

# UCUENCA

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

“Cuantificación de la actividad antibacteriana de aceites esenciales frente a *Escherichia coli* ATCCC 25922 y *Escherichia coli* portadora de betalactamasas de espectro extendido.”

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico

**Autoras:**

Joseline Karina Avila Gualpa

CI: 0105916886

Correo electrónico: jkarinavilag@gmail.com Ángela

Cynthia Guzmán Gaona

CI: 1726761610

Correo electrónico: angela90guzman@gmail.com

**Tutor:**

Ing. David Enrique Vanegas Jácome

CI: 0104046057

**Cuenca, Ecuador**

11-enero-2023

## RESUMEN

La resistencia a antibióticos por la producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) de *Escherichia coli* se ha convertido en una amenaza para la salud pública. Frente a esta situación, el uso de aceites esenciales (AE) es considerado como una nueva alternativa terapéutica para contrarrestar este problema. El método más utilizado para determinar la actividad antimicrobiana de AE, es la técnica de microdilución en placa, que permite determinar la concentración inhibitoria (CI) al 50 % y al 90 %, a partir de la medición de la turbidez en un lector de microplacas; sin embargo, esto genera un elevado margen de error en la cuantificación bacteriana, razón por la cual es recomendado utilizar indicadores de "viabilidad celular" como el bromuro de 3- (4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) y la resazurina.

En el presente estudio se evaluó la actividad antibacteriana (CI 50 % y CI 90 %) de nueve aceites esenciales frente a *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* productora de BLEE por medio de la técnica de microdilución en caldo utilizando indicadores como el MTT y resazurina, con el fin de analizar que indicador es ideal para la cuantificación de la actividad antibacteriana. Se utilizó AE comerciales de *Cinnamomum casia*, *Citrus limonum*, *Mentha spicata*, *Pogostemon cablin*, *Cymbopogon flexuosos* y AE obtenidos a partir de la hidrodestilación de *Clinopodium nubigenum*, *Aloysia citriodora*, *Pimpinella anisum* y *Zingiber officinale*.

Los aceites esenciales de *A. citriodora*, *M. spicata*, *C. casia*, *Z. officinale*, *C. flexuosos* y *C. nubigenum* se estimó que presentan actividad antibacteriana frente a *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* productora de BLEE, a diferencia de *C. limonum*, *P. cablin* y *P. anisum* que resultaron inactivos a las concentraciones estudiadas utilizando MTT. Además, se determinó que la técnica utilizando MTT a una lectura de 450 nm presenta un porcentaje de coeficiente de variación menor que la resazurina a una lectura de 560 a 590 nm.

**Palabras clave:** Aceites esenciales. Microdilución. MTT. Resazurina. CI 50 %. CI 90 %.

## ABSTRACT

Antibiotic resistance due to the production of the extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) by *Escherichia coli* has become a threat to public health. For this reason, the use of essential oils (EOs) is considered a new therapeutic alternative to counteract this problem. The most widely used method to determine the antimicrobial activity of EOs is the plate microdilution technique, which allows to determinate the inhibitory concentration (IC) at 50 % and 90 %, from the measurement of turbidity in a microplate reader. However, this generates a high margin of error in bacterial quantification, which is why it is recommended to use cell viability indicators such as 3- (4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and resazurin.

In the present study, the antibacterial activity (IC 50 % and IC 90 %) of nine EOs against *E. coli* ATCC 25922 and ESBL-producing *E. coli* was evaluated with the microdilution technique using indicators such as MTT and resazurin in order to analyze which indicator is ideal for the quantification of the activity. Commercial EOs from *Cinnamon cassia*, *Citrus limonum*, *Mentha spicata*, *Pogostemon cablin*, *Cymbopogon flexuosos* and EOs obtained from the hydrodistillation of *Clinopodium nubigenum*, *Aloysia citriodora*, *Pimpinella anisum* and *Zingiber officinale* were used.

Essential oils from *A. citriodora*, *M. spicata*, *C. cassia*, *Z. officinale*, *C. flexuosos* and *C. nubigenum* were estimated to have antibacterial activity against *E. coli* ATCC 25922 and ESBL-producing *E. coli*, different to *C. limonum*, *P. cablin* and *P. anisum*. In addition, it was determined that the technique using MTT at a wavelength of 450 nm presents a lower percentage of coefficient of variation than resazurin at a wavelength of 560 to 590 nm.

