



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CARRERA DE ALIMENTOS

**Evaluación de la actividad antimicrobiana de aceite
esencial de Ishpingo (*Ocotea quixos*) para aplicaciones
en modelos alimentarios**

Trabajo de integración curricular previo a la obtención del título de:

INGENIERO EN ALIMENTOS

Autor: Calva Jumbo, Francisco Josué

Director: Hualpa Salinas, Diana Ines

LOJA

2024



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NC-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2024

Aprobación del director del Trabajo de Integración Curricular

Loja, 15 de marzo de 2024

Magister,
Jorge Felipe Reyes Bueno
Director de la carrera de Alimentos
Ciudad.-

De mi consideración:

Me permito comunicar que, en calidad de director del presente Trabajo de Integración Curricular denominado: Evaluación de la actividad antimicrobiana de aceite esencial de Ishpingo (*Ocotea quixos*) para aplicaciones en modelos alimentarios realizado por Francisco Josué Calva Jumbo ha sido orientado y revisado durante su ejecución, así mismo ha sido verificado a través de la herramienta de similitud académica institucional, y cuenta con un porcentaje de coincidencia aceptable. En virtud de ello, y por considerar que el mismo cumple con todos los parámetros establecidos por la Universidad, doy mi aprobación a fin de continuar con el proceso académico correspondiente.

Particular que comunico para los fines pertinentes.

Atentamente,

Director: Mgtr. Diana Ines Hualpa Salinas

C.I.: 1102806062

Correo electrónico: dihualpa@utpl.edu.ec

Declaración de autoría y cesión de derechos

Yo, Francisco Josué Calva Jumbo, declaro y acepto en forma expresa lo siguiente:

Ser autor (a) del Trabajo de Integración Curricular denominado: Evaluación de la actividad antimicrobiana de aceite de Ishpingo (Ocotea quixos) para aplicaciones en modelos alimentarios, de la carrera de Alimentos, específicamente de los contenidos comprendidos en: (se debe colocar los nombres de los capítulos elaborados en el Trabajo de Integración Curricular), siendo (nombres y apellidos completos), director (a) del presente trabajo; también declaro que la presente investigación no vulnera derechos de terceros ni utiliza fraudulentamente obras preexistentes. Además, ratifico que las ideas, criterios, opiniones, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad. Eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones judiciales o administrativas, en relación a la propiedad intelectual de este trabajo.

Que la presente obra, producto de mis actividades académicas y de investigación, forma parte del patrimonio de la Universidad Técnica Particular de Loja, de conformidad con el artículo 20, literal j), de la Ley Orgánica de Educación Superior; y, artículo 91 del Estatuto Orgánico de la UTPL, que establece: "Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad", en tal virtud, cedo a favor de la Universidad Técnica Particular de Loja la titularidad de los derechos patrimoniales que me corresponden en calidad de autor/a, de forma incondicional, completa, exclusiva y por todo el tiempo de su vigencia.

La Universidad Técnica Particular de Loja queda facultada para ingresar el presente trabajo al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública, en cumplimiento del artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

.....

Autor: Francisco Josué Calva Jumbo

C.I.: 1150965331

Correo electrónico: fjcalva@utpl.edu.ec

Dedicatoria

Este trabajo se lo dedico a Dios que me dio la fortaleza para seguir este camino y encarar las adversidades que se presentaron.

A mi familia, en especial a mis padres quienes me dieron su apoyo y sus consejos que me ayudaron en el camino y en especial a superar los momentos difíciles. Además, de guiarme para convertirme en la persona que soy en el presente.

A mi hermano, por estar siempre presente y ayudarme con animo para seguir adelante.

Agradecimiento

Le agradezco a mi familia que son el pilar fundamental de mi vida, a mis padres Martín y Carmen que inculcaron en mí los valores que forman parte de mí, además, por ser un ejemplo de vida a seguir que me motivaron para seguir adelante durante este camino y por darme la oportunidad de tener una gran educación a lo largo de mi vida.

Le doy las gracias a mi hermano por el apoyo brindado a lo largo de mi vida y por guiarme con sus consejos.

A mis amigos por vivir junto a mí todo el proceso de desarrollo y apoyarme en todo momento con palabras de aliento.

A mi directora de tesis, Mgtr. Diana Hualpa, que por medio de sus consejos y experiencias brindarme apoyo durante el proceso de realización de este trabajo y por confiar en que podría realizar un buen trabajo.

Índice de contenido

Aprobación del director del Trabajo de Integración Curricular	II
Declaración de autoría y cesión de derechos	III
Dedicatoria	V
Agradecimiento	VI
Índice de contenido.....	VII
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Capítulo uno	5
Objetivos	5
Objetivo General	5
Objetivo Especifico	5
Capítulo dos	6
Marco Teórico	6
2.1 Aceites esenciales.....	6
2.1.1 Extracción de aceites esenciales.....	6
2.1.2 Caracterización.....	7
2.1.2.1 Cromatografía de gases.....	7
2.1.3 Usos y aplicaciones.....	7
2.2 Familia Lauraceae.....	7
2.2.1 Género Ocotea.....	8
2.2.2 Ocotea quixos (Lam.) Kosterm	8
2.2.3 Clasificación taxonómica de Ocotea quixos (Lam.) Kosterm	8
2.3 Organismos Biológicos.....	9
2.3.1 Bacterias Gramnegativas	10
2.3.1.1 Campylobacter jejuni.	10
2.3.1.2 Escherichia coli.	10

2.3.1.3 <i>Klebsiella aerogenes</i>	10
2.3.1.4 <i>Pseudomona aeruginosa</i>	11
2.3.1.5 <i>Sallmonella enterica subsp. enterica</i>	11
2.3.2 Bacterias Grampositivas	11
2.3.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	11
2.3.2.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	12
2.3.2.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	12
2.3.3 Mohos	12
2.3.3.1 <i>Aspergillus niger</i>	12
2.3.4 Levaduras	12
2.3.4.1 <i>Candida albicans</i>	13
Capítulo tres	14
Materiales y métodos	14
3.1 Obtención del aceite esencial	14
3.2 Actividad antimicrobiana in vitro	14
3.2.1 <i>Especies microbianas</i>	14
3.2.2 <i>Revivificación de microorganismos</i>	15
3.3 Determinación de actividad antimicrobiana	17
3.3.1 <i>Agar Nutrient+ sangre 5%</i>	17
3.3.2 <i>Preparación de diluciones del aceite esencial</i>	18
3.3.3 <i>Lectura de datos</i>	22
3.4 Análisis estadístico	23
Capítulo cuatro.....	24
Resultados y discusión	24
4.1 Actividad antimicrobiana	24
4.2 Actividad antifúngica	27
Conclusiones	30
Recomendaciones.....	31

Referencias	32
Apéndice A. Resultados de actividad antimicrobiana a diferentes diluciones	36

Índice de tablas

Tabla 1 Clasificación de las especies a utilizar y preparación de microorganismos	14
Tabla 2 Condiciones de cultivo de microorganismos.....	18
Tabla 3 Diluciones de aceite esencial en disolución de DMSO	19
Tabla 4 Inhibición antimicrobiana a bacterias.....	25
Tabla 5 Inhibición antifungica a moho y levadura	27

Índice de figuras

Figura 1 Estriado en agar inclinado o pico de flauta	15
Figura 2 Secado de tubos de ensayo con agar inclinado.....	16
Figura 3 Selección de colonia típica de <i>Pseudomona aeruginosa</i>	20
Figura 4 Estriado con asa diglasky	21
Figura 5 Pocillos realizados con puntas de micropipetas	22
Figura 6 Halos de inhibición producidos por el aceite esencial de <i>Ocotea quixos</i> , con respecto a <i>Staphylococcus aureus</i>	23

Resumen

Los aceites esenciales están definidos como el resultado de una destilación que se componen de una mezcla de compuestos volátiles, el aceite esencial de Ishpingo (*Ocotea quixos*) proviene de una especie de árboles originarios de Ecuador de los cuales se ha reconocido sus propiedades aromáticas, tanto de las hojas como de los calices. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de Ishpingo (*Ocotea quixos*) sobre las bacterias (*Salmonella enterica* subsp. *Entérica*, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Aspergillus niger* y *Candida albicans*), por medio del método de difusión en agar con pocillos, donde se utilizaron diferentes concentraciones del aceite esencial de Ishpingo para observar su respuesta a los microorganismos planteados, se encontró que el aceite esencial presenta actividad antimicrobiana con respecto a los diferentes patógenos estudiados, dando énfasis en, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Campylobacter jejuni* y *Listeria monocytogenes* que fueron los que tuvieron mayor actividad antimicrobiana. Se presume que la razón de la actividad antimicrobiana es la sinergia de los componentes presentes, en especial de (E)-cinamaldehído, (E)-cinamato de metilo y (E)-cariofileno.

