract against *Streptococcus mutans*". *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(6), ZC01-ZC03. DOI: 10.7860/JCDR/2015/12090.6002.

Singh, R., Chandra, R., Bose, M., & Luthra, P. M. (2002). Antibacterial activity of *Curcuma longa* rhizome extract on pathogenic bacteria. *Current Science*, 83(6), 737–740. <http://www.jstor.org/stable/24106150>

Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2013). *Fundamentals of Analytical Chemistry* (9th ed.). Cengage Learning.

Sousa, V. I., Parente, J. F., Marques, J. F., Forte, M. A., & Tavares, C. J. (2022). Microencapsulation of Essential Oils: A Review. In *Polymers* (Vol. 14, Issue 9). <https://doi.org/10.3390/polym14091730>

Srivastava, K. C., Bordia, A., & Verma, S. K. (1995). Curcumin, a major component of food spice turmeric (*Curcuma longa*) inhibits aggregation and alters eicosanoid metabolism in human blood platelets. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 52(4), 223–227. [https://doi.org/10.1016/0952-3278\(95\)90040-3](https://doi.org/10.1016/0952-3278(95)90040-3)

Tisserand, R., & Young, R. (2014). *Essential Oils Safety: A Guide for Health Care Professionals*. Churchill Livingstone.

Tofiño-Rivera, A., Ortega-Cuadros, M., Galvis-Pareja, D., Jiménez-Rios, H., Merini, L. J., & Martínez-Pabón, M. C. (2016). *Effect of Lippia alba and Cymbopogon citratus essential oils on biofilms of Streptococcus mutans and cytotoxicity in CHO cells*. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.10.044>

Torres, E., Moreno, R., Tamayo, Y., Hermosilla, R., & Guillén, Z. (2014). Estudio de la actividad antibacteriana del aceite esencial de los rizomas de *Curcuma longa* L. *Quimica Viva*, 13(2).

Ulin, P. R., Robinson, E. T., & Tolley, E. E. (2007). Investigación aplicada en salud pública: métodos cualitativos. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 49(2). <https://doi.org/10.1590/s0036-46652007000200015>

Ulloa Ulloa, C., P. Acevedo-Rodríguez, S. G. Beck, M. J. Belgrano, R. Bernal, P. E. Berry, L. Brako, M. Celis, G. Davidse, S. R. Gradstein, O. Hokche, B. León, S. León-Yáñez, R. E. Magill, D. A. Neill, M. H. Nee, P. H. Raven, H. Stimmel, M. T. Strong, J.

L. Villaseñor Ríos, J. L. Zarucchi, F. O. Zuloaga & P. M. Jørgensen. 2018 (onwards). An integrated Assessment of Vascular Plants Species of the Americas (Online Updates).

UTAMANİNGYAS, A., PRAMESTİ, H. T., & BALAFİF, F. F. (2023). The Streptococcus mutans ability to survive in biofilms and during dental caries formation: scoping review. *Journal of Syiah Kuala Dentistry Society*, 7(2). <https://doi.org/10.24815/jds.v7i2.30295>

Valarezo, E., Vullien, A., & Conde-rojas, D. (2021). Variability of the chemical composition of the essential oil from the amazonian ishpingo species (*Ocotea quixos*). *Molecules*, 26(13). <https://doi.org/10.3390/molecules26133961>

Valdés, M. Á. S. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 16(3).

Vazquez, M. (2020). Pruebas de sensibilidad o antibiogramas. *Manual MSD*.

Vélez-Vásquez, V. A., Villavicencio-Capará, E., Cevallos-Romero, S., & Del Castillo-López, C. (2019). Impacto de la experiencia de caries en la calidad de vida relacionada a la salud bucal; Machángara, Ecuador. *Revista Estomatológica Herediana*, 29(3). <https://doi.org/10.20453/reh.v29i3.3604>

Wang, M., Zhang, Y., Wang, R., Wang, Z., Yang, B., & Kuang, H. (2021). An evolving technology that integrates classical methods with continuous technological developments: Thin-layer

chromatography bioautography. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 15).