**Keywords:** Essential oils. Microdilution. MTT. Resazurin. IC 50 %. IC 90 %.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN .....	2
ABSTRACT .....	3
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	4
ÍNDICE DE TABLAS .....	7
ÍNDICE DE FIGURAS .....	8
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES .....	9
DEDICATORIA.....	14
AGRADECIMIENTOS.....	15
INTRODUCCIÓN .....	16
Objetivo general.....	18
Objetivos específicos .....	18
1 MARCO TEÓRICO.....	19
1.1 Plantas medicinales.....	19
1.2 Aceites esenciales.....	23
1.2.1 Clasificación de los aceites esenciales .....	23
1.2.1.1 Según la consistencia.....	23
1.2.1.2 Según el origen .....	23
1.2.2 Características físicas de los aceites esenciales.....	23
1.2.3 Características químicas de los aceites esenciales .....	24
1.2.4 Usos de los aceites esenciales .....	24
1.3 Propiedades de los aceites esenciales.....	24
1.4 Métodos de extracción de los aceites esenciales .....	27
1.4.1 Extracción con solventes volátiles.....	27
1.4.2 Prensado.....	27
1.4.3 Microondas .....	27
1.4.4 Fluidos supercríticos .....	27

# UCUENCA

1.4.5	Destilación con arrastre de vapor.....	28
1.4.6	Hidrodestilación .....	28
2	METODOLOGÍA.....	29
2.1	Materiales.....	29
2.1.1	Materia vegetal.....	29
2.1.2	Recolectado .....	29
2.1.3	Comprado .....	29
2.1.4	Aceites esenciales comerciales.....	29
2.1.5	Reactivos .....	30
2.1.6	Equipos.....	30
2.2	Cepas bacterianas utilizadas .....	30
2.3	Métodos.....	31
2.3.1	Procesamiento de la droga vegetal.....	31
2.3.2	Obtención del aceite esencial .....	31
2.3.2.1	Trituración .....	31
2.3.2.2	Hidrodestilación.....	31
2.3.3	Determinación de la actividad antibacteriana.....	32
2.3.3.1	Preparación del cryostock .....	32
2.3.3.2	Determinación del peso del aceite esencial.....	32
2.3.3.3	Microdilución .....	33
	Preparación del inóculo bacteriano .....	33
	Preparación de controles .....	34
2.3.4	Pruebas preliminares para el uso de indicadores MTT y resazurina.....	35
2.3.4.1	Tiempo de incubación y homogeneización de la microplaca con resazurina 35	
2.3.4.2	Tiempo de incubación de la microplaca con MTT.....	36
2.3.4.3	Longitud de onda para la lectura de la microplaca con MTT .....	37
2.3.5	Indicadores para la cuantificación de la actividad antibacteriana.....	37
2.3.5.1	Microplacas con resazurina .....	37
2.3.5.2	Microplacas con MTT .....	38
2.4	Análisis estadístico .....	38
2.5	Cálculos.....	39
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	41

# UCUENCA

3.1 Lecturas de los controles de la microplaca con MTT y resazurina.....	41
portadora de BLEE utilizando como indicadores MTT y resazurina. ....	43
3.3 Análisis estadístico .....	47
3.4 Resultados del %I, CI 50 % y CI 90 %.....	47
4 CONCLUSIONES.....	52
5 RECOMENDACIONES .....	53
6 BIBLIOGRAFÍA.....	54

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Información botánica y usos medicinales de las plantas utilizadas en el presente estudio.	20
<b>Tabla 2.</b> Actividad antibacteriana de los aceites esenciales utilizados en el presente estudio.	26
<b>Tabla 3.</b> Plantas recolectadas.	29
<b>Tabla 4.</b> Plantas compradas.	29
<b>Tabla 5.</b> Aceites esenciales comerciales.	30
<b>Tabla 6.</b> Resultados del control positivo utilizando como cepa bacteriana E. coli.	41
<b>Tabla 7.</b> Resultados del control positivo utilizando como cepa bacteriana E. coli.	41
<b>Tabla 8.</b> Resultados del control negativo utilizando como cepa bacteriana E. coli.	41
<b>Tabla 9.</b> Resultados del control de esterilidad del medio utilizando como cepa bacteriana E. coli ATCC 25922 e indicador MTT y resazurina.	42
<b>Tabla 10.</b> Resultados del control positivo utilizando como cepa bacteriana E. coli.	42
<b>Tabla 11.</b> Resultados del control positivo utilizando como cepa bacteriana E. coli.	42
<b>Tabla 12.</b> Resultados del control negativo utilizando como cepa bacteriana E. coli.	43
<b>Tabla 13.</b> Resultados del control de esterilidad del medio utilizando como cepa bacteriana E. coli portadora de BLEE e indicador MTT y resazurina.	43
<b>Tabla 14.</b> Resultados de las lecturas de los pocillos con los AE frente a E. coli ATCC 25922 utilizando como indicadores MTT y resazurina.	43
<b>Tabla 15.</b> Resultados de las lecturas de los pocillos con los AE frente a E. coli portadora de BLEE utilizando como indicadores MTT y Resazurina.	45
<b>Tabla 16.</b> Resultados de la CI 50 % y CI 90 % frente a E. coli ATCC 25922 y portadora de BLEE.	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama de flujo de la preparación de diluciones. Fuente: Autores.....	33
<b>Figura 2.</b> Preparación del control de antibiótico. Fuente: Autores. ....	34
<b>Figura 3.</b> Preparación de la microplaca. Fuente: Autores. ....	35
<b>Figura 4.</b> Barrido espectral de microplaca utilizando MTT .....	37
<b>Figura 5.</b> Diagrama de microplacas con cada indicador y su respectiva lectura. ....	38
<b>Figura 6.</b> Efecto de la concentración de los AE de canela, cedrón, hierba luisa, jengibre, menta y tipo sobre E. coli ATCC 25922. Fuente: autores.....	48
<b>Figura 7.</b> Efecto de la concentración de los AE de canela, cedrón, hierba luisa, jengibre, tipo y menta sobre E. coli portadora de BLEE. Fuente: autores.....	49



## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<b>Ilustración 1.</b> Formación de dos fases utilizando resazurina. Fuente: Autores.....	35
<b>Ilustración 2.</b> Cambio de coloración del control de esterilidad del medio después de los 30 min. Fuente: Autores.....	36

## Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

---

Yo, **Joseline Karina Avila Gualpa**, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "**Cuantificación de la actividad antibacteriana de aceites esenciales frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* portadora de betalactamasas de espectro extendido**", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 11 de enero de 2023



---

**Joseline Karina Avila Gualpa**

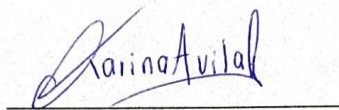
**C.I: 0105916886**

## Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Yo, **Joseline Karina Avila Gualpa**, autora del trabajo de titulación "**Cuantificación de la actividad antibacteriana de aceites esenciales frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* portadora de betalactamasas de espectro extendido**", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 11 de enero de 2023



**Joseline Karina Avila Gualpa**

C.I: 0105916886

## Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

---

Yo, **Ángela Cynthia Guzmán Gaona** en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "**Cuantificación de la actividad antibacteriana de aceites esenciales frente a *Escherichia coli* ATCCC 25922 y *Escherichia coli* portadora de betalactamasas de espectro extendido**", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 11 de enero de 2023



Ángela Cynthia Guzmán Gaona

C.I: 1726761610

## Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Yo, **Ángela Cynthia Guzmán Gaona**, autora del trabajo de titulación "**Cuantificación de la actividad antibacteriana de aceites esenciales frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* portadora de betalactamasas de espectro extendido**", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 11 de enero de 2023



---

Ángela Cynthia Guzmán Gaona

C.I: 1726761610

## DEDICATORIA

A Dios, a mi abuelita Tránsito y mis padres Gerardo y Mayra por su gran amor y por ser mi mayor soporte y fortaleza incondicional durante todo mi camino enseñándome que nada me puede derrotar.

A mi hermana Renata Valentina, que ilumina mi vida y es mi mayor inspiración en el mundo para superarme.

A mis mascotas que me han acompañado con su luz y lealtad y a mis amigos que me recuerdan siempre que puedo lograr grandes cosas.

Los amo,

Karina Avila G.

A Dios y mis padres que siempre fueron incondicionales, por su amor, paciencia, enseñanzas, esfuerzo y apoyo durante toda mi vida en cada paso que doy.

Angela Guzmán G.



## AGRADECIMIENTOS

A Dios y nuestra familia por ser nuestra inspiración y fortaleza a lo largo de nuestra carrera universitaria.

Especialmente a nuestro tutor Ingeniero David Vanegas por su confianza, paciencia, enseñanzas, al ser nuestro soporte y guía durante toda la realización del trabajo.

De manera especial a la Dra. Lourdes Jerves por brindarnos su conocimiento, sabiduría y con paciencia asesorarnos durante el proyecto.

Al Dr. Fabian León por su atención y gran disposición para solventar cada duda presentada, brindándonos su conocimiento y recomendaciones.

A la Dra. Andrea Abril que fue incondicional y paciente durante toda la ejecución del trabajo de titulación, al ayudarnos, comprendernos, enseñarnos y brindarnos todos sus conocimientos.

A la Dra. Jessica Calle y Dra. Salome Zea por su gran disposición, tiempo y colaboración a lo largo de toda esta etapa.

A nuestros amigos que estuvieron para darnos ánimos y escucharnos en cada dificultad que se presentó.

Con cariño Karina y Angela.

## INTRODUCCIÓN

Los antibióticos fueron el gran descubrimiento del siglo XX, desde entonces transformaron la medicina moderna y han salvado millones de vidas. Sin embargo, décadas después, las infecciones bacterianas se han convertido nuevamente en una amenaza debido a que las bacterias han generado diferentes mecanismos de resistencia por el uso inadecuado y excesivo de estos medicamentos (Davies & Davies, 2010; Ventola, 2015).

