



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ
MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

CARRERA DE AGROINDUSTRIA

**INFORME DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR PREVIO A
LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

MECANISMO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

TEMA:

**INFLUENCIA DE LAS DOSIS DEL EXTRACTO DE HOJAS DE
MENTA EN LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE CEPAS
PATÓGENAS**

AUTORES:

EVERSON DERIAN MENÉNDEZ MACAY

JOSÉ LUIS VÉLIZ MARCILLO

TUTORA:

ING. LUISA ANA ZAMBRANO MENDOZA, MGTR.

CALCETA, OCTUBRE 2024

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Everson Derian Menéndez Macay, con cédula de ciudadanía 131557792-2 y José Luis Véliz Marcillo, con cédula de ciudadanía 131733618-6, declaramos bajo juramento que el Trabajo de Integración Curricular titulado: **INFLUENCIA DE LAS DOSIS DEL EXTRACTO DE HOJAS DE MENTA EN LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE CEPAS PATÓGENAS** es de nuestra autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, y que hemos consultado las referencias bibliográficas que incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, concedemos a favor de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso comercial de la obra, con fines estrictamente académicos, conservando a nuestro favor todos los derechos patrimoniales de autor sobre la obra en conformidad con el Artículo 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación.



**EVERSON DERIAN MENÉNDEZ
MACAY
CC: 131557792-2**



**JOSÉ LUIS VÉLIZ MARCILLO
CC: 131733618-6**

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Everson Derian Menéndez Macay, con cédula de ciudadanía 131557792-2 y José Luis Véliz Marcillo, con cédula de ciudadanía 131733618-6, autorizamos a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, la publicación en la biblioteca de la institución del Trabajo de Integración Curricular titulado: **INFLUENCIA DE LAS DOSIS DEL EXTRACTO DE HOJAS DE MENTA EN LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE CEPAS PATÓGENAS**, cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra exclusiva responsabilidad y total autoría.



**EVERSON DERIAN MENÉNDEZ
MACAY
CC: 131557792-2**



**JOSÉ LUIS VÉLIZ MARCILLO
CC: 131733618-6**

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

ING. LUISA ANA ZAMBRANO MENDOZA, certifica haber tutelado el Trabajo de Integración Curricular titulado: INFLUENCIA DE LAS DOSIS DEL EXTRACTO DE HOJAS DE MENTA EN LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE CEPAS PATÓGENAS, que ha sido desarrollado Everson Derian Menéndez Macay y José Luis Véliz Marcillo, previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial, de acuerdo al **REGLAMENTO DE LA UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR DE CARRERAS DE GRADO** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

ING. LUISA ANA ZAMBRANO MENDOZA, MGTR.
CC:131428769-7
TUTORA

CERTIFICACIÓN DEL COORDINADOR DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

Yo, **ING ELY FERNANDO SACÓN VERA** Coordinador del Grupo de Investigación **CITEA**, certifico que los estudiantes, **EVERSON DERIAN MENÉNDEZ MACAY Y JOSÉ LUIS VÉLIZ MARCILLO**, realizaron su Trabajo de Integración Curricular titulado: **INFLUENCIA DE LAS DOSIS DEL EXTRACTO DE HOJAS DE MENTA EN LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE CEPAS PATÓGENAS** previo a la obtención del título de **INGENIERO AGROINDUSTRIAL**. Este trabajo se ejecutó como parte de una actividad del proyecto de investigación titulado: **APLICACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS DE PLANTAS SILVESTRES PARA UNA BEBIDA FUNCIONAL EN EL MEJORAMIENTO DE LA CADENA DE VALOR DE PRODUCTORES PEQUEÑOS**, registrado en la Secretaría Nacional de Planificación con CUP **385946**.

ING. SACON VERA ELY FERNANDO., Ph.D.
CC:1309117636
COORDINADOR DEL GRUPO DE
INVESTIGACIÓN "CITEA"

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes del Tribunal correspondiente, declaramos que hemos **APROBADO** el Trabajo de Integración Curricular titulado: INFLUENCIA DE LAS DOSIS DEL EXTRACTO DE HOJAS DE MENTA EN LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE CEPAS PATÓGENAS, que ha sido desarrollado por Everson Derian Menéndez Macay y José Luis Véliz Marcillo , previo a la obtención del título de Ingeniería Agroindustrial, de acuerdo al **REGLAMENTO DE LA UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR DE CARRERAS DE GRADO** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

ING. SACON VERA ELY FERNANDO., Ph.D.
CC:1309117636
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

ING. JADAN PIEDRA CARLOS
ALBERTO., Ph.D.
CC: 0102917952
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

ING. GARCIA PAREDES ROSA
IRINA., MGTR.
CC:1310779044
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

AGRADECIMIENTO I

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López por haberme dado la oportunidad de crecer como profesional brindando una educación de calidad tanto como persona y como profesional.

A Dios por bendecirme día a día además de cuidarme en cada paso de mi vida y por darme las fuerzas para terminar mis estudios, protegiéndome siempre.

A mi padre Oscar Véliz y a mi madre Nancy Marcillo por ser esa motivación principal en todas las etapas de mi vida, por no dejarme solo en esta meta apoyándome durante toda mi etapa académica, por sus consejos que fueron de mucha ayuda en momentos difíciles que se nos presentan cuando nos trazamos una meta, gracias por su amor incondicional y por nunca dejarme solo.

A mis abuelos y a mi familia que de una manera u otra han confiado en que si puedo cumplir las metas que me propongo. A mis profesores de la Politécnica por todas las enseñanzas brindadas. A mi tutora Ing. Luisa Ana Zambrano por darnos la ayuda y por orientarnos en nuestra investigación para cumplir con cada uno de los requerimientos a realizar. También quiero agradecer de manera especial y sincera a los Ingenieros Carlos Tubay y Francisco Demera por el apoyo incondicional y el aporte invaluable que me brindaron para la culminación de este trabajo.

A mi amiga, la Ing. Marcela Looor por estar siempre a mi lado y ayudarme en toda mi investigación. A mi amigo el Ing. Carlos Peñarrieta y a mis compañeros de clase. A Everson Menéndez por el compromiso en todo momento para culminar nuestro proyecto. Agradezco enormemente a todas las personas que estuvieron conmigo desde el inicio de mis estudios y aquellas que se sumaron en el camino.

JOSÉ LUIS VÉLIZ MARCILLO

AGRADECIMIENTO II

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López que me dio la oportunidad de crecer como ser humano a través de una educación superior de calidad y en la cual he forjado mis conocimientos profesionales día a día;

Quiero expresar mi gratitud de manera muy especial a Dios por brindarme sus bendiciones a lo largo de mi existencia y a mi familia por su apoyo incondicional en los momentos buenos y adversos.

También mi profundo agradecimiento a mi tutora por la enseñanza y conocimientos impartidos en este proceso de titulación, a los miembros del tribunal y mentores que aportaron con sus instrucciones para llevar a éxito esta investigación.

Por último, agradecer a todos aquellos compañeros y amigos que formaron parte de este recorrido académico, en especial a mis amigos la Ing. Marcela Loor, Ing. Carlos Peñarrieta y a mi colega de investigación José Luis Véliz gracias a cada uno de ellos por su paciencia, dedicación, apoyo incondicional y amistad.

EVERSON DERIAN MENÉNDEZ MACAY

DEDICATORIA I

A Dios, por bendecirme y darme fuerzas para seguir en todo mi proceso académico y poder tener uno de mis anhelos más deseados.

A mi familia, que me han apoyado para salir adelante en todo momento, a mi padre y madre por todo su apoyo, por el amor que brindan, por el trabajo y sacrificio de todos estos años, por poner en mi toda su confianza para culminar mis estudios de tercer nivel, por ser ejemplo de responsabilidad perseverancia y valentía, por animarme a terminar todo lo que empiezo y alcanzar mis metas. A mis hermanos por siempre creer en mí.

A mi esposa Melany Cedeño, por estar siempre a mi lado brindándome su amor y consejos y por apoyarme en todo, en las buenas y malas sin esperar nada a cambio por ser quien me motiva a cumplir esta meta.

Por último, cada uno de mis amigos, pero en especial a mi grupo de amigos de la Universidad: Carlos Peñarrieta, Derian Menéndez, Maricela Calderón, Nixon Bravo y en especial a Marcela Loor, gracias por toda su ayuda, por estar en las buenas y malas, quienes fueron de mucha ayuda con sus palabras motivadoras para seguir adelante. Y a todas aquellas personas que estuvieron a mi lado apoyándome en el transcurso de mis estudios.

JOSÉ LUIS VÉLIZ MARCILLO

DEDICATORIA II

A mi padre querido con todo mi corazón Everth Menéndez, aunque no está físicamente presente, siento que sus enseñanzas siguen guiándome día a día. Este logro es en tu honor, porque fue gracias a tu amor y dedicación que aprendí a nunca rendirme.

A mi madre Ángela Lucelina por su amor incondicional y por creer en mí día a día, a mi hija Danna Cristel y mi esposa Heiddy Cristel por ser la fuente de inspiración para poder seguir en este apreciado y hermoso camino de la educación, y por último a mi abuela paterna Efigenia Monserrate por ser mi segunda madre y estar presente en los momentos que más la necesite.

EVERSON DERIAN MENÉNDEZ MACAY

CONTENIDO GENERAL

DECLARACIÓN DE AUTORÍA	2
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN	3
CERTIFICACIÓN DEL TUTOR	4
CERTIFICACIÓN DEL COORDINADOR DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN	5
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL	6
AGRADECIMIENTO I	7
AGRADECIMIENTO II	8
DEDICATORIA I	9
DEDICATORIA II	10
CONTENIDO GENERAL	11
CONTENIDO DE TABLAS	13
CONTENIDO DE FIGURAS	13
RESUMEN	14
PALABRAS CLAVE	14
ABSTRACT	15
KEY WORDS	15
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	1
1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	1
1.2. JUSTIFICACIÓN	3
1.3. OBJETIVOS	5
1.3.1. OBJETIVO GENERAL	5
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
1.4. HIPÓTESIS	5
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	6
2.1. PLANTAS MEDICINALES	6
2.1.1. MENTA (Mentha Piperita L.)	7
2.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	7
2.2.1. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA	8
2.3. PRINCIPIOS ACTIVOS	8
2.3.1. PRINCIPIOS ACTIVOS DE LA Mentha Piperita	9

	12
2.4. TAMIZAJE FITOQUÍMICO	9
2.4.1. TERPENOS	9
2.4.2. SAPONINAS	10
2.4.3. TANINOS	10
2.4.4. FLAVONAS	10
2.4.5. FENOLES TOTALES	11
2.5. BACTERIAS PATÓGENAS	11
2.5.1. Salmonella	11
2.5.2. E. Coli	11
2.5.3. Staphylococcus aureus	12
2.6. MÉTODO SOXHLET	12
2.6.1. SOLVENTE ORGÁNICO	12
2.6.2. METANOL	13
CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO	14
3.1. UBICACIÓN	14
3.2. DURACIÓN	15
3.3. MÉTODOS Y TÉCNICAS	15
3.3.1. MÉTODOS	15
• 15	
• 15	
• 15	
3.3.2. TÉCNICAS	15
• 15	
• 16	
• 16	
• 16	
• 17	
• 17	
3.4. FACTORES EN ESTUDIO	17
3.4.1. NIVELES	17
3.4.2. TRATAMIENTOS	18
3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL	18
3.6. UNIDAD EXPERIMENTAL	19

3.7. MANEJO DEL EXPERIMENTO	19
3.7.1. DESCRIPCIÓN DEL DIAGRAMA DE PROCESO EN LA OBTENCIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO DE HOJAS DE MENTA	21
3.7.2. VARIABLES A MEDIR	22
3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	22
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1. TAMIZAJE FITOQUÍMICO	23
4.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	24
4.3. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) Y LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)	28
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	29
5.1. CONCLUSIONES	29
5.2. RECOMENDACIONES	29
BIBLIOGRAFÍA	30
ANEXOS	42

CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 3.1. Tamizaje fitoquímico	15
Tabla 3.2. Detalles de los tratamientos	17
Tabla 3.3. Esquema de ANOVA factorial	18
Tabla 4.1. Tamizaje fitoquímico del extracto metanólico de <i>Mentha piperita</i>	22
Tabla 4.2. Análisis de la actividad antimicrobiana función de las dosis del extracto (Factor A)	23
Tabla 4.3. Análisis de la actividad antimicrobiana función de las cepas patógenas (Factor B)	24
Tabla 4.4. Análisis de la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de menta a través de la interacción de los factores A y B	25

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 3.1. ESPAM MFL	13
Figura 3.2. Diagrama de proceso de la obtención del extracto de menta	19

RESUMEN

El propósito de esta investigación fue evaluar la influencia de las dosis de los extractos de hojas de menta (*Mentha piperita L.*) en la actividad antimicrobiana contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* y *Escherichia coli*. Se utilizó un diseño experimental bifactorial A*B en un diseño completamente al azar, obteniendo nueve tratamientos con tres réplicas. Posteriormente, se realizó el análisis fitoquímico para determinar la presencia de saponinas, taninos, fenoles, terpenos y flavonoides mediante pruebas específicas, como el ensayo de espuma, cloruro férrico, Liebermann-Burchard y Shinoda, respectivamente. El ensayo antimicrobiano se efectuó a través del método de difusión en discos de papel según Kirby-Bauer, teniendo como referencia la medición del diámetro de la zona de inhibición del control positivo y la medición del halo del extracto. Se obtuvo poco contenido (+) de terpenos y saponinas, presencia moderada (++) de flavonoides y taninos, mientras que mucha presencia (+++) de fenoles. El extracto metanólico de hojas de menta papel mostró sensibilidad para *E. Coli* un halo mínimo de 6mm a 25% y un diámetro máximo de 7.67mm a 100%, mientras que para *Staphylococcus aureus* se obtuvo un valor mínimo de 0.00mm a 25% y un máximo de 7.33mm a 100%, por otro lado, para *Salmonella* se obtuvo como valor mínimo 0.00mm a 25% y un valor máximo 7.67mm a 100% de concentración, por tanto, se considera que las concentraciones influyen significativamente en la actividad antimicrobiana, debido a que al aumentar la dosis de extracto presentó mejor efectividad antimicrobiana para las cepas patógenas (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella*).