Palabras clave: *Ocotea quixos*, actividad antimicrobiana, aceite esencial.

Abstract

Essential oils are defined as the result of a distillation that are composed of a mixture of volatile compounds, the essential oil of Ishpingo (*Ocotea quixos*) comes from a species of trees native to Ecuador whose aromatic properties have been recognized, both from the leaves and calyxes. The present work aims to determine the antimicrobial activity of the essential oil of Ishpingo (*Ocotea quixos*) on bacteria (*Salmonella enterica subsp. Enterica*, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Aspergillus niger* and *Candida albicans*), by the agar well diffusion method with pots, where different concentrations of Ishpingo essential oil were used to observe its response to the microorganisms studied, it was found that the essential oil presents antimicrobial activity with respect to the different pathogens studied, with emphasis on *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Campylobacter jejuni* and *Listeria monocytogenes*, which had the greatest antimicrobial activity. It is presumed that the reason for the antimicrobial activity is the synergy of the components present, especially (E)-cinnamaldehyde, (E)-methyl cinnamate and (E)-caryophyllene.

Keywords: *Ocotea quixos*, antimicrobial activity, essential oil.

Introducción

Ecuador se distingue como uno de los países con mayor biodiversidad por unidad de área a nivel global, como se ha evidenciado en un estudio previo realizado por Bravo-Velásquez, (2014). En este contexto, reviste una importancia significativa la exploración y aprovechamiento de las diversas variedades de plantas presentes en el territorio ecuatoriano, dada la presencia de efectos beneficiosos que aún permanecen en gran medida desconocidos. La comprensión y aplicación de estas propiedades podría contribuir no solo al avance del conocimiento científico, sino también a la optimización de recursos naturales con potenciales implicaciones para la salud y el bienestar humano.

Los aceites esenciales se definen como las fracciones líquidas volátiles, que usualmente se destilan por arrastre con vapor de agua como en este caso, aquí es donde se almacenan las sustancias que le dan su aroma característico a las plantas, usualmente son mezclas complejas que pueden llegar a contener hasta 100 componentes entre los que son posible destacar: compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos (Martínez, 2003).

Según Torres Espinoza Gonzalo José (2013), se ha prestado particular atención al aceite esencial extraído de las hojas de Ishpingo (*Ocotea quixos*) en investigaciones recientes. Los hallazgos indican una actividad inhibitoria notable frente al crecimiento de hongos y bacterias, acompañada de un perfil aromático distintivo. Estas propiedades propician un crecimiento notorio en su aplicación en la industria farmacéutica y cosmética.

En el presente trabajo se busca determinar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de Ishpingo (*Ocotea quixos*) sobre las bacterias (*Salmonella enterica subsp. Entérica*, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*) y los mohos y levaduras (*Aspergillus niger* y *Candida albicans*), comunes en alimentos para su posible aplicación posterior en modelos alimentarios. La metodología utilizada fue la difusión

en agar con pocillos y la variable respuesta fue el diámetro de los halos de inhibición de las diferentes diluciones del aceite esencial.

La investigación tiene la siguiente estructura: el primer capítulo presenta los objetivos, el capítulo 2 está constituido por el marco teórico, donde constan de manera detallada los conceptos utilizados en el desarrollo del presente proyecto; el tercer capítulo es el de Materiales y métodos, donde se describe las técnicas utilizadas en esta investigación y por último el cuarto capítulo de Resultados y discusión, donde se presentan y analizan los resultados obtenidos.

Capítulo uno

Objetivos

Objetivo General

Determinar la actividad antimicrobiana de aceite de Ishpingo (*Ocotea quixos*) sobre bacterias y hongos patógenos de los alimentos para su aplicación posterior en modelos alimentarios.

Objetivo Especifico

Reportar la medición de los halos de inhibición por triplicado frente a las bacterias: *Salmonella enterica subsp. Entérica*, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, mohos y levaduras: *Aspergillus niger* y *Candida albicans*.

Capítulo dos

Marco Teórico

2.1 Aceites esenciales

Un aceite esencial se define como el producto obtenido a partir de materia prima vegetal mediante procesos de hidrodestilación, destilación al vapor o en seco, o a través de un proceso mecánico apropiado en el caso de los cítricos, (Zuzarte & Salgueiro, 2015). Los aceites esenciales se componen de una combinación compleja de compuestos volátiles, los cuales son sintetizados a través del metabolismo secundario en las plantas, (Usano-Aleman y et al., 2014).

Los aceites esenciales tienen la capacidad de adoptar un estado líquido a temperatura ambiente, aunque algunos pueden presentarse en forma sólida o con características resinosas. Son producidos por todos los tejidos vegetales, incluyendo yemas, flores, hojas, tallos, ramas, semillas, frutos, raíces, madera y corteza (Bassolé & Juliani, 2012).

2.1.1 *Extracción de aceites esenciales*

Los aceites esenciales pueden ser obtenidos de muestras vegetales a través de diversos métodos. La destilación por arrastre de vapor de agua es el método más utilizado a nivel industrial, esto debido a su alto rendimiento, la pureza del aceite obtenido y su capacidad para prescindir de tecnología sofisticada (Martínez, 2003).

La destilación por arrastre con vapor de agua es un proceso de separación en el cual los componentes volátiles de la materia vegetal se vaporizan con la utilización de vapor de agua. Este procedimiento implica el paso de un flujo de vapor a través de la materia prima, lo que arrastra los aceites esenciales presentes en ella. Luego, estos vapores son enfriados y condensados, resultando en un destilado líquido compuesto por dos fases inmiscibles: una fase acuosa y una fase orgánica, que corresponde al aceite esencial. Estas fases pueden ser separadas mediante el proceso de decantación, aprovechando la diferencia de densidad que existe entre ellas (Casado, 2018).

2.1.2 Caracterización

La caracterización de los aceites esenciales se realiza comúnmente por medio del método de cromatografía de gases y el fin de este proceso es la identificación de los componentes químicos que están presentes dentro del aceite esencial.

2.1.2.1 Cromatografía de gases. En este proceso los componentes de una muestra que ha sido vaporizada se separan debido a su distribución entre una fase gaseosa y una fase estacionaria que se contiene en una columna. Durante el proceso de separación cromatográfica de gases, la muestra es vaporizada y se introduce en la cabeza de una columna cromatográfica. Los equipos de cromatografía de gases acoplados a espectrometría de masas (GC-MS) se emplean con el propósito de discernir y caracterizar una amplia variedad de compuestos que se encuentran en sistemas naturales y biológicos (Skoog et al., 2008).

