



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA**

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Determinación de la actividad antimicrobiana y antioxidante de los extractos de la planta sunfo (*Clinopodium nubigenum*) frente a cepas de *Staphylococcus*

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniero Biotecnólogo, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Juan Fernando Chiriboga Cordones

Tutor: Blga. Helena Maritza De la Torre Olvera, PhD.

Ambato – Ecuador

Febrero 2024

APROBACIÓN DEL TUTOR

Blga. Helena Maritza De la Torre Olvera, PhD.

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final del Trabajo de Titulación, opción de Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 12 de enero 2024

Blga. Helena Maritza De la Torre Olvera, PhD.

C.I. 1309651998

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Juan Fernando Chiriboga Cordones manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, opción Proyecto de Investigación, previo la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo, son absolutamente originales, como auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Juan Fernando Chiriboga Cordones

C.I. 1804387650

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga uso del Informe Final del Trabajo de Titulación, o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando los derechos de autor.



Juan Fernando Chiriboga Cordones

C.I. 1804387650

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, opción Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

.....

Presidente del tribunal

.....

PhD. William Ricardo Calero Cáceres

1714344885-9

.....

MSc. María Eugenia García Pazmiño

210024850-5

Ambato, 05 de febrero del 2024

AGRADECIMIENTO

Al haber culminado este proyecto, agradezco a todas las personas que he encontrado en mi camino y me han brindado un granito de arena para superarme día a día. Primeramente, a Dios por brindarme la salud y sabiduría para seguir adelante y lograr cumplir mis metas de forma académica y personal.

A mi madre Yolanda Cordones, por las palabras de aliento y nunca dejar de preocuparse por mi bienestar y guiarme por el camino correcto. A mi padre Marco Chiriboga, que me ha mostrado el camino del esfuerzo, donde cada paso que se realice con ganas y sacrificio tendrá buenos resultados.

A mi tutora, Blga. Helena de la Torre, PhD. que ha sido una guía para cumplir este trabajo, brindándome paciencia y ayuda en las dudas que se presentaban.

A mi abuelita Mamilaura que siempre ha brindado su apoyo y preocupación, Papiagusto, Abuelo Gonzalo y a Mamicharito que siempre me cuidará desde el cielo.

A mi hermano Mateo, que me ha brindado su ayuda cuando la necesitaba, a mi hermana Liliana que ha estado pendiente de mi bienestar, a mi sobrino Mathy, que ha compartido momentos de alegría y bromas cuando me visita y a mi mascota Sammy.

A mis tíos Gabi, Kandela, Susi, Lucas, Diego por toda la ayuda brindada en mi carrera universitaria y en los consejos cuando los necesitaba.

A Melita Aguilar, por estar en los momentos buenos y malos, agradezco su compañía y amor, sus palabras de apoyo y las ganas de seguir adelante a mi lado.

A mis amigos Jona, Vivi, Cayo, Carito, Licha, Josu, por la ayuda brindada y los momentos que hemos compartido. Y un profundo agradecimiento a Grace Bejarano y Alex Caiza, por ser un pilar importante en mi vida.

Un especial agradecimiento a la MSc, María Daniela Gárces, MSc. Alejandra Sánchez, MSc. Ruth Pérez, Ing. Geovanny Freire y Químico Lander Pérez, por la ayuda brindada y los consejos para que se pudiera lograr este proyecto.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	iii
DERECHOS DE AUTOR.....	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xii
RESUMEN EJECUTIVO	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO	1
1.1 Antecedentes investigativos	1
1.1.1. Justificación	1
1.1.2. Plantas medicinales.....	2
1.1.3. Sunfo (<i>Clinopodium nubigenum</i>).....	2
1.1.1.4. Hábitat y descripción.....	2
1.1.3.2. Clasificación taxonómica	3
1.1.3.3. Usos.....	4
1.1.3.4. Composición química.....	4
1.1.4. Métodos de extracción.....	5
1.1.4.1. Extracción Soxhlet	5
1.1.4.2. Extracción por maceración.....	6
1.1.5. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS).....	6
1.1.5.1. Contexto a nivel mundial	6
1.1.5.2. Enfermedades transmitidas por alimentos más conocidas	7
1.1.5.3. Contexto a nivel nacional.....	9
1.1.6. Queso fresco	11
1.1.7. <i>Staphylococcus aureus</i>	11

1.1.7.1. Descripción general.....	11
1.1.7.2. Hábitat y transmisión	12
1.1.7.3. Resistencia a antibióticos	13
1.1.8. Métodos de estudio de la actividad antimicrobiana.....	13
1.1.8.1. Dilución en caldo	13
1.1.8.2. Difusión en disco de agar.....	14
1.1.9. Método de estudio de la actividad antioxidante.....	15
1.1.9.1. Propiedades antioxidantes de plantas.....	15
1.1.9.2. Método por DPPH.....	15
1.2. Objetivos.....	16
1.2.1. General.....	16
1.2.2. Específicos.....	16
CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA.....	17
2.1. Materiales	17
2.1.1. Material de laboratorio.....	17
2.1.2. Reactivos.....	18
2.1.3. Equipos	18
2.2. Métodos	19
2.2.1. Extracción mediante Soxhlet	19
2.2.1.1. Obtención del material vegetal.....	19
2.2.1.2. Limpieza y secado del material vegetal	19
2.2.1.3. Extracción Soxhlet	19
2.2.1.4. Cálculo del rendimiento	20
2.2.2. Análisis de la capacidad antimicrobiana	20
2.2.2.1. Obtención de bacterias	20
2.2.2.2. Siembra de colonias	20
2.2.2.3. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	20
2.2.2.4. Concentración Mínima Bactericida (CMB)	22
2.2.3. Evaluación de la actividad antioxidante	23
2.2.3.1. Determinación del porcentaje de inhibición de DPPH	23
2.2.4. Hipótesis	24
2.2.5. Variables.....	24

CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
3.1. Análisis y discusión	25
3.1.1. Rendimiento del extracto	25
3.1.2. Prueba de actividad antimicrobiana	26
3.1.3. Determinación de la actividad antioxidante.....	31
3.2. Verificación de la hipótesis.....	34
CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	35
4.1. Conclusiones.....	35
4.2. Recomendaciones.....	36
MATERIALES DE REFERENCIA	37
Referencias Bibliográficas.....	37
Anexos.....	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de la especie <i>Clinopodium nubigenum</i>	3
Tabla 2. Distintas enfermedades transmitidas por alimentos	8
Tabla 3. Casos notificados de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS) en el año 2023	9
Tabla 4. Materiales de laboratorio	17
Tabla 5. Reactivos de laboratorio	18
Tabla 6. Equipos de laboratorio.....	18
Tabla 7. Rendimiento del extracto mediante la técnica Soxhlet.....	25
Tabla 8. Concentración mínima inhibitoria del extracto de la planta sunfo frente a <i>S. aureus</i> y SCN	29
Tabla 9. Concentración mínima bactericida del extracto de la planta sunfo (<i>Clinopodium nubigenum</i>) frente a <i>S. aureus</i> y SCN	30
Tabla 10. Porcentaje de inhibición de radicales mediante DPPH del extracto a diferentes concentraciones	31
Tabla 11. Contenido de fenoles totales del extracto	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sunfo (<i>Clinopodium Nubigenum</i>).....	3
Figura 2. Modelo sistemático de extracción por Soxhlet.....	5
Figura 3. Morfología de <i>S. aureus</i>	12
Figura 4. Placa de 96 pocillos para prueba de microdilución en caldo.....	14
Figura 5. Prueba de difusión en disco de agar	14
Figura 6. Mecanismo de reacción del uso de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)	15
Figura 7. Preparación de placa para prueba de microdilución.....	22
Figura 8. Bacterias obtenidas mediante Staph Express.....	27
Figura 9. Microdilución en placa de 96 pocillos.....	28
Figura 10. Porcentaje de inhibición a distintas concentraciones mediante DPPH.....	32

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A. Obtención de extracto.....	48
Anexo A 1. Tamizado mecánico de las hojas de <i>C. nubigenum</i>	48
Anexo A 2. Pulverizado del material vegetal (hojas).....	48
Anexo A 3. Obtención del extracto etanólico mediante Soxhlet	48
Anexo A 4. Uso del rotavapor para eliminación del etanol	48
Anexo B. Actividad antimicrobiana	49
Anexo B 1. Primera dilución de extracto frente a cepas de <i>Staphylococcus</i>	49
Anexo B 2. Queso obtenido en el mercado de Ambato	50
Anexo B 3. Siembra en petrifilm	50
Anexo B 4. Preparación prueba de coagulasa.....	50
Anexo B 5. Escala Mcfarland del inóculo	50
Anexo B 6. Preparación de la resazurina	50
Anexo B 7. Prueba de CMI en placas de 96 pocillos.....	50
Anexo B 8. Dilución de extractos para la CMI.....	51
Anexo B 9. Siembra en placas de PCA para prueba de CMB	51
Anexo B 10. Placas que presentaron CMB a 24, 48 y 72 horas	51
Anexo C. Actividad antioxidante	51
Anexo C 1. Absorbancia del extracto de la planta Sunfo (<i>C. nubigenum</i>).....	51

RESUMEN EJECUTIVO

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS) provocan síntomas como: diarrea, vómitos y dolores estomacales; su tratamiento es el uso de antibióticos como: cefalosporinas, penicilina y aminoglucósidos. Debido al mal uso de estos, se ha presentado resistencia a bacterias como: *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, entre otras. En la presente investigación la bacteria utilizada, fue *S. aureus* y *Staphylococcus* Coagulasa Negativa (SCN), obtenidas en quesos de mercados de la Ciudad de Ambato, donde se buscó una alternativa frente al uso de antibióticos mediante ensayos antimicrobianos y su relación con la actividad antioxidante.

Para esto se llevó a cabo la obtención de un extracto de la planta Sunfo (*C. nubigenum*) donde sus principales componentes son polifenoles como: flavonoides y ácidos fenólicos. Mediante el método Soxhlet, se obtuvo metabolitos secundarios junto al disolvente etanol. La identificación de la bacteria se realizó en Agar Manitol Salado, una coloración amarilla indicó la presencia de *S. aureus* y una coloración roja indicó la presencia de SCN. Para la prueba antimicrobiana se utilizó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Bactericida (CMB) junto con el indicador resazurina, observando un cambio de coloración; para la actividad antioxidante se realizó un ensayo colorimétrico con 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

Finalmente, se determinó que el extracto de *C. nubigenum* presentó propiedades antimicrobianas, por la inhibición de las especies *S. aureus* y SCN, verificando el cambio de coloración con la prueba de CMI y CMB. Así mismo, el extracto evaluado presentó propiedades antioxidantes mediante la lectura de absorbancias entre el DPPH y el extracto.

Palabras clave: Biotecnología vegetal, actividad antimicrobiana, actividad antioxidante, plantas medicinales, extractos vegetales, sunfo, *Staphylococcus*, ETAS.

ABSTRACT

Foodsborne illnesses cause symptoms such as: diarrhea, vomiting and stomach pains; the treatment is the use of antibiotics such as: cephalosporins, penicillin and aminoglycosides. Due to the bad use, resistance has occurred to bacteria such as: *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, among others. In the present investigation, the bacteria used was *S. aureus* and Coagulase Negative *Staphylococcus* (CoNS), obtained in cheeses from markets in the City of Ambato, where searched for an alternative to the use of antibiotics through antimicrobial tests and its relationship with the antioxidant activity.