La resistencia microbiana mediante la producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) es la más común y de importancia en la salud pública (Tejada et al., 2015). Estas enzimas hidrolizan el anillo beta-lactámico evitando la acción de los antibióticos betalactámicos y son producidas por bacterias Gram negativas, como por ejemplo *Escherichia coli*. Las opciones terapéuticas para contrarrestar una infección por *E. coli* productora de BLEE se han vuelto más limitadas, sobrepasando la barrera hospitalaria hasta la comunidad, este inconveniente se acentúa cada vez más, razón por la cual es necesario implementar otras alternativas terapéuticas. Entre ellas, la búsqueda de nuevos medicamentos a partir de productos naturales, como los aceites esenciales (AE) (Aguilar, 2015).

Los AE son metabolitos secundarios sintetizados por las plantas como mecanismo de defensa, al actuar como agentes antibacterianos, antivirales, antifúngicos e insecticidas. Su composición es compleja, consiste en una mezcla de sustancias orgánicas como hidrocarburos, alcoholes, cetonas, ésteres, etc. (Torrenegra et al., 2017). Sin embargo, entre los constituyentes principales se encuentran los monoterpenos, sesquiterpenos y compuestos fenólicos (Muntean et al., 2019). Estas sustancias se pueden almacenar en diferentes órganos de la planta como flores, hojas, frutos, semillas o raíces, pero en diferentes concentraciones. En total las plantas poseen aproximadamente tan solo el 1 % de aceite volátil; además, no todas las familias son productoras, las más representativas son Lamiaceae, Apiaceae, Myrtaceae, Zingiberaceae, Lauraceae, Rutaceae, Asteraceae y Cupressaceae (Muntean et al., 2019).

Los AE se pueden obtener a partir de diferentes métodos: destilación y/o arrastre con vapor de agua, extracción con solventes volátiles, fluidos supercríticos o por métodos mecánicos como el prensado (Muntean et al., 2019). Los AE obtenidos por destilación



suelen poseer compuestos bioactivos que han demostrado tener actividad bacteriostática y bactericida al actuar en la partición de los lípidos de la membrana y provocar la fuga del contenido celular de las bacterias, así como también tener la capacidad de inhibir la síntesis de proteínas y replicación del ADN. Razón por la cual se han estudiado como una opción terapéutica para infecciones bacterianas y como una alternativa frente a la resistencia a antibióticos (Gadisa et al., 2019).

Varios métodos para evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de un aceite esencial han sido estudiados, entre los más conocidos para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) están el método de dilución en caldo (macrodilución y microdilución), y el método de dilución en agar. Entre ellos, el más práctico para trabajar con AE es el método de microdilución debido a que la cantidad de AE es limitada y esta técnica requiere de cantidades reducidas de muestra, además de ser económico, permite trabajar con diferentes AE simultáneamente y realizar repeticiones (Benkova et al., 2020).

El método de microdilución en caldo permite conocer la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial realizando lecturas de la turbidez de las diluciones en un lector de microplacas. Sin embargo, leer solo la turbidez de la muestra presenta un mayor margen de error debido a que las células se agrupan en la parte inferior de la microplaca e incluye la turbidez de las bacterias muertas. Por lo tanto, es importante utilizar indicadores de viabilidad celular como las sales de tetrazolio o resazurina que permiten excluir a las células muertas, obteniendo resultados apropiados para determinar la CI 50 % y CI 90 % (Eloff, 2019).

Existen diferentes tipos de sales de tetrazolio, no obstante, el bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio (MTT) es uno de los más utilizados, debido a que las bacterias reducen el MTT (amarillo) a formazán (púrpura), el cual es proporcional al número de células vivas. Otros reactivos de tetrazolio como el MTS, XTT y WTS pueden reducirse mediante células viables para generar productos de formazán que son directamente solubles en el medio de cultivo, sin embargo, requieren combinarse con reactivos aceptores de electrones intermedios, que suelen ser tóxicos, como el metilsulfato de fenazina (PMS) o etilsulfato de fenazina (PES), para que puedan penetrar en las células viables, reducirse y salir, donde pueden convertir el tetrazolio en un producto formazán soluble (Riss et al., 2016).

# UCUENCA

En cambio, la resazurina es un indicador de oxido-reducción, se caracteriza por ser un tinte azul no fluorescente y no tóxico. Las células con metabolismo activo pueden reducir la resazurina a resorufina dando lugar a una coloración rosa fluorescente. La cantidad de resorufina es proporcional al número de bacterias vivas, las cuales podrían cuantificarse por métodos simples como determinación de fluorescencia (Riss et al., 2016).

## **Objetivo general**

Evaluar la actividad antibacteriana de aceites esenciales frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* portador de betalactamasas de espectro extendido mediante el método de microdilución en caldo utilizando como indicadores resazurina y bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).

## **Objetivos específicos**

Determinar la CI 50 % y CI 90 % de aceites esenciales frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* portador de betalactamasas de espectro extendido.

Analizar los resultados obtenidos de la cuantificación de la actividad antibacteriana en relación al indicador (MTT y resazurina).