2.1.3 Usos y aplicaciones

Los aceites esenciales desempeñan un papel fundamental en diversas aplicaciones, como la producción de fragancias corporales, ambientadores, aromas, además de su uso como saborizantes en condimentos, licores, dulces y golosinas, así como en la fabricación de cosméticos. Asimismo, se ha reconocido su valor medicinal desde tiempos antiguos, ya que se emplean en el tratamiento de numerosas dolencias y enfermedades. Sin embargo, a principios del siglo XX, con el advenimiento de la química orgánica sintética, estos aceites fueron dejados de lado (Ortuño, 2017).

2.2 Familia Lauraceae

La familia *Lauraceae* está compuesta por un gran número de plantas madereras con alrededor de 50 géneros y entre 2500 y 3000 especies que se distribuyen en regiones de latitudes tropicales a subtropicales. La diversidad taxonómica actual de las *Lauraceae* se concentra principalmente en América tropical y Australasia. En las regiones tropicales de

América, se destacan como componentes prominentes en los bosques de tierras bajas y suelen ser elementos dominantes en la vegetación de montaña (Chanderbali et al., 2001).

2.2.1 Género *Ocotea*

Dentro de este género existen alrededor de 350 especies. Se considera el género principal de *Lauráceas* en las regiones neotropicales, especialmente dentro de la Amazonia. *Ocotea* se caracteriza por tener tépalos de longitud relativamente larga y superficie interna no granulada. Una característica distintiva de *Ocotea* es la presencia de anteras con cuatro foliolos dispuestos en dos filas. Además, sus hojas son alternas y su fruto está suspendido por una cúpula (Montealegre Pinzón, 2011).

2.2.2 *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm

Es un árbol de tamaño mediano originario del Ecuador amazónico y países adyacentes, que ha sido reconocido por sus propiedades aromáticas desde la época de los incas, aunque no es ampliamente conocido fuera de Ecuador. Este árbol produce cálices grandes y leñosos de flores bienales, localmente llamados Ishpingo. Los cálices se recolectan cuando los árboles silvestres son talados y los indígenas amazónicos tradicionalmente los utilizan, ya sea frescos o secos, en su forma completa o triturada, como una especia. Recientemente, su uso también se ha extendido en áreas no rurales con el nombre de Flor de Canela, debido a su aroma similar al de la canela. Tradicionalmente, se utiliza para aromatizar pasteles, bebidas e infusiones, y se aprecia como aperitivo, eupéptico, desinfectante y anestésico local (Bruni et al., 2004).

2.2.3 Clasificación taxonómica de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Laurales

Familia: Lauraceae

Género: *Ocotea*

Especie: *Ocotea quixos*

2.3 Organismos Biológicos

Para la realización del presente estudio se utilizaron diferentes tipos de cepas bacterianas, de las cuales 5 son gramnegativas, 3 son grampositivas y se utilizó un moho y una levadura.

2.3.1 Bacterias gramnegativas

2.3.1.1 Campylobacter jejuni. Se trata de un bacilo gramnegativo sin capacidad de formar esporas, cuya forma adopta una morfología curvada o en forma de S. Un rasgo característico de muchas cepas es su capacidad de movimiento, lo cual está relacionado con la presencia de un flagelo en uno o ambos extremos polares de la bacteria. Estas bacterias experimentan un crecimiento óptimo en concentraciones de oxígeno que oscilan entre el 3% y el 5%. Como resultado, tienden a ser bastante sensibles en el entorno natural y presentan cierta dificultad para su cultivo en el laboratorio. Entre las principales fuentes de alimentos asociadas a las infecciones se incluyen productos avícolas que han sido manipulados de manera incorrecta o no cocinados adecuadamente, leche no pasteurizada ("cruda") y quesos elaborados con leche no pasteurizada, así como el consumo de agua contaminada (Food and Drug Administration, 2012).

2.3.1.2 Escherichia coli. Se trata de un bacilo gramnegativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* y a la tribu *Escherichia*. Es un microorganismo facultativo anaerobio que coloniza el intestino humano poco tiempo después del nacimiento y se considera parte de la flora normal. Sin embargo, existen cepas que pueden ser patógenas y causar diversos cuadros clínicos dañinos (Rodríguez-Angeles, 2002). Este microorganismo se encuentra comúnmente en el tracto gastrointestinal de los animales de sangre caliente. Algunas cepas son responsables de la aparición de gastroenteritis y otras enfermedades. Su capacidad para causar enfermedades es ampliamente reconocida y se ha asociado con diversos trastornos, como diarrea, colitis hemorrágica, disentería, infecciones urinarias y meningitis, entre otras patologías (Bayona, 2009).

2.3.1.3 Klebsiella aerogenes. La bacteria que antes se conocía como *Enterobacter aerogenes* ha sido reclasificada como *Klebsiella aerogenes*. Pertenece al género de bacterias gramnegativas, anaerobias facultativas, con forma de bastoncillos y que no forman esporas. Se encuentra comúnmente en muestras clínicas humanas obtenidas del tracto respiratorio, urinario, sanguíneo y gastrointestinal (Davin-Regli & Pagès, 2015).

2.3.1.4 Pseudomona aeruginosa. Se trata de un tipo de bacteria en forma de bastón que se tiñe negativamente en la técnica de Gram, y representa la principal amenaza para los seres humanos dentro del género *Pseudomonas*. Se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, presente en diferentes entornos como el suelo, el agua, las plantas y los animales. Es especialmente problemática en los entornos hospitalarios, donde causa numerosas infecciones. Esta bacteria puede provocar tanto enfermedades localizadas como sistémicas, afectando prácticamente cualquier órgano o tejido del cuerpo humano. Aquellos individuos con un sistema inmunitario debilitado son más propensos a sufrir una infección (Harvey et al., 2008).

2.3.1.5 Sallmonella enterica subsp. enterica. Se trata de una bacteria de la familia *Enterobacteriaceae* y la tribu *Salmonellae*, que se clasifica como gramnegativa. Es un organismo móvil y no forma esporas, con una forma alargada similar a un bastoncillo. Esta bacteria es conocida por causar enfermedades gastrointestinales en los seres humanos, manifestándose a través de síntomas como náuseas, vómitos, diarrea, calambres y fiebre. Estos síntomas suelen durar varios días y desaparecer en aproximadamente una semana. En individuos sanos, los síntomas tienden a resolver por sí solos, aunque en algunos casos puede desarrollarse artritis crónica a largo plazo (Food and Drug Administration, 2012).

2.3.2 Bacterias Grampositivas

2.3.2.1 Staphylococcus aureus. Son bacterias grampositivas positivas para la enzima catalasa y que no son móviles. Tienen una forma esférica y pequeña, conocida como cocos. Entre los patógenos humanos no formadores de esporas, son consideradas una de las más resistentes. Pueden sobrevivir en diversos alimentos, especialmente en carne y productos cárnicos, lo que los convierte en causantes frecuentes de intoxicaciones alimentarias. A menos que se sometan a procesos térmicos adecuados, se espera que estas bacterias estén presentes en todos los alimentos que son manipulados directamente por los seres humanos o que provienen de animales (Food and Drug Administration, 2012).

2.3.2.2 Staphylococcus epidermidis. Son bacterias grampositivas de forma esférica, pertenecientes a la familia *Staphylococcaceae*, positivas para la enzima catalasa. Se puede encontrar naturalmente en la superficie corporal como parte de la flora normal, y sobrevive gracias a la presencia de enzimas llamadas lipasas. Las infecciones causadas por *S. epidermidis* están asociadas con la colonización de objetos extraños en el cuerpo, especialmente en pacientes hospitalizados. Esta especie de bacteria es una de las más comunes que se aíslan en infecciones humanas (Pírez & Mota, 2006).