For this purpose, an extract of the Sunfo (*C. nubigenum*) was obtained, where its main components are polyphenols such as: flavonoids and phenolic acids. Through the Soxhlet method, secondary metabolites were obtained together with the solvent ethanol. The identification of the bacteria was realized on Salted Mannitol Agar, a yellow colour indicated the presence of *S. aureus* and a red colour indicated the presence of CoNS. For the antimicrobial test, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Bactericidal Concentration (MBC) were used together with the resazurin indicator, observing a change in coloration; for antioxidant activity, a colorimetric assay was realized with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

Finally, it was determined that the *C. nubigenum* extract presented antimicrobial properties, due to the inhibition of the *S. aureus* and CoNS species, verifying the colour change with the MIC and MBC test. Likewise, the evaluated extract presented antioxidant properties by reading absorbances between DPPH and the extract.

Keywords: Plant biotechnology, antimicrobial activity, antioxidant activity, medicinal plants, plant extracts, sunfo, *Staphylococcus*, ETAS.

CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos

1.1.1. Justificación

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS) se encuentran directamente ligadas a la ingesta de alimentos con contaminantes físicos, químicos y biológicos, destacando a los microorganismos como: virus, bacterias y hongos (**Fernández et al., 2021**). Afecta en un gran porcentaje a las personas que cuentan con el hábito de consumir alimentos sin etiquetas, con un bajo nivel de almacenamiento o con una deficiente práctica de inocuidad alimentaria (**Benítez et al., 2019**). Además, tiene una alta incidencia en la mortalidad y morbilidad de las personas, afectando a grupos sociales con ingresos bajos o a los países en vías de desarrollo (**Ponce et al., 2019**).

En el Ecuador se ha registrado hasta el año 2020 un número de 5890 personas con intoxicaciones alimentarias bacterianas, lo que indica un gran problema con relación a la salud de las personas (**MSP, 2023**). La bacteria *Staphylococcus aureus* es una de las especies que ocasionan intoxicaciones alimentarias en los seres humanos debido a la producción de enterotoxinas (**Grispoldi et al., 2021**). Por lo cual, una de las principales problemáticas de esta bacteria es su relación directa con las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS), donde, se destaca el consumo de los productos lácteos y sus derivados como el queso fresco (**Gajewska et al., 2022**).

La ingesta de productos lácteos o cárnicos contaminados, pueden terminar en la producción de enterotoxinas estafilocócicas o en la toxina del síndrome del shock tóxico-1 (TSST-1) (**Gaschignard et al., 2020**). Cabe destacar que *S. aureus* fue una de las primeras bacterias en presentar resistencia a los antibióticos como es el caso de la penicilina (**Galarza Galarza & Yarzabal Rodríguez, 2021**). Así mismo, puede existir la presencia de *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) en alimentos para consumir y

que puede estar asociada al mal uso de antibióticos, destacando un mal manejo de las prácticas sanitarias (**Espinoza et al., 2019**).

1.1.2. Plantas medicinales

En el Ecuador se encuentra una gran cantidad de plantas medicinales que son utilizadas para el tratamiento de enfermedades comunes, especialmente por las distintas etnias que mantienen estas prácticas de una forma tradicional (**Armijos et al., 2021**). El tratamiento con las plantas medicinales se prepara en su mayoría mediante infusiones para un mejor consumo de los compuestos activos, donde destacan: flavonoides y compuestos fenólicos, para el tratamiento de migrañas, cólicos o como antiparasitario (**Guevara et al., 2019**).

En la estructura de la plantas se encuentran presentes más de 100 compuestos químicos como: monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos. Destacando la presencia de hidrocarburos terpénicos como el terpeno, el cual es un metabolito secundario que brinda aroma y sabor a las plantas (**Blanco et al., 2020**). La importancia del uso de metabolitos secundarios es su aplicación en la industria farmacéutica por su enfoque en propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (**Egamberdieva et al., 2021**).

1.1.3. Sunfo (*Clinopodium nubigenum*)

1.1.1.4. Hábitat y descripción

Este tipo de planta aromática es representativa de países como Perú, Colombia y Ecuador, encontrándose principalmente en los páramos de la provincia de Pichincha. Su altura alcanza un tamaño máximo de 15 cm y sus ramificaciones se forman de manera vertical, en su estructura sus hojas tienen una forma ovalada, de coloración verde, presentan flores de coloración morada o blanca como se lo observa en la **Figura 1** (**Mittal et al., 2019**).

Pertenece a la familia *Lamiaceae*, que es conocida por contar con especies aromáticas y medicinales, destacando al orégano (*Origanum*), toronjil (*Melissa officinalis*) o *Satureja*

spp., que son las más estudiadas a diferencia de *C. nubigenum*, debido a su poco conocimiento y su falta de producción en la industria (Valerio et al., 2021).

Figura 1.

Sunfo (Clinopodium Nubigenum)



1.1.3.2. Clasificación taxonómica

Tabla 1. *Taxonomía de la especie Clinopodium nubigenum*

Reino	<i>Plantae</i>
Clase	<i>Equisetopsida C. Agardh</i>
Subclase	<i>Magnoliidae Novák ex Takht.</i>
Superorden	<i>Asteranae Takht.</i>
Orden	<i>Lamiales Bromhead</i>
Familia	<i>Lamiaceae Martinov</i>
Género	<i>Clinopodium L.</i>
Especie	<i>C. nubigenum</i>
Nombre Común	Sunfo, Sunfillo

Nota: La tabla muestra la clasificación taxonómica de la especie *C. nubigenum*.

Fuente: (Coral, 2018).

1.1.3.3. Usos

Es una planta endémica que se ha utilizado desde la antigüedad para tratar dolores estomacales y dolores musculares (**Armijos et al., 2022**). De la misma forma, se utiliza *C. nubigenum* para el tratamiento del resfriado y como antiinflamatorio (**Ruiz et al., 2010**). En provincias como Tungurahua, Pichincha o Cañar, se ha evidenciado su uso de manera reconstituyente y tónica para las personas que escalan los páramos; además, las hojas se las utiliza para la preparación de infusiones como uso alimentario (**de la Torre et al., 2008**).

1.1.3.4. Composición química

Esta planta cuenta con una composición química que tiene funciones terapéuticas en los seres humanos, tales como: psicotrópicas y sedantes, ya que en su estructura cuentan con componentes como: taninos, esteroides, flavonoides y triterpenos (**Fierascu et al., 2020**). En la estructura de las plantas de la familia *Lamiaceae* se encuentra presente una gran cantidad de metabolitos secundarios como: compuestos fenólicos, antocianinas y taninos; por lo cual, su actividad antioxidante consiste principalmente en el atrapamiento de los radicales libres, igualmente con efectos antidiabéticos y antibacterianos (**Henriques et al., 2021**).

El estudio realizado por (**Guerra, 2016**), indico los principales componentes en el aceite esencial de *C. nubigenum*, donde los que en mayor porcentaje se presentaron fueron: carvacrol en un $20,66 \pm 1,73$ %, carvacrol acetato en un $42,17 \pm 1,21$ %, timol en un $5,54 \pm 0,42$ % y pulegona $6,3 \pm 0,06$ %, los cuales son compuestos fenólicos que presentan propiedades antimicrobianas y antioxidantes.

1.1.4. Métodos de extracción

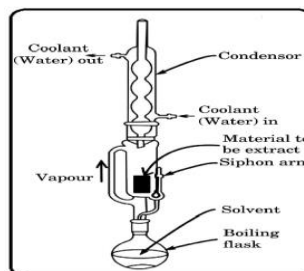
1.1.4.1. Extracción Soxhlet

La extracción por Soxhlet consiste en la obtención de metabolitos secundarios, donde se utilizan diferentes tipos de solventes como: etanol, metanol, hexano, éter de petróleo, entre otros (F. Vásquez & Fernández, 2020). El fundamento de esta técnica se basa en la separación de compuestos bioactivos, que generalmente se encuentran en las plantas, donde se va a obtener un recuperado del contacto entre el disolvente y la muestra vegetal, y los compuestos solubles obtenidos pasan un proceso de evaporación y condensación (Alara et al., 2018).

Además, es importante considerar que es uno de los métodos más recomendables para la obtención de compuestos fenólicos por la alta recuperación en su extracto, la simplicidad del proceso y la disponibilidad del disolvente, destacando un mayor uso del etanol en comparación con disolventes como el metanol y el hexano, que se encuentran estrictamente controlados (Sridhar et al., 2021). Una de sus desventajas es el alargado tiempo de su proceso, que pueden ir de 4 a 18 horas; así mismo, la gran cantidad de muestra a utilizar, alrededor de 10 a 30 g y la pérdida de la energía térmica (Sen et al., 2019).

Figura 2.

Modelo sistemático de extracción por Soxhlet



Nota: Se encuentran los principales componentes del equipo Soxhlet, destacando el condensador, el balón aforado y el sifón.

Fuente: (Shahid et al., 2015).

1.1.4.2. Extracción por maceración

El método de maceración consiste en la obtención de los metabolitos secundarios a partir de una interacción sólido-líquido, donde se coloca una muestra vegetal en forma de polvo junto a un disolvente **(Thakur & Kumar, 2021)**. Los disolventes frecuentes por utilizar son: hexano, etanol, metanol o acetona, los cuales permiten la obtención de lípidos, polifenoles o enzimas, mediante la degradación de la estructura del material vegetal **(Coelho et al., 2019)**.

Adicionalmente al tiempo de reposo de muestra, se realiza una agitación para que exista homogeneidad en la mezcla, una vez terminado el tiempo del proceso se debe realizar una eliminación del disolvente, usualmente se utiliza un filtro para esta etapa **(Farooq et al., 2020)**. En cuanto a sus desventajas, se puede obtener un bajo rendimiento del extracto obtenido por factores como el tiempo prolongado de exposición al solvente, así mismo, el tipo de solvente puede inferir en los resultados por su tipo de polaridad **(Rashid et al., 2021)**.

1.1.5. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS)

1.1.5.1. Contexto a nivel mundial

Los distintos alimentos contaminados por microorganismos o sustancias químicas provocan las enfermedades transmitidas por alimentos, las cuales tienen un impacto directo a la salud de las personas **(Diaz Ramirez & Hernandez Alvarez, 2018)**. La presencia de microorganismos patógenos como: bacterias, virus, hongos o parásitos, siendo una de las principales causantes de diarreas en seres humanos a través del consumo de alimentos contaminados **(Maurya et al., 2021)**.

Esto puede ocurrir con mayor frecuencia en las personas de bajos recursos debido a la calidad de los alimentos, agua contaminada, por el escaso conocimiento de la inocuidad al momento de su preparación (**Cartín & Pascual, 2021**). Se ha evidenciado igualmente la presencia de microorganismos patógenos en países desarrollados, como lo es el caso del brote epidémico causado por *E. coli* O104 en Alemania, donde no se ha identificado la fuente de infección, solamente se la relaciono con una contaminación en brotes de soja, afectando a 3.222 personas y causando la muerte en 39 de estas (**Vila & Zboromyrska, 2012**).

Los principales microorganismos que influyen en las enfermedades diarreicas son: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi*, *Campylobacter spp.*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* O157:H7, estas se multiplican en el tracto intestinal donde liberan sus toxinas y causan una intoxicación rápida, lo que produce un gran número en la mortalidad según reportes de Salud Pública (**Guarín & Restrepo, 2020**).