<https://doi.org/10.3390/molecules26154647>

Yeh, H. F., et al. (2013). Antimicrobial activity and safety of cinnamaldehyde from *Cinnamomum cassia*. *Journal of Food Science*, 78(9), M648-M653.

Yustinianus, R. R., Wunas, J., Rifai, Y., & Ramli, N. (2019). Curcumin Content in Extract of some Rhizomes from Zingiberaceae Family. *Journal of Pharmaceutical and Medicinal Sciences*, 4(1).

Zhang, J. S., Chu, C. H., Yu, O. Y. (2022). Oral Microbiome and Dental Caries Development. In *Dentistry Journal* (Vol. 10, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/dj10100184>

Zhang, S., Kou, X., Zhao, H., Mak, K. K., Balijepalli, M. K., & Pichika, M. R. (2022). *Zingiber officinale* var. *rubrum*: Red Ginger's Medicinal Uses. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/molecules27030775>

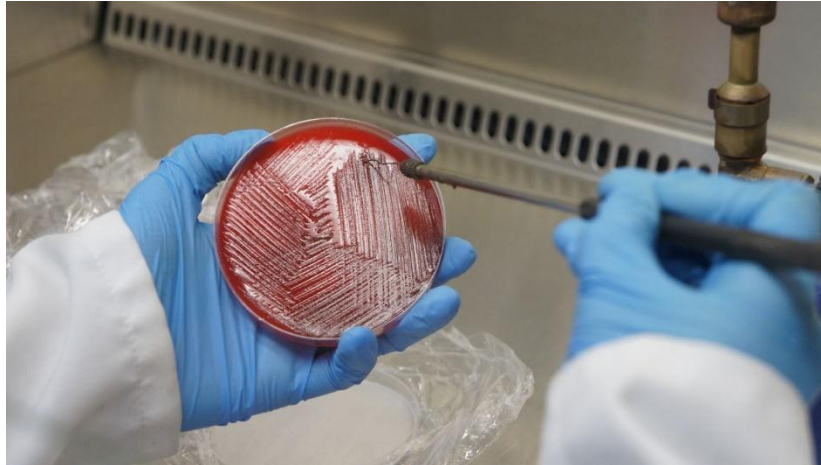
Khan, M. S., & Khan, M. S. (2015). Microdilution method for antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Laboratory Medicine*, 10(2), 43-50. <https://doi.org/10.1007/s11688-015-0078-3>