2.3.2.3 Listeria monocytogenes. Son microorganismos que pertenecen al grupo de los bacilos grampositivos, de tamaño reducido y forma delgada. A diferencia de otros bacilos, no forman esporas. Esta especie en particular es la única capaz de infectar a los seres humanos. Las infecciones causadas por *Listeria* suelen originarse en casos aislados o en pequeñas epidemias, y generalmente se transmiten a través de alimentos. Se estima que aproximadamente entre un 2% y un 3% de los productos lácteos están contaminados por este microorganismo (Harvey et al., 2008).

2.3.3 Mohos

2.3.3.1 Aspergillus niger. Es una variedad de hongo responsable del desarrollo del "moho de color negro" que se observa en la superficie de ciertos alimentos como duraznos, cebollas, uvas, entre otros. Esto convierte al *Aspergillus niger* en un organismo que deteriora los alimentos. Este hongo tiene la capacidad de adaptarse y producir grandes cantidades de fructooligosacáridos, debido a la alta actividad transfructosiladora de las enzimas presentes en su superficie (Hinton-Sheley, 2018).

2.3.4 Levaduras

2.3.4.1 Candida albicans. Aunque se clasifica como una levadura, *C. albicans* tiene la capacidad de adoptar dos formas distintas y puede formar un micelio verdadero. Es responsable de causar la candidiasis (candidosis), junto con otras especies de *Candida* que son parte de la flora normal de la piel, boca, vagina e intestinos. Las infecciones ocurren cuando la flora bacteriana que normalmente compite con *Candida* es eliminada, por ejemplo, mediante el uso de antibióticos antibacterianos, lo que permite que la levadura crezca de manera descontrolada. Las infecciones se manifiestan de diversas formas, dependiendo de la ubicación en la que se desarrollen (Harvey et al., 2008).

Capítulo tres

Materiales y métodos

3.1 Obtención del aceite esencial

El material vegetal de *Ocotea quixos* fue procesada de manera inmediata y fresca al llegar al laboratorio, dentro de un período de 2 a 6 horas después de su recolección. Se utilizó un dispositivo de tipo Clevenger para llevar a cabo la hidrodestilación del aceite esencial, manteniendo el proceso durante 3 horas. Posteriormente, el aceite esencial fue separado del agua a través de decantación, se secó utilizando sulfato de sodio anhidro y se almacenó a una temperatura de 4 °C hasta su utilización tal y como lo describe Sosa et al., (2023).

Este proceso se llevó a cabo en el Departamento de Química, en el laboratorio de Microbiología de alimentos de la Universidad Técnica Particular de Loja.

3.2 Actividad antimicrobiana in vitro

3.2.1 Especies microbianas

Para la preparación de los agares de revivificación, se utilizó el agar correspondiente para cada microorganismo (Tabla 1) y siguiendo las especificaciones que se presentan en la etiqueta de cada medio de cultivo.

Tabla 1

Clasificación de las especies a utilizar y preparación de microorganismos

Microorganismo	Identificación de la cepa	Gram	Agar de revivificación	T de incubación (°C)
<i>Salmonella enterica subsp. Enterica</i>	VT000312-10EA derivada ATCC® 14028	-		
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	ATCC® 10145	-	TSA	37
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11775	-		
<i>Klebsiella aerogenes</i>	ATCC 13048	-		

<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228	+	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	+	
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115	+	
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC® 33560	-	Nutrient+sangre 5% 42
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 6275		Extracto de Malta 25
<i>Candida albicans</i>	ATCC 24433		AYM

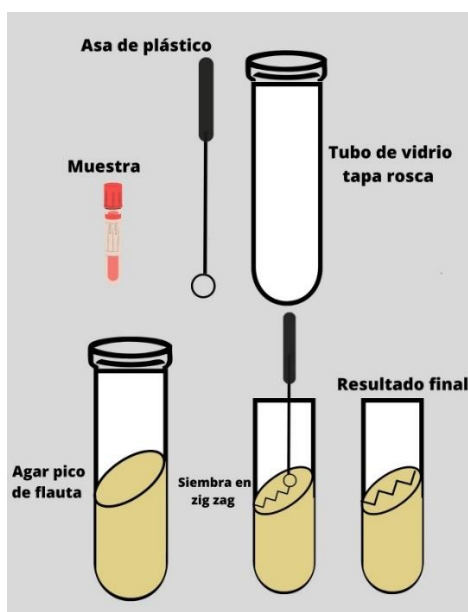
Nota. (Diez et al., 2023), Cepas ATCC: American Type Culture Collection. Estados Unidos, Universidad Técnica Practicar de Loja. Laboratorios Acreditados UTPL

3.2.2 Revivificación de microorganismos

Una vez preparados los distintos medios de cultivos a continuación se colocó 6ml de agar en tubos de ensayo y se procedió a auto clavar a 121°C, 15 psi por 15 minutos. El método de siembra en agar inclinado o pico de flauta es como se deben solidificar los diferentes medios de cultivo como se muestra en la Figura 1.

Figura 1

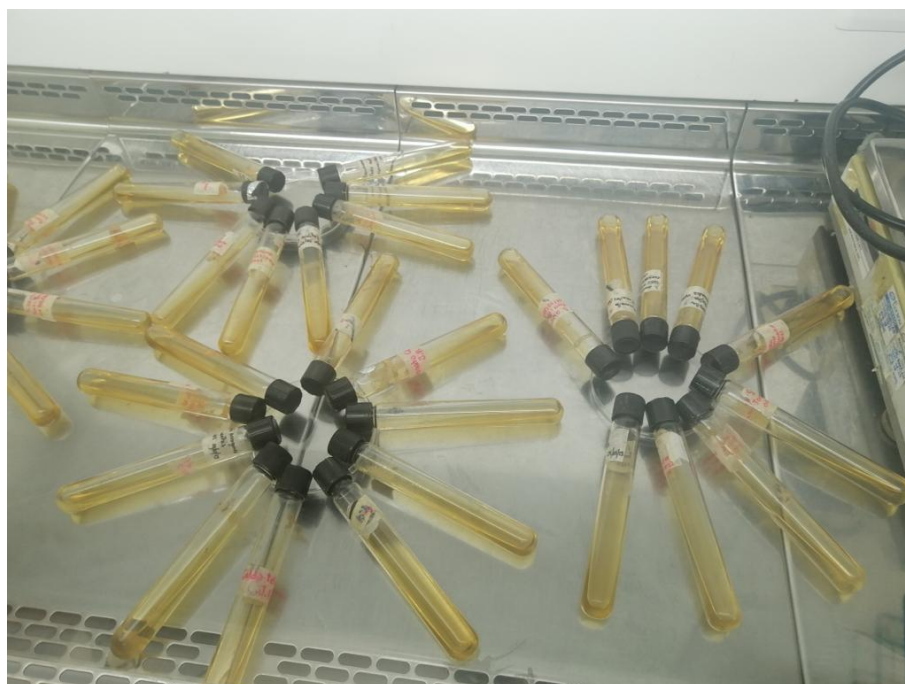
Estriado en agar inclinado o pico de flauta



Dentro de la cámara de flujo laminar, que propicia un ambiente estéril, se dejó secar el agar de forma inclinada para la correcta aplicación del método de estriado hasta lograr conseguir su solidificación aproximadamente 2 horas (Figura 2). Se mantuvo en refrigeración hasta su utilización para la siembra de los diferentes microorganismos.

Figura 2

Secado de tubos de ensayo con agar inclinado



Tomando en cuenta todas las medidas de protección, con la ayuda de un asa de siembra se realiza el estriado de las cepas crio congeladas de los diferentes microorganismos (-70°C) como se muestra en la Figura 1 en los tubos de ensayo con el agar que se preparó previamente, se repitió este proceso por triplicado para cada cepa. Posteriormente, se colocó en incubación los tubos de ensayo siguiendo las condiciones descritas en la tabla 1 para cada microorganismo.