Las ETAS puede presentarse como una infección y como una intoxicación, donde una infección se caracteriza por el consumo de alimentos que presentan agentes infecciosos como bacterias vivas, las cuales proliferan e invaden especialmente al intestino. Por otro lado, una intoxicación se debe al consumo de toxinas producidas por microorganismos, que se adaptan al alimento en etapas como producción, distribución o preservación, suele ocurrir de manera accidental por un mal manejo de la inocuidad (**Fernández et al., 2021**).

1.1.5.2. Enfermedades transmitidas por alimentos más conocidas

Los diferentes microorganismos en los alimentos pueden encontrarse en varios ámbitos, como lo son: producción, preservación, distribución, entre otros. En la **Tabla 2**, se describe las principales enfermedades de interés en el área de la salud.

Tabla 2. *Distintas enfermedades transmitidas por alimentos*

Enfermedad	Organismo Responsable	Fuente	Síntoma
Salmonelosis	<i>Salmonella enteritidis</i>	- Animales - Aves de corral - Huevos - Seres humanos	- Náuseas - Vómito - Diarrea - Fiebre - Vómitos
Campilobacteriosis	<i>Campylobacter jejuni</i>	- Animales de compañía - Animales o personas infectadas - Agua	- Náuseas - Fiebre - Diarrea - Dolor abdominal
Listeriosis	<i>Listeria monocytogenes</i>	- Alimentos contaminados - Animales o personas infectadas - Agua	- Fiebre baja - Meningitis y encefalitis - Malestar
Shigelosis	<i>Especie Shigella</i>	- Seres humanos - Alimentos contaminados	- Dolor abdominal - Diarrea - Fiebre - Material fecal con sangre

Intoxicación estafilocócica por alimentos	<i>Staphylococcus aureus</i>	- Animales	- Dolor abdominal
		- Aves de coral	- Diarrea
		- Huevos	- Fiebre
		- Seres humanos	- Náusea
			- Vómitos
<i>Escherichia coli:</i> intoxicación e infección	<i>Escherichia coli 0157:H7</i>	- Seres humanos	- Diarrea
		- Ganado	- Náuseas
		- Agua contaminada (aguas residuales)	- Vómito
			- Puede afectar al páncreas y al cerebro.
			- Escalofríos

Nota: Se presenta en la tabla las principales enfermedades transmitidas por alimentos

Fuente: (Marcillo et al., 2019), (Sadek et al., 2023), (Soto et al., 2016).

1.1.5.3. Contexto a nivel nacional

En el Ecuador los informes realizados por la Subsecretaría Nacional de Vigilancia de la Salud Pública – Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica, indica que la Gaceta 36 del año 2023, se han identificado a las bacterias que provocan infecciones e intoxicaciones en las personas, como se lo observa en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Casos notificados de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS) en el año 2023

Enfermedad	Descripción	Casos notificados a nivel nacional
------------	-------------	---------------------------------------

Tifoidea	Se debe principalmente al consumo de la bacteria <i>Salmonella tiphy</i> en alimentos contaminados, teniendo mayor presencia en la provincia del Guayas con 186 casos.	732
Salmonelosis	Una de las bacterias más comunes al momento de consumir alimentos contaminados con <i>Salmonella spp.</i> La mayor presencia se encuentra en la provincia del Guayas con 357 casos.	974
Hepatitis A	Esta enfermedad ocurre por el contagio del virus de la hepatitis A, en personas que cuentan con este virus y lo transmiten mediante heces o agua contaminada. Su presencia más elevada se da en la provincia de Morona Santiago, con 52 casos.	287
Shigelosis	Esta infección ocurre por el consumo de <i>Shigella spp.</i> , destacando uno de sus principales síntomas, diarrea con sangrado. La provincia con mayores casos fue Pichincha con 51.	163
Otras intoxicaciones alimentarias bacterianas	Son causadas por bacterias o virus que producen toxinas y que ingresan mediante agua o alimentos, destacando a <i>S. aureus</i> , la provincia con más casos fue Pichincha con 2605.	6825

Nota: En la provincia del Guayas se presenta un mayor número de personas contagiadas de Tifoidea y Salmonelosis, destacando la baja inocuidad y control que ocurren en la manipulación de los alimentos.

Fuente: (MSP, 2023).

1.1.6. Queso fresco

Se considera al queso como un alimento que se obtiene mediante coagulación de la leche, mediante la separación de la cuajada del lactosuero; para que sea considerado un queso fresco es necesario que, dentro del proceso de la cuajada, este no se encuentre madurado (**Mazorra & Moreno, 2019**). Para su conservación, es necesario mantenerlo bajo refrigeración por ser un producto perecible debido a su alto porcentaje de agua (**Christaki et al., 2021**).

Existe una gran diferencia entre el manejo de quesos elaborados en una industria y en los quesos elaborados en los mercados, ya que este último comprende un proceso más artesanal, describiendo un nivel escaso en el manejo de control de calidad, especialmente en las cadenas de frío y de transporte (**Possas et al., 2021**). La ingesta de este producto ocasiona infecciones intestinales producidas principalmente por la bacteria *S. aureus*, las cuales presentan resistencia a medicamentos de uso clínico como los antibióticos de la meticilina, gentamicina, ciprofloxacina, entre otros (**Nandhini et al., 2022**).

1.1.7. *Staphylococcus aureus*

1.1.7.1. Descripción general

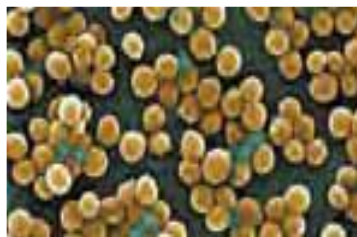
Esta especie pertenece al Género *Staphylococcus*, con una característica infección directa hacia la piel, lo que produce lesiones cutáneas como ampollas y pus (**Flores et al., 2021**), *S. aureus* es una bacteria grampositiva, con un tamaño entre los 0,8 y 1,5 μm de diámetro; además, puede aparecer en cadenas o su forma más conocida en racimos de uvas.

Con respecto a su metabolismo es anaerobia facultativa, coagulasa positiva que genera una reacción del fibrinógeno a fibrina, catalasa por su reacción al aplicar peróxido de hidrógeno y oxidasa negativa, por lo que cuenta con una fácil supervivencia a diferentes condiciones ambientales (**Hurtado et al., 2002**).

Esta bacteria es una de las principales causantes de intoxicaciones alimentarias como infecciones en la piel, lo cual presenta un problema en la salud por su alta capacidad de adaptación, causando una interacción entre especies como humanos-animales. Donde, las propiedades fisicoquímicas de alimentos como: humedad, coagulación y maduración, pueden albergar una contaminación bacteriana y así permitir su transmisión en alimentos como: productos cárnicos, leche y sus derivados, huevos, entre otros (**Zendejas et al., 2014**).

Figura 3.

Morfología de S. aureus



Nota: Cada coco aproximadamente mide 1 μm de diámetro

Fuente: (Madigan et al., 2015).

1.1.7.2. Hábitat y transmisión

Esta bacteria puede encontrarse en el tracto respiratorio de las personas y en la piel, por lo cual el principal hospedador son las personas y así puede tener otro contacto directo con los animales, llegando hasta su propagación en el agua y en los alimentos. La principal forma de transmisión es mediante pinchazos o cortes con objetos contaminados (**Flores et al., 2021**).

Una vez que se encuentran en los alimentos *S. aureus* produce enterotoxinas estafilocócicas causando la intoxicación en las personas, la toxina (TSST-1) responsable

de producir el síndrome del shock tóxico y las toxinas exfoliativas que producen el síndrome de la piel escaldada (**Bukowski et al., 2010**).

1.1.7.3. Resistencia a antibióticos

Este patógeno cuenta con factores de virulencia como la proteína A, ácido teicoico o peptidoglicano que permite generar una resistencia frente a los antibióticos, creando clones multirresistentes (**Torres & Pacheco, 2021**). La evolución de esta bacteria se ha efectuado desde hace muchos años, donde la principal razón fue el uso discriminado de antibióticos, donde el primer antibiótico utilizado fue la penicilina, una vez presentada resistencia a este antibiótico se utilizó la meticilina, para el tratamiento de *S. aureus* que son resistentes a la penicilina, debido a la presencia del gen *mecA* (**Cervantes et al., 2014**).

1.1.8. Métodos de estudio de la actividad antimicrobiana

1.1.8.1. Dilución en caldo

Esta técnica se basa en la preparación de diferentes concentraciones de un extracto vegetal o de un antibiótico frente a diferentes patógenos, se clasifica en : macrodilución y microdilución, la primera utilizar un volumen aproximado de 2 mL y se la realiza en tubos de ensayo, por otro lado, la microdilución se utiliza un volumen máximo de 200 µL, un detalle importante es utilizar una escala 0.5 McFarland del inóculo bacteriano para conocer la carga bacteriana a utilizar, se utiliza una incubación aproximada de 24 horas y se agrega un indicador de crecimiento llamado resazurina (**Balouiri et al., 2016**).

Figura 4.

Placa de 96 pocillos para prueba de microdilución en caldo



Nota: Prueba de microdilución en caldo, evaluando un extracto vegetal frente a *B. subtilis*.

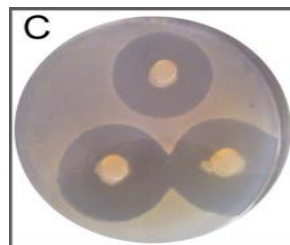
Fuente: (Balouiri et al., 2016).

1.1.8.2. Difusión en disco de agar

Esta prueba se utiliza para determinar la susceptibilidad de los diferentes antimicrobianos, especialmente los antibióticos, donde, se utiliza medios de cultivo específicos para una mejor obtención de resultados. En este método, se prepara una placa con el medio y se le agrega el patógeno a analizar, por consiguiente, se coloca un disco de papel filtro que contenga al antibiótico a diferentes concentraciones, una vez realizada la incubación se observa el diámetro de inhibición en el caso que exista (**Balouiri et al., 2016**).

Figura 5.

Prueba de difusión en disco de agar



Nota: Se observa la inhibición de *Bacillus sp.* frente a *Candida albicans*.

Fuente: (Balouiri et al., 2016).

1.1.9. Método de estudio de la actividad antioxidante

1.1.9.1. Propiedades antioxidantes de plantas

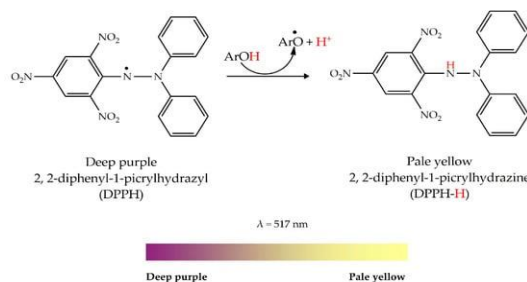
Las plantas cuentan con metabolitos secundarios que evitan la neutralización de los radicales libres, así, evitando la oxidación durante reacciones del metabolismo (Kotha et al., 2022). La principal función de los antioxidantes es evitar el estrés oxidativo, lo que deriva en la aparición de enfermedades debido a la alteración del funcionamiento de las células, provocado por una alta producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) como lo son peróxidos, radicales libres o iones de oxígeno (Mendonça et al., 2022).

1.1.9.2. Método por DPPH

El uso del ensayo colorimétrico del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) permite la cuantificación de compuestos bioactivos presentes especialmente en una muestra vegetal, consiste en cuantificación de compuestos bioactivos a través de la transferencia de un electrón de hidrógeno. Además, se puede medir la capacidad de inhibición mediante el uso de un espectrofotómetro a una absorbancia específica (Bibi et al., 2020).