APÉNDICES Y ANEXOS

Apéndice A: *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Figura A1

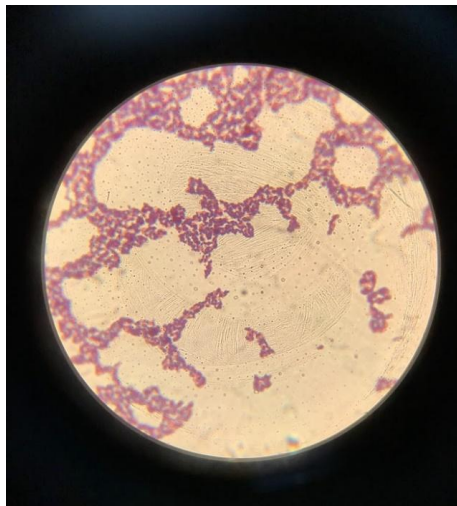
Cultivo de *S. mutans* en agar sangre



Fuente: Autores

Figura A2

S. mutans observado bajo el microscopio (100x)

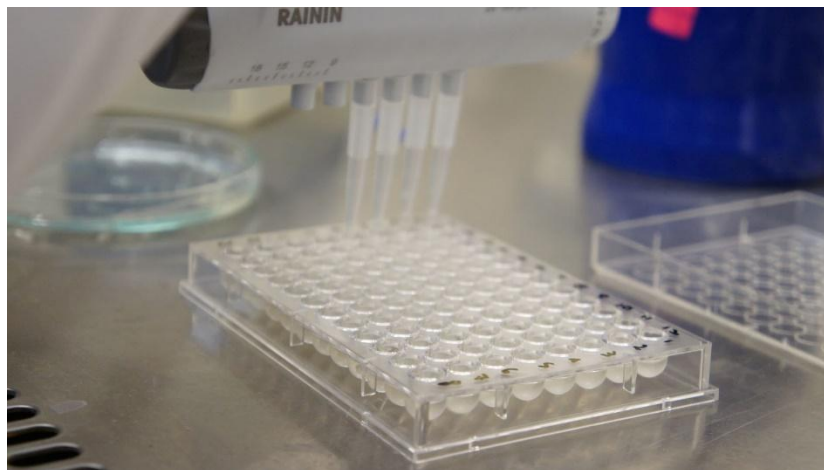


Fuente: Autores

Apéndice B: Técnica de microdilución

Figura B1

Diluciones de aceites esenciales en pocillos de placa de 96 pocillos

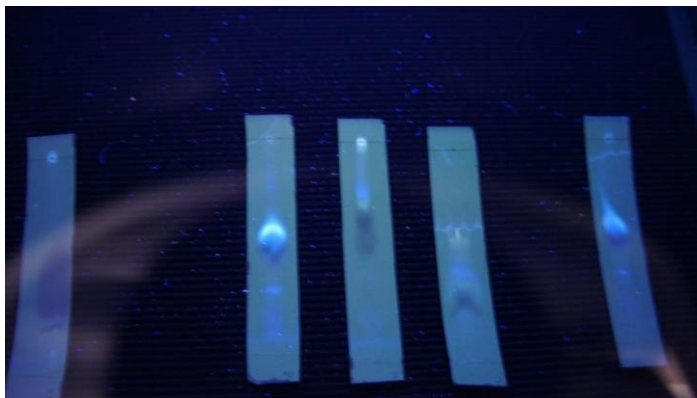


Fuente: Autores

Apéndice C: Técnica de bioautografía

Figura C1

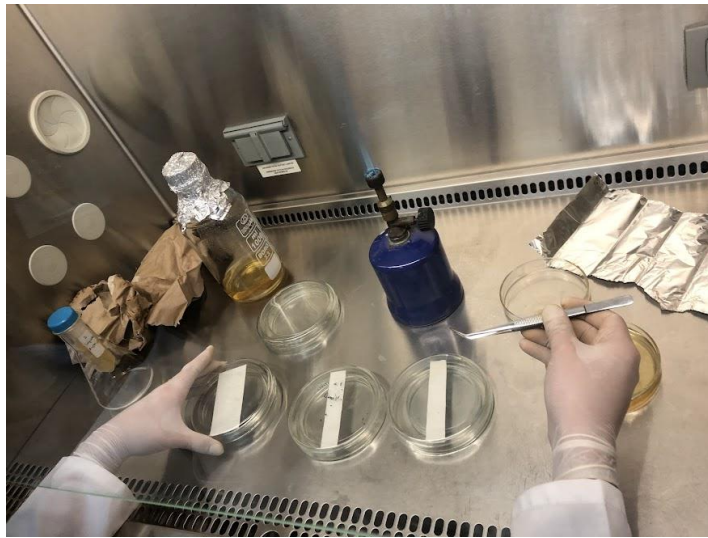
Placas de TLC con aceites esenciales observadas a una longitud de onda de 366 nm



Fuente: Autores

Figura C2

Placas de TLC colocadas en cámara de vapor previas a ser incubadas durante 24 horas

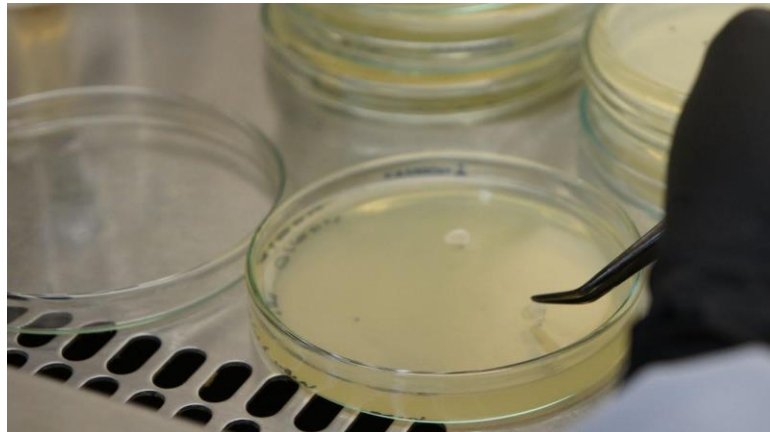


Fuente: Autores

Apéndice D: Técnica de kirby-bauer

Figura D1

Discos sumergidos en cada aceite a distintas concentraciones sobre agar previamente inoculado