## 1 MARCO TEÓRICO

### 1.1 Plantas medicinales

El uso de las plantas medicinales ha conformado la base de la identidad y cultura de la humanidad desde sus inicios. En base a pruebas empíricas y científicas se ha demostrado los beneficios de diversas plantas medicinales en la salud y bienestar, además conforman una forma de medicina tradicional que ha prevalecido a lo largo del tiempo (Sailema, 2020).

En el Ecuador existe una gran variedad de plantas medicinales que durante años han sido recolectadas debido a sus propiedades terapéuticas, gracias a que contienen metabolitos secundarios tales como los aceites esenciales que presentan actividad biológica (Azurero et al., 2016).

Los aceites esenciales de plantas medicinales cultivadas en Ecuador han demostrado poseer efectos antibacterianos, sin embargo, en este país no se han realizado estudios más profundos de esto (Azurero et al., 2016).

Para el presente estudio dentro de la gran diversidad de plantas medicinales del Ecuador se seleccionaron las siguientes: (Tabla 1).

**Tabla 1.** Información botánica y usos medicinales de las plantas utilizadas en el presente estudio.

Nombre científico	Nombre común	Características botánicas	Partes utilizadas	Usos medicinales	Autor
<i>Aloysia citriodora</i>	Cedrón	Planta perenne de la familia Verbenaceae. Tallo leñoso, recto, cuadrangular, de tamaño desde 0,5 hasta 7 m. Hojas verdes, lanceoladas, se agrupan en tres hojas opuestas.	Hojas	Se emplea como antiespasmódico, tranquilizante, calmante, expectorante, para combatir cuadros febriles, dolor de cabeza y como diurético.	Gil et al., 2007; Sailema, 2020
<i>Cinnamomun casia</i>	Canela	Árbol perenne de la familia Lauraceae. Árbol de tallos grises que puede ir desde los 3 hasta los 10 m. de altura. Hojas verdes, lanceoladas, pueden medir entre 10 y 15 cm.	Tallo (corteza)	En infusiones ayuda a procesos de distensión abdominal, cólicos y diarreas. La presencia de su principio activo (eugenol) lo hace un excelente antiséptico empleado en el tratamiento de heridas.	Jeyaratnam et al., 2016; Raveau et al., 2020; Tariq et al., 2019
<i>Citrus limonum</i>	Limón	Árbol frutal perenne de la familia Rutaceae, que puede alcanzar hasta 4 metros de altura. Hojas verdes mate, pueden medir entre 5 y 10 cm.	Cáscara	Por su contenido en vitamina C ayuda a fortalecer el sistema inmune, el ácido cítrico a prevenir piedras en la vesícula y es un buen antioxidante. Como aceite esencial es utilizado para mejorar la circulación sanguínea, aclarante y ayuda a la digestión.	Acosta et al., 2020; Klimek-szczykutowicz et al., 2020

<p><i>Clinopodium nubigenum</i></p>	<p>Tipo</p>	<p>Planta herbácea, vascular, rastrera de la familia Lamiaceae</p> <p>Tallo de color café rojizo con ramificaciones llega hasta una altura máxima de 15 cm.</p> <p>Hojas simples de forma oval-lanceoladas, miden hasta 4 mm de largo.</p>	<p>Hojas</p>	<p>Se conoce su empleo desde la antigüedad por sus propiedades farmacológicas como digestivo, antiinflamatorio, antiespasmódico, antivomitivo, antioxidante, antibacteriano, expectorante y calmante.</p> <p>Se emplea para tratar hemorragias, úlceras bucales, dolores de garganta y menstruales.</p>	<p>Bayas, 2018; Paco et al., 2018</p>
<p><i>Cymbopogon flexuosos</i></p>	<p>Hierba Luisa</p>	<p>Hierba terrestre, de la familia Poaceae.</p> <p>Hierba aromática de color verde que mide hasta 2 m. de altura.</p> <p>Posee hojas arrosetadas en la base de la planta.</p>	<p>Hojas</p>	<p>Se utiliza para tratar escalofríos, como analgésico natural para dolores de pecho, cabeza y estómago (cólicos por diarreas, gastritis y úlceras).</p> <p>También es benéfica para tratamientos contra el reumatismo, como diurético, diaforético y regulador del ciclo menstrual.</p>	<p>Parikh &amp; Desai, 2011; Sailema Guevara, 2020; Tariq et al., 2019</p>
<p><i>Mentha spicata</i></p>	<p>Menta</p>	<p>Planta herbácea, de la familia Lamiaceae, de una altura aproximada de 43 a 84 cm.</p> <p>Posee hojas simples, ovaladas, dentadas, de color verde oscuro y tamaño variable.</p>	<p>Hojas</p>	<p>Es utilizada por su propiedad analgésica, espasmolítica y antiséptica, la infusión de sus hojas se usa para enfermedades como la bronquitis, sinusitis, neuralgia, reumas y trastornos del sistema digestivo, e incluso su aceite esencial se emplea como repelente de mosquitos.</p>	<p>García, 2014; Mahboubi, 2021</p>