Figura 6.

Mecanismo de reacción del uso de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)



Nota: El cambio de coloración morada hacia amarilla indica la presencia de compuestos antioxidantes

Fuente: (Bibi et al., 2020).

1.2. Objetivos

1.2.1. General

Determinar las propiedades antimicrobianas y antioxidantes de extractos de Sunfo (*Clinopodium nubigenum*) frente a bacterias del género *Staphylococcus*.

1.2.2. Específicos

- Obtener el extracto de la planta Sunfo (*Clinopodium nubigenum*) mediante el método de extracción Soxhlet.
- Analizar la capacidad antimicrobiana de los extractos de la planta Sunfo (*Clinopodium nubigenum*) frente a cepas de *Staphylococcus* por medio de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB).
- Evaluar la actividad antioxidante del extracto de la planta Sunfo (*Clinopodium nubigenum*) mediante la técnica 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA

2.1. Materiales

En las Tablas 4,5 y 6 se describen los materiales utilizados en el tema de investigación (material, reactivos y equipos de laboratorio).

2.1.1. Material de laboratorio

Tabla 4. *Materiales de laboratorio*

Material	Cantidad
Asa bacteriológica	1
Asa de Drigalsky	2
Cajas Petri desechables	40
Caja de microtitulación	8
Espátula	1
Frascos de vidrio oscuro	4
Frascos con tapa (1L)	4
Gradilla	1
Guantes	1 paquete
Lámpara de alcohol	1
Matraz Erlenmeyer	1
Micropipeta	2
Pipeta volumétrica	2
Pinzas	1
Puntas estériles	2 paquetes
Tubos de ensayo	20
Tubos eppendorf	30
Vaso de precipitación (500 mL)	2

2.1.2. Reactivos

Tabla 5. *Reactivos de laboratorio*

Reactivo	Cantidad
Agua peptonada	200 g
Agua destilada	3 litros
Etanol 96%	2 litros
Gentamicina	10 mL
Medio Manitol Salado	200 g
Medio PCA	30 g
Plasma de conejo liofilizado	1 vial (4mL)
Resazurina 0,02%	0,0159 g
Solución madre DPPH	0,1 g
Solución madre Trolox	1 g
Solución salina (Marca Life)	500 mL

2.1.3. Equipos

Tabla 6. *Equipos de laboratorio*

Equipo	Cantidad
Autoclave	1
Balanza analítica	1
Cámara de flujo laminar	1
Espectrofotómetro	1
Extractor Soxhlet	1
Incubadora	1
Refrigeradora	1
Rotavapor	1
Vórtex	1

2.2. Métodos

2.2.1. Extracción mediante Soxhlet

2.2.1.1. Obtención del material vegetal

Las plantas fueron compradas en el mercado Santa Clara, perteneciente al cantón Quito, provincia de Pichincha. Las partes de la planta a elegir fueron: tallos y hojas, con características de color verde y que no se encuentren ninguna impureza, como lo son: manchas, hongos, entre otros.

2.2.1.2. Limpieza y secado del material vegetal

Para la limpieza del material vegetal de las hojas, se utilizó una solución de hipoclorito de sodio al 1 % en agua durante 10 a 15 minutos. Posteriormente, se enjuagó con agua destilada. El secado de la muestra se realizó bajo sombra con una temperatura entre 21 y 30 °C y se las almacenó en bolsas de plástico (Zapata et al., 2022). Finalmente, se trituró hasta obtener un polvo de la muestra vegetal.

2.2.1.3. Extracción Soxhlet

Para la obtención de los extractos se utilizó el equipo Soxhlet, donde se ingresó 20 g del polvo del material vegetal en el tubo extractor; posteriormente, se colocó un volumen de 300 mL del disolvente etanol al 96 % dentro del balón de destilación con 3 perlas de ebullición. Con una plancha de calentamiento se llegó a una temperatura de 73 °C para iniciar el paso del agua hacia el condensador y se realizó un lavado de 5 y 10 ciclos, hasta obtener un cambio de coloración. Luego, se utilizó un rotavapor para la eliminación del etanol a una temperatura de 73 °C y se realizó un duplicado de la muestra. Por último, su almacenamiento se los guardó en frascos de vidrio ámbar y se los llevó a la refrigeradora con una temperatura entre 0 y 8 °C (Suresh et al., 2021).

2.2.1.4. Cálculo del rendimiento

El rendimiento del extracto fue determinado mediante la fórmula mencionada por (Gonelimali et al., 2018), que se viene definida por:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Peso del extracto después de la evaporación del disolvente}}{\text{Peso seco del polvo vegetal antes de la extracción}} * 100$$

2.2.2. Análisis de la capacidad antimicrobiana

2.2.2.1. Obtención de bacterias

Las cepas bacterianas se obtuvieron con la metodología utilizada por (Apaza Paco et al., 2018), con respecto a la siembra en 3M Petrifilm Staph Express (STX), donde se observó colonias con una coloración rojo-violeta correspondiente a la especie *S. aureus* y azul-verde que corresponden a otras especies de *Staphylococcus*.

2.2.2.2. Siembra de colonias

Se realizó un estriado simple con un asa bacteriológica de las colonias rojo-violeta y azul-verde en ambos lados de una placa con Agar Manitol Salado, siguiendo las indicaciones de la casa comercial y se incubó durante 48 horas con una temperatura de 37 °C, colocando las placas de manera invertida. Posteriormente, se identificó si las colonias tornaron un cambio de coloración para finalmente realizar una prueba de coagulasa en tubos de ensayo, con ayuda de Plasma de conejo liofilizado para corroborar la presencia de la especie *S.aureus*.

2.2.2.3. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

- **Dilución de los extractos**

Se preparó una solución madre Las concentraciones por utilizar serán de 10, 20, 40, 60, 80 y 100 µg/mL. En tubos eppendorf se agregó agua peptonada para la dilución de la muestra con un vórtex a 30 revoluciones por minuto por 10 segundos. Se realizó una

segunda y tercera secuencia de diluciones, tomando en cuenta los resultados para la realización de CMI.

- **Preparación del inóculo**

Se utilizó la escala de McFarland con una estandarización 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) (Kowalska & Dudek, 2021).

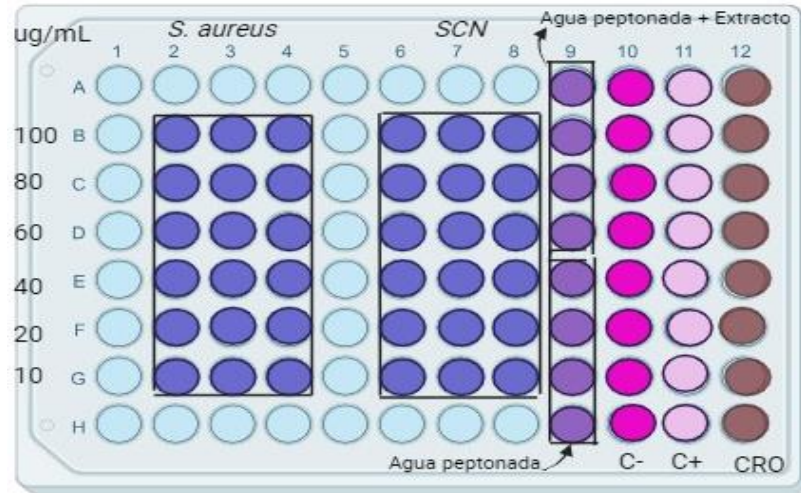
- **Preparación de las placas de microdilución**

Para la evaluación de microdilución en caldo se utilizó la metodología empleada por (Balouiri et al., 2016), con ciertas modificaciones. En una placa de microtitulación de 96 pocillos, se colocó 100 μ L del inóculo y 100 μ L de las diluciones de los extractos. Se utilizó un control positivo utilizando gentamicina y ceftriaxona junto al inóculo, un control negativo utilizando agua peptonada con el inóculo; además, se realizó un control colocando agua peptonada y otro colocando agua peptonada junto al extracto.

Posteriormente, se realizó un triplicado con las diferentes concentraciones con las dos especies del género *Staphylococcus* (N. Vásquez et al., 2019). En cada pocillo se agregó 20 μ L de resazurina al 0,02% y se incubó durante 2 horas, a continuación, se observó el viraje colorimétrico para determinar la presencia o ausencia del crecimiento bacteriano. Finalmente, se realizó diluciones con menor escala entre diferentes rangos de concentración por duplicado, donde se determinó la ausencia del crecimiento bacteriano en los pocillos para su consideración en la CMI, como se encuentra en la **Figura 7**.

Figura 7.

Preparación de placa para prueba de microdilución



Nota: Modelo de placa para microtitulación realizada en el software Biorender

2.2.3.4. Concentración Mínima Bactericida (CMB)

Se sembró en medio PCA (Plate Count Agar), los pocillos que no mostraron viraje colorimétrico para establecer la concentración mínima bactericida de las cepas de *Staphylococcus* a las diferentes concentraciones de los extractos.

En cajas Petri se colocó el medio PCA, donde se homogeneizó el contenido de los pocillos que no presentaron ningún cambio con una micropipeta y se colocó el inóculo en las cajas Petri, se realizó una siembra por diseminación en superficie con el asa de Drigalsky. Finalmente, se llevó a una incubadora a 37 °C y se observó la ausencia de colonias a las 24 y 48 horas (Tazi & Bricaire, 2007).

2.2.3. Evaluación de la actividad antioxidante

Se preparó una solución madre de DPPH (150 μM) con 0,0059 g en 100 mL de una solución metanol-agua 80:20 (v/v) y se agitó durante 40 minutos en presencia de la luz. Posteriormente, se preparó la solución madre de Trolox (500 μM) con la disolución de 0,0125 g en 100 mL de la solución metanol-agua a una proporción 50:50 (v/v). Con respecto, a la solución madre se preparó concentraciones del reactivo a (50, 100, 200, 300, 400 y 500) μM para la elaboración de la curva de calibración (**Moncayo et al., 2021**).

Para la medición de la actividad antioxidante, se utilizó una placa de 96 pocillos donde se ingresará 20 μL de las diluciones junto a 180 μL de la solución de DPPH y se incubó en un cuarto oscuro con un tiempo de 40 minutos; para el control, se usó la solución de DPPH junto con una solución de metanol-agua; por otro lado, el blanco constó de 180 μL de DPPH y 20 μL del Trolox. Finalmente, se midió la densidad óptica a 517 nm con la ayuda de un espectrofotómetro.

2.2.3.1. Determinación del porcentaje de inhibición de DPPH

La determinación del porcentaje de inhibición se calculó con la ecuación definida por (**Bobo et al., 2015**):

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = \left[1 - \left(\frac{A_m - A_b}{A_c - A_b} \right) \right] * 100$$

Donde, A_m corresponde a la Absorbancia de la muestra, A_b corresponde a la absorbancia del blanco y A_c corresponde a la Absorbancia del control.

2.2.4. Hipótesis

El efecto de la actividad antimicrobiana y antioxidante del extracto a partir de la planta Sunfo (*Clinopodium nubigenum*) frente a bacterias patógenas.

- **Hipótesis nula**

Los extractos de la planta Sunfo (*Clinopodium nubigenum*) obtenidos por el método Soxhlet no poseen actividad antimicrobiana y antioxidante.