Lo siguiente es comprobar la presencia de colonias en los tubos y sellar para colocar en refrigeración (4°C) hasta su utilización en la siguiente etapa del ensayo.

3.3 Determinación de actividad antimicrobiana

Para la realización de este ensayo se ha adaptado el método utilizado para la determinación de la actividad antimicrobiana usado por Arjabi et al., (2021) y Reyes et al., (2022). Se realizaron 3 repeticiones de cada ensayo para cada microorganismo.

El agar que se utilizó para el plaqueado es el agar Muller Hinton, a excepción de *Campylobacter jejuni*, donde se utilizó agar Nutrient+ sangre 5%, por lo que se realizaron los cálculos para su preparación siguiendo las instrucciones detalladas en la etiqueta. Posterior a esto se prepararon los diferentes medios de cultivo según corresponda para cada microorganismo (Tabla 2) y se colocó 10 ml en cada tubo de ensayo, tomando en cuenta que deben caber en el densitómetro. A continuación, se esterilizó el agar Muller Hinton, los tubos de ensayo con los medios de cultivo, puntas para micropipetas de 200µl y 1000µl y asas diglasky a 121°C, 15 psi por 15 minutos.

Una vez esterilizado el agar, dentro de la cámara de flujo laminar se colocó aproximadamente 60ml de agar Muller Hinton en cada placa de 150mm y se dejó secar hasta que se solidifique. Se almaceno en refrigeración (4°C) cubiertas de aluminio, para evitar la entrada de humedad, hasta el momento de su utilización en el ensayo.

3.3.1 Agar Nutrient+ sangre 5%

Para la realización del ensayo de *Campylobacter jejuni* fue necesaria la utilización de agar Nutrient+ sangre 5%, que se preparó siguiendo las instrucciones que se detallan en la etiqueta, posterior a esto se midió el pH y con la ayuda de Hidróxido de sodio, se estandarizó hasta tener un pH de 7.3 ± 0.2 , a continuación, se esterilizó a 121°C, 15 psi por 15 minutos.

Con el agar esterilizado, en la cámara de flujo laminar, se colocó el 5% de sangre correspondiente dentro del matraz donde se encontraba el agar, utilizando las paredes del matraz para no causar burbujas dentro del agar. Luego de esto se agita hasta tener una mezcla homogénea.

Lo siguiente fue colocar aproximadamente 60ml de agar Nutrient+ sangre 5% en cada placa de 150mm y dejar secar hasta solidificar. Se almacenó en refrigeración (4°C) cubiertas de aluminio, para evitar la entrada de humedad, hasta el momento de su utilización en el ensayo.

Tabla 2

Condiciones de cultivo de microorganismos

Microorganismo	Medio cultivo	de	T de incubación (°C)	Tiempo de incubación (horas)
<i>Salmonella enterica subsp. Enterica</i>	TSB			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
<i>Escherichia coli</i>			37	
<i>Klebsiella aerogenes</i>				24
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	BHI			
<i>Staphylococcus aureus</i>				
<i>Listeria monocytogenes</i>				
<i>Campylobacter jejuni</i>			42	
<i>Aspergillus niger</i>				
<i>Candida albicans</i>	CYM		25	48

3.3.2 Preparación de diluciones del aceite esencial

Se utilizaron diferentes diluciones del aceite esencial de *Ocotea quixos* con una disolución de dimetilsulfóxido (DMSO) en agua estéril con una equivalencia de 1:4. Las concentraciones utilizadas fueron determinadas a partir de la disponibilidad de aceite esencial y son descritas en la Tabla 3.

Tabla 3*Diluciones de aceite esencial en disolución de DMSO*

Microorganismo	Diluciones aceite esencial/ (disolución DMSO/agua estéril)	Concentración en ppm de las diluciones aceite esencial/ (disolución DMSO/agua estéril)
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Enterica</i>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
<i>Escherichia coli</i>	1:1	4.37x10 ⁵
<i>Klebsiella aerogenes</i>	1:3	2.19x10 ⁵
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Aceite esencial puro	8.75x10 ⁵
<i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>Listeria monocytogenes</i>		
<i>Campylobacter jejuni</i>		
<i>Aspergillus niger</i>	1:3	2.19x10 ⁵
	1:5	1.46x10 ⁵
<i>Candida albicans</i>	1:7	1.09x10 ⁵

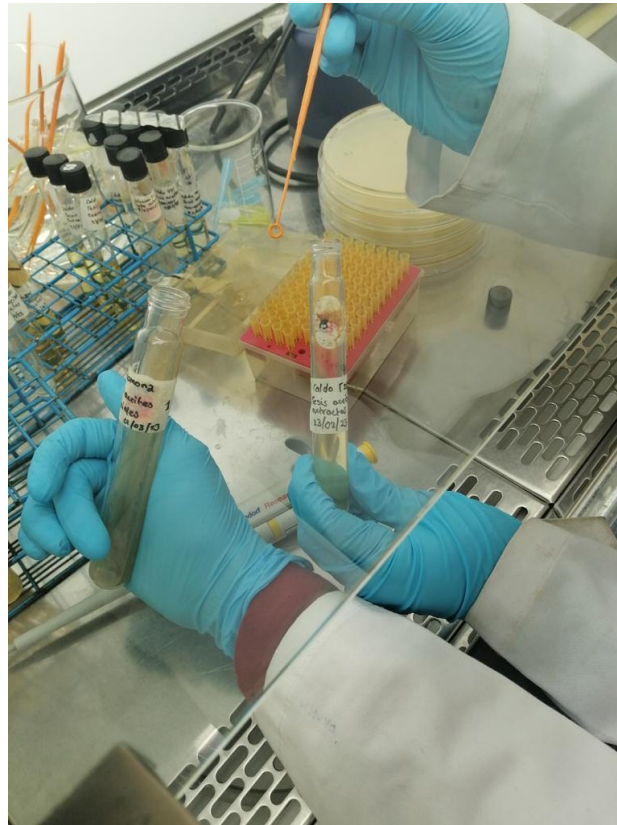
Nota. La reducción de las diluciones en los casos de *Aspergillus niger* y *Candida albicans* es debido a que en ensayos previos realizados no era posible realizar la lectura de los resultados del ensayo.

Además de las diluciones se realizó dos controles en el ensayo, un positivo con hipoclorito de sodio en dilución con agua 1:4 y un control de agua estéril-DMSO 1:4.

Dentro de un ambiente estéril, se selecciona una colonia típica como se muestra en la figura 3 y se traspa al medio de cultivo que corresponda según el microorganismo (Tabla 2) hasta alcanzar una turbiedad de 0.5 en el densitómetro (equivalente 1.5x10⁸ número de células en la escala McFarland).