PALABRAS CLAVE

Extractos, compuestos bioactivos, tamizaje fitoquímico, bacterias patógenas

ABSTRACT

The purpose of this research was to evaluate the influence of doses of mint (*Mentha piperita* L.) leaf extracts on the antimicrobial activity against strains of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* and *Escherichia coli*. A bifactor A*B experimental design was used in a completely randomized design, obtaining nine treatments with three replications. Subsequently, phytochemical analysis was carried out to determine the presence of saponins, tannins, phenols, terpenes and flavonoids using specific tests, such as the foam test, ferric chloride, Liebermann-Burchard and Shinoda, respectively. The antimicrobial test was carried out through the diffusion method on paper discs according to Kirby-Bauer, with as reference the measurement of the diameter of the inhibition zone of the positive control and the measurement of the halo of the extract. A low content (+) of terpenes and saponins was obtained, a moderate presence (++) of flavonoids and tannins, while a high presence (+++) of phenols was obtained. The methanolic extract of paper mint leaves showed sensitivity for *E. Coli* a minimum halo of 6mm at 25% and a maximum diameter of 7.67mm at 100%, while for *Staphylococcus aureus* a minimum value of 0.00mm was obtained at 25% and a maximum of 7.33mm at 100%, on the other hand, for *Salmonella* the minimum value was obtained 0.00mm at 25% and a maximum value of 7.67mm at 100% concentration, therefore, it is considered that the concentrations significantly influence the activity antimicrobial, because by increasing the dose of extract it presented better antimicrobial effectiveness for pathogenic strains (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella*).

KEY WORDS

Extracts, bioactive compounds, phytochemical screening, pathogenic bacteria

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Hoy en día la tendencia del consumidor a comprar productos alimenticios más naturales y menos procesados ha animado a la industria alimentaria a utilizar alternativas naturales, lo que ha impulsado a los científicos a investigar las nuevas sustancias naturales presentes en las plantas aromáticas y medicinales (MutluIngok, 2020). Actualmente, existe una preocupación por parte de la población, debido a la contaminación microbiana de los alimentos dando lugar a las ETA's (Enfermedades de Transmisión Alimentaria) derivadas al ingerir productos contaminados por agentes patógenos (Baggini, 2020), es por ello que la industria alimentaria busca alternativas para el desarrollo y consumo de productos inocuos (Garófalo, 2021).

Martínez (2020), menciona que los alimentos son contaminados por microorganismos alterantes, mismos que afectan a las propiedades fisicoquímicas, nutricionales y organolépticas, produciendo su deterioro y enfermedades al ser humano, ocasionando un grave problema para la industria alimentaria (Molina et al., 2014). Cordero et al. (2017), menciona que "las plantas son muy utilizadas para diferentes fines como comestibles y medicinales". En el Ecuador, la flora ha sido reconocida por ser rica en plantas útiles (Yáñez y Clavijo, 2017), debido a que producen moléculas bioactivas con actividad biológica y antibacteriana (Ramos y Portal, 2017), sin embargo, no se les ha realizado un estudio profundo (Azuero et al., 2016).

Las propiedades antibacterianas que poseen las plantas van desde la inhibición parcial hasta completa del crecimiento microbiano (Pabón et al., 2013), siendo los extractos utilizados como fitoquímicos activos puros (García et al., 2022), La actividad antimicrobiana de los extractos de plantas contra las bacterias que contaminan los alimentos ha sido demostrada por varios investigadores. Estas propiedades bioactivas permiten su uso a nivel industrial (Ashraf et al., 2017).

En Manabí, las plantas medicinales son utilizadas como infusiones, sin embargo, se desconocen los compuestos que se atribuyen al mejoramiento de la salud y alimentación (Murillo, 2018). Castillo et al. (2014), mencionan que las plantas medicinales sintetizan compuestos químicos como fenoles y derivados (quinonas, flavonas, flavonoides, flavonoles, taninos y cumarinas), terpenoides, aceites esenciales, alcaloides, pectinas y polipéptidos que poseen propiedades antimicrobianas y antioxidantes (Gonelimali et al., 2018), que podrían servir como mecanismos de defensa contra microorganismos.

Compuestos como terpenoides y polipéptidos, según redacta Mendiola (2017), han demostrado actividad antimicrobiana, antioxidante y conservante. Todas estas características nombran a los compuestos bioactivos como un instrumento relevante para la industria alimentaria, despertando de esta forma, el interés científico por alimentos naturales que contengan este tipo de compuestos (Sanz y Soria, 2019).

Diferentes estudios se han centrado en la identificación y aislamiento de sustancias que tienen actividad antimicrobiana (Pramila et al., 2012) siendo las hojas de menta una alternativa porque se utilizan en té y fines culinarios para añadir sabor y aroma, ricas en fuentes de hierro y magnesio, registrando, además, efectividad inhibitoria contra bacterias como *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Aspergillus flavus* (Feitosa Alves et al., 2020 citado por Carrillo et al., 2021). Mientras que, Sabahat S. y Col (2005) citado por Mamani (2013) manifiesta que los extractos de las hojas y el tallo de *Mentha piperita* fueron seleccionados para actividad antibacteriana contra cepas Gram-negativas: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*, siendo las hojas las que evidenciaron mayor actividad antimicrobiana.

Sujana et al. (2013) y Herbozo (2015) mencionan que los extractos de las hojas presentan una fuerte actividad antibacteriana a diferencia de los extractos de tallo y raíz por la presencia de monoterpenos oxigenados en su composición química (Feitosa Alves et al., 2020 citado por Carrillo et al., 2021).

Existen diversos métodos de extracción de compuestos bioactivos, tanto convencionales como no convencionales como destilación simple, soxhlet (Duarte et al., 2020), hidrodestilación convencional e hidrodestilación asistida por microondas (Branimir et al., 2021). Morro (2021) manifiesta que, soxhlet se utiliza para extraer compuestos bioactivos de materiales vegetales, el cual logra buenos resultados, el solvente más utilizado para extraer extractos vegetales por el método de soxhlet es el etanol, también se emplean otros como el hexano y el metanol, sin embargo, cada solvente produce extractos y composiciones específicas por la diferencia en sus polaridades y afinidades (Gutiérrez, 2016).

El creciente número de brotes de enfermedades son causadas por patógenos de transmisión alimentaria como: La *Salmonella* y *Escherichia coli* que afectan a millones de personas cada año (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2020). El microorganismo *Staphylococcus aureus*, se ha transformado en la principal fuente de infecciones en el torrente circulatorio e intoxicaciones originadas por alimentos (Zendejas et al., 2014), causando preocupación por la inocuidad, conservación y consumo de productos naturales libres de aditivos sintéticos (Catherine et al., 2012), lo que ha generado interés en el uso de antibacterianos naturales (Bin Shan, 2007), como extractos de plantas comestibles y medicinales (Catherine et al., 2012).

De acuerdo con lo anterior expuesto se plantea la siguiente interrogante:

¿Existirá presencia de compuestos bioactivos y actividad antimicrobiana en extractos metanólicos de hojas de menta?

1.2. JUSTIFICACIÓN

La investigación está encaminada en evaluar de manera cualitativa la presencia o ausencia de metabolitos secundarios en extractos metanólicos y el efecto inhibitor que presentan en el crecimiento de microorganismos patógenos de acuerdo con las dosis aplicadas. La menta (*M. piperita L*), es una planta aromática siendo su componente principal el mentol, presente en las hojas en una proporción de 45 - 70% (Quispe,

2016), este posee propiedades benéficas que permiten su utilización en la industria de alimentos, cosméticos, medicina y aplicaciones farmacéuticas (Abdelhalim, 2021).

Ecuador al ser un país en desarrollo, reporta pocas investigaciones en cuanto a la composición bioactiva de la menta así lo indica Jiménez, et al. (2021), cuya investigación profundizó el conocimiento sobre la utilización de las plantas de interés medicinal en diferentes localidades de Manabí indicando la presencia de compuestos como flavonoides, fenoles, triterpenos y alcaloides, algo similar demostró Bernal, (2021) señalando que en las regiones del país precisamente en la costa existe poca investigación científica sobre la evaluación de compuestos activos presentes en los extractos metanólicos de hojas de la menta y su actividad inhibidora en microorganismos, por lo que su estudio permitirá su aplicación en el ámbito alimentario.

Según el Departamento de Actualización Profesional (DAP, 2017) la menta es utilizada en las industrias especialmente por su componente alcohol terpénico cíclico llamado mentol el cual se ha utilizado en diversidad de formulaciones tópicas, además de tener propiedad antiséptica, analgésica, antiinflamatoria, rubefaciente y anti pruriginosa, por ello, se estima proponer como alternativa la utilización de extractos en el tratamiento de microorganismos para fines agroindustriales.

Como lo señala Ramírez, et al. (2018) los extractos de este tipo de planta medicinal contienen compuestos bioactivos que pueden cumplir con la función de neutralizar microorganismos, y al ser aplicados en alimentos lograrían alargar la vida de los mismo, así lo demostró Carrillo, et al. (2021) en su investigación, evaluando el impacto antimicrobiano del aceite esencial de menta demostrando una actividad antimicrobiana significativa sobre las diferentes cepas Gram positivas y Gram negativas, lo que da fundamento para la aplicación de este tipo de extracto como un posible conservante en la industria alimentaria.

Tomando en cuenta que el Ecuador presenta una rica biodiversidad de especies silvestres, se da la necesidad de caracterizar fitoquímicamente y evaluar el efecto antimicrobiano de los extractos metanólicos de las hojas de menta y de esta forma

contribuir al proyecto institucional de “Aplicación de principios activos de plantas silvestres para una bebida funcional en el mejoramiento de la cadena de valor de productores de pequeña escala” y sea aplicada en el desarrollo de investigaciones en productos agroindustriales innovadores, cumpliendo así con el objetivo N° 9 de los ODS (Objetivos de Desarrollo Sustentable) que indica que es necesario aumentar la investigación científica y mejorar la capacidad tecnológica de los sectores industriales de todos los países, en particular los países en desarrollo, entre otras cosas fomentando la innovación (PNUD, 2022).

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la influencia de las dosis de los extractos de hojas de menta (*Mentha piperita L*) en la actividad antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* y *Escherichia Coli*.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar la presencia cualitativa de metabolitos secundarios en extracto metanólico de hojas de menta (*Mentha piperita L*).
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto de menta en cepas gram positivas (*Staphylococcus aureus*) y gram negativas (*Escherichia coli* y *Salmonella*).
- Establecer la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto que presenta mejor efecto inhibitor en bacterias patógenas (*Staphylococcus aureu*, *Escherichia coli* y *Salmonella*).

1.4. HIPÓTESIS

Al menos una de las dosis del extracto metanólico de hojas de menta presentará mayor efecto antimicrobiano frente a cepas de *Salmonella spp*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. PLANTAS MEDICINALES

Son aquellas que por sus propiedades químicas y composición ejercen soluciones curativas y se han usado desde tiempos ancestrales en diferentes regiones geográficas (Chevalier, 1997; Rojas Alba, 2009 citado por Aranda et al., 2017), se aprovechan de diversas maneras: como materia prima, como extractos alcohólicos o acuosos, en forma semi purificada o también como sustancias puras o semi sintéticas (Zambrano, 2015).

En la composición de las plantas, se encuentra la presencia de diversos metabolitos secundarios, que exhiben un amplio rango de actividades biológicas (Milevskaya, Prasad y Temerdashev, 2019 citado por Flores et al., 2020), se encuentran principalmente en el aceite esencial y en los extractos de las plantas, que reportan actividades antimicrobianas (Fikry et al., 2019). La presencia de estas moléculas en las plantas varía, de acuerdo con las condiciones ambientales y del suelo donde ha crecido la planta (hábitat) (D´Armas, 2015), cambiando la composición química de sus aceites esenciales y extractos, es decir de sus metabolitos secundarios en general (Flores et al., 2020).

Los metabolitos secundarios juegan un papel ecológico crucial, operando como componentes de defensa frente a varios factores ambientales. La mayoría de las especies vegetales producen metabolitos secundarios como terpenos, compuestos fenólicos, alcaloides, saponinas y esteroides siendo una fuente importante de principios activos para la medicina. Sus aplicaciones farmacéuticas son extensas, abarcando propiedades analgésicas, antibacterianas, antioxidantes, fungicidas, entre otras (Hernández, et al., 2018).

En el Ecuador se encuentran diversas plantas medicinales endémicas, que pueden ser utilizadas para diferentes fines por sus compuestos activos que sirven para la elaboración de productos en la industria farmacéutica y alimentaria.

2.1.1. MENTA (*Mentha Piperita L.*)

Es una especie herbácea que pertenece a la familia Lamiaceae, con tallos erectos, cuadrangulares ramificados, puede alcanzar una altura de 80cm (Maque, 2020) con hojas opuestas pecioladas, lanceoladas o agudas, con bordes aserrados, color verde oscuro (García et al., 2019), cultivada en huertos, jardines o campos, crece espontáneamente en tierras profundas, ricas en humus y con bastante humedad (Carrillo y Fausto, 2021), siendo utilizada para preservar alimentos y bebidas debido a que poseen un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de microorganismos (Maque, 2020) y se emplea con frecuencia como agente aromatizante para alimentos y bebidas (García et al., 2019).