- **Hipótesis alternativa**

Los extractos de la planta Sunfo (*Clinopodium nubigenum*) obtenidos por el método Soxhlet poseen actividad antimicrobiana y antioxidante.

2.2.5. Variables

- **Independiente**

- Actividad antioxidante
- Actividad antimicrobiana

- **Dependiente**

- Extracción Soxhlet
- Sunfo (*Clinopodium nubigenum*)

CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión

3.1.1. Rendimiento del extracto

El extracto obtenido a partir de las hojas de la planta Sunfo (*C. nubigenum*) mediante la extracción Soxhlet junto el disolvente etanol al 96%, dio un valor de rendimiento de 13.97 ± 0.65 % y 18.45 ± 0.91 %, mediante una evaluación previa entre 5 y 10 ciclos respectivamente, como se observa en la **Tabla 7**.

De acuerdo con (**Otálora & Martin, 2020**), el valor de un rendimiento depende de varios parámetros, como lo son: solvente (polaridad, concentración, tiempo de contacto), temperatura, método utilizado y su relación con el material vegetal utilizado. En este caso, el disolvente utilizado fue etanol (96 %), que cuenta con una polaridad significativa, lo que permite la obtención de compuestos con una polaridad alta como lo es el caso de polifenoles, otros tipos de solventes que cuentan con la misma polaridad son metanol, acetato de etilo y acetona, (**Salas et al., 2022**).

Tabla 7. Rendimiento del extracto mediante la técnica Soxhlet

Ciclos	Peso utilizado (g)	Rendimiento (%p/v)
5	20	$13,97 \pm 0,651$
10	20	$18,45 \pm 0,913$

Nota: El valor del rendimiento se obtuvo mediante un promedio del proceso de extracción.

Otro punto importante por considerar es el número de ciclos realizados en el equipo Soxhlet, ya que mientras exista una mayor interacción entre el material vegetal y el solvente se podrá extraer una mayor cantidad de compuestos bioactivos, lo recomendable es un mínimo de 6 horas de lavado, obteniéndose un promedio de ciclo por cada hora (**Palacio et al., 2018**). El rendimiento obtenido con 10 ciclos presenta un alto rendimiento

en comparación a otras investigaciones donde utilizan diferentes solventes como el agua, hexano, entre otros.

Debido a que no existen estudios similares de extracción con etanol mediante la técnica Soxhlet se realizó una comparación con los aceites esenciales de *C. nubigenum*, donde la investigación realizada por **(Mena & Salas, 2022)**, mostró un rendimiento máximo de 1,4893 % utilizando agua destilada, que es mucho menor en comparación al obtenido en la **Tabla 7**.

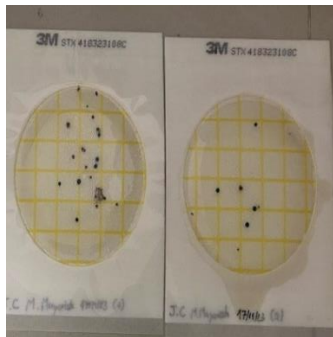
3.1.2. Prueba de actividad antimicrobiana

La obtención de las bacterias se basó en las indicaciones del uso de las Placas Petrifilm Staph Express de la marca 3M. Donde, su uso es para el recuento de colonias de *S. aureus* en alimentos procesados, alimentos como: mariscos, aves o cárnicos, productos lácteos y sus derivados.

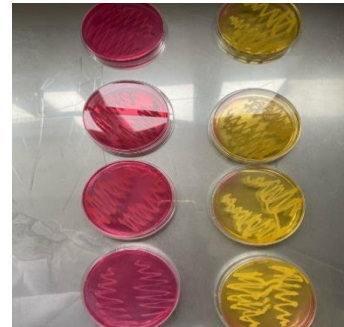
Se realiza un control de calidad de los productos en relación con la presencia de la bacteria *S. aureus* que se basa en normativas, como lo es el caso del método AOAC encargado de controles químicos y biológicos **(Cretenet et al., 2011)**. Por lo cual, se utilizó este método para la obtención de las bacterias del género *Staphylococcus*, donde colonias moradas corresponden a la especie *S. aureus* y las colonias turquesas pertenecen a otras especies.

Figura 8.

Bacterias obtenidas mediante Staph Express



a) Colonias moradas y turquesas pertenecientes al género *Staphylococcus*



b) Diferenciación de cepas del género *Staphylococcus* en agar manitol salado, coloración amarilla para *S. aureus* y colonias rojas para *Staphylococcus* Coagulasa Negativa (SCN)

Nota: Se realizó un duplicado de la muestra de queso obtenido en los mercados de la Ciudad de Ambato.

El uso del agar manitol salado permitió la diferenciación entre las distintas especies que pueden pertenecer al género *Staphylococcus*; por eso, este es un medio selectivo por contener un alto nivel de NaCl, lo cual permite el crecimiento específico de *S. aureus* y evita el crecimiento de bacterias no halófilas. Otro componente importante es el manitol, donde únicamente la especie *S. aureus* puede fermentarlo debido a la presencia del indicador rojo fenol, dicho cambio va de una coloración roja hacia una coloración amarilla por la fermentación del manitol, donde hay un cambio de pH 8.2 a un pH 6.8; así, como se observa en la **Figura 7 (Tigabu & Getaneh, 2021)**.

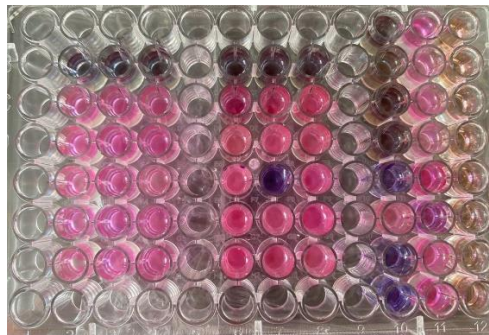
Para la prueba de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se utilizó el método de microdilución, el cual consistió en tomar pequeñas alícuotas del extracto y el inóculo,

añadiendo la prueba colorimétrica de la resazurina, indicando un cambio de coloración en presencia de un crecimiento bacteriano.

En la **Figura 8** se muestra, las concentraciones iniciales para la aplicación del extracto, usando concentraciones de 10 µg/mL hasta llegar a una concentración de 100 µg/mL, presentando en esta última concentración una inhibición de la bacteria por no cambiar la coloración del pocillo y no presentar turbidez, de aquí se realiza una segunda y tercera dilución para determinar la concentración para tomar la CMI.

Figura 9.

Microdilución en placa de 96 pocillos.



Nota: Los pocillos de coloración rosada presentan actividad microbiana, mientras que los pocillos de coloración morada indican inhibición bacteriana.

En la **Tabla 8** la concentración encontrada de la CMI, que fue de $92,00 \pm 0,89$ µg/mL para *S. aureus* y $86,00 \pm 0,43$ µg/mL para SCN. Donde, no hubo mucha diferencia de inhibición para los dos tipos de especie, donde SCN necesito una menor concentración para evitar su crecimiento.

Tabla 8. Concentración mínima inhibitoria del extracto de la planta sunfo frente a *S. aureus* y *SCN*

Microorganismo	Valor de CMI ($\mu\text{g/mL}$)
<i>S. aureus</i>	92,00 \pm 0,89
<i>SCN</i>	86,00 \pm 0,43

Nota: Se obtuvo los datos mediante un promedio de 3 repeticiones.

Estudios realizados con la especie *C. brownei* mediante la técnica de maceración con etanol al 96 % presento una actividad antimicrobiana con resultados de inhibición frente a diferentes cepas de *Staphylococcus*, presentando inhibición frente a *S. epidermidis* y *S. warneri*, pero no pudo inhibir bacterias multirresistentes como el caso de *S. aureus* (SARM), *S. aureus* y *S. hominis* (Pabón et al., 2023).

Por otro lado, el aceite esencial de *C. nubigenum* y su actividad antimicrobiana mediante la difusión en agar, presento inhibición en cepas como: *S. aureus*, *S. mutans*, *S. pyogenes* y *S. pneumoniae*, dieron valores en sus halos de: (12.68, 8.80, 8.46 y 8.46) mm, respectivamente; además, en esta investigación se identificó los principales componentes de esta planta, como lo fueron: acetato de carvacrol (42,2 %), carvacrol (20,7 %), timol (5,5 %) y pulegona (6,3 %), compuestos fenólicos con altas propiedades antimicrobianas (Noriega et al., 2018).

Es importante considerar que estos compuestos pueden variar en su nivel de presencia por el método utilizado, ya que, para un aceite esencial se utiliza solamente agua para la extracción, caso contrario un extracto por Soxhlet utiliza un disolvente que debe alcanzar altas temperaturas para lograr una extracción.

El estudio realizado por (Ramírez et al., 2015) mostró el uso de 6 tipos de material vegetal para evaluar su actividad antimicrobiana con el método Soxhlet, que fueron: *Calendula officinalis*, *Foeniculum vulgare* Mill., *Malva parviflora* L., *Plantago australis* Lam., *Sambucus nigra* L.P, *Vicia faba* L. y *Solanum americanum* Mill, frente a *S. aureus* ATCC 43300. Donde, la CMI para los extractos fue de 1,25 mg/mL, siendo una concentración elevada a comparación a la obtenida en la **Tabla 8**, el uso de disolventes como el diclorometano o el metanol influyeron de manera directa en la obtención de compuestos bioactivos, con su relación de temperatura, volumen y tiempo utilizado.

La concentración mínima bactericida (CMB) se determinó mediante la identificación de los pocillos que no presentaron turbidez. El valor considerado para *S. aureus* son mayores o iguales a 92 µg/mL y mayores o iguales de 86 µg/mL para SCN, los cuales presentaron una similitud a la CMI.

Tabla 9. Concentración mínima bactericida del extracto de la planta sunfo (*Clinopodium nubigenum*) frente a *S. aureus* y SCN

Microorganismo	Valor de CMB (µg/mL)
<i>S. aureus</i>	≥92,00
SCN	≥86,00

Los valores obtenidos de CMB con el uso de *C. pulchellum* presentaron valores de: 1.25 mg/mL para *S. aureus*, 10.00 mg/mL para *B. subtilis*, 40.00 mg/mL para *E. coli* y 2,50 mg/mL para SARM; donde, el método utilizado para obtener el extracto fue un baño por ultrasonido. Estos valores muestran diferencia con los obtenidos en la **Tabla 9**, ya que se necesitó una menor concentración para la inhibición de *S. aureus* con el uso del solvente etanol y el método Soxhlet (Polo et al., 2022).

En el estudio realizado por (Argote et al., 2017) se evaluó la concentración mínima bactericida del aceite esencial de Eucalipto (*Eucalyptus*), cáscara de limón (*Citrus limón*) y mandarina (*Citrus Reticulata*) frente a *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923. Presentando valores de CMB de 6,8 µL/mL con Eucalipto, 6,8 µL/mL con mandarina y 7,6 µL/mL para cáscara de limón, con la cepa de *S. aureus*, lo cual indica la eliminación del 99,9 % de bacterias y sus valores son los mismos obtenidos en la CMI.

Los resultados obtenidos en la **Tabla 8** y **9**, demostraron el potencial antimicrobiano de la planta Sunfo (*C. nubigenum*), donde se conoce la inhibición ocurre debido a la sensibilidad en su estructura, donde *S. aureus* es una bacteria grampositiva. La cual no cuenta con una membrana externa y solamente cuenta en su mayoría con peptidoglicano, lo que la hace susceptible a las propiedades antimicrobianas de los extractos (Mzid et al., 2017).