<i>Pimpinella anisum</i>	Anís	<p>Planta herbácea, de la familia Apiaceae, de una altura de 30 a 50 cm.</p> <p>Posee un fruto oval alargado que mide de 2 a 4 mm, de color gris verdoso o verde amarillento con pilosidades.</p>	Semilla	Se utiliza principalmente para trastornos digestivos (indigestión y flatulencias).	Sierra, 2017; Suquillo, 2017
<i>Pogostemon cablin</i>	Pachulí	<p>Es un subarbusto de la familia Lamiaceae, con una altura de 0.3 a 1 m.</p> <p>Posee un tallo grueso, con hojas ovadas, gruesas, aserradas.</p> <p>Sus flores son de color variable de rosa, púrpura a blanco violeta.</p>	Flores	Por sus propiedades antifúngicas y antibacterianas se utiliza para tratar el acné y el pie de atleta. También se emplea para reducir el apetito e inflamación, fiebre, resfriados, cólicos menstruales y como cicatrizante.	Orellana, 2009; Van Beek & Joulain, 2018
<i>Zingiber officinale</i>	Jengibre	<p>Planta rastrera, perteneciente a la familia Zingiberaceae.</p> <p>Posee un rizoma tuberoso y grueso de aproximadamente dos centímetros de diámetro y tiene hojas lanceoladas.</p>	Rizoma	Se utiliza como expectorante, anticonvulsivo, laxante, hipoglucemiante e hipocolesterolémico. Ayuda a aliviar los mareos producidos por viajar.	Ancalla & Uriarte, 2018; Suquillo, 2017

## 1.2 Aceites esenciales

Los AE son productos del metabolismo secundario de las plantas, y les brindan protección contra el ataque de parásitos, así como enfermedades propias; además, su olor actúa atrayendo a animales (principalmente insectos) que ayudan al proceso de polinización (Irshad et al., 2012).

Los AE pueden estar constituidos por diferentes compuestos, su composición varía entre especies de plantas, sin embargo, los principales constituyentes son los terpenos (Calvache et al., 2018; Ríos, 2016).

### 1.2.1 Clasificación de los aceites esenciales

Los principales criterios que permiten establecer una clasificación de los AE son según su consistencia y origen.

#### 1.2.1.1 Según la consistencia

- Esencias fluidas: Aceites de consistencia líquida, se caracterizan por ser muy volátiles a temperatura ambiente.
- Bálsamos: AE ligeramente espesos, poseen baja volatilidad, están constituidos mayormente por sesquiterpenoides.
- Oleorresinas: Son de consistencia líquida y alta viscosidad, se caracterizan por poseer el aroma concentrado de las plantas (Can Başer & Buchbauer, 2015).

#### 1.2.1.2 Según el origen

- Naturales: Son aquellos AE que se obtienen directamente de la planta y no se someten a ninguna modificación fisicoquímica posterior, generalmente son costosos y de variada composición.
- Artificiales: Son los AE que se obtienen al enriquecer las esencias naturales con un componente de interés. Es posible también obtenerlo al preparar una mezcla de esencias de origen natural que pueden extraerse de varias plantas
- Sintéticos: Se obtienen por síntesis química, son asequibles y ampliamente utilizados en la obtención de aromatizantes y saborizantes (Hanif et al., 2019).

## 1.2.2 Características físicas de los aceites esenciales

Los AE son incoloros o ligeramente amarillentos, son volátiles, líquidos a temperatura ambiente, su densidad varía puede ser inferior a la del agua o levemente mayor, son muy poco solubles en agua, solubles en alcohol y en grasas (Can Başer & Buchbauer, 2015).

### 1.2.3 Características químicas de los aceites esenciales

Los principales compuestos químicos que se encuentran en los AE son: 1) los compuestos terpenos y terpenoides, 2) compuestos sesquiterpenos y 3) los derivados del fenilpropano (Calvache et al., 2018; Ríos, 2016).

### 1.2.4 Usos de los aceites esenciales

Según Can Başer & Buchbauer, 2015 los AE tienen diversas aplicaciones en la industria tales como:

- Industria cosmética y farmacéutica: por su empleo en la elaboración de fragancias, agentes de conservación, principios activos, etc.
- Industria de alimentos: en esta área los AE se emplean para potencializar el sabor de alimentos procesados.
- Industria de productos de limpieza: su principal aplicación es como fragancias para este tipo de productos.
- Industria de plaguicidas: se emplean como agentes atrayentes y repelentes de insectos.
- Medicina: Dadas las propiedades de algunos AE, pueden ser utilizados para tratar heridas y quemaduras.
- Aromaterapia: Por el agradable aroma de algunos AE se emplean para terapias de relajación.