Fuente: Autores

Figura D2

Incubación en condiciones anaeróbicas



Fuente: Autores

Apéndice E: Capacidad mínima inhibitoria de los aceites esenciales (*Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale* y *Ocotea quixos*) frente a *Streptococcus mutans*

Tabla E1

Datos obtenidos de la CMI de *C. longa* frente a *S. mutans*

Microdilución	Tratamientos	Capacidad Mínima Inhibitoria	Capacidad Mínima Inhibitoria
		(ng/dL)	(ng/dL)
		[Datos originales]	[Datos transformados]
6.4	t1	0.029	0.000841
6.4	t1	0.028	0.000784
3.2	t2	0.282	0.079524
3.2	t2	0.303	0.091809
1.6	t3	0.248	0.061504
1.6	t3	0.259	0.067081
0.8	t4	0.257	0.066049
0.8	t4	0.251	0.063001

0.4	t5	0.274	0.075076
0.4	t5	0.262	0.068644
0.2	t6	0.273	0.074529
0.2	t6	0.268	0.071824
0.1	t7	0.344	0.118336
0.1	t7	0.297	0.088209
0.05	t8	0.323	0.104329
0.05	t8	0.317	0.100489

Fuente: Autores

Tabla E2

Datos obtenidos de la CMI de *C. citratus* frente a *S. mutans*

Microdilucion	Tratamientos	Capacidad Mínima Inhibitoria (ng/dL)
6.4	t1	0.071
6.4	t1	0.052
3.2	t2	0.277
3.2	t2	0.321
1.6	t3	0.273
1.6	t3	0.494
0.8	t4	0.264
0.8	t4	0.271
0.4	t5	0.26
0.4	t5	0.266
0.2	t6	0.281

0.2	t6	0.264
0.1	t7	0.34
0.1	t7	0.914
0.05	t8	0.342
0.05	t8	0.342

Fuente: Autores

Tabla E3

Datos obtenidos de la CMI de *Z. officinale* frente a *S. mutans*

Microdilucion	Tratamientos	Capacidad Mínima Inhibitoria (ng/dL)
6.4	t1	0.057
6.4	t1	0.012
3.2	t2	0.763
3.2	t2	0.27
1.6	t3	0.252
1.6	t3	0.254
0.8	t4	0.255
0.8	t4	0.243
0.4	t5	0.274
0.4	t5	0.268
0.2	t6	0.269
0.2	t6	0.261
0.1	t7	0.341

0.1	t7	0.333
0.05	t8	0.33
0.05	t8	0.318

Fuente: Autores

Tabla E4

Datos obtenidos de la CMI de *O. quixos* frente a *S. mutans*

Microdilucion	Tratamientos	Capacidad Mínima Inhibitoria	Capacidad Mínima
		(ng/dL)	Inhibitoria (ng/dL)
		[Datos originales]	[Datos transformados]
6.4	t1	0.023	0.130416647
6.4	t1	0.025	0.136423003
3.2	t2	0.277	0.499964393
3.2	t2	0.291	0.513454795
1.6	t3	0.275	0.498011825
1.6	t3	0.336	0.554910841
0.8	t4	0.82	0.89837877
0.8	t4	0.293	0.515357398
0.4	t5	0.26	0.483154032
0.4	t5	0.254	0.477100868
0.2	t6	0.279	0.501910487
0.2	t6	0.266	0.489143271
0.1	t7	0.342	0.560239979