Figura 3

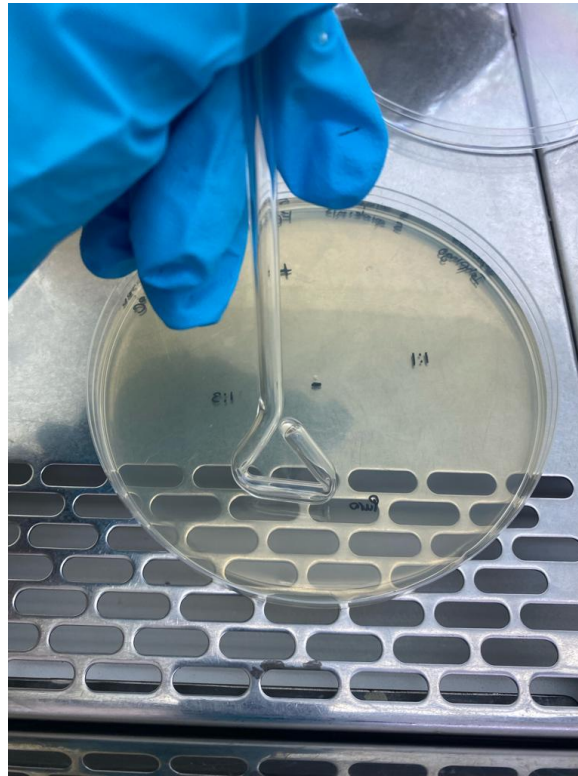
*Selección de colonia típica de Pseudomona
aeruginosa*



Con la ayuda de una micropipeta se colocó 250 μ l del medio de cultivo con la turbiedad de 0.5 en las placas de 150mm con el agar Muller Hinton y se estrió alrededor de la placa con un asa diglasky estéril como se muestra en la Figura 4 y dejar secar por aproximadamente 15 minutos.

Figura 4

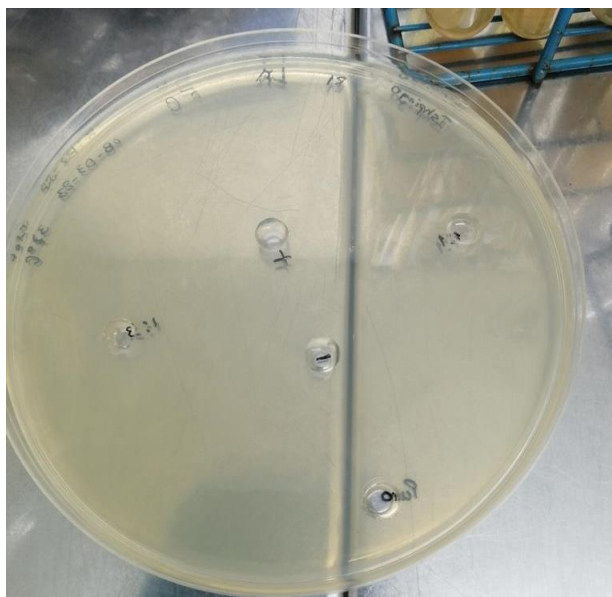
Estriado con asa diglasky



Con la ayuda de puntas de micropipetas estériles de 8mm de diámetro se realizó 5 pocillos en cada placa inoculada (figura 5). A continuación, se colocó 40 μ l de cada solución descrita en la tabla 3 además de los controles positivo y negativo. Se secan dentro de la cámara de flujo laminar hasta que sea posible invertirlas sin que las soluciones colocadas se derramen.

Figura 5

Pocillos realizados con puntas de micropipetas



Las placas se colocaron invertidas dentro de una incubadora con las especificaciones de tiempo y temperatura especificadas en la tabla 2 correspondiente a cada microorganismo.

3.3.3 Lectura de resultados

Una vez que han transcurrido el tiempo de incubación establecido para cada microorganismo, si el aceite esencial tiene efecto, será posible ver un halo de inhibición alrededor de cada pocillo como se muestra en la figura 6. Con la ayuda de una regla se registró la medida del diámetro de cada halo de inhibición y se fotografió cada placa.

Figura 6

Halos de inhibición producidos por el aceite esencial de Ocotea quixos, con respecto a Staphylococcus aureus

**3.4 Análisis estadístico**

Con los datos recolectados de los diámetros de los halos de inhibición de las diferentes soluciones con respecto a cada microorganismo, se aplicó un anova simple y una prueba de rango múltiple de FISHER ($p < 0.5$).

Capítulo cuatro

Resultados y discusión

Los resultados de este estudio se exhiben en las Tablas 4 y 5, las cuales proporcionan un desglose exhaustivo de la actividad antimicrobiana y antifúngica, las diluciones empleadas y los microorganismos sujetos de investigación.

4.1 Actividad antimicrobiana

Tabla 4

Inhibición antimicrobiana a bacterias

Dilución	<i>Salmonella</i> <i>enterica subsp.</i> <i>Enterica</i>		<i>Pseudomona</i> <i>aeuruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella</i> <i>aerogenes</i>	<i>Campylobacter</i> <i>jejuni</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>							
Dilución 1:3	12 ± 0,7	b A	ni	12 ± 1,5	c A	12 ± 0,6	b A	14 ± 4	bc A	10 ± 1,7	c B	11 ± 2,1	b B	18 ± 4,2	a A	
Dilución 1:1	13 ± 1,5	b C	ni	16 ± 1,5	bc AB	13 ± 1	b BC	17 ± 2,7	ab A	13 ± 2,5	bc B	18 ± 1,5	a A	19 ± 2,5	a A	
Puro	16 ± 0,6	a B	13 ± 0,6	a B	18 ± 2,1	b AB	15 ± 1,2	b B	23 ± 6,4	a A	17 ± 3,8	ab A	20 ± 1,7	a A	21 ± 2,7	a A
Blanco (+)	17 ± 2,1	a B	17 ± 3,1	a B	23 ± 3,1	a A	20 ± 3	a AB	8,7 ± 1,2	c C	21 ± 1,5	a A	21 ± 3,6	a A	18 ± 2	a A

Nota. No hay inhibición (ni). Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n = 3). Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Las letras minúsculas comparan a las diluciones entre sí en cada bacteria (columnas), las letras mayúsculas comparan el comportamiento de la dilución en todas las bacterias (filas), p < 0.05. Las medidas de los halos de inhibición se presentan en milímetros.

Campylobacter jejuni y *Listeria monocytogenes* manifiestan una notable sensibilidad al aceite esencial, evidenciada por halos de inhibición que oscilan entre 14 mm y 23 mm. Todas las diluciones muestran halos de inhibición significativamente mayores ($p < 0.05$) en comparación con el control positivo. La sensibilidad particular de *Campylobacter jejuni* podría atribuirse a la sinergia entre (E)-cinamaldehído y (E)-cinamato de metilo presentes en el aceite esencial. Este resultado se respalda por la investigación de Kollanoor Johny et al., (2008), que destaca el alto potencial antimicrobiano de (E)-cinamaldehído frente a este microorganismo, mientras que Valarezo et al., (2022) señala un potencial similar para el (E)-cinamato de metilo. En el caso de *Listeria monocytogenes*, Calderón et al., (2018) ha demostrado una marcada capacidad antimicrobiana atribuible a la presencia de fenilpropanoides.

Salmonella enterica subsp. Enterica, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* mostraron halos de inhibición con diámetros comprendidos entre 10 mm y 20 mm. Sin embargo, en ninguno de estos casos los resultados superaron al control positivo ($p < 0.05$), indicando una sensibilidad moderada al aceite esencial de *Ocotea quixos*. Se destaca que Pino et al., (2018) coincide con la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Ocotea quixos* frente a *Salmonella enterica subsp. Enterica*, aunque difiere en la identificación de los componentes responsables, atribuyendo la acción a 1,8-cineol como agente antimicrobiano y a p-cimeno como potenciador, en contraste con el presente estudio que muestra una composición del 1.3% de 1,8-cineol sin presencia de p-cimeno. Estos cambios en la composición pueden deberse a factores climáticos, al metabolismo adaptativo de la planta o a la parte específica de la planta de la cual se extrajo el aceite esencial. Noriega et al., (2018) coincide con Calderón et al., (2018) al confirmar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ocotea quixos* frente a *E. coli*, aunque divergen en la causa de la inhibición. Noriega et al., (2018) identifica al (E)-acetato de cinamilo como responsable de la actividad antimicrobiana, mientras que Calderón et al., (2018) propone la participación de fenilpropanoides en el aceite esencial como causa. En el caso de *Klebsiella*

aerogenes, Unlu et al., (2010) señala que el aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum Blume* (Lauraceae), rico en (E)-cinamaldehído, exhibe una destacada capacidad antimicrobiana contra este microorganismo, sugiriendo la posible implicación de este componente en la actividad antimicrobiana observada en el presente estudio. En relación a *S. epidermidis* y *S. aureus*, tanto Noriega & Dacarro, (2008) como Pino et al., (2018) concluyen que existe capacidad antimicrobiana frente a ambos y Noriega et al., (2023) propone que la presencia de (E)-cariofileno podría ser la causa de la actividad antimicrobiana observada en estos microorganismos.