3.1.3. Determinación de la actividad antioxidante

Para la determinación de la actividad antioxidante del extracto de la planta Sunfo (*C. nubigenum*) se utilizó la técnica de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), como se observa en la **Tabla 10** los valores a cada concentración del extracto, con el valor más alto obtenido fue de $79,990 \pm 0,003$ (%) a una concentración de 3000 µg/mL.

Tabla 10. Porcentaje de inhibición de radicales mediante DPPH del extracto a diferentes concentraciones

Concentración (µg/mL)	Porcentaje de Inhibición (%)	µmol Equivalentes Trolox/L
3000	79,990 ± 0,003	380,357 ± 1,798
2000	76,270 ± 0,008	363,357 ± 5,393
1500	65,898 ± 0,007	316,214 ± 4,684

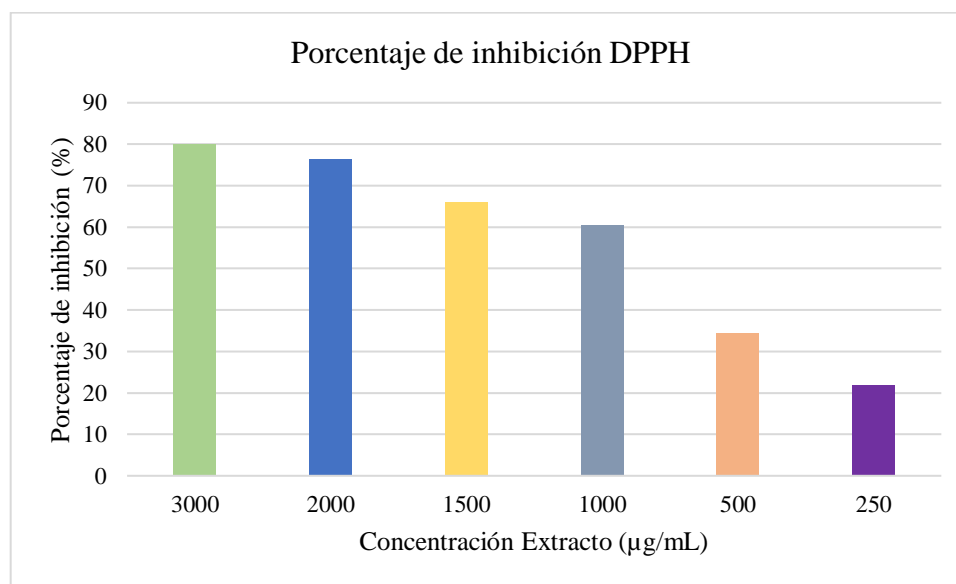
1000	60,450 ± 0,007	291,452 ± 5,265
500	34,311 ± 0,019	172,643 ± 13,628
250	21,949 ± 0,007	116,452 ± 5,017

Nota: Los resultados del porcentaje de inhibición son resultado de un promedio de 3 réplicas

En una investigación realizada por (Pérez et al., 2023) se obtuvo valores de 179,9 $\mu\text{mol TE L}^{-1}$ para la especie *C. macrostemum* y 282.9 $\mu\text{mol TE L}^{-1}$ para *C. mexicanum*, donde se presentó valores similares en comparación a los obtenidos en la **Tabla 10**. De igual manera, como se observa en la **Figura 9** cuando aumenta la concentración del extracto se obtendrá un mayor porcentaje de inhibición y su relación directa con el aumento de $\mu\text{mol Equivalentes Trolox/L}$.

Figura 10.

Porcentaje de inhibición a distintas concentraciones mediante DPPH



Nota: Los valores de inhibición aumentan a medida que la concentración del extracto es más alta.

La obtención de fenoles totales se lo realizó mediante la técnica de Folin-Ciocalteu, que consiste en el cambio de coloración como indicador, donde la aparición de una coloración oscura indico la presencia de compuestos fenólicos. Para obtener la concentración de fenoles totales se utilizó la curva estándar de ácido gálico, obteniéndose un contenido fenólico de $(37,531 \pm 1,335 \text{ mg GAE/g})$ como se observa en la **Tabla 11**.

Tabla 11. *Contenido de fenoles totales del extracto*

Absorbancia (750 nm)	Fenoles Totales (mg GAE/g)
$0,211 \pm 0,004$	$37,531 \pm 1,335$

Nota: El valor de los fenoles se lo obtuvo mediante 3 repeticiones y su respectivo promedio, relacionando la absorbancia y relacionándola con la pendiente de la curva del ácido gálico.

En el estudio realizado por (Serrano et al., 2020) se observó la presencia de fenoles totales con la misma metodología de Folin-Ciocalteu pero con el método de baño ultrasónico, las plantas utilizadas fueron: *C. brevicalyx*, *C. revolutum*, *C. sericeum* y *C. pulchellum*; donde, los fenoles totales obtenidos fueron de: 30.14 ± 0.40 , 16.12 ± 0.33 , 34.05 ± 0.47 y 16.08 ± 0.14 , respectivamente y con una concentración de $\mu\text{g AG}/ 100 \mu\text{g}$ de extracto etanólico; por lo tanto, el valor más alto que corresponde a *C. sericeum* se debe principalmente a la presencia de flavonoides, que pertenece a la familia de los fenoles.

De igual manera en un estudio realizado por (Pérez et al., 2023) obtuvo valores de 30,1 (mg GAE g⁻¹) para *C. macrosterum* y 39,5 (mg GAE g⁻¹) para *C. mexicanum*, por lo cual, se encuentran en el mismo rango obtenido con la especie *C. nubigenum* con un valor de $37,531 \pm 1,335$ (mg GAE g⁻¹).

3.2. Verificación de la hipótesis

Con los resultados obtenidos mediante las pruebas antimicrobianas y antioxidantes:

- Se rechaza la hipótesis nula.
- Se acepta la hipótesis alternativa, por lo cual, se determinó que los extractos de la planta Sunfo (*Clinopodium nubigenum*) por el método Soxhlet si poseen actividad antimicrobiana y antioxidante.

CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- A partir del extracto obtenido mediante la técnica Soxhlet, se obtuvo un rendimiento de $18,45 \pm 0,913$ %, con el extracto que tuvo 10 ciclos de lavado. Donde, se destaca el uso del disolvente Etanol como principal responsable de la obtención de compuestos bioactivos por la polaridad que presentan y en la obtención de compuestos como los fenoles.
- La actividad antimicrobiana de la planta Sunfo (*C. nubigenum*) se realizó mediante la técnica de microdilución en placas de 96 pocillos. Donde, se utilizó diferentes concentraciones hasta encontrar el valor donde no ocurría un crecimiento bacteriano, el indicador fue el no presentarse un cambio de coloración morada hacia un color rosado. El valor de CMI para *S. aureus* fue de $92,00 \pm 0,89$ ($\mu\text{g/mL}$) y para SCN fue de $86,00 \pm 0,43$ ($\mu\text{g/mL}$), para la CMB, se obtuvo un valor de ≥ 92 ($\mu\text{g/mL}$) para *S. aureus* y ≥ 86 para SCN ($\mu\text{g/mL}$), donde se destaca la presencia de componentes fenólicos que cuentan con propiedades antimicrobianas.
- La capacidad antioxidante se realizó mediante la técnica de DPPH, donde se obtuvo el mayor valor de inhibición de radicales libres a una concentración de $79,990 \pm 0,003$ %; por lo cual, el valor de $380,357 \pm 1,798$ (μmol Equivalentes Trolox/L). Con la prueba de Folin-Ciocalteu se determinó la cantidad de $37,531 \pm 1,335$ (mg GAE/g) en fenoles totales; de tal manera, que este valor de fenoles totales presentes en el extracto es responsable de la actividad antioxidante.
- El extracto obtenido mediante la técnica Soxhlet junto a un disolvente de etanol al 96% si presenta actividad antimicrobiana y antioxidante. Esto se lo realizó mediante pruebas de CMI y CMB frente a cepas de *Staphylococcus* y la actividad antioxidante mediante el uso de DPPH, presentando valores esperados de inhibición de bacterias y de radicales libres; finalmente, existe una relación entre las propiedades antimicrobianas y antioxidantes por la presencia de compuestos, especialmente los fenoles.

4.2. Recomendaciones

- Utilizar más tipos de disolvente para conocer si se puede obtener un rendimiento mayor con la planta *C. nubigenum*.
- Realizar una cromatografía de gases para conocer los compuestos que se encuentran presentes en el extracto y así conocer a profundidad sobre la planta.
- Ejecutar pruebas antimicrobianas con diferentes tipos de bacterias, especialmente las que presentan resistencia a antibióticos, como alternativa al uso de estos.
- Realizar estudios complementarios para conocer a que especie pertenece la bacteria perteneciente a SCN, además, realizar estudios para determinar el tipo de toxinas que producen los dos tipos de cepas utilizadas.

MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias Bibliográficas

- Alara, O., Abdurahman, N., & Ukaegbu, C. (2018). Soxhlet extraction of phenolic compounds from *Vernonia cinerea* leaves and its antioxidant activity. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, *11*, 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2018.07.003>
- Apaza Paco, J. P., Aspillaga Sánchez, H. L., & Espada Silva, A. M. (2018). Evaluation of the performance indicators of 3M Petrifilm Staph Express (STX) against the ISO 6888-1: 2003 standard in the count of *Staphylococcus aureus* in fresh cheeses by artificial contamination. *Scielo*, 15–26. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310-02652018000100003
- Argote, F., Suarez, Z., Tobar, M., Perez, J., Hurtado, A., & Delgado, J. (2017). Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. *Bioteología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, *15*(SPE2), 52–60. <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v15nspe2/1692-3561-bsaa-15-spe2-00052.pdf>
- Armijos, C., Ramírez, J., Salinas, M., Vidari, G., & Suárez, A. (2021). Pharmacology and Phytochemistry of Ecuadorian Medicinal Plants: An Update and Perspectives. *Pharmaceuticals*, *14*(11), 1145. <https://doi.org/10.3390/ph14111145>
- Armijos, C., Ramírez, J., & Vidari, G. (2022). Poorly Investigated Ecuadorian Medicinal Plants. *Plants*, *11*(12), 1590. <https://doi.org/10.3390/plants11121590>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, *6*(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Benítez, A., Martínez, C., & Sánchez, S. (2019). Epidemiological and clinical characteristics of disease outbreaks transmitted by food. Paraguay 2015 - 2016.