Sujana et al. (2013) en su estudio demostró que la *Mentha piperita* contiene metabolitos secundarios presentes en los extractos de hoja evidenciando que contenía más fenoles y taninos además de contar con la presencia de alcaloides, flavonoides y esteroides. Por otro lado, Hui (2022) menciona que cada vez hay más pruebas que demuestran que la menta posee una potente actividad antibacteriana frente bacterias patógenas como el *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Escherichia coli*.

La menta es apetecible por sus diversos usos tanto medicinales como alimentarios. Tradicionalmente se la ingiere por infusiones para tratar enfermedades relacionadas con las vías respiratorias, como anticongestivas y expectorantes (Mahendran y Rahman, 2020).

2.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Es la capacidad de impedir la proliferación de bacterias patógenas que provocan infecciones graves o incluso la muerte de los seres humanos (García, 2015), siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad (Górniak et al., 2019). Alrededor del 60% de la población mundial utiliza plantas naturales, para tratar diversas enfermedades con fármacos derivados de productos naturales (Noles 2019).

2.2.1. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA

El término concentración mínima inhibitoria (CMI) hace referencia a la concentración más pequeña de antibiótico que inhibe el crecimiento macroscópico de un microorganismo después de un período de incubación estándar, generalmente de 18 a 24 h (Marco et al., 2018). La CMI, es la concentración más baja (en $\mu\text{g/ml}$) de un antibiótico que inhibe el crecimiento de una determinada cepa bacteriana (IDEXX, 2022).

La concentración bactericida mínima (CBM) es la concentración más pequeña de un antibiótico que produce una reducción igual o superior al 99.9 % en el número de células viables al compararlo con el inóculo inicial (Marco et al., 2018).

2.3. PRINCIPIOS ACTIVOS

Son compuestos químicos conocidos como productos vegetales secundarios (Singh, 2008), se encuentran en las hojas, flores, tallos, semillas y raíces entre los principales se encuentran: flavonoides, taninos, vitaminas, alcaloides, minerales, ácidos grasos esenciales. Si se halla más de un principio activo puede tener diversos usos (Moncayo, 2007), varían cuantitativamente en las diferentes estaciones del año y la mayoría suelen ser recolectadas mejor durante la estación seca, cuando las hierbas están en su punto máximo de madurez y concentración (Singh, 2008).

En una sola planta se encuentran principios activos llamados “principales”, los cuales están detrás de la acción principal, así como distintos principios activos que son considerados secundarios, los que a su vez realizan el papel de coadyuvantes en algunos casos, mientras que en otros funcionan como moduladores de la acción (Herrera, 2020). Dentro de los productos naturales más populares se encuentran los extractos de plantas que son una mezcla compleja de compuestos activos, que poseen propiedades antioxidantes, antibióticas, antivirales, anticancerígena, antiparasitarios, antifúngicos entre otros (Armendáriz-Barragán et al., 2016; Chiang et al., 2005; Yarnell et al., 2016 citado por Rodríguez y López, 2015).

2.3.1. PRINCIPIOS ACTIVOS DE LA *Mentha Piperita*

La *Mentha piperita* tiene como principal principio activo su aceite esencial, mismo que contiene mentona, felandreno, acetato de mentilo, cineol o eucaliptol, flimoneno y mentol desde un 50% a un 86%, también contiene flavonoides, alcanfor, ácidos fenólicos y taninos (Lagarto et al., 1997).

Esta planta medicinal se utiliza para tratamiento de afecciones del estómago, faringe, hígado, refriados, además de poseer propiedades antiespasmódicas y carminativas sobre el sistema digestivo, antiséptico y antiinflamatorio sobre el sistema respiratorio y antiséptico sobre la piel y mucosas. Otras propiedades que se le atribuyen son, estimulante, hipostenizante cardiovascular, antidismenorreica y antihipocondríaca, presencia de compuestos fenólicos como carnosol, rosmanol, ácido carnosico y desoxocarnosol, son los compuestos principales que le dan a esta planta actividad antioxidante y antimicrobiana (Rosa et al. 2021).

2.4. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Para determinar la naturaleza química de los metabolitos de las plantas, los ensayos fitoquímicos constituyen una forma de realizar un análisis cualitativo de los extractos (Prashant et al., 2011 citado por Castillo et al., 2017), se basa fundamentalmente en la identificación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de productos naturales, a través de reacciones y análisis químicos, se le realiza a los extractos etéreo, alcohólico y acuoso del producto natural con el fin de identificar y comparar los metabolitos secundarios extraídos con cada disolvente de diferentes polaridades (García et al., 2020).

2.4.1. TERPENOS

Compuestos orgánicos aromáticos y volátiles que están conformados por cinco átomos de carbono (Vera y Álvarez, 2021). Grupo de mayor importancia con más de 40000 moléculas, se consideran pieza fundamental para la supervivencia de las plantas. Son insolubles en agua y se derivan de la unión de unidades de isopreno (Hernández et

al., 2018), además posee propiedades antimicrobianas tanto contra las bacterias susceptibles y resistentes a los antibióticos como por ejemplo *Staphylococcus aureus*, especialmente por su capacidad para promover la ruptura celular y la inhibición de la síntesis de proteínas y ADN (Sánchez et al., 2023).

2.4.2. SAPONINAS

Son compuestos no volátiles caracterizados por la presencia de una aglicona nopolar (sapogenina) acoplada con moléculas polares de azúcar. La naturaleza anfifílica de las saponinas las convierte en fuertes compuestos activos de superficie y se ha reportado que el consumo de saponinas protege contra el riesgo de cáncer, disminuye el nivel de colesterol en sangre. Además, se reportan actividades antiinflamatorias e inmunoestimuladoras (García et al., 2022).

2.4.3. TANINOS

Sustancias polifenólicas presentes en gran número de plantas producto del metabolismo secundario. Su carácter hidrosoluble permite que sea de fácil extracción y de utilidad en diversos usos en la industria química y farmacéutica. Son de composición química variable distinguiéndose por la característica común de ser astringentes. Sus propiedades coagulantes permiten ser utilizados para interferir en la absorción de alcaloides y metales pesados (Jerez, 2018). Se encuentran en las hojas, ramas y debajo de la corteza, sustancias con alto peso molecular (Castillo et al., 2017). La función antibacteriana de los taninos se produce fundamentalmente al privar a los microorganismos del medio apropiado para que puedan desarrollarse (Cárdenas, 2017).

2.4.4. FLAVONAS

Son estructuras fenólicas que contienen un grupo carbonilo. Constituyen la familia más grande de fenoles naturales. Su actividad frente a los microorganismos probablemente se debe a que forman complejos con las proteínas solubles y extracelulares y con las células de la pared bacteriana (Domingo, López-Brea, 2003 citado por Pava, 2016).

2.4.5. FENOLES TOTALES

La actividad antimicrobiana de una gran variedad de compuestos fenólicos de origen natural a partir de diferentes plantas ha sido estudiada en detalle (Rodríguez et al., 2010 citado por Leyva et al., 2013). Estos compuestos desempeñan un papel importante en la protección contra agentes patógenos, reacciones de oxidación y pueden retrasar el crecimiento de microorganismos. Los compuestos fenólicos presentes en plantas como el ácido gálico y ácido elágico presentan capacidad para inhibir el crecimiento de hongos y bacterias (Zambuchini et al., 2008 citado por Leyva et al., 2013).

2.5. BACTERIAS PATÓGENAS

Son bacterias que pueden desencadenar numerosos casos de enfermedades de transmisión alimentaria (ETA). Los alimentos contaminados con este tipo de bacterias suponen un alto riesgo a la salud del consumidor, pues son fuentes de posibles infecciones o enfermedades (BioPharm, s, f).

2.5.1. *Salmonella*

Según el Instituto de Salud Pública de Chile (ISPCH) son bacterias Gram negativas no esporuladas, anaerobias facultativas, mesófilas con una temperatura óptima de crecimiento de 35 - 37°C y un rango de 5 - 46°C, no tienen preferencia por algún huésped en especial, por lo que infectan tanto al hombre como a los animales (ISPCH, 2016), tiene gran impacto en salud pública; datos epidemiológicos indican que la gastroenteritis y la fiebre tifoidea son de distribución mundial, y ocurren en países desarrollados y subdesarrollados. Los alimentos en los que se ha detectado principalmente este patógeno son la carne de pollo, carne de cerdo, carne de pavo, productos con carne cruda, huevos y jamón de cerdo (Soto et al., 2016).

2.5.2. *E. Coli*

Bacilo Gram negativo, es utilizado como indicador de posible contaminación fecal y presencia de patógenos en agua y alimentos debido a que se encuentra

abundantemente en heces de humanos y animales (Soto et al., 2016). Esta bacteria produce la toxina Shiga (STEC), misma que está asociada a las ETA's, pudiendo causar desde diarrea sanguinolenta (DS) hasta enfermedades severas en el hombre (Zotta et al., 2016).

2.5.3. *Staphylococcus aureus*

Es importante no solo porque ocasiona infecciones en diversas partes del organismo humano, sino porque es una de las principales bacterias implicadas en las ETA's, las infecciones ocurren por la ingesta de alimentos contaminados con las toxinas. Se encuentran presentes en el aire, leche, agua potable, agua residual y en la comida o en el equipo donde los alimentos han sido elaborados (Zendejas et al., 2014). Tiene un metabolismo de tipo fermentativo y anaerobio facultativo, catalasa positiva y oxidasa negativa. Son capaces de crecer en presencia de un 40% de bilis. Su temperatura óptima de crecimiento va de 35 a 40 °C y el pH óptimo oscila entre 7.0 y 7.5 aunque soportan pH mucho más extremos (Pava, 2016).

2.6. MÉTODO SOXHLET

La extracción soxhlet es denominado el método estándar más utilizado para muestras sólidas y el que utilizan para comparar otro tipo de métodos; esta técnica permite determinar: el contenido graso de muestras, extracción de aceites vegetales, aceites grasos, hidrocarburos no volátiles, grasas animales, ceras, jabones, aceites esenciales y compuestos relacionados. Este procedimiento se lo puede aplicar a distintas muestras, sin embargo, tiene un requerimiento especial, y es que la muestra empleada debe ser anhidra o seca, ya que de esta forma se evitarán errores (Cárdena, 2004). La extracción con disolventes es aquella técnica que permite la separación sólida-líquida, utilizando como ventaja las discrepancias de solubilidad de los compuestos de la mezcla en un disolvente adecuado (Angurell, et al., 2020).

2.6.1. SOLVENTE ORGÁNICO

En el reino vegetal se originan metabolitos como fenoles, terpenoides alcaloides, acetilenos, ácidos carboxílicos, ácidos grasos, entre otros, con propiedades insecticidas, acaricidas y nematocidas (Naveda, 2010 citado por Fuel, 2015). La mejor forma de aprovechar estos metabolitos secundarios es mediante la preparación de sus tejidos en extractos vegetales o infusiones empleando diversos solventes orgánicos como agua, alcohol, éter etílico, aceites, cetonas y benceno, mediante técnicas tradicionales y no tradicionales de extracción (Sharapin, 2000 citado por Fuel, 2015).

2.6.2. METANOL

Es el alcohol más sencillo, también conocido como alcohol de madero o alcohol metílico. Se lo considera un compuesto incoloro, inflamable y tóxico. Se encuentra en estado líquido y generalmente es empleado como disolvente de extracción de compuestos activos en matrices vegetales. Su fórmula química es CH_3OH (AGRIPAC, 2021).

Para el factor solvente el metanol 100% es el de mayor eficiencia para la extracción de compuestos, debido a su alta polaridad favorece significativamente el rendimiento, marcando una diferencia de porcentaje del 68% a diferencia del solvente hexano y éter, considerándose el agente de extracción más eficiente para compuestos bioactivos; los valores de extracción con este solvente oscilaron entre 15.8, 16.7 y 17.9 mg (Lilia, et al.,2022).

CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

3.1. UBICACIÓN

El proceso de obtención del extracto de hojas de menta se realizó en los laboratorios de Bromatología y Química de la carrera de Agroindustria de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, ubicada en el sitio “El Limón”, en Calceta, cantón Bolívar, provincia de Manabí, aproximadamente en las coordenadas $0^{\circ}49'46''\text{S}$ $80^{\circ}10'51''\text{W}$ (Figura 3.1) (Google Earth, 2021). El tamizaje fitoquímico (saponina, fenoles, taninos, terpenos y flavonas) y actividad antimicrobiana, se desarrolló en los laboratorios de la Universidad Técnica de Manabí, extensión Chone, situada aproximadamente bajo las coordenadas $0^{\circ}41'18''\text{S}$ $80^{\circ}07'24''\text{W}$ (Google Earth, 2022).



Figura 3.1. ESPAM MFL

Fuente: (Google Earth, 2022)

3.2. DURACIÓN

La investigación se llevó a cabo a lo largo de 32 semanas, iniciando el 27 de febrero de 2023, fecha en la que se aprobó la planificación del proyecto de investigación.

3.3. MÉTODOS Y TÉCNICAS

3.3.1. MÉTODOS

- **MÉTODO BIBLIOGRÁFICO**

Se obtuvo información científica acerca de la obtención del extracto de hojas de menta proveniente de fuentes como: Scielo, Dialnet, Redalyc, Elsevier, etc.

- **MÉTODO DESCRIPTIVO**

Permitió describir los resultados del tamizaje fitoquímico de manera cualitativa del extracto metanólico de menta.

- **MÉTODO EXPERIMENTAL**

Se caracterizó la actividad antimicrobiana del extracto de menta (*Mentha piperita L*) obtenido de las hojas frescas mediante el método de difusión en agar por diseminación superficial en disco.

3.3.2. TÉCNICAS

- **TAMIZAJE FITOQUÍMICO**

En la tabla 3.1 se muestra el tamizaje fitoquímico (saponinas, taninos, fenoles, terpenos y flavonoides) con sus respectivos ensayos.