Finalmente, es importante destacar que *Pseudomona aeruginosa* exhibe exclusivamente actividad antimicrobiana en el aceite esencial en su forma pura, indicando una capacidad antimicrobiana inferior en comparación con las otras bacterias analizadas. Este resultado presenta que la capacidad mínima inhibitoria del aceite esencial de *Ocotea quixos* se manifiesta de manera más notable en su estado puro. El (E)-cinamato de metilo, según lo señalado por Ali et al., (2010), presenta una capacidad antimicrobiana menor frente a *Pseudomona aeruginosa* en comparación con otras bacterias, lo cual podría explicar la disminución observada en la actividad antimicrobiana general.

4.2 Actividad antifúngica

Tabla 5

Inhibición antifúngica a moho y levadura

Dilución	<i>Aspergillus niger</i>		<i>Candida albicans</i>	
Dilución 1:7	19 ±	9,2 b	ni	
Dilución 1:5	21 ±	1,2 b A	25 ±	4 a A
Dilución 1:3	37 ±	1,2 a A	29 ±	13 a A
Blanco (+)	22 ±	2,9 b A	27 ±	1,7 a A

Nota. No hay inhibición (ni). Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n = 3). Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Las letras minúsculas comparan a las diluciones entre sí en

cada bacteria (columnas), las letras mayúsculas comparan el comportamiento de la dilución en todas las bacterias (filas), $p < 0.05$. Las medidas de los halos de inhibición se presentan en milímetros.

Aspergillus niger y *Candida albicans* han exhibido los resultados más destacados en términos de inhibición entre todos los microorganismos investigados. Esto contrasta con la necesidad de reducir la concentración del aceite esencial, ya que los halos de inhibición a las concentraciones utilizadas en los demás patógenos fueron excesivamente amplios, impidiendo una lectura precisa. A pesar de ello, se observaron halos de inhibición en el rango de 19 mm a 37 mm. En el caso de *Aspergillus niger*, no se detectaron diferencias significativas entre la dilución 1:7, la más baja, y el blanco positivo, indicando un grado de inhibición similar. Pino et al., (2018) respalda la capacidad antimicrobiana del aceite esencial de *Ocotea quixos* frente a *Aspergillus niger*. Fon-Fay et al., (2017) coincide con los autores mencionados previamente al atribuir la actividad antimicrobiana al elevado contenido de (E)-cinamaldehído. Además, Fon-Fay et al., (2017) añade que esta actividad antimicrobiana se debe a la inhibición de la síntesis enzimática de proteasas y amilasas en los microorganismos, provocando debilitamiento y lisis de la pared celular. En cuanto a *Candida albicans*, los resultados revelan una notable capacidad antimicrobiana del aceite esencial, ya que la dilución 1:5 no muestra diferencias significativas con el blanco positivo. Sin embargo, en la dilución 1:7 no se observa halo de inhibición, lo que indica una capacidad mínima inhibitoria del 146000 ppm. Sosa et al., (2023) y Noriega & Dacarro, (2008) respaldan la actividad antimicrobiana frente a *Candida albicans*, aunque el primero sugiere que la sinergia entre los componentes del aceite esencial o la alta concentración de (E)-cinamato de metilo y (E)-cariofileno podrían ser las causas, ya que han demostrado efectos antimicrobianos en diversas especies de *Candida*.

Sosa et al., (2023) presenta los compuestos existentes dentro del aceite esencial de *Ocotea quixos* utilizado para el ensayo, donde predominan (E)-cinamato de metilo, (E)-cariofileno y (E)-acetato de cinamilo.

Conclusiones

El aceite esencial de *Ocotea quixos* tiene un mayor grado de inhibición con respecto a *Aspergillus niger* y *Candida albicans* por lo que una aplicación en matrices alimentarias se presenta como una posibilidad en alimentos afectados por estos patógenos.

Campylobacter jejuni y *Listeria monocytogenes*, presentan un alto grado de sensibilidad al aceite esencial de *Ocotea quixos*, por lo que es factible su utilización posteriormente en modelos alimentarios.

Salmonella enterica subsp. Enterica, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* presentaron halos de inhibición de tamaño moderado, por lo que su uso dentro de investigaciones posteriores en modelos alimentarios es factible.

Recomendaciones

Se recomienda realizar el ensayo donde se realice las diluciones necesarias para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los bacterias y hongos ,excepto *Pseudomona aeruginosa* y *Candida albicans*, con el objetivo de determinar las concentraciones adecuadas para realizar un futuro modelo alimentario, tomando un especial énfasis en *Aspergillus niger*, *Campylobacter jejuni* y *Listeria monocytogenes*.

Se recomienda utilizar el aceite esencial de *Ocotea quixos* en futuros proyectos que impliquen la conservación de alimentos tales como frutas que usualmente son afectadas por *Aspergillus niger* y productos carnicos que son afectados por *Listeria monocytogenes*, *Excherichia coli* y *Campylobacter jejuni*.

Se recomienda realizar un ensayo con otros microorganismos que puedan estar presentes dentro de una matriz alimentaria para determinar cual es la amplitud de la capacidad antimicrobiana del aceite esencial de *Ocotea quixos*.

Referencias

- Ali, N. A. M., Rahmani, M., Shaari, K., Ali, A. M., & Ee Cheng Lian, G. (2010). Antimicrobial activity of *Cinnamomum impressicostatum* and *C. pubescens* and bioassay-guided isolation of bioactive (E)-methyl cinnamate. *Journal of Biological Sciences*, 10(2). <https://doi.org/10.3923/jbs.2010.101.106>
- Arjabi, A., Anarjan, N., & Jafarizadeh-Malmiri, H. (2021). Effects of extracting solvent composition on antioxidant and antibacterial activities of *Alhagi maurorum* extracts. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(3). <https://doi.org/10.1111/jfpp.15300>
- Bassolé, I. H. N., & Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. In *Molecules* (Vol. 17, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/molecules17043989>
- Bayona, M. A. (2009). *Evaluación microbiológica de alimentos adquiridos en la vía pública en un sector del norte de Bogotá*. <https://doi.org/10.31910/rudca.v12.n2.2009.654>
- Bravo-Velásquez, E. (2014). La biodiversidad en el Ecuador. In *Igarss 2014, Universidad Politécnica Salesiana* (Issue 1).
- Bruni, R., Medici, A., Andreotti, E., Fantin, C., Muzzoli, M., Dehesa, M., Romagnoli, C., & Sacchetti, G. (2004). Chemical composition and biological activities of *Ischpingo* 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., Ortiz, Y. L. S., & García, P. L. G. (2018). Chemical composition and antioxidant and antibacterial activity of *Ocotea quixos*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 23(4).
- Casado, I. (2018). Optimización de la extracción de Aceites Esenciales por destilación en Corriente de Vapor. *Universidad Politécnica de Madrid*, 1.
- Chanderbali, A. S., Van Der Werff, H., & Renner, S. S. (2001). Phylogeny and historical biogeography of Lauraceae: Evidence from the chloroplast and nuclear genomes. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 88(1). <https://doi.org/10.2307/2666133>