## 1.3 Propiedades de los aceites esenciales

En los últimos años, los AE se han estudiado a mayor profundidad debido a que se ha descubierto que poseen propiedades antifúngicas, antibacterianas y antivirales, convirtiéndose en una fuente potencial de nuevos compuestos antimicrobianos, especialmente en la actualidad, en donde la resistencia a los antibióticos representa una gran amenaza para la salud mundial (Chouhan et al., 2017).



Los factores y mecanismos que explican la actividad antibacteriana de los AE son los siguientes:

El poder hidrofílico/hidrofóbico de los AE: esta propiedad le permite cambiar la estructura lipídica de la pared celular de las bacterias, de modo que permite el ingreso del principio activo, provocando la desnaturalización y muerte de la célula (Hanif et al., 2019; Irshad et al., 2012).

La composición química de los AE: algunos compuestos intervienen en procesos de protonación que favorecen la fosforilación del ATP (Hanif et al., 2019; Irshad et al., 2012).

Su poder de ataque a microorganismos: se conoce que las bacterias Gram positivas presentan mayor susceptibilidad a los AE que las Gram negativas. En los estudios desarrollados *in-vitro*, esto se debe a las diferencias en la composición de la membrana externa. En las bacterias Gram negativas, dependiendo del tipo de metabolito presente en el aceite este podría penetrar en su estructura, tal es el caso del carvacrol y el timol que han demostrado poder desintegrar la membrana de *E. coli*, causando su muerte (Chouhan et al., 2017; Nazzaro et al., 2013).

Los AE objeto de investigación han sido estudiados como agentes antibacterianos y se han reportado conjuntamente con la CMI y en algunos casos con la CI 50 % y CI 90 % (Tabla 2):

**Tabla 2.** Actividad antibacteriana de los aceites esenciales utilizados en el presente estudio.

Nombre científico de planta	Nombre común de planta	Bacteria	CMI	Método	Autor
<i>Aloysia citriodora</i>	Cedrón	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2,84 ± 0,83 a 3,73 ± 1,00 mg/ml	Microdilución	Oukerrou et al., 2017
<i>Cinnamomun casia</i>	Canela	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	CI 90% = 2 mg/ml	Microdilución	Murbach et al., 2014
<i>Citrus limonum</i>	Limón	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	CI 50% y 90% = > 25,2 mg/ml	Microdilución	Hojjati & Barzegar, 2017
<i>Clinopodium nubigenum</i>	Tipo	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	132 mg/ml	Macrodilución	Gomez, 2017
<i>Cymbopogon flexuosos</i>	Hierbaluisa	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,5482 mg/ml	Microdilución	Adinarayana et al., 2012
<i>Mentha spicata</i>	Menta	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,21 mg/ml	Microdilución	Hussain et al., 2010
<i>Pimpinella anisum</i>	Anís	<i>Escherichia coli</i> aislada de una infección urogenital	25 mg/ml	Microdilución	Maofari et al., 2013
<i>Pogostemon cablin</i>	Pachulí	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	CI 50% y 90% = > 30,27 mg/ml	Microdilución	Murbach et al., 2014
<i>Zingiber officinale</i>	Jengibre	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,31 mg/ml	Microdilución	Sivasothy et al., 2011

## **1.4 Métodos de extracción de los aceites esenciales**

Los AE proceden de diferentes partes de la planta como puede ser de sus flores, frutos, hojas, semillas, corteza o raíces y son sometidos a diferentes procedimientos físicos o químicos de extracción (Hanif et al., 2019).

### **1.4.1 Extracción con solventes volátiles**

La extracción del aceite esencial de una muestra vegetal se realiza utilizando un solvente volátil como puede ser: alcohol, cloroformo, entre otros. Estos se encargan de solubilizar y extraer diferentes sustancias, tales como grasas y ceras, dando como resultado un extracto impuro, por lo cual para eliminar las impurezas se debe filtrar la muestra y evaporar el disolvente, para obtener el aceite esencial (Hanif et al., 2019).

### **1.4.2 Prensado**

Es posible obtener aceites esenciales de cáscaras, cortezas o semillas a través de la técnica del prensado. Este método se basa en la presión realizada sobre la materia prima de origen vegetal utilizando cilindros filosos que raspan la superficie de la cáscara de la fruta con el objetivo de abrir los pequeños depósitos que contienen el aceite esencial, posteriormente se rocía agua sobre la muestra y la mezcla acuosa resultante es filtrada y centrifugada para separar el aceite del agua (Hill, 2017).

### **1.4.3 Microondas**

Una alternativa para la obtención de aceites esenciales, puede ser tanto de forma asistida (microondas + hidrodestilación) o adaptando equipos para establecerlo como método autónomo. Esta técnica consiste en colocar la muestra seca y triturada en un matraz con agua destilada para posteriormente instalarlo en un horno de microondas, el cual se acopla a un condensador, cuando la muestra se calienta, genera vapores que llegan al condensador, se enfrían y se obtiene el aceite esencial (Gomez et al., 2016). Entre los beneficios que trae la extracción por microondas se tiene a la reducción considerable del tiempo y por consiguiente del gasto energético (Song et al., 2022).