Tabla 3.1. Tamizaje fitoquímico

Metabolitos secundarios	Ensayo	Citas de referencias
Saponinas	Espuma	Rivas et al. (2020)
Taninos	Cloruro férrico	Ramos y Solórzano, 2016 citado por Vera et al. (2022)
Fenoles	Cloruro férrico	Ramos y Solórzano (2016) citado por Vera et al. (2022)
Terpenos	Liebermann-Burchard	Vélez (2015)
Flavonoides	Shinoda	Cedeño y Romero (2017)

● DETERMINACIÓN DE SAPONINA

En un tubo de ensayo se colocó un 1mL del extracto de *Mentha piperita* y 5mL de agua destilada, luego se agitó manualmente por 10 minutos. Si hay formación de espuma y se mantiene por dos minutos el resultado será positivo (Ver anexo 1).

● DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y TANINOS

En un tubo de ensayo se adicionó un 1mL de extracto de *Mentha piperita* y se le agregó 3 gotas de solución de cloruro férrico al 5% en una solución salina fisiológica. La solución se tornó de color rojo vino y verde intenso para fenoles y taninos, respectivamente (Ver anexo 2).

● DETERMINACIÓN DE TERPENOS

Se tomó 2mL de extracto de *Mentha piperita* y se llevó a evaporar a baño maría (90°C), el residuo se disolvió en 1mL de cloroformo, después se añadió 1mL de anhídrido acético y se mezcló, luego se agregaron 3 gotas de ácido sulfúrico al 98% sin agitar. El ensayo se consideró positivo por el cambio de coloración pasando de rosado a verde intenso y oscuro (Ver anexo 3).

- **DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES**

Se ocupó 1mL del extracto de *Mentha piperita* y se añadió 1mL de ácido clorhídrico al 37% y una pequeña parte de virutas de magnesio metálico. Después de 5 minutos se adicionó 1mL de alcohol amílico y se dejó reposar por 10 minutos hasta separarse la fase del extracto metanólico y la fase del alcohol amílico. Se consideró un ensayo positivo cuando el alcohol amílico se coloreó de amarillo (Ver anexo 4).

- **ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO (KIRBY-BAUER)**

Se realizó la inoculación y siembra sobre la superficie de los agares Mueller Hinton para cepas certificadas de *Salmonella spp*, *Escherichia coli*, *S. aureus*, cada una de ellas por separado. Se impregnaron diferentes dosis de los extractos, en cada uno de los discos de papel filtro por triplicado y se colocaron sobre la superficie de la placa de agar inoculada. Estas se incubaron invertidas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, posteriormente se midieron los halos de inhibición incluyendo el diámetro de los discos (Sánchez et al., 2016 citado por Sabando, 2020). La carga microbiana se comparó con los requisitos que establece la NTE INEN 2392:2007 para hierbas aromáticas.

3.4. FACTORES EN ESTUDIO

Los factores que se manipularon fueron:

- **Factor A:** Dosis del extracto de menta
- **Factor B:** Bacterias patógenas

3.4.1. NIVELES

Para el factor A se utilizaron los siguientes niveles:

$$a_1 = 25\%$$

$$a_2 = 50\%$$

$$a_3 = 100\%$$

Para el factor B se emplearon los siguientes niveles:

$b_1 = E. coli$

$b_2 = Staphylococcus aureus$

$b_3 = Salmonella$

3.4.2. TRATAMIENTOS

En la tabla 3.2 se detalla las combinaciones que se obtuvieron de los diferentes niveles de cada factor, obteniendo un total de nueve tratamientos.

Tabla 3.2. Detalles de los tratamientos

Tratamientos	Códigos	Descripción	
		Dosis de extracto de menta	Cepas
T1	a1b1	25%	<i>E. coli</i>
T2	a1b2	25%	<i>Staphylococcus aureus</i>
T3	a1b3	25%	<i>Salmonella</i>
T4	a2b1	50%	<i>E. coli</i>
T5	a2b2	50%	<i>Staphylococcus aureus</i>
T6	a2b3	50%	<i>Salmonella</i>
T7	a3b1	100%	<i>E. coli</i>
T8	a3b2	100%	<i>Staphylococcus aureus</i>
T9	a3b3	100%	<i>Salmonella</i>

Fuente: Los autores

3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se empleó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo bifactorial 3k con tres réplicas para cada tratamiento, obteniendo un total de 27 unidades experimentales (N), lo cual se describe en la Tabla 3.3 considerando los grados de libertad (N-1).

Tabla 3.3. Esquema de ANOVA factorial

FUENTE DE VARIACIÓN	gl
Total	26
Tratamiento	8
Factor A	2
Factor B	2
AxB	4
Error	18

Fuente: Los autores.

3.6. UNIDAD EXPERIMENTAL

Se tomó una muestra de 1000g de hojas de menta sin daño físico y deterioro, se obtuvo un total de 21.11mL de extracto. Para el análisis fitoquímico, en cada muestra se utilizó 2mL, mientras que en los análisis microbiológicos 1mL de muestra.

3.7. MANEJO DEL EXPERIMENTO

Para el cumplimiento de los objetivos planteados se efectuaron las siguientes actividades, se realizó el proceso de obtención del extracto de las hojas de menta, luego se elaboró un diagrama de proceso (Figura 3.2).

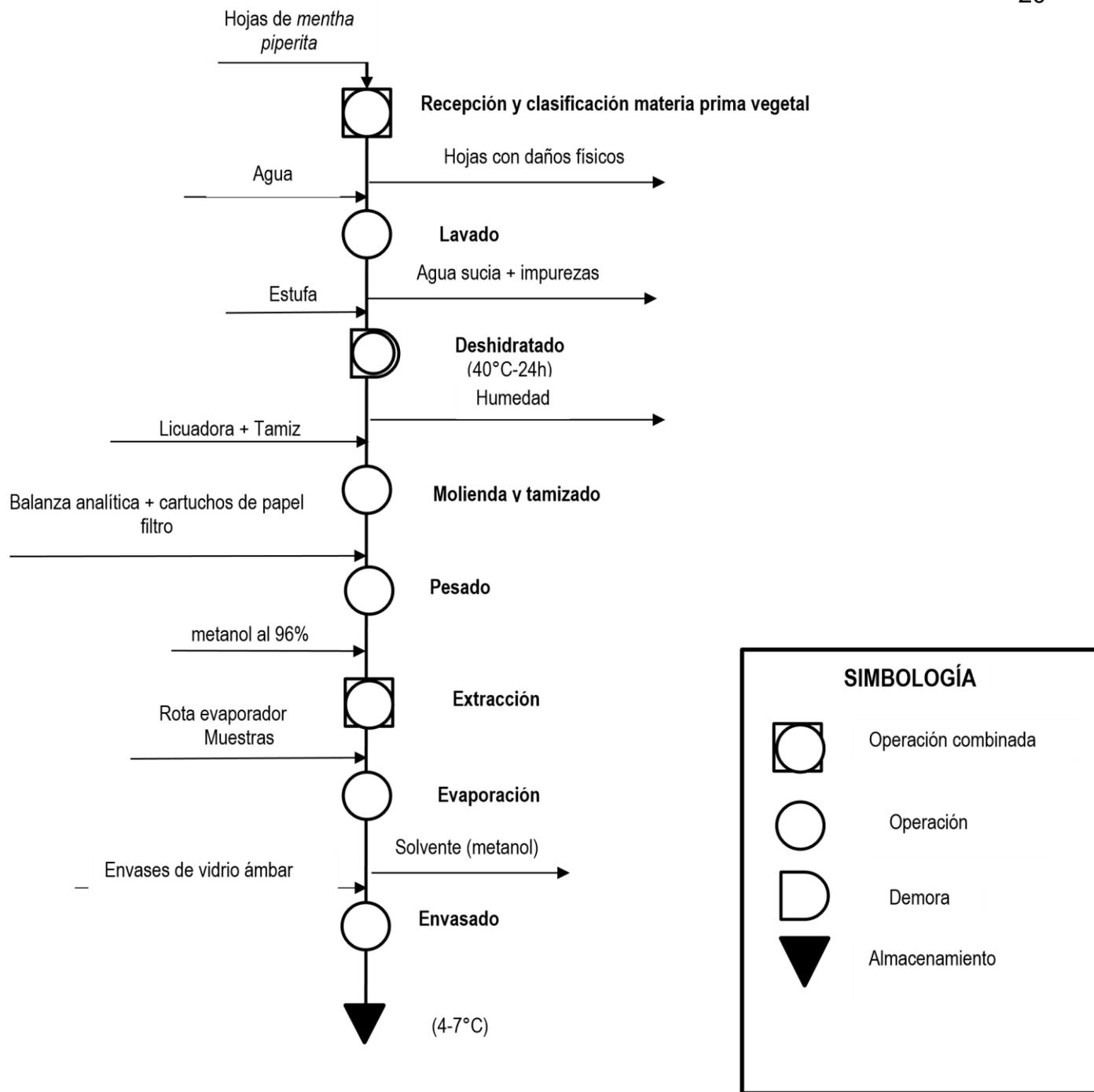


Figura 3.2. Diagrama de proceso de la obtención del extracto de menta

3.7.1. DESCRIPCIÓN DEL DIAGRAMA DE PROCESO EN LA OBTENCIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO DE HOJAS DE MENTA

Recepción y clasificación de la materia prima vegetal: Se recolectaron 1000g de hojas de *Mentha piperita* procedentes del sector de platanales, parroquia Calceta, cantón Bolívar, provincia de Manabí, se seleccionaron las que estaban en buen estado sin daño físico o rasgaduras (Ver anexo 5) las mismas que fueron envueltas en papel aluminio.

Lavado: Se lavaron en un recipiente con agua potable (marca all natural) para eliminar las impurezas, posteriormente se colocaron en papel absorbente con el propósito de eliminar el excedente de agua presente en la superficie de las hojas (Ver anexo 6 y 7).

Deshidratado: Se pesaron las hojas en la balanza digital (marca camry), luego fueron llevadas a la estufa (marca Memmert) a 40°C por 24 horas (Ver anexo 8), cabe recalcar que se determinó el porcentaje de humedad a las hojas antes que ingresen a la estufa (81.39%) y después que se retiren de la estufa (12.17%), este proceso se lo realizó en la termobalanza (marca Boecco) ajustada a una temperatura de 135°C por 10 minutos (Ver anexo 9).

Molienda y tamizado: El material vegetal se trituro hasta obtener un polvo con la ayuda de una licuadora (marca Oster) debido a que, el grado de división de la muestra influye en la superficie de contacto entre las fases de extracción ocasionando una mejor difusión a través de la membrana porosa; es decir que, durante el proceso de extracción, el metanol entra en contacto con el tejido de las hojas, ocasionando la liberación de compuestos. En cuanto al tamizaje se lo efectuó en un tamiz de malla 1 mm, permitiendo obtener una muestra adecuada para facilitar la extracción (Ver anexo 10).

Pesado: Se pesaron cinco gramos de *Mentha piperita* en una balanza analítica (marca CAMRY) (Ver anexo 11) y se colocaron al interior de un cartucho elaborado a partir de papel filtro y sellados con grapas. En total se realizaron 6 cartuchos.

Extracción: Para obtener el extracto se lo efectuó en el equipo Soxhlet con metanol al 99% una temperatura de aproximadamente de 300°C durante cuatro corridas (Ver anexo 12), se empleó dicho solvente porque en la planta existen metabolitos con polaridad alta y por ende se tiene que utilizar disolventes con la misma polaridad (Colina, 2016).

Evaporación: La muestra pasa al equipo rotavapor DLAB R100-pro para eliminar el alcohol que contiene 230 mL (Ver anexo 13).

Envasado: Se colocaron 20 mL de extracto en envases de vidrio de color ámbar para evitar su degradación por efecto de la luz (Ver anexo 14).

Almacenado: A una temperatura de 4°C se almacenaron los extractos en refrigeración para posteriormente efectuar la actividad antimicrobiana (Ver anexo 15).

3.7.2. VARIABLES A MEDIR

- Concentración mínima inhibitoria (CIM) ($\mu\text{L}/\text{mL}$) y concentración mínima bactericida (CMB) ($\mu\text{L}/\text{mL}$).

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se emplearon los programas estadísticos IBM SPSS versión Statistics 28 (libre) e InfoSat/Libre versión 2020. En el programa SPSS se analizaron la distribución de los datos sobre la variable respuesta a través de los supuestos del ANOVA (Ver anexo 16), para Shapiro-Wilk la significancia fue 0.00, por ende, al no presentar un valor ≥ 0.05 no se efectuó la prueba de Levene, evaluándose los resultados a través de la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Con el programa InfoSat se analizaron cada factor de estudio (dosis del extracto metanólico de hojas de menta y cepas patógenas) frente a la variable dependiente (actividad antimicrobiana) para detectar los niveles y tratamientos que difieren entre sí.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

En la tabla 4.1 se presentan los resultados del tamizaje fitoquímico del extracto metanólico de *Mentha piperita* demostrando que el extracto tuvo alta presencia de fenoles, presencia moderada en flavonoides y taninos, mientras que las saponinas y terpenos demostraron poca presencia.

Tabla 4.1. Tamizaje fitoquímico del extracto metanólico de *Mentha piperita*

Análisis	Extracto metanólico de hojas de menta
Flavonoides	++
Saponinas	+
Fenoles	+++
Taninos	++
Terpenos	+

Poca presencia (+), presencia moderada (++) y mucha presencia (+++)

La alta presencia de compuestos fenólicos en el extracto se debió a la polaridad del metanol, debido a que cada solvente tiene diferente afinidad y espectro de solubilidad para tener la capacidad de disolver el analito y reducir la extracción otros componentes bioactivos presentes en la muestra (Soto y Rosales, 2016 citado por González et al., 2019). Cabe mencionar, que los componentes fenólicos están relacionados con la actividad antimicrobiana (Zuni, 2017), sin embargo, en este estudio no se garantiza la cantidad de fenoles presentes, debido a que es un análisis cualitativo. En cuanto a flavonoides y taninos se obtuvo presencia moderada, porque son metabolitos polares son mejor extraídos por solventes de la misma polaridad como el metanol, es decir que el extracto de menta tiene propiedades antioxidantes (Colina, 2016).