0.1	t7	0.901	0.945260232
0.05	t8	0.342	0.560239979
0.05	t8	0.506	0.692215435

Fuente: Autores

Apéndice F: Actividad antibacteriana de los aceites esenciales (*Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale* y *Ocotea quixos*) mediante el método de difusión de discos frente a *Streptococcus mutans*

Tabla F1

Datos obtenidos del halo de inhibición de *C. longa* frente a *S. mutans*

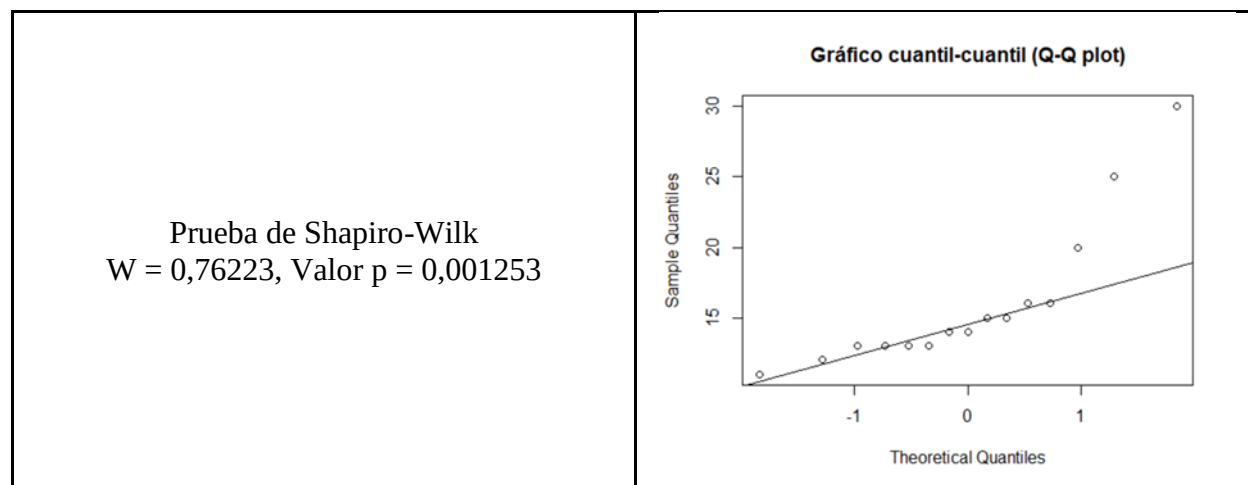
Descripción	Concentración (%)	Tratamientos	Halo de inhibición (mm)	Halo de inhibición (mm)
			[Datos originales]	[Datos transformados]
Aceite esencial de <i>Curcuma longa</i>	100	t1	11	0.00826446
	100	t1	13	0.00591716
	100	t1	13	0.00591716
	75	t2	16	0.00390625
	75	t2	14	0.00510204
	75	t2	15	0.00444444
	50	t3	13	0.00591716
	50	t3	16	0.00390625

	50	t3	15	0.00444444
	25	t4	14	0.00510204
	25	t4	13	0.00591716
	25	t4	12	0.00694444
Clorhexidina	0.12	t5	25	0.0016
(Control +)	0.12	t5	30	0.00111111
	0.12	t5	20	0.0025

Fuente: Autores

Tabla F2

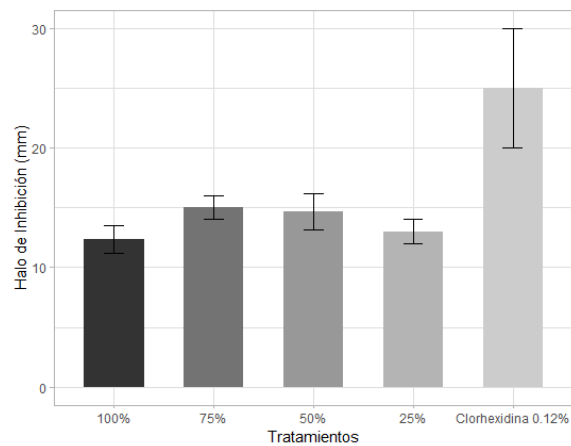
Pruebas de Shapiro-Wilk y grafico cuartil-cuartil con datos transformados de *C. longa*