Revista de Salud Pública Del Paraguay, 9(1), 33–40.
<https://doi.org/10.18004/rspp.2019.junio.33-40>

Bibi, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, M. (2020). The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety—Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants*, 9(8), 709. <https://doi.org/10.3390/antiox9080709>

Blanco-Olano, C., Olascuaga-Castillo, K., Rubio-Guevara, S., & Valdiviezo-Campos, J. E. (2020). *Senecio tephrosioides Turcz. (Asteraceae)*: Una revisión de etnobotánica, fitoquímica y farmacología. *Ethnobotany Research and Applications*, 19. <https://doi.org/10.32859/era.19.14.1-14>

Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Virseda, P., Marín-Arroyo, M. R., & Navarro, M. (2015). Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1), 204–209. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jsfa.6706>

Bukowski, M., Wladyka, B., & Dubin, G. (2010). Exfoliative Toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins*, 2(5), 1148–1165. <https://doi.org/10.3390/toxins2051148>

Cartín Rojas, A., & Pascual Barrera, A. (2021). Alimentos de origen animal y Enfermedades de Transmisión Alimentaria en Costa Rica: 2015- 2020. *UNED Research Journal*, 13(2). <https://doi.org/10.22458/urj.v13i2.3587>

Cervantes, E., García, R., & Salazar, P. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61(1), 28–40. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=48300>

Christaki, S., Moschakis, T., Kyriakoudi, A., Biliaderis, C. G., & Mourtzinos, I. (2021). Recent advances in plant essential oils and extracts: Delivery systems and potential uses as preservatives and antioxidants in cheese. *Trends in Food Science & Technology*, 116, 264–278. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.07.029>

- Coelho, E., de Souza, M., Corrêa, L., Viana, A., de Azevêdo, L., & dos Santos, M. (2019). Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Mango Peel Liqueurs (*Mangifera indica* L.) Produced by Different Methods of Maceration. *Antioxidants*, 8(4), 102. <https://doi.org/10.3390/antiox8040102>
- Coral, P. (2018). *Diseño de una planta para la elaboración de un deshidratado para infusiones de Sunfo Clinopodium nubigenum (Kunth) Kuntze* [Escuela Politécnica Nacional]. <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/19876>
- Cretenet, M., Even, S., & Le Loir, Y. (2011). Unveiling *Staphylococcus aureus* enterotoxin production in dairy products: a review of recent advances to face new challenges. *Dairy Science & Technology*, 91(2), 127–150. <https://doi.org/10.1007/s13594-011-0014-9>
- de la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M., & Balslev, H. (2008). *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*.
- Diaz Ramirez, M., & Hernandez Alvarez, A. J. (2018). Enfermedades transmitidas por los alimentos, probióticos y salud. *Productos Del Vínculo Investigación-Docencia*. <https://doi.org/10.24275/uam/lerma/repinst/ciai2018/000143/Diaz>
- Egamberdieva, D., Jabborova, D., Babich, S., Xalmirzaeva, S., Salakhiddinov, K., & Madazimov, M. (2021). Antimicrobial activities of herbal plants from *Uzbekistan* against human pathogenic microbes. *Environmental Sustainability*, 4(1), 87–94. <https://doi.org/10.1007/s42398-020-00147-5>
- Espinoza, I., Báez, M., Hernández, R., López, Y., Lobo, E., & Corona, B. (2019). Resistencia antimicrobiana en bacterias de origen animal: desafíos para su contención desde el laboratorio. *Revista de Salud Animal*, 41(3). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2019000300008&lng=es&nrm=iso
- Farooq, S., Shah, M., Siddiqui, M., Dar, B., Mir, S., & Ali, A. (2020). Recent trends in extraction techniques of anthocyanins from plant materials. *Journal of Food*

Measurement and Characterization, 14(6), 3508–3519.
<https://doi.org/10.1007/s11694-020-00598-8>

Fernández, S., Marcía, J., Bu, J., Baca, Y., Chávez, V., Montoya, H., Varela, I., Ruiz, J., Lagos, S., & Ore, F. (2021). Enfermedades transmitidas por Alimentos (Etas); Una Alerta para el Consumidor. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 5(2), 2284–2298. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v5i2.433

Fierascu, R. C., Fierascu, I. C., Dinu-Pirvu, C. E., Fierascu, I., & Paunescu, A. (2020). The application of essential oils as a next-generation of pesticides: recent developments and future perspectives. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 75(7–8), 183–204. <https://doi.org/10.1515/znc-2019-0160>

Flores, R., Villarroel, J. L., & Valenzuela, F. (2021a). Enfrentamiento de las infecciones de piel en el adulto. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 32(4), 429–441. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2021.06.004>

Flores, R., Villarroel, J. L., & Valenzuela, F. (2021b). Enfrentamiento de las infecciones de piel en el adulto. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 32(4), 429–441. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2021.06.004>

Gajewska, J., Chajęcka-Wierzchowska, W., & Zadernowska, A. (2022). Occurrence and Characteristics of *Staphylococcus aureus* Strains along the Production Chain of Raw Milk Cheeses in Poland. *Molecules*, 27(19), 6569. <https://doi.org/10.3390/molecules27196569>

Galarza Galarza, M. I., & Yarzabal Rodríguez, L. A. (2021). *Staphylococcus aureus* Resistentes a meticilina en animales de granja en Suramérica: una revisión sistemática. *Revista Vive*, 4(11), 358–377. <https://doi.org/10.33996/revistavive.v4i11.99>

Gaschignard, J., Bidet, P., & Faye, A. (2020). Infecciones por estreptococos y enterococos. *EMC - Pediatría*, 55(2), 1–25. [https://doi.org/10.1016/S1245-1789\(20\)43833-8](https://doi.org/10.1016/S1245-1789(20)43833-8)

- Gonelimali, F., Lin, J., Miao, W., Xuan, J., Charles, F., Chen, M., & Hatab, S. (2018). Antimicrobial Properties and Mechanism of Action of Some Plant Extracts Against Food Pathogens and Spoilage Microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01639>
- Grispoldi, L., Karama, M., Armani, A., Hadjicharalambous, C., & Cenci-Goga, B. T. (2021). *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food of animal origin and staphylococcal food poisoning risk assessment from farm to table. *Italian Journal of Animal Science*, 20(1), 677–690. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2020.1871428>
- Guarín Patarroyo, C. E., & Restrepo Ochoa, D. A. (2020). Sobre la relación entre el consumo de leche cruda y la salud humana: una revisión sistemática. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 30(2), 516–238.
- Guerra, P. (2016). *Evaluación de la actividad antioxidante Bioautográfica de dos variedades de aceites esenciales andinos Clinopodium nubigenum (Kunt) Kuntze y Baccharis latifolia* [Universidad Politécnica Salesiana]. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/12183>
- Guevara, M., Tejera, E., Iturralde, G. A., Jaramillo-Vivanco, T., Granda-Albuja, M. G., Granja-Albuja, S., Santos-Buelga, C., González-Paramás, A. M., & Álvarez-Suarez, J. M. (2019). Anti-inflammatory effect of the medicinal herbal mixture infusion, Horchata, from southern Ecuador against LPS-induced cytotoxic damage in RAW 264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, 131, 110594. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110594>
- Henriques, M. Q. S., Barbosa, D. H. X., Alves, D. da N., Melo, A. K. V., & Dias de Castro, R. (2021). Chemical composition, antioxidant, antimicrobial activity, toxicity, genetic analysis and popular use of *Eugenia luschnathiana* (O. Berg) Klotzsch ex B.D.Jacks: a literature review. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 20(3), 215–225. <https://doi.org/10.37360/blacpma.21.20.3.17>

- Hurtado, M., de la Parte, M., & Brito, A. (2002). *Staphylococcus aureus*: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 22(2), 112–118. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562002000200003
- Kotha, R., Tareq, F., Yildiz, E., & Luthria, D. (2022). Oxidative Stress and Antioxidants—A Critical Review on In Vitro Antioxidant Assays. *Antioxidants*, 11(12), 2388. <https://doi.org/10.3390/antiox11122388>
- Kowalska-Krochmal, B., & Dudek-Wicher, R. (2021). The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens*, 10(2), 165. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020165>
- Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D., & Stahl, D. (2015). *Brock: Biología de los microorganismos* (14a ed.). Pearson/Prentice Hall.
- Marcillo, C., Murillo, A., Peñaherrera, M., & Parrales, I. (2019). Síndrome diarreico infeccioso causado por *Salmonella spp.* *RECIMUNDO*, 3(3), 493–508. [https://doi.org/10.26820/recimundo/3.\(3\).septiembre.2019.493-508](https://doi.org/10.26820/recimundo/3.(3).septiembre.2019.493-508)
- Maurya, A., Prasad, J., Das, S., & Dwivedy, A. K. (2021). Essential Oils and Their Application in Food Safety. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.653420>
- Mazorra-Manzano, M. Á., & Moreno-Hernández, J. M. (2019). Propiedades y opciones para valorizar el lactosuero de la quesería artesanal. *CienciaUAT*, 14(1), 133. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v14i1.1134>
- Mena, G., & Salas, E. (2022). *Extracción del aceite esencial de sunfo (Clinopodium nubigenum Kunth Kuntze) por el método de arrastre de vapor, para su caracterización química, antioxidante y microbiológica* [Universidad Técnica de Cotopaxi]. <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/9427>
- Mendonça, J., Guimarães, R., Zorgetto, V., Fernandes, C., Marcelino, G., Bogo, D., Freitas, K., Hiane, P., de Pádua Melo, E., Vilela, M., & Nascimento, V. (2022).

- Natural Antioxidant Evaluation: A Review of Detection Methods. *Molecules*, 27(11), 3563. <https://doi.org/10.3390/molecules27113563>
- Mittal, R. P., Rana, A., & Jaitak, V. (2019). Essential Oils: An Impending Substitute of Synthetic Antimicrobial Agents to Overcome Antimicrobial Resistance. *Current Drug Targets*, 20(6), 605–624. <https://doi.org/10.2174/1389450119666181031122917>
- Moncayo, S., Cornejo, X., Castillo, J., & Valdez, V. (2021). Preliminary phytochemical screening for antioxidant activity and content of phenols and flavonoids of 18 species of plants native to western Ecuador. *Trends in Phytochemical Research*, 5(2), 93–104. <https://doi.org/https://doi.org/10.30495/tpr.2021.1922658.1196>
- MSP. (2023). *Subsistema de vigilancia Sive- Alerta. Enfermedades transmitidas por agua y alimentos Ecuador*. <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2023/12/Gaceta-de-ETAS-SE-36.pdf>
- Mzid, M., Ben, S., Ben, M., Regaieg, W., & Rebai, T. (2017). Antioxidant and antimicrobial activities of ethanol and aqueous extracts from *Urtica urens*. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 775–781. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1275025>
- Nandhini, P., Kumar, P., Mickymaray, S., Alothaim, A. S., Somasundaram, J., & Rajan, M. (2022). Recent Developments in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Treatment: A Review. *Antibiotics*, 11(5), 606. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11050606>
- Noriega, P., de Los Ángeles, T., Osorio, E., Guerra, P., & Fonseca, A. (2018). *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze essential oil: Chemical composition, antioxidant activity, and antimicrobial test against respiratory pathogens. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 10(9), 149–157. <https://doi.org/10.5897/JPP2017.0467>
- Otálora, D., & Martín, D. (2020). Técnicas emergentes de extracción de β -caroteno para la valorización de subproductos agroindustriales de la zanahoria (*Daucus carota* L.): una revisión. *Informador Técnico*, 85(1). <https://doi.org/10.23850/22565035.2857>