La poca presencia de terpenos y taninos se debió al solvente empleado (metanol) puesto que, según Jiang et al. (2016) se deben extraer con solventes de menor polaridad, por ello es esencial tener en cuenta el tipo de moléculas que se desea extraer y de esta manera seleccionar el solvente adecuado para la extracción, siendo el metanol el disolvente más apropiado para extraer compuestos de alta y mediana

polaridad como fenoles y terpenos que son los componentes principales a extraer en esta investigación por sus propiedades antimicrobianas (Sailema et al., 2023).

Los resultados de este trabajo son similares a los reportados por Patil et al. (2016), quienes obtuvieron en el extracto acuoso de *Mentha piperita* presencia de taninos, flavonoides, fenoles, y saponina, pero difiere con el etanólico que evidenció ausencia de taninos, saponinas y flavonoides excepto fenoles. No obstante, Mainasara et al. (2018) en su investigación observó presencia moderada (++) de taninos, saponinas y flavonoides en el extracto acuoso de *M. piperita*. Khanal (2019) en la extracción metanólica de menta mostró la presencia (+) de fenoles, taninos, flavonoides. Por otro lado, Waleed (2023) no detectó (-) saponinas en el extracto, sin embargo, evidenció la presencia (+) de compuestos fenólicos y flavonoides en el extracto metanólico de hojas menta. Cabe recalcar que los metabolitos secundarios dependen del estado fenológico de la planta, época del año, características del suelo, la región del país y las condiciones ambientales (Sampaio y Da Costa, 2018), por ende, la variación de resultados con respecto a este estudio.

4.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

En la tabla 4.2 se detallan las medias de la actividad antimicrobiana adquirida de la *Mentha piperita*, siendo para el factor A (dosis de extracto) un p _valor de 0.0001 (Anexo 17), existiendo diferencia significativa (p _valor <0.05) entre las actividades antimicrobianas de cada porcentaje de extracto metanólico de menta.

Tabla 4.2. Análisis de la actividad antimicrobiana en función de las dosis del extracto (Factor A)

Dosis (%) de extracto de menta (Factor A)	Actividad antimicrobiana (mm)
25	2.00±3.00b
50	6.67±0.50a
100	7.56±0.53a
P_valor	0.0001

*Medias con letras distintas presentan diferencias estadísticas.

En la presente investigación se consideró que al aumentar la dosis del extracto de *Mentha piperita* se observó un mayor efecto antimicrobiano cuyos resultados oscilaron entre 2, 6.67 y 7.56 milímetros de diámetro (mm) de halo de inhibición, esto difiere con Carrillo et al. (2021), quien determinó que a 25% de aceite esencial de *Mentha piperita* con un 6 mm de halo de inhibición, a los 50% fue de 8 mm y 13 mm al 100% de aceite puesto que al incrementar la concentración de los agentes antimicrobianos se reduce el crecimiento de microorganismos debido a que la permeabilidad de la pared celular aumenta y también depende del tipo de compuestos bioactivos que se encuentren presente en el extracto (Maleki et al., 2008 citado por Wenji et al., 2019).

En la tabla 4.3 se detallan los resultados de la actividad antimicrobiana en relación con el factor B (cepas patógenas), en donde se muestra que la bacteria *E. Coli* tiene mayor susceptibilidad a los agentes antimicrobianos, no obstante, estadísticamente (p _valor 0.4247) el factor B no tuvo efecto en la variable respuesta (anexo 18), siendo la actividad antimicrobiana similar para las bacterias evaluadas: *E. Coli*, *Salmonella* y *Staphylococcus aureus*.

Tabla 4.3. Análisis de la actividad antimicrobiana en función de las cepas patógenas (Factor B)

Cepas patógenas (Factor B)	Actividad antimicrobiana (mm)
<i>E. coli</i>	6.89±0.78
<i>Salmonella</i>	4.56±3.50
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.78±3.60
P_valor	0.4247

En este trabajo la cepa patógena *E. coli* reportó una media de 6.89±0.78 mm de actividad antimicrobiana, superior a las otras bacterias. Okmen et al. (2017) evidenciaron que los extractos etanólicos, metanólicos y acuosos de menta inhibieron el crecimiento de bacterias *Staphylococcus* entre 7-16mm, de 9 a 20mm y de 14 a 21mm respectivamente, siendo estos valores superiores a los de esta investigación para *Staphylococcus aureus* (4.78mm). Por lo que Hammadi y Adnan (2021) argumentan que las bacterias Gram negativas (*E. coli*) presentan mayor

susceptibilidad a los agentes antimicrobianos a diferencia de las Gram positivas (*Staphylococcus aureus*).

En la tabla 4.4 se observan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (P_valor 0.0022), es decir, la interacción de las dosis de extractos de menta (factor A) y cepas patógenas (factor B), quienes mostraron variación en lo que respecta a la actividad antimicrobiana (anexo 19 y 20), demostrando que los tratamientos T7 y T9 comparten categoría y presentan mayor efectividad antimicrobiana para *E. coli* y *Salmonella* a una concentración de 100% con un halo de inhibición de 7.67mm de diámetro. Mientras que el T2 y T3 comparten categoría, de la misma manera T1 y T6, la interacción de T4 evidencia un valor estadísticamente similar con T5 y T8.

Tabla 4.4. Análisis de la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de menta a través de la interacción de los factores A y B

Tratamientos	Actividad antimicrobiana (mm)
T1	6.00±0.00bc
T2	0.00±0.00c
T3	0.00±0.00c
T4	7.00±0.00ab
T5	7.00±0.00ab
T6	6.00±0.00bc
T7	7.67±0.58a
T8	7.33±0.58ab
T9	7.67±0.58a
P_valor	0.0022

*Medias con letras iguales corresponden a tratamientos estadísticamente similares.

**Medias con letras distintas son tratamientos que presentan diferencias estadísticas.

El extracto metanólico de *Mentha piperita* tuvo poca presencia de terpenos y, por ende, su actividad antimicrobiana fue poco efectiva, debido a que los terpenos influyen en la actividad antimicrobiana frente a bacterias susceptibles como resistentes (Mahizan et

al., 2019) debido a su capacidad para promover la ruptura celular y la inhibición de la síntesis de proteínas y ADN (Álvarez et al., 2021). Los resultados de esta investigación son superiores a los reportados por Waleed (2023) quien obtuvo halos de inhibición en su extracto metanólico de 4.5mm y 5mm para *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente.

Khanal (2019) en su estudio demostró que el extracto metanólico de hojas de *M. piperita* no mostró ninguna actividad antibacteriana sobre las bacterias *Salmonella*, *S. aureus*, *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, siendo similares a los obtenidos en este estudio esto se debe a varios factores como la altitud, lugar de recolección de la planta, la impureza en el extracto y el tipo y concentración de solvente empleado, factores que influyen en la actividad bioactiva del extracto (Khanal, 2019). Mientras que, Wenji et al. (2019) presentó una mayor inhibición en *C. albicans* con el metanol (9.08 a 10 mm) en comparación con el cloroformo (8.35 a 9.28) pudo deberse a la polaridad de cada solvente.

Por otro lado, Bupesh et al. (2007) citado por Shalayel et al. (2016) y Alam et al. (2022) en su estudio de *M. piperita* manifiestan que la actividad antibacteriana depende de la cepa porque algunas son resistentes a ciertos extractos, por lo que es necesario seleccionar el extracto y la especie de planta adecuada para el tipo de bacteria a tratar. En la presente investigación los promedios de diámetros, de los halos de inhibición de hojas de menta a diferentes concentraciones frente a las cepas evaluadas, mostraron que *E.coli* y *Staphylococcus aureus* tienen mayor sensibilidad frente al extracto metanólico al 100% con halos de inhibición de 7.67mm de diámetro mientras que al 25% de menta la *Salmonella* y *Staphylococcus aureus* no presentaron actividad antimicrobiana. Por lo tanto, la dosis empleada juega un papel esencial en la efectividad del tratamiento antibacteriano, puesto que una dosis insuficiente puede no ser efectiva contra la bacteria por su estructura celular (Bupesh et al., 2007 citado por Shalayel et al., 2016 y Alam et al., 2022).

4.3. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) Y LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

En el presente trabajo no se pudo determinar la CIM y CBM, debido a que los halos de inhibición estuvieron en un rango de 0 a 7.67 mm siendo menor a 14 mm (Rossi, 2012), es decir, las cepas *E. coli*, *Salmonella* y *Staphylococcus aureus* fueron resistentes a las concentraciones empleadas. En el estudio realizado por Zuni (2017) observaron que el aceite de *Mentha piperita* presentó en el rango de 2.5% hasta 30% evidencia de la inhibición del crecimiento *E. coli*, mientras que del mismo que fue de 2.5% de CIM, lo que difiere con los resultados de esta investigación que no se pudo determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM).

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- El tamizaje fitoquímico efectuado al extracto metanólico de hojas de *Mentha piperita* evidenció mayor cantidad de fenoles (+++), seguido de flavonoides y taninos (++) y poca presencia (+) de saponinas y terpenos.
- La dosis del extracto metanólico de hojas de *Mentha piperita* influyen en la actividad antimicrobiana demostrando que al incrementar la concentración de extracto presenta mejor efectividad antimicrobiana, con halos de inhibición de hasta 7.56mm de diámetro.
- En la actividad antimicrobiana se presentaron diferencias estadísticas significativas en los tratamientos, siendo T7 (100% de extracto metanólico de hojas de menta+E. Coli) y T9 (100% de extracto metanólico de hojas de menta+Salmonella) los que evidenciaron mayor sensibilidad contra las bacterias Gram negativas.

5.2. RECOMENDACIONES

- Efectuar investigaciones empleando otra variedad de menta (*M. spicata*) en las bacterias Gram positivas y Gram negativas.
- Utilizar otro tipo de solvente (cloroformo), debido a que este influye en la composición fitoquímica y actividad antimicrobiana del extracto.
- Realizar análisis cuantitativo al extracto de menta para observar qué tipos de compuestos fitoquímicos están presente en la hoja de menta.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdelhalim, A. (2021). The effect of *Mentha piperita* L. on the mental health issues of university students: A pilot study. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 9 (1), 49-57. https://jppres.com/jppres/pdf/vol9/jppres20.932_9.1.49.pdf
- AGRIPAC. (2021). *Metanol*. <https://agripac.com.ec/productos/metanol/>
- Alam, M. Bano, N. Ahmad, T. Sharangi, A. Upadhyay, T. Alraey, Y. Alabdallah, N. Rauf, y M. Saeed, M. (2022). Synergistic Role of Plant Extracts and Essential Oils against Multidrug Resistance and Gram-Negative Bacterial Strains Producing Extended-Spectrum β -Lactamases. *Antibiotics (Basel)*, 11(7). doi: 10.3390/antibiotics11070855.
- Álvarez, F. Barrajón, E. Herranz, M. y Micol, V. (2021). Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. *Phytomedicine*, 90. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153626>
- Aranda, S. Castillo, T. Cruz, V. Ana, P. Guillen, C. Lozoya, C. Rubio, M. (2015). Ley de Fick. [Instituto Tecnológico de Mixicali, Ingeniería Química]. <https://es.slideshare.net/slideshow/prctica-ix-ley-de-fick/46375161>
- Aranda, V. Arellano, C. Mancilla, G. y Arreola, E. (2017). Conocimiento y potencial de uso de plantas medicinales en estudiantes de primaria en el estado de campeche. *AP Agro productividad*, 11(2). <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/137/115>
- Angurell, I. Casamitjana, N. Caubet, A. Dinares, I. Llor, N., Muñoz-Torero, D. y Velasco, D. (2020). *Operaciones básicas en el laboratorio de química* [Universidad de Barcelona]. https://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/extraccio_tip.html
- Ashraf, A. Abdulaziz, A. Khalid, S. Turki, M. Essam, N. y Marwah M. (2017). Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi Journal of Biological Sciences* 25(2) , 361-366. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.02.004>
- Azuero, A. Jaramillo, C. San Martín, D. D´Armas, H. (2016). Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador. *Revista Ciencia Unemi*, 9 (20), 10-18. <https://www.redalyc.org/pdf/5826/582663826003.pdf>
- Bernal, J. (2021). *Evaluación de extractos etanólicos de manzanilla, ajo, llantén, orégano, ruda en el control de monilophthora roreri a nivel in vitro*. [Trabajo de titulación: Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Técnica de Machala]. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/16542/1/TTUACA-2021-IADE00008.pdf>
- Bin Shan; Yi-Zhong Cai; John D. Brooks; Harold Corke (2007). The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology* 117(1), 112–119. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.03.003