Fuente: Autores

Ilustración F1

Promedio del halo de inhibición (mm) $\pm$ DS, n = 3 de *C. longa*



Fuente: Autores

Tabla F3

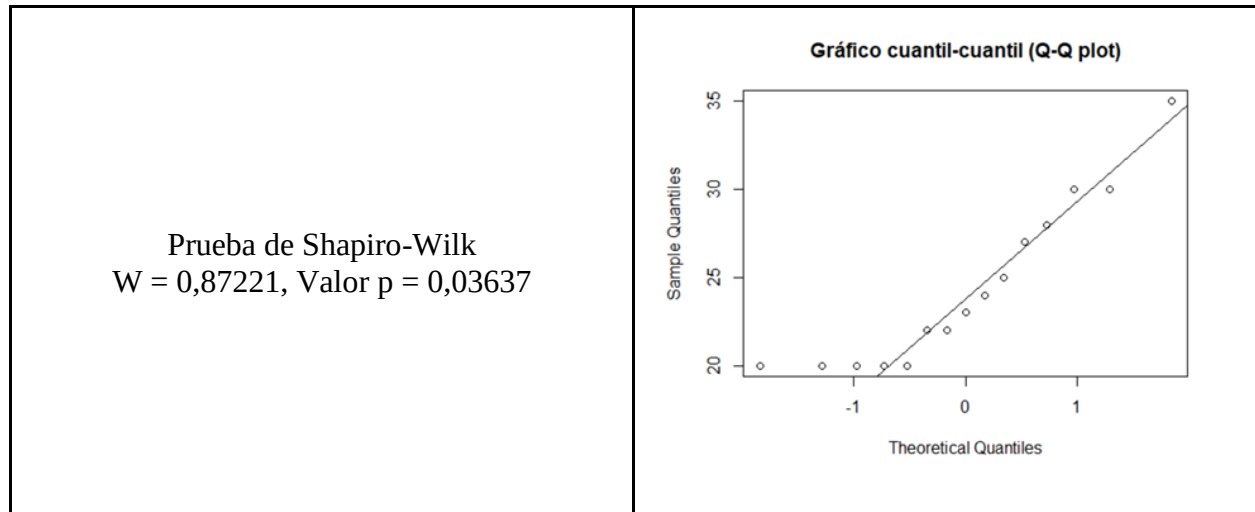
Datos obtenidos del halo de inhibición de *C. citratus* frente a *S. mutans*

Descripción	Concentración (%)	Tratamientos	Halo de inhibición (mm)
Aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i>	100	t1	35
	100	t1	30
	100	t1	28
	75	t2	22
	75	t2	20
	75	t2	24
	50	t3	20
	50	t3	23
	50	t3	20
	25	t4	27

	25	t4	20
	25	t4	22
	0.12	t5	25
Clorhexidina	0.12	t5	30
	0.12	t5	20

Tabla F4

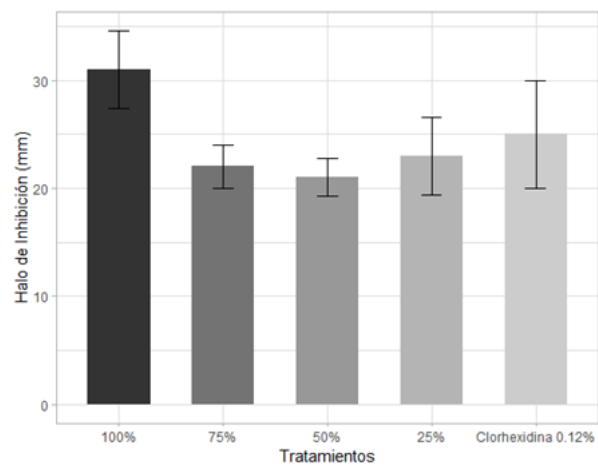
Pruebas de Shapiro-Wilk y grafico cuartil-cuartil con datos transformados de *C. citratus*



Fuente: Autores

Tabla F5

Promedio del halo de inhibición (mm) $\pm$ DS, n = 3 de *C. citratus* frente a *S. mutans*.