- Pabón, L., Granados, J., Velasco, W., Rodríguez, M., & Hernández, P. (2023). Actividad antimicrobiana de extractos de plantas frente a *Staphylococcus* aislados de pacientes con conjuntivitis bacteriana. *Revista Ciencias de La Salud*, 21(1), 1–14. <https://doi.org/10.12804/revistas.urosario.edu.co/revsalud/a.10242>
- Palacio, E., Arroyave, J., Cardona, M., Hurtado, J., & Martínez, J. (2018). Extracción de glucósidos de *stevia rebaudiana* (bertoni) a partir de tecnologías de extracción verdes. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 10(1), 43–56. <https://doi.org/10.22490/21456453.2336>
- Pérez, M., Vera, A., & Chávez, J. (2023). Antioxidant Compounds and Activity of the Medicinal Plants *Tagetes* sp. and *Clinopodium* sp. from Indigenous Communities in Mexico. *Journal of Medicinal Plants and By-Product*. 10.22034/JMPB.2023.358021.1460
- Polo, M., Avila, A., Suárez, L., Costilla, Noé., & Ganoza, M. (2022). Actividad antibacteriana de *Myrcianthes myrsinoides* y *Clinopodium pulchellum* procedentes del cerro “La Botica” región La Libertad. *Revista Peruana de Medicina Integrativa*, 7(2), 90–94. <https://doi.org/10.26722/rpmi.2022.v7n2.20>
- Ponce, J., García, M., Barriga, N., & Quiroz, B. (2019). Morbimortalidad producida por enfermedad diarreica. *RECIMUNDO*, 3(4), 212–232. [https://doi.org/10.26820/recimundo/3.\(4\).diciembre.2019.212-232](https://doi.org/10.26820/recimundo/3.(4).diciembre.2019.212-232)
- Possas, A., Bonilla-Luque, O. M., & Valero, A. (2021). From Cheese-Making to Consumption: Exploring the Microbial Safety of Cheeses through Predictive Microbiology Models. *Foods*, 10(2), 355. <https://doi.org/10.3390/foods10020355>
- Ramírez, R., Mojica, D., & Espitia, M. (2015). Actividad antibacteriana de extractos de plantas provenientes del área rural de Soracá contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM)/Antibacterial activity of plant extracts from rural area of Soracá against methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA). *Ciencia y Salud Virtual*, 7(1), 4. <https://doi.org/10.22519/21455333.469>

- Rashid, S., Majeed, L., Nisar, B., Nisar, H., Bhat, A., & Ganai, B. (2021). Phytomedicines: Diversity, extraction, and conservation strategies. In *Phytomedicine* (pp. 1–33). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824109-7.00009-1>
- Ruiz, S., Malagón, O., Zaragoza, T., & Valarezo, E. (2010). Composition of the Essential Oils of *Artemisia sodiroi* Hieron., *Siparuna eggersii* Hieron., *Tagetes filifolia* Lag. and *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze from Loja Ecuador. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 13(6), 676–691. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2010.10643879>
- Sadek, S., Shaapan, R., & Barakat, A. (2023). Campylobacteriosis in Poultry: A Review. *Journal of World's Poultry Research*. <https://doi.org/10.36380/jwpr.2023.19>
- Salas, L., Moncayo, M. del R., Borroel, V., Guzmán, T., & Ramírez, M. (2022). Composición fitoquímica y actividad antioxidante en tres variedades de albahaca por efecto de distintos solventes. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 28, 113–123. <https://doi.org/10.29312/remexca.v13i28.3267>
- Sen, K., Singh, K., Tandey, R., Mehta, R., & Mandal, V. (2019). Impact of microwaves on the extraction yield of phenolics, flavonoids, and triterpenoids from *Centella* leaves: An approach toward digitized robust botanical extraction. *Pharmacognosy Magazine*, 15(64), 267. https://doi.org/10.4103/pm.pm_99_19
- Serrano, C., Villena, G., & Rodríguez, E. (2020). Algunos componentes fitoquímicos y actividad antioxidante en representantes de la tribu *Mentheae* (*Lamiaceae*) del Perú. *Arnaldoa*, 27(1), 169–180. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2413-32992020000100169
- Shahid, M., Yusuf, M., & Mohammad, F. (2015). Plant phenolics: A Review on Modern extraction techniques. *Recent Progress in Medicinal Plants*, 265–287. <https://www.researchgate.net/publication/310614780>

- Soto, Z., Pérez, L., & Estrada, D. (2016). Bacteria causing of foodborne diseases: an overview at colombia. *Salud Uninorte*, 32(1), 105–122. <https://doi.org/10.14482/sun.32.1.8598>
- Sridhar, A., Ponnuchamy, M., Kumar, P. S., Kapoor, A., Vo, D.-V. N., & Prabhakar, S. (2021). Techniques and modeling of polyphenol extraction from food: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(4), 3409–3443. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01217-8>
- Suresh, A., Velusamy, S., Ayyasamy, S., & Rathinasamy, M. (2021). Techniques for essential oil extraction from kaffir lime and its application in health care products— A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 36(1), 5–21. <https://doi.org/10.1002/ffj.3626>
- Tazi, A., & Bricaire, F. (2007). Elección de un antibiótico. *EMC - Tratado de Medicina*, 11(3), 1–5. [https://doi.org/10.1016/S1636-5410\(07\)70630-X](https://doi.org/10.1016/S1636-5410(07)70630-X)
- Thakur, A., & Kumar, A. (2021). Sustainable Inhibitors for Corrosion Mitigation in Aggressive Corrosive Media: A Comprehensive Study. *Journal of Bio- and Tribo-Corrosion*, 7(2), 67. <https://doi.org/10.1007/s40735-021-00501-y>
- Tigabu, A., & Getaneh, A. (2021). *Staphylococcus aureus*, ESKAPE Bacteria Challenging Current Health Care and Community Settings: a Literature Review. *Clinical Laboratory*, 67(07/2021). <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2020.200930>
- Torres, S., & Pacheco, K. (2021). *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina en alimentos. *Revista Vive*, 4(12), 457–469. <https://doi.org/10.33996/revistavive.v4i12.106>
- Valerio, F., Mezzapesa, G., Ghannouchi, A., Mondelli, D., Logrieco, A., & Perrino, E. (2021). Characterization and Antimicrobial Properties of Essential Oils from Four Wild Taxa of *Lamiaceae* Family Growing in Apulia. *Agronomy*, 11(7), 1431. <https://doi.org/10.3390/agronomy11071431>

- Vásquez, F., & Fernández, H. (2020). *Análisis proximal en alimentos Fundamentos teóricos y técnicas experimentales* (Primera). ColloQuium. <http://colloquiumbiblioteca.com/index.php/web/article/view/43/39>
- Vásquez, N., Cáceres, P., Fiorrili, G., & Moreno, S. (2019). Resistencia emergente a la mupirocina en aislados de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en un hospital pediátrico terciario en la Argentina. *Archivos Argentinos de Pediatría*, *117*(1). <https://doi.org/10.5546/aap.2019.48>
- Vila, J., & Zboromyrska, Y. (2012). Brotes epidémicos causados por *Escherichia coli* diarreagénicas. *Gastroenterología y Hepatología*, *35*(2), 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2011.10.007>
- Zapata, C., Serrato, M., Rodríguez, J., & Guerra, D. (2022). In vitro morphogenesis in genus *Tagetes*: A review. *Horticultura Argentina*, *41*(104), 200–216.
- Zendejas, G., Avalos, H., & Soto, M. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomédica*, *25*(3), 129–143. <https://www.revistabiomedica.mx/index.php/revbiomed/article/view/42>

Anexos

Anexo A. Obtención de extracto



Anexo A 1. Tamizado mecánico de las hojas de *C. nubigenum*



Anexo A 2. Pulverizado del material vegetal (hojas)



Anexo A 3. Obtención del extracto etanólico mediante Soxhlet



Anexo A 4. Uso del rotavapor para eliminación del etanol

Anexo B. Actividad antimicrobiana

Anexo B 1. Primera dilución de extracto frente a cepas de *Staphylococcus*

Bacteria	Réplica	CMI ($\mu\text{g/mL}$)					
		10	20	40	60	80	100
<i>S. aureus</i>	1	+	+	+	+	+	-
	2	+	+	+	+	+	-
	3	+	+	+	+	+	-
SCN	1	+	+	+	+	+	-
	2	+	+	-	+	+	-
	3	+	+	+	+	+	-

Nota: el signo positivo (+) representa crecimiento de la bacteria y el signo negativo (-) inhibición de la bacteria.



Anexo B 2. *Queso obtenido en el mercado de Ambato*



Anexo B 3. *Siembra en petrifilm*



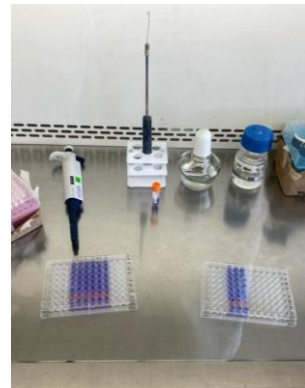
Anexo B 4. *Preparación prueba de coagulasa*



Anexo B 5. *Escala Mcfarland del inóculo*



Anexo B 6. *Preparación de la resazurina*



Anexo B 7. *Prueba de CMI en placas de 96 pocillos*



Anexo B 8. Dilución de extractos para la CMI



Anexo B 9. Siembra en placas de PCA para prueba de CMB



Anexo B 10. Placas que presentaron CMB a 24, 48 y 72 horas

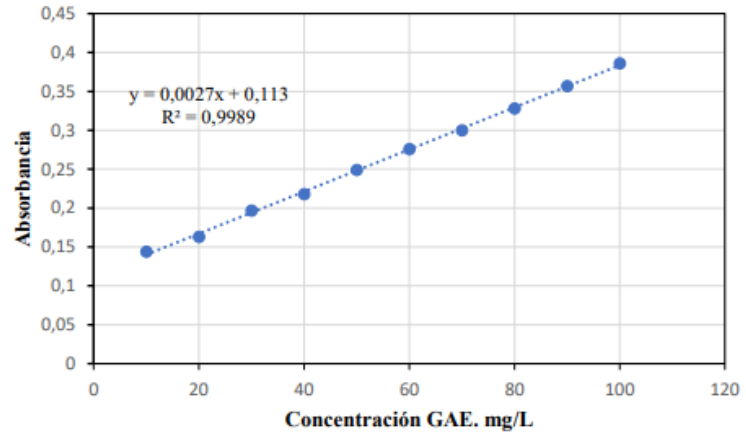
Anexo C. Actividad antioxidante

Anexo C 1. Absorbancia del extracto de la planta Sunfo (*C. nubigenum*)

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia 515 nm			Promedio	Desviación estándar
	1	2	3		
3000	0,172	0,170	0,175	0,172	0,003
2000	0,195	0,189	0,204	0,196	0,008
1500	0,255	0,263	0,268	0,262	0,007
1000	0,294	0,305	0,291	0,297	0,007
500	0,481	0,465	0,443	0,463	0,019
250	0,535	0,541	0,549	0,542	0,007
Blanco	0,045	0,044	0,046	0,045	0,001
Control	0,687	0,700	0,657	0,681	0,022

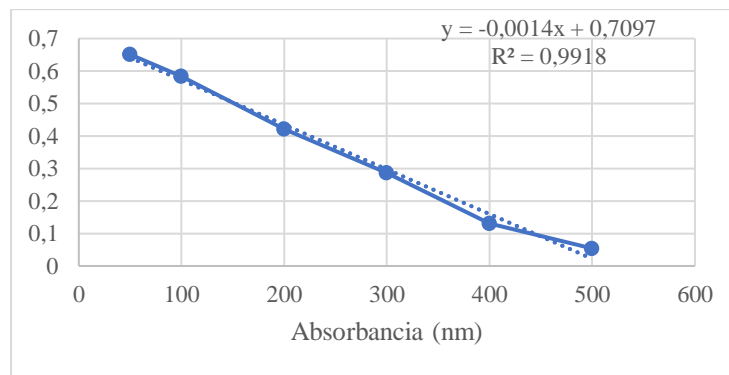
Anexo C 2.

Curva estándar de ácido gálico



Anexo C 3.

Curva estándar trolox



Anexo C 4.

Evaluación DPPH junto a extracto de Sunfo (C. nubigenum)