- Biopharm (s:f). *Bacterias patógenas - Food & Feed Analysis*.
<https://food.rbiopharm.com/es/analitos/microbiologia/bacterias-patogenas/>
- Branimir, P. Nemanja, T. Gokhan, Z. Sasa, D. Dusan, R. Aleksandra, C. Gunes, A. Zoran, Z. (2021). Antioxidant and enzyme-inhibitory activity of peppermint extracts and essential oils obtained by conventional and emerging extraction techniques. *Revista Science Direct*, 338. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127724>.
- Cárdenas, C. (2004). *Determinación del contenido graso de leche en polvo: extracción Soxhlet*. *Ciencias Ambientales*.
https://www.upo.es/depa/webdex/quimfis/docencia/TAQ/curso0405/TAQP5_0405.pdf
- Carrillo, L. Fausto, A. (2021). *Efectividad antimicrobiana del aceite esencial de menta al 25, 50 y 100% frente a cepas de Porphyromonas Gingivalis. Estudio in vitro* [Tesis de Odontólogo, Universidad Central del Ecuador].
<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/26689/1/FOD-CPOCARRILLO%20FAUSTO.pdf>
- Carrillo, F. Palacios, E. y Dona, M. (2021). Efectividad antimicrobiana del aceite esencial de menta al 25, 50 y 100% frente a cepas de porphyromonas gingivalis. Estudio in vitro. *Revista Científica Mundo de la Investigación y el Conocimiento*, 5 (2), 307-315. 10.26820/recimundo/5(2). abril.2021.307-315
- Castillo, A. Pascual, Y. Cunhanune, L. De La Paz, C. y Cañete, F. (2014). Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de hojas y semillas de Morinda citrifolia L. (noni). *Revista Cubana de plantas medicinales*, 19 (4). <http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/88/99>
- Castillo, G. Zavala, D. y Carrillo, M. (2017). Análisis fitoquímico: una herramienta para develar el potencial biológico y farmacológico de las plantas. *TLATEMOANI*, 24, 7186. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7283800>
- Catherine, Ann A.; Deepika, Hanumanthiah; Negi, Pradeep S. (2012). Antibacterial activity of eugenol and peppermint oil in model food systems. *Journal of Essential Oil Research*, 24(5), 481–486. doi:10.1080/10412905.2012.703513
- Cedeño, E. y Romero, A. (2017). *Obtención de colorante natural a partir de la cáscara de plátano verde (Musa Paradisiacal) mediante procesos físicos de extracción* [Ingeniero Químico, Universidad Técnica De Manabí].
<http://repositorio.utm.edu.ec:3000/server/api/core/bitstreams/72704a2a-a7544741-8eff-70f99a7e9141/content>
- Chang, L. América, Y. Espinosa, A. y Melquíades, H. (2013). Caracterización fitoquímica y la evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de hojas y tallos de Solanum nigrum L. que crece en Cuba. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 44(4). 30-35.
<https://www.scielo.org.mx/pdf/rmcf/v44n4/v44n4a4.pdf>
- Chang, L., García, A., Rosabal, Y., Espinoza, A., Ramos, M., & Remon, H. (2013). Caracterización fitoquímica y la evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de hojas y tallos de Solanum nigrum L. que crece en Cuba.

- Revista Mexicana de Ciencias farmaceuticas*, 44(2), 30-35.
<https://www.scielo.org.mx/pdf/rmcf/v44n4/v44n4a4.pdf>
- Colina, A. (2016). Análisis fitoquímico, determinación cualitativa y cuantitativa de flavonoides y taninos, actividad antioxidante, antimicrobiana de las hojas de "Muehlenbeckia hastulata (J.E.Sm) I.M. Johnst" de la zona de Yucay (Cusco) [Tesis Ing. Químico, UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS].<https://core.ac.uk/download/pdf/323351821.pdf>
- Cordero, S. Abello, L. y Galvez, F. (2017). *Plantas silvestres comestibles y medicinales de Chile y otras partes del mundo*. Ed. Corporación Chilena de la Madera, Concepción, Chile, 292 p. https://ecoachibueno.cl/libros/guia-de-campo_plantassilvestres-comestibles-y-medicinales-de-chile-y-otras-partes-del-mundo1.pdf
- Departamento de Actualización Profesional, [DAP], (2017). *Productos tópicos con mentol. Riesgo de quemaduras raras pero graves. Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Santa Fe, Argentina*. <https://colfarsfe.org.ar/wp-content/uploads/2017/05/Farmacovigilancia.-Productos-to%CC%81picos-conmentol.pdf>
- D´Armas, H. (2015). *Evaluación de productos naturales orgánicos con posible actividad biológica, de las plantas medicinales Hierbaluisa (Lyppia citriodora, familia Verbenaceae) y Toronjil (Melissa officinalis, familia Labiatae)* [Universidad Técnica de Machala].
http://www.utmachala.edu.ec/archivos/planificacion/2014/prometeos/Dr.%20Hadelba%20D%C2%B4Armas/FIN%20VINCULACION%20Dra.%20D%20Armas/INFO RME-FINAL-VINCULACION_HTDA.pdf
- Duarte, A. Jiménez, J. Pineda, J. González, C. y García, M. (2020). Extracción de sustancias bioactivas de *Pleurotus ostreatus* (Pleurotaceae) por maceración dinámica. *Acta biol. Colomb*, 25(1), 61-74. DOI:
<http://dx.doi.org/10.15446/abc.v25n1.72409>
- Elansary, H. Szopa, A. Kubica, P. Ekiert, H. Szczykutoicz, M. El-Ansary, D. y Mahmoud, E. (2020). Polyphenol Profile and Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Natural *Mentha x piperita* and *Mentha longifolia* Populations in Northern Saudi Arabia. *Processes*, 8(4),479. <https://doi.org/10.3390/pr8040479>
- Espinoza, H. y Pincay, G. (2022). *Relación del extracto de Piper carpunya Y Momordica charantia sobre la inhibición de patógenos in vitro y el tipo de interacción* [Magister en Agroindustria, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria De Manabí Manuel Félix López]:
- Fikry, S. Khalil, N. y Salama, O. (2019). Chemical profiling, biostatic and biocidal dynamics of *Origanum vulgare* L. essential oil. *AMB Expr*, 9 (41).
<https://doi.org/10.1186/s13568-019-0764-y>
- Flores, E. Sáenz, A. Castañeda, A. y Narro, R. (2020). Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): su origen, importancia y generalidades de sus metabolitos secundarios. *Scielo*, 29. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.266>

- Fuel, R (2015). *Obtención de extracto de barbasco (Thephrosia sinapou), para su evaluación potencial como agente nematocida en tomate (Cyphomandra betacea)* [Ingeniero en Desarrollo Integral Agropecuario, Universidad Politécnica Estatal Del Carchi].
<http://repositorio.upec.edu.ec/bitstream/123456789/359/1/289%20Obtenci%C3%B3n%20de%20extracto%20de%20barbasco%20%28Thephrosia%20sinapou%29%20para%20su%20evaluaci%C3%B3n%20potencial%20como%20agente%20nematicida%20en%20tomate%20%28Cyphomandra%20betacea%29.pdf>
- García, A. Tamargo, B. Salas, E. Calzadilla, C. Acevedo, R. y Sierra, G. (2020). Tamizaje fitoquímico de extractos obtenidos de la planta Sapindus saponaria L que crece en Cuba. *Revista bionatura*, 5(3), 1209-1214.
<http://revistabionatura.com/files/2020.05.03.7.pdf>
- García, C. Martínez, A. Ortega, J. y Castro, F. (2020). Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Revista Química Viva*, (2), 86-96. <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v9n2/garcia.pdf>
- García, M. Jaramillo, J. Guajardo, J. Sánchez y Rodríguez, K. (2022). Perfil Fitoquímico y capacidad antioxidante de tés de flores de plantas medicinales. *Verano de la ciencia*, 1, 1-8.
<https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/3595/3091>
- García, P. Romero, M. Llanderal, A. Cermeño, P. Lao, M. y Segura, M. (2019). Effects of Drought Stress on Biomass, Essential Oil Content, Nutritional Parameters, and Costs of Production in Six Lamiaceae Species. *Water*, 11 (573), 1-12. doi:10.3390/w11030573
- Gonelimali, F. Lin, J. Miao, W. Xuan J. Charles, F. Chen, M. y Hatab, S. (2018). Antimicrobial Properties and Mechanism of Action of Some Plant Extracts Against Food Pathogens and Spoilage Microorganisms. *Front Microbiol.* 10.3389/fmicb.2018.01639
- González, L. Díaz, M. Castro, I. Fonte, L. Lugo, Y y Altunaga, N. (2019). Caracterización fitoquímica y actividad antioxidante total de diferentes extractos de Tithonia diversifolia (Hemsl) A. Gray. *Pastos y Forrajes*, 42(3). <http://orcid.org/0000-0001-6066-232X>
- Google Earth (2021). *Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López*.
https://earth.google.com/web/search/Escuela+Superior+Polit%c3%a9cnica+Agrop+ecuaria+de+Manab%c3%ad,+Calceta/@-0.82759103,-80.18480242,16.90926462a,1043.5466575d,35y,0h,0t,0r/data=CigiJgokCd2rt1WjXTNAEd2rt1WjXTPAGS_pVYiwGEIAISzpVYiwGENA
- Google Earth (2022). *Universidad Técnica de Manabí extensión Chone*.

https://earth.google.com/web/search/Universidad+T%c3%a9cnica+de+Manab%c3%ad+extensi%c3%b3n+Chone/@-0.6878028,-80.1237279,10.36563582a,1056.45707849d,35y,0h,45t,0r/data=CpsBGnESawoIMHg5MDJiYTIiZTUxOTM3NjgxOjB4MTIxMzczMWYwODI0YTYyNBI_HIMEewLmvyGTBm0o6wdUwCowVW5pdmVyc2lkYWQgVMOpY25pY2EgZGUgTWFuYWLDrsBleHRlbnNpw7NuIENob25lGAIgASImCiQJtzt0NpA96r8Rqh4OFU2M6r8ZgYwA ZFI LVMAhM4t1WYcMVMAoAg

- Górniak, I. Bartoszewski, R. y Króliczewski, J. (2019). Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Springer*, 18, 241–272. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11101-018-9591-z>
- Gutiérrez, M. (2016). *Solvente más utilizado para extraer extractos vegetales por el método de soxhlet es el etanol, sin embargo, cada solvente produce extractos y composiciones específicas* [Tesis Ingeniero en industrias agropecuarias, Universidad Técnica Particular De Loja]. <https://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/14425/1/Gutierrez%20Novillo%20Maria%20Augusta.pdf>
- Hammadi, A. y Adnan, H. (2021). Determination Antimicrobial Activity from Ethanolic Extract of *Mentha piperita* L. (peppermint). *SCIENTIFIC JOURNAL OF MEDICAL RESEARCH*, 5(17), 1-6. https://www.researchgate.net/publication/350043324_Determination_Antimicrobial_Activity_from_Ethanolic_Extract_of_Mentha_piperita_L_peppermint.
- Herbozo, R. (2015). *Evaluación del efecto antiséptico del enjuague bucal elaborado a base del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de *Mentha piperita* "menta" Frente al *Streptococcus mutans** [Tesis de químico farmacéutico, escuela de farmacia y bioquímica]. https://repositorio.uap.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12990/9825/Tesis_evaluaci%c3%b3n_efecto%20antis%c3%a9ptico_enjuague%20bucal_aceite%20esencial_hojas%20frescas_Mentha%20piperita_Streptococcus%20mutans.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Hernández, J. Zaragoza, A. López, G. Peláez, A. Olmedo, A. y Rivero, N. (2018). Actividad antibacteriana y sobre nematodos gastrointestinales de metabolitos secundarios vegetales: enfoque en Medicina Veterinaria. *Abanico veterinario*, 8(1). https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S244861322018000100014

- Herrera, C. (2020). *Principios activos de plantas medicinales con actividad antimicrobiana contra microorganismos de interés estomatológico: Una revisión* [Tesis Cirujano Dentista, Universidad César Vallejo].
[https://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12692/64829/Herrera_CC D R-SD.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12692/64829/Herrera_CC_D_R-SD.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Hui, Z. Shan, R. Han, Y. Shun, T. Chenyang, G. Maolun, L. Qiu, T. Tianqi, M, Haibi, X. (2022). Peppermint essential oil: its phytochemistry, biological activity, pharmacological effect and application. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 154.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113559>
- IDEXX (2022). *Guía microbiológica para interpretar la concentración mínima inhibitoria (CMI)*. <https://www.idexx.es/files/mic-gui%CC%81a-microbiolo%CC%81gica-es.pdf>
- Instituto de Salud Pública de Chile. ISPC. (2016). *Salmonella spp. 2012-2016*.
<https://www.ispch.cl/sites/default/files/BoletinSalmonella-23012017A.pdf>
- Jerez, N. (2018). *“Uso de plantas medicinales como tranquilizante en la Parroquia Salasaca”* [Tesis Licenciada en Enfermería, Universidad Técnica De Ambato].
<https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/27533/2/proyecto%20final%20b lioteca.pdf>
- Jiang, Z. Kempinski, C. y Chappell, J. (2016). Extraction and Analysis of Terpenes/Terpenoids. *Current Protocols In Plant Biology*.
<https://doi.org/10.1002/cppb.20024>
- Jiménez, A. Mora, K. Rosete, S. Y Cabrera, C. (2021). Utilización de plantas medicinales en cuatro localidades de la zona sur de Manabí, Ecuador. *Revista Científica Siembra* 8 (2).
<https://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/SIEMBRA/article/view/3223/4203>
- Khanal, B. (2019). *Phytochemical and Antibacterial Analysis of Mentha piperita (Peppermint)*. DOI:10.13140/RG.2.2.23973.73444
- Lagarto, A., Tillán, J., & Cabrera, Y. (1997). Toxicidad aguda oral del extracto fluido de *Mentha spicata* L. (hierbabuena). *Revista Cubana de Plantas medicinales*, 2(2), 68.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102847961997000200002#:~:text=El%20principio%20activo%20fundamental%20de,%20C%20mentona%20C%20felandreno%20y%20limoneno.
- Leyva, J. Pérez, J. González, G. Esqueda, M. y Ayala, J. (2013). Funcionalidad antibacteriana y antioxidante de extractos hidroalcohólicos de *Phellinus merrillii*. *Revista Mexicana De Micología*, 37, 11-17.
<https://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v37/v37a3.pdf>
- Lilia, S. Maria, M. Victoria, J. Tania, L. Mercedes, G. (2022). Composición fitoquímica y actividad antioxidante en tres variedades de albahaca por efecto de distintos

solventes. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*.
doi: 10.29312/remexca.v13i28.3267

Mahendran, G. y Rahman, L. (2020). Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological updates on Peppermint (*Mentha piperita* L.) A review. *Phytotherapy Research*, ptr.6664–. doi:10.1002/ptr.6664

Mahizan, N. Yang, S. Moo, C. Song, A. Chong, C. Chon, C. Abushelaibi, A. Lim, S. y Lai, K. (2019). Terpene Derivatives as a Potential Agent against Antimicrobial Resistance (AMR) Pathogens. *Molecules*, 24(14): doi: 10.3390/molecules24142631.