Fuente: Autores

Tabla F6

Datos obtenidos del halo de inhibición de *Z. officinale* frente a *S. mutans*

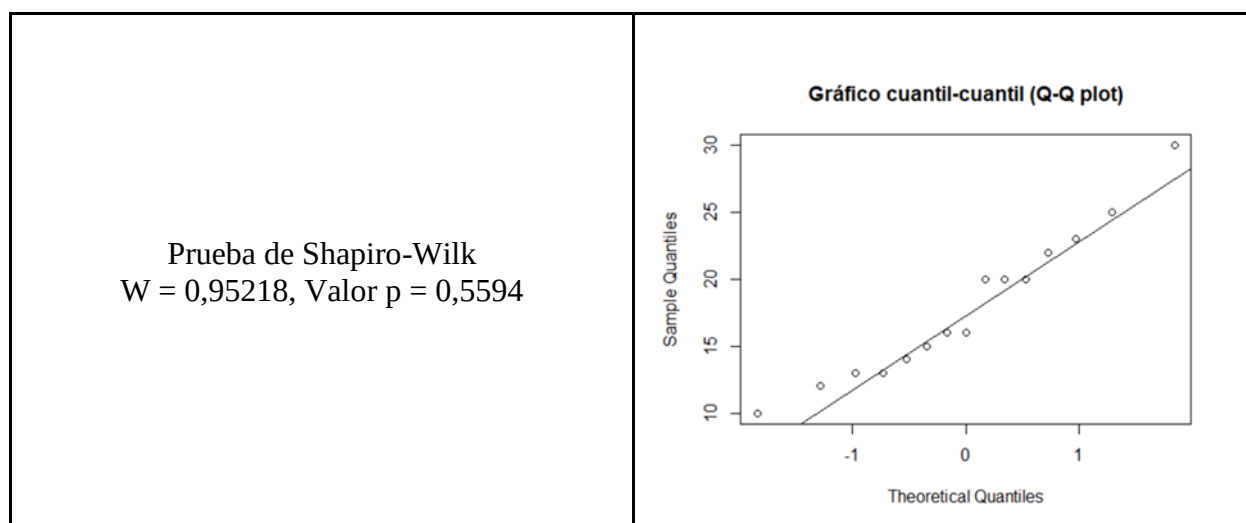
Descripción	Concentración (%)	Tratamientos	Halo de inhibición (mm)
Aceite esencial de <i>Zingiber officinale</i>	100	t1	14
	100	t1	13
	100	t1	22
	75	t2	23
	75	t2	16
	75	t2	20
	50	t3	20
	50	t3	16
	50	t3	13

	25	t4	10
	25	t4	15
	25	t4	12
	0.12	t5	25
Clorhexidina	0.12	t5	30
	0.12	t5	20

Fuente: Autores

Tabla F7

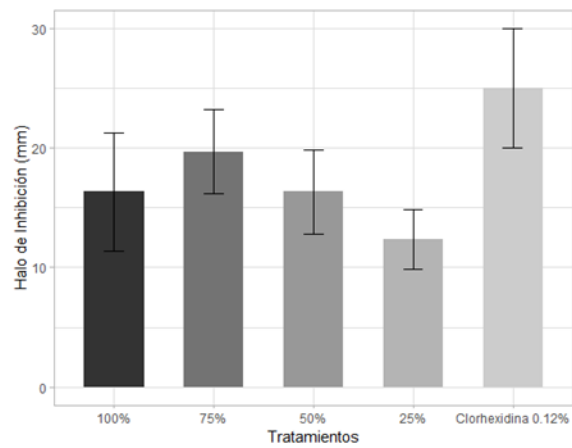
Pruebas de Shapiro-Wilk y grafico cuartil-cuartil con datos transformados de *Z. officinale*



Fuente: Autores

Tabla F8

Promedio del halo de inhibición (mm) $\pm$ DS, n = 3 de *Z. officinale* frente a *S. mutans*.