- Davin-Regli, A., & Pagès, J. M. (2015). Enterobacter aerogenes and Enterobacter cloacae; Versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 6, Issue MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00392>
- Diez, A. M., Bocigas, C., Martín, C. B., Modificado, M., Diana, :, Salinas, H., Felipe, /, & Bueno, R. (2023). *Protocolo normalizado de trabajo Capacidad Antimicrobiana- Extractos/Aceites*.
- Fon-Fay, F. M., Casariego Alicia, Falco Ana Siva, & Pino Jorge. (2017). Antimicrobial activity of essential oils from Ocotea quixos (Lam.) Kosterm, Bursera graveolens (Kunth) Triana & Planch, Cymbopogon citratus (DC) Stapf, and Curcuma longa L. against food contaminant microorganisms. *Ciencia y Tecnología de Los Alimentos*, 27(3).
- Food and Drug Administration. (2012). Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. Second Edition. In *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*.
- Harvey, R., Champe, P., & Fischer, B. (2008). *Microbiología (2a. ed.)* (P. Champe & R. Harvey, Eds.; 2nd ed., Vol. 0). Wolters Kluwer Health. <http://bit.ly/3Rgcflo>
- Hinton-Sheley, P. (2018). What is Aspergillus niger? *News Medical*.
- Kollanoor Johny, A., Darre, M. J., Hoagland, T. A., Schreiber, D. T., Donoghue, A. M., Donoghue, D. J., & Venkitanarayanan, K. (2008). Antibacterial effect of Trans-cinnamaldehyde on Salmonella enteritidis and Campylobacter jejuni in chicken drinking water. *Journal of Applied Poultry Research*, 17(4). <https://doi.org/10.3382/japr.2008-00051>
- Martínez, A. (2003). *Aceites Esenciales*. https://www.med-informatica.net/TERAPEUTICA-STAR/AceitesEsencialesUdeA_esencias2001b.pdf
- Montealegre Pinzón, C. (2011). *Etnobotánica preliminar del Espíngo (Ocotea quixos (Lam.) Kosterm.) en la medicina tradicional indígena Inga, pruebas fotoquímicas y evaluación de la actividad antimicrobiana*. <http://hdl.handle.net/10554/8875>
- Noriega, P., Calderón, L., Ojeda, A., & Paredes, E. (2023). Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Bioautography Activity of Essential Oil from Leaves of

- Amazon Plant *Clinopodium brownei* (Sw.). *Molecules*, 28(4).
<https://doi.org/10.3390/molecules28041741>
- 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>
- Ortuño, M. (2017). Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. In *Ingeniería industrial* (Vol. 35).
- Pino, J. A., Fon-Fay, F. M., Falco, A. S., Pérez, J. C., Fernández, M. D., Hernández, I., & Rodeiro, I. (2018). Chemical composition and biological activities of essential oil from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. leaves grown wild in Ecuador. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 6(1).
- Pérez, M., & Mota, M. (2006). Temas de Bacteriología y Virología Médica. *Universidad de La República | Facultad de Medicina Departamento de Bacteriología y Virología Instituto de Higiene*, 2.
- Reyes, J. F., Diez, A. M., Melero, B., Rovira, J., & Jaime, I. (2022). Antimicrobial Effect of *Simira ecuadorensis* Extracts and Their Impact on Improving Shelf Life in Chicken and Fish Products. *Foods*, 11(15). <https://doi.org/10.3390/foods11152352>
- Rodríguez-Angeles, M. G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. In *Salud Pública de Mexico* (Vol. 44, Issue 5). <https://doi.org/10.1590/s0036-36342002000500011>
- Skoog, A. D., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2008). Principios de análisis instrumental. In *Cengage Learning* (Vol. 3).
- Sosa, L., Espinoza, L. C., Valarezo, E., Bozal, N., Calpena, A., Fábrega, M. J., Baldomà, L., Rincón, M., & Mallandrich, M. (2023). Therapeutic Applications of Essential Oils from

- Native and Cultivated Ecuadorian Plants: Cutaneous Candidiasis and Dermal Anti-Inflammatory Activity. *Molecules*, 28(15). <https://doi.org/10.3390/molecules28155903>
- Torres Espinoza Gonzalo José. (2013). *Manual de buenas prácticas de recolección de la Ishpink*.
- Unlu, M., Ergene, E., Unlu, G. V., Zeytinoglu, H. S., & Vural, N. (2010). Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Food and Chemical Toxicology*, 48(11). <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.09.001>
- Usano-Aleman, J., Palá-Paúl, J., & Díaz, S. (2014). Aceites esenciales: conceptos básicos y actividad antibacteriana. *Reduca (Biología. Serie Botánica)*, 7(2), 60–70.
- Valarezo, E., Ludeña, J., Echeverria-Coronel, E., Cartuche, L., Meneses, M. A., Calva, J., & Morocho, V. (2022). Enantiomeric Composition, Antioxidant Capacity and Anticholinesterase Activity of Essential Oil from Leaves of Chirimoya (*Annona cherimola* Mill.). *Plants*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/plants11030367>
- Zuzarte, M., & Salgueiro, L. (2015). Essential oils chemistry. In *Bioactive Essential Oils and Cancer*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-19144-7_2

Apéndice A. Resultados de actividad antimicrobiana a diferentes diluciones

A continuación se presentan los datos obtenidos en cada uno de los ensayos realizados por triplicado y los cuales son la base para el análisis estadístico presentado en la tabla 4 y 5:

Tabla A1

Inhibición antimicrobiana y antifúngica del aceite esencial de Ocotea quixos

Aceite esencial de Ishpingo (<i>Ocotea quixos</i>)				
Microorganismo	Dilución	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
<i>Salmonella enterica</i> <i>subsp. Enterica</i>	1:1	11	14	13
	1:3	ni	12	11
	Puro	15	16	16
	Blanco (+)	19	16	15
	Blanco (-)	ni	ni	ni
<i>Pseudomona</i> <i>aeruginosa</i>	1:1	ni	ni	10
	1:3	ni	ni	ni
	Puro	13	14	13
	Blanco (+)	14	18	20
	Blanco (-)	ni	ni	ni
<i>Escherichia coli</i>	1:1	16	15	18
	1:3	11	12	14
	Puro	16	17	20
	Blanco (+)	26	22	20
	Blanco (-)	ni	ni	ni
<i>Klebsiella aerogenes</i>	1:1	14	13	12
	1:3	12	12	11
	Puro	14	14	16
	Blanco (+)	23	20	17
	Blanco (-)	ni	ni	ni
<i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i>	1:1	16	13	11
	1:3	11	11	8
	Puro	20	19	13
	Blanco (+)	22	21	19
	Blanco (-)	ni	ni	ni
<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	1:1	20	18	17
	1:3	9	13	12
	Puro	21	21	18
	Blanco (+)	24	22	17
	Blanco (-)	ni	ni	ni
<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	1:1	16	21	19
	1:3	15	21	ni
	Puro	19	24	20
	Blanco (+)	16	20	18
	Blanco (-)	ni	ni	ni
<i>Campylobacter jejuni</i>	1:1	20	15	16
	1:3	18	13	10
	Puro	30	20	18

	Blanco (+)	8	8	10
	Blanco (-)	ni	ni	ni
<i>Aspergillus niger</i>	1:7	14	30	14
	1:5	20	22	20
	1:3	36	38	36
	Blanco (+)	20	25	20
	Blanco (-)	ni	ni	ni
		1:7	3,1	ni
<i>Candida albicans</i>	1:5	30	23	23
	1:3	40	15	32
	Blanco (+)	25	28	28
	Blanco (-)	ni	ni	ni

Nota. No hay inhibición (ni). Las medidas de los halos de inhibición se presentan en milímetros.