Mainasara, M. Bakar, M. Waziri, A. y Musa, A. (2018). Comparison of Phytochemical, Proximate and Mineral Composition of Fresh and Dried Peppermint (*Mentha piperita*) Leaves. *Journal of Science and Technology*, 10 (2), 85-91.

Malbrán, C (2012) Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución. *Servicios Antimicrobianos*, 32 (2).

Mamani, B. (2013). *Actividad antibacteriana de aceite esencial de Mentha spicata L. sobre flora mixta salival* [Cirujano Dentista, Universidad Nacional Mayor San Marcos].
https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/03/880049/actividadantibacteriana-de-aceite-esencial-de-mentha-spicata-l_CjZjAMP.pdf

Maque, Y. (2020). “*Avances científicos del efecto antimicrobiano de menta piperita L. (menta)*” [Tesis de bachiller en farmacia bioquímica universidad privada autónoma del sur]. <http://bolsa-trabajo.upads.edu.pe/bitstream/handle/UPADS/129/MAQUE%20CRUZ%20YAN ET H%20YOVANA%20-%20Bach..pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Marco, F. Liñares, J. y Miro, J. (2018). Utilidad de los estudios in vitro para seleccionar los estudios in vivo. *Modelos experimentales de patología infecciosa*, 11-22.
<https://www.esteve.org/wp-content/uploads/2018/01/136895.pdf>

Martínez, L. (2020). *Inmovilización de antimicrobianos de origen natural y su aplicación en la industria alimentaria* [Tesis en ciencia y tecnología de los alimentos, Universidad Politécnica De Valencia].
<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/148959/Mart%c3%adnez%20-%20Inmovilizaci%c3%b3n%20de%20antimicrobianos%20de%20origen%20natural%20y%20su%20aplicaci%c3%b3n%20en%20la%20industria%20al....pdf?sequence=2&isAllowed=y>

Mendiola, M. (2017). *Caracterización de compuestos bioactivos y efecto de la aplicación de pulsos eléctricos de moderada intensidad de campo en setas cultivadas en la Rioja* [Tesis Doctoral, Universitat de Lleida]

<https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/456031/Tmml1de1.pdf?sequence=2&isAllowed=y>

- Molina, V. Blanco, M. Titto, G. Corbalán, N. Vincent, P. Pomares, F. Eisenberg, P. (2014). Desarrollo de películas de celulosa microfibrilada con actividad antimicrobiana para la industria alimentaria. *Proceedings of the VIII CIADICYP*. https://www.researchgate.net/profile/Mariana-Blanco-Massani/publication/332072675_DESARROLLO_DE_PELICULAS_DE_CELULOSA_MICROFIBRILADA_CON_ACTIVIDAD_ANTIMICROBIANA_PARA_LA_INDUSTRIA_ALIMENTARIA/links/5c9def8f299bf111694e40fa/DESARROLLO-DEPELICULAS-DE-CELULOSA-MICROFIBRILADA-CON-ACTIVIDAD-ANTIMICROBIANA-PARA-LA-INDUSTRIA-ALIMENTARIA.pdf
- Mollejo, V. (2020). Todas las propiedades de la menta que, a día de hoy se desconoce. *Revista Científica El Confidencial*. https://www.alimente.elconfidencial.com/bienestar/2020-04-26/menta-propiedadesbeneficios_1900346/
- Moncayo, L. (2007). *Las bondades curativas de las plantas medicinales y su utilización en la ciudad de Ambato* [Tesis Ingeniero en Alimentos, Universidad Técnica De Ambato]. https://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/06/998020/las-bondadescurativas-de-las-plantas-medicinales-y-su-utilizac_bL8cA8K.pdf
- Morro, N. (2021). *Distillation and extraction of herbs from Lamiaceae family*. [Tesis Ingeniero Químico, Universidad De Valladolid]. <https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/47817/TFG-I-1899.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Murillo, D. (2018). *Inventario de la biodiversidad de plantas medicinales en el área rural del sur de Manabí* [Tesis Ingeniero En Medio Ambiente, Universidad Estatal Del Sur De Manabí]. <http://repositorio.unesum.edu.ec/bitstream/53000/1431/1/UNESUMECUA-ING.MEDIO-53.pdf>
- Mutlu-Ingok, A. Devocioglu, D. Dikmetas, DN. Karbancioglu-Guler, F. y Capanoglu, E. (2020). Antibacterial, Antifungal, Antimycotoxigenic, and Antioxidant Activities of Essential Oils: *An Updated Review*. *Molecules*. 25(20). 10.3390/molecules2520471 Normativa Técnica Ecuatoriana INEN. (2017). *NTE INEN-ISO 856*. https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_iso_856.pdf
- Okmen, A. Okmen, G. Arslan, A. y Vurkun, M. (2017). Antibacterial Activities of Mentha piperita L. Extracts Against Bacteria Isolated from Soccer Player's Shoes and its Antioxidant Activities. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 51(3). DOI:10.5530/ijper.51.3s.5

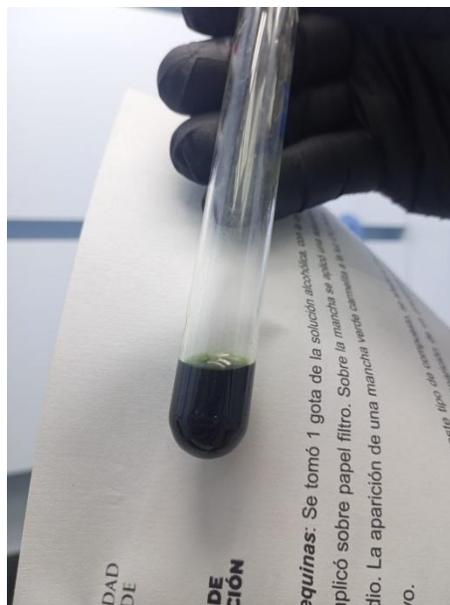
- Organización Mundial de la salud [OMS]. (2020). *Inocuidad de los alimentos*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- Pabón, L. Vanegas, J. Rendón, M. Santos, R. y Hernández, P. (2013). Actividad antioxidante y antibacteriana de extractos de hojas de cuatro especies agroforestales de la Orinoquía colombiana. *Rev Cubana Plant Med*, 18 (1). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962013000100008
- Patil, S. Patil, R. y Godhate, A. (2016). Mentha piperita linn: phytochemical, antibacterial and dipterian adulticidal approach. *Innovare Academic Sciences* . <https://journals.innovareacademics.in/index.php/ijpps/article/view/10370/4868#:~:text=Results%3A%20The%20Mentha%20piperita%20were,phenols%2C%20coumarin%2C%20and%20saponin.>
- Pava, T. (2016). *Actividad antimicrobiana de extractos de Allium sativum Y Zingiber officinale sobre microorganismos de importancia en patologías infecciosas de cavidad oral* [Bacterióloga, Pontificia Universidad Javeriana]. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/20405/PavaAngelTatian a2016%20%281%29.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- PNUD, (2022). *Los ODS en acción. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo*. <https://www.undp.org/es/sustainable-development-goals>
- Pramila, Xavier. Marimuthu, K. Khoo, S. Senthilkumar, S. y Sreeramanan, S. (2012). Phytochemical analysis and antimicrobial potential of methanolic leaf extract of peppermint (Mentha piperita: Lamiaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(2), 331-335. 10.5897/JMPR11.1232
- Quispe, D. (2016). *Uso terapéutico de Menta piperita (menta) en pobladores del asentamiento humano las lomas de la pradera. Pimentel. Chiclayo, setiembre 2014 – septiembre 2015* [Tesis Químico Farmacéutico, Universidad Católica De Los Ángeles Chimbote]. https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/10/915645/usoterapeutico-de-menta-piperita-menta-en-pobladores-del-asent_eRypfJU.pdf
- Ramírez, M. Vargas, R. Torres, B. Torrescano, G. y Sánchez, A. Extractos de hojas de plantas para conservar la calidad de la carne y los productos cárnicos frescos. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud Biotecnia*. <https://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/article/view/712/279>
- Ramos, K. y Portal, O. (2017). Metabolitos secundarios de las Plantas, una alternativa para el manejo de enfermedades en cultivos de interés económico. *Editorial académica española*. https://www.researchgate.net/publication/341295118_Metabolitos_secundarios_de_las_Plantas_una_alternativa_para_el_manejo_de_enfermedades_en_cultivos_de_interes_economico
- Rosa, H. Fidelia, T. Maria, C y Guido, N. (2021). Perfil químico y actividad antioxidante de aceites esenciales de hierbas aromáticas altoandinas del Perú. *Revista de*

- investigación en ciencias Agronómicas y veterinarias.*
<http://www.scielo.org.bo/pdf/arca/v5n14/2664-0902-arca-5-14-153.pdf>
- Reyes, E. y Moreira, J. (2017). Metabolitos secundarios en las plantas medicinales usadas para problemas gastrointestinales. Una revisión sobre medicina ancestral Ecuatoriana. *Revista Bases de la Ciencia*.
<https://revistas.utm.edu.ec/index.php/Basedelaciencia/article/download/1036/974/2605>
- Rivas, D. Dueñas, A. y Rodríguez, J. (2020). Secondary metabolites and antioxidant activity of wild to-matillo (*Solanum pimpinellifolium* L.). *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería*, (2), 26-32. <https://doi.org/10.22209/rt.ve2020n2a04>.
- Rodríguez, O y López, O. (2021). Extractos de plantas microencapsuladas con potencial actividad antiviral: una revisión general. *Revista investigación y desarrollo I+D*, 14, 45 - 58 •
<https://revistas.uta.edu.ec/erevista/index.php/dide/article/view/1326/1646>
- Sabando, L. (2020). *Efecto antimicrobiano in vitro del extracto de hojas de icaco en bacterias mesófilas (Salmonella spp, Escherichia coli, Staphylococcus aureus)* [Tesis Ing. Agroindustrial, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria De Manabí Manuel Félix López].
<https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/1288/1/TTAI08D.pdf>
- Sabando, L. (2020). *Efecto antimicrobiano in vitro del extracto de hojas de icaco en bacterias mesófilas (Salmonella spp, Escherichia coli, Staphylococcus aureus)* [Tesis Ing. Agroindustrial, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria De Manabí Manuel Félix López].
<https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/1288/1/TTAI08D.pdf>
- Sailema, M. Palacios, R. Zambrano, C. Salazar, E. y Carrera, W. (2023). Efecto de solvente y temperatura para la extracción de compuestos fenólicos en hojas de fresa. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 7(3), 2563-2575.
https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v7i3.6365
- Sampaio, B y Da Costa, F. (2018). Influence of abiotic environmental factors on the main constituents of the volatile oils of *Tithonia diversifolia*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 28, 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.02.005>
- Sánchez, Y, Rivera, J. Luna, M. y Conde, L. (2023). Análisis de terpenos en aceites esenciales obtenidos mediante extracción por microondas. *Acta de ciencia en salud*.<https://actadecienciaensalud.cutonala.udg.mx/index.php/ACS/article/download/183/113/639>
- Sanz, M. y Soria, A. (2019). Estrategias analíticas avanzadas de obtención y análisis de compuestos bioactivos en muestras de origen vegetal [Tesis Doctoral, Universidad Complutense De Madrid].
<https://eprints.ucm.es/id/eprint/58144/1/T41539.pdf>
- Shalayel, H. Asaad, m. Qureshi, A. y Elhussein, B. r (2016). Anti-bacterial activity of peppermint (*Mentha piperita*) extracts against some emerging multi-drug resistant

- human bacterial pathogens. *Journal of Herbal Medicine*. doi:10.1016/j.hermed.2016.08.003
- Singh, A. (2008). *A Note on Variation of Active Principles in Indian Medicinal Plants and TIM Formulations. Ethnobotanical Leaflets*, 12. <https://opensiuc.lib.siu.edu/cgi/viewcontent.cgi?referer=&httpsredir=1&article=1115&context=ebl#:~:text=The%20active%20principles%20or%20constituents,inhibit%20bacterial%20or%20fungal%20pathogens.>
- Soto, Z. Pérez, L y Estrada, D. (2016). Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia. *Salud Uninorte*, 32 (1), 105-122. DOI: <https://doi.org/10.14482/sun.32.1.8598>
- Sujana, P. Muneppa, T. Josthna, P. y Varadarajulu, C. (2013). Antibacterial Activity and Phytochemical Analysis of *Mentha piperita* L. (Peppermint)—An Important Multipurpose Medicinal Plant. *American Journal of Plant Sciences*, 4(1). DOI:10.4236/ajps.2013.41012
- Unalan, I. Slavik, B. Buettner, A. Goldman, Frank, G. Boccacini, A. (2019). Physical and Antibacterial Properties of Peppermint Essential Oil Loaded Poly (ϵ -caprolactone) (PCL) Electrospun Fiber Mats for Wound Healing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3 (346). 10.3389/fbioe.2019.00346
- Vélez, J. (2015). *Extracción, caracterización y actividad biológica de los metabolitos secundarios mayoritarios en hojas de Bixa Orellana* [Magister en Ciencias Químicas]. <https://bibliotecadigital.univalle.edu.co/bitstream/handle/10893/15324/CB0534711.pdf?sequence=1>
- Vera, S y Álvarez, D. (2021). *Evaluación de la viabilidad técnico-financiera para la obtención de terpenos partiendo del cannabis mediante una revisión del arte* [Ingeniero Químico, Fundación Universidad De América]. <https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/8294/1/6181819-20211-IQ.pdf>
- Vera, J. Dueñas, A. Rodríguez, J. y Radice, M. (2022). Phytochemical characterization of the extracts, antioxidant activity, phenolic content and toxicity of the essential oil of *Curcuma longa* L. *Revista de la facultad de Agronomía*, 39(1), 1-7. DOI: [https://doi.org/10.47280/RevFacAgron\(LUZ\).v39.n1.06](https://doi.org/10.47280/RevFacAgron(LUZ).v39.n1.06)
- Waleed, D. (2023). Characterization of Peppermint Plant Extract and Antimicrobial Activity. *E3S Web of Conferences*, 391. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202339101120>
- Wenji, K. Rukmi, I. y Supriyadi, A. (2019). In vitro Antifungal Activity of Methanolic and Chloroform Mint Leaves (*Mentha piperita* L.) Extracts Against *Candida albicans*. *Journal of Physics: Conference Series*, 1-7. doi:10.1088/1742-6596/1217/1/012136