Fuente: Autores

Tabla F9

Datos obtenidos del halo de inhibición de *Ocotea quixos* frente a *S. mutans*.

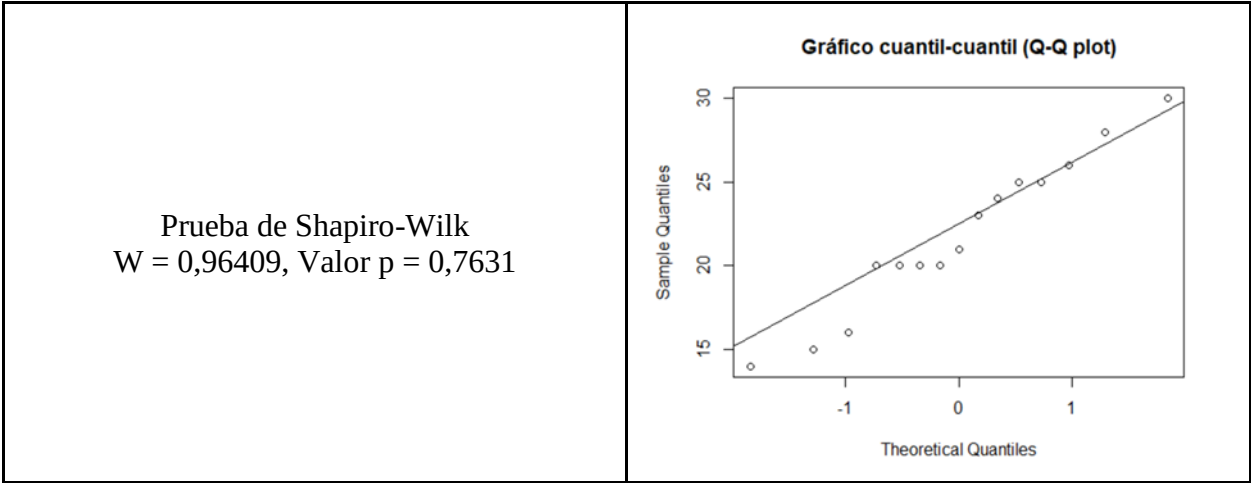
Descripción	Concentración (%)	Tratamientos	Halo de inhibición (mm)
<i>Ocotea quixos</i>	100	t1	28
	100	t1	24
	100	t1	25
	75	t2	15
	75	t2	26
	75	t2	14
	50	t3	16
	50	t3	23
	50	t3	20
	25	t4	20

	25	t4	20
	25	t4	21
	0.12	t5	25
Clorhexidina	0.12	t5	30
	0.12	t5	20

Fuente: Autores

Tabla F10

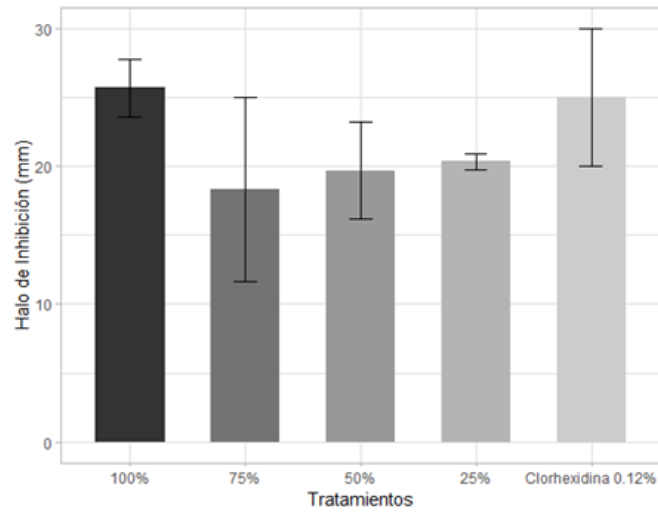
Pruebas de Shapiro-Wilk y grafico cuartil-cuartil con datos transformados de *O. quixos*



Fuente: Autores

Tabla F11

Promedio del halo de inhibición (mm) ± DS, n = 3 de *O. quixos* frente a *S. mutans*.



Fuente: Autores