- Yáñez, P y Clavijo, J. (2017). Plantas frecuentemente utilizadas en zonas rurales de la Región Amazónica centro occidental de Ecuador. *INNOVA Research Journal*, 2 (6), 9-21.
- Zambrano, A. (2015). *Estudio farmacognóstico y composición proximal de Cymbopogon citratus (hierba luisa), melissa officinalis (toronjil) y lippia citriodora (cedrón) proveniente de las provincias del Oro y Azuay, Ecuador* [Tesis Bioquímica Farmacéutica, Universidad Técnica De Machala]. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/2795/3/CD00000-7-TRABAJO%20COMPLETO.pdf>
- Zendejas, G. Avalos, H. y Soto M. (2014). Microbiología general de Staphylococcus aureus: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Rev Biomed*, 25, 129-143. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2014/bio143d.pdf>
- Zotta, C., Lavayén, S., Nario, F., y Piquín, A. (2016). Detección de Echerichia coli productor de toxina Shiga en vísceras en animales bovinos y pollos destinados para el consumo humano. *Revista Journal of the Selva Andina Research Society*, 7, 2 - 9. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2072-92942016000100002
- Zuni, J. (2017). Actividad antibacteriana “in vitro” del aceite esencial de menta (Mentha piperita L.) frente a Escherichia coli Enteropatógena (EPEC). *Revista de Investigaciones de la Escuela de Posgrado*, 6(3), 244-254. DOI: <http://dx.doi.org/10.26788/riepg.2017.47>

ANEXOS

Anexo 1. Determinación de saponinas**Anexo 2.** Determinación de fenoles y taninos**Anexo 3.** Determinación de flavonoides**Anexo 4.** Determinación de terpenos

Anexo 5. Recolección de la materia prima



Anexo 6. Lavado de las hojas



Anexo 7. Dsecado de las hojas



Anexo 8. Deshidratado de las hojas



Anexo 9. Humedad de las hojas deshidratadas



Anexo 10. Tamizado



Anexo 11. Pesado



Anexo 12. Extracción en el equipo Soxhlet



Anexo 13. Evaporación



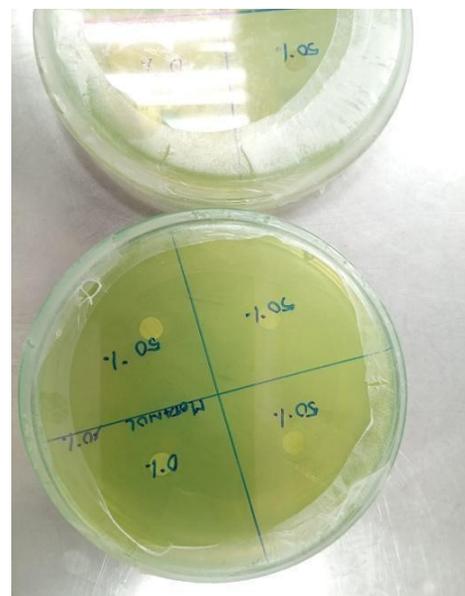
Anexo 14. Envasado



Anexo 15. Halos de inhibición



Anexo 16. Halos de inhibición



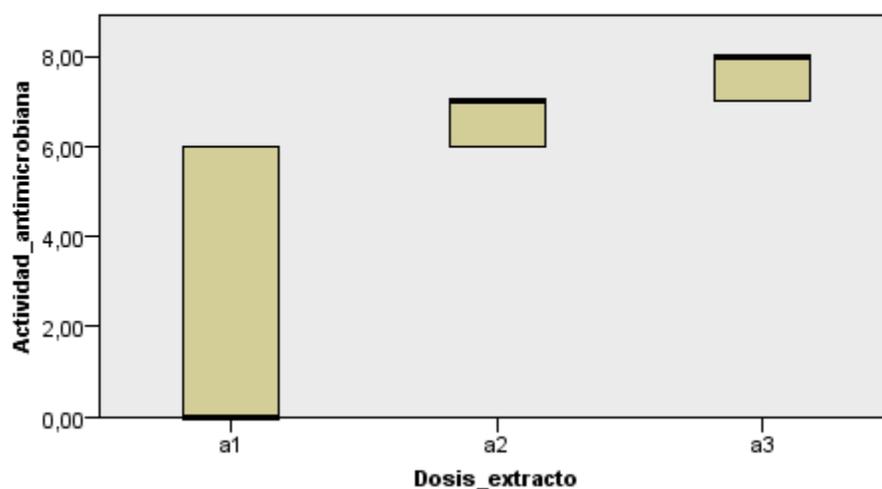
Anexo 16. Prueba de los supuestos de ANOVA para la variable actividad antimicrobiana

	Shapiro-Wilk			Levene
	Estadístico	gl	Sig.	Sig.
Actividad antimicrobiana (mm)	0.688	27	0.000	-

Anexo 17. Prueba de Kruskal-Wallis para el factor A en los programas SPSS e InfoStat

Resumen de prueba de hipótesis				
	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de Actividad_antimicrobiana es la misma entre las categorías de Dosis_extracto.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	,000	Rechazar la hipótesis nula.
Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.				

Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes



Variable	%Dosis de extracto	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	gl	C	H	p
Actividad antimicrobiana	25	9	2.00	3.00	0.00	5.50	2	0.92	18.82	<0.0001
Actividad antimicrobiana	50	9	6.67	0.50	7.00	14.83				
Actividad antimicrobiana	100	9	7.56	0.53	8.00	21.67				

Trat. Ranks

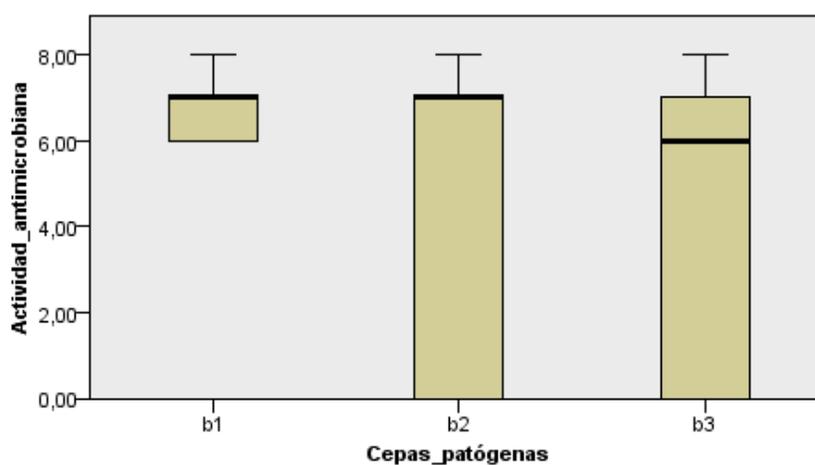
25	5.50	A
50	14.83	B
100	21.67	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 18. Prueba de Kruskal-Wallis para el factor B en los programas SPSS e InfoStat

Resumen de prueba de hipótesis				
	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de Actividad_antimicrobiana es la misma entre las categorías de Cepas_patógenas.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	,425	Retener la hipótesis nula.
Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.				

Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes

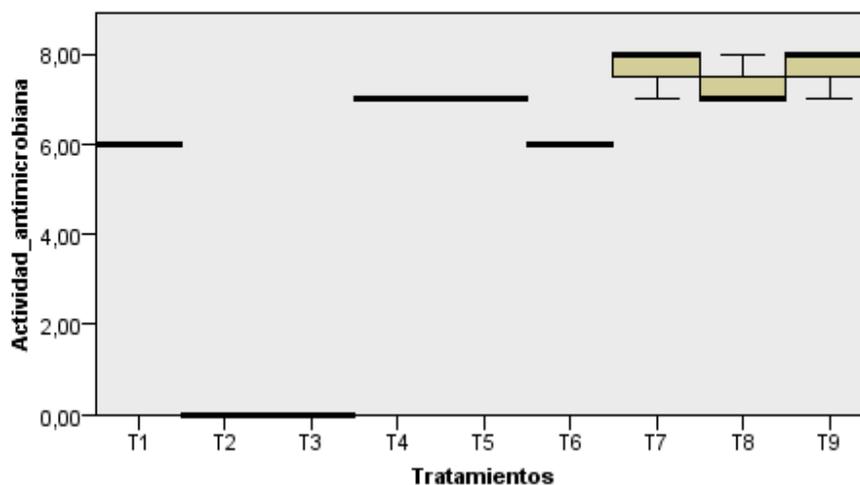


Variable	Cepas Patógenas	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	gl	C	H	p
Actividad antimicrobiana	E.coli	9	6.89	0.78	7.00	16.50	2	0.92	1.58	0.4247
Actividad antimicrobiana	Salmonella	9	4.56	3.50	6.00	11.83				
Actividad antimicrobiana	Staphylococcus aureus	9	4.78	3.60	7.00	13.67				

Anexo 19. Prueba de Kruskal-Wallis para el factor A en los programas SPSS e InfoStat

Resumen de prueba de hipótesis				
	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de Actividad_antimicrobiana es la misma entre las categorías de Tratamientos.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	,002	Rechazar la hipótesis nula.
Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.				

Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes



Variable	Tratamientos	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	gl	C	H	p
Actividad antimicrobiana	T1	3	6.00	0.00	6.00	9.50	8	0.92	22.19	0.0022
Actividad antimicrobiana	T2	3	0.00	0.00	0.00	3.50				
Actividad antimicrobiana	T3	3	0.00	0.00	0.00	3.50				
Actividad antimicrobiana	T4	3	7.00	0.00	7.00	17.50				
Actividad antimicrobiana	T5	3	7.00	0.00	7.00	17.50				
Actividad antimicrobiana	T6	3	6.00	0.00	6.00	9.50				
Actividad antimicrobiana	T7	3	7.67	0.58	8.00	22.50				
Actividad antimicrobiana	T8	3	7.33	0.58	7.00	20.00				
Actividad antimicrobiana	T9	3	7.67	0.58	8.00	22.50				

Trat. Ranks

T3	3.50	A
T2	3.50	A
T1	9.50	A B
T6	9.50	A B
T5	17.50	B C
T4	17.50	B C
T8	20.00	B C
T9	22.50	C
T7	22.50	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)



FCZ-LAB

Investigamos para cambiar el sector Agropecuario

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ FACULTAD DE CIENCIAS ZOOTÉCNICAS EXTENSIÓN CHONE

Cliente	José Luis Veliz Marcillo Everson Dorian Menéndez Macay	Fecha de recibido: 14/08/2023 Fecha de análisis: 15/08/2023 Fecha de reporte: 18/01/2024
Dirección	Calceta	 MARIO JAVIER SOBILLA LOOR Responsable de los Laboratorios de la FCZ - LAB Autorizado y revisado
Teléfono	0998129092	
Muestra	Extractos de menta	
Cantidad recibida	100mL	
Objetivo del análisis	Realizar análisis - funcional y fitoquímico de extractos de menta	

Metanol 99%

Concentración (%)	Diámetro de inhibición (mm)			Microorganismo
	1	2	3	
0	0	0	0	E. coli ATCC 25922TM
25	6	6	6	
50	7	7	7	
100	8	8	7	
Control (Ampicilina)	20	21	20	

Metanol 99%

Concentración (%)	Diámetro de inhibición (mm)			Microorganismo
	1	2	3	
0	0	0	0	S. aureus
25	0	0	0	
50	7	7	7	
100	7	8	7	
Control (Ampicilina)	20	21	20	



FCZ-LAB

Investigamos para cambiar el sector Agropecuario

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ FACULTAD DE CIENCIAS ZOOTÉCNICAS EXTENSIÓN CHONE

Cliente	José Luis Veliz Marillo Everson Dorian Menéndez Macay	Fecha de recibido: 14/08/2023 Fecha de análisis: 15/08/2023 Fecha de reporte: 18/01/2024
Dirección	Calceta	 <small>MARCO JAVIER RODRÍGUEZ LABOR</small>
Teléfono	0998129092	
Muestra	Extractos de menta	
Cantidad recibida	100mL	
Objetivo del análisis	Realizar análisis - funcional y fitoquímico de extractos de menta	
		Responsable de los Laboratorios de la FCZ - LAB Autorizado y revisado

Metanol 99%

Concentración (%)	Diámetro de inhibición (mm)			Microorganismo
	1	2	3	
0	0	0	0	Salmonella
25	0	0	0	
50	6	6	6	
100	7	8	8	
Control (Ampicilina)	22	20	21	

Tamizaje Fitoquímico

Metabolito	Fración Metanólica 99%
Flavonoides	++
Saponinas	+
Fenoles	+++
Taninos	++
Terpenos	+
Poca presencia (+), presencia moderada (++) y mucha presencia (+++)	