### **1.4.4 Fluidos supercríticos**

Este método consiste en triturar el material vegetal, para posteriormente empacarlo

en una cámara de acero inoxidable con el objetivo de que a través de la muestra circule el fluido supercrítico (como por ejemplo dióxido de carbono) que actúa como solvente extractor, generando que los compuestos apolares sean solubilizados y arrastrados. Finalmente, el fluido es eliminado por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente obteniendo el aceite esencial (Andrade, 2017).

#### **1.4.5 Destilación con arrastre de vapor**

Inicia a partir de la inyección de vapor de agua sobre la muestra (material vegetal), generando que la presión de vapor del agua y la mezcla orgánica se combinen para alcanzar la presión de recinto, de esta manera los componentes de la muestra logran evaporarse a pesar de tener un punto de ebullición más alto que el del agua. Finalmente, el vapor es condensado dando como resultado la obtención de dos fases inmiscibles: la fase orgánica (aceite esencial) y la acuosa, que posteriormente son separadas (Peredo et al., 2009).

#### **1.4.6 Hidrodestilación**

Consiste en sumergir el material vegetal (seco o fresco, de tamaño de partícula reducido) en agua destilada para llevarlo a ebullición. El vapor generado es condensado dando lugar a la obtención del aceite esencial y una fase acuosa que posteriormente será separada (Yunge, 2011).

Se recomienda para aplicar este método mantener una agitación constante de la muestra debido a que se suele apelmazar en el fondo del balón, degradándose térmicamente, lo cual afecta la calidad del aceite esencial. Este es uno de los métodos más utilizados debido a su fácil ejecución y por ser económico (Yunge, 2011).

## 2 METODOLOGÍA

### 2.1 Materiales

Vasos de precipitación de 10, 50, 100 y 500 mL, matraz de fondo redondo de 1000 mL, condensador, trampa tipo “Clevenger”, pipetas Pasteur de vidrio, cajas Petri, tubos eppendorf de 1,5 mL, microplacas de fondo plano, viales de vidrio color ámbar de 1 y 3 mL, tubos cónicos de plástico de 15 y 50 mL, pipetas serológicas de vidrio de 10 mL, puntas de pipeta eppendorf de 1 y 10 mL.

#### 2.1.1 Materia vegetal

El material vegetal que se utilizó corresponde a plantas medicinales recolectadas y adquiridas en el mercado 10 de agosto - Cuenca, Ecuador.

#### 2.1.2 Recolectado

Las plantas fueron recolectadas en diferentes lugares de la provincia del Azuay (Tabla 3).

**Tabla 3.** Plantas recolectadas.

Nombre científico de la planta	Nombre común de la planta	Procedencia
<i>Clinopodium nubigenum</i>	Tipo	Azuay - Rañas - -3.252826, -79.069176
<i>Aloysia citriodora</i>	Cedrón	Azuay - Cuenca - -2.881694, -79.002944

#### 2.1.3 Comprado

El material vegetal comprado fue obtenido del mercado 10 de agosto de la ciudad de Cuenca - Ecuador.

**Tabla 4.** Plantas compradas.

Nombre científico de la planta	Nombre común de la planta	Procedencia
<i>Pimpinella anisum</i>	Anís	Azuay - Cuenca - Mercado 10 de agosto
<i>Zingiber officinale</i>	Jengibre	Azuay - Cuenca - Mercado 10 de agosto

#### 2.1.4 Aceites esenciales comerciales

Los AE comerciales fueron adquiridos de la marca “Calily” (Virginia, Estados Unidos) del grupo de plantas medicinales y productos naturales del departamento de

**Tabla 5.** Aceites esenciales comerciales.

Nombre científico de la planta del aceite esencial	Nombre común de la planta del aceite esencial
<i>Cinnamomun casia</i>	Canela
<i>Cymbopogon flexuosos</i>	Hierba luisa
<i>Citrus limonum</i>	Limón
<i>Pogostemon cablin</i>	Pachulí
<i>Mentha spicata</i>	Menta

## 2.1.5 Reactivos

Los reactivos utilizados fueron: Sulfato de sodio de Merck (Darmstadt, Alemania), caldo tripticasa soya (TSB) de Becton Dickinson (Heidelberg, Alemania), presto Invitrogen-Life Technologies (California, Estados Unidos), MTT de Sigma-Aldrich (California, Estados Unidos), Tween 80 de Merck (Darmstadt, Alemania) y agar Mueller Hinton adquirido de Merck (Darmstadt, Alemania).

## 2.1.6 Equipos

Los equipos utilizados fueron: Estufa de la marca Memmert (Schwabach, Alemania), licuadora de Osterizer (Winconsin, Estados Unidos), balanza analítica de Boeco (Hamburgo, Alemania), refrigerador de Indurama (Cuenca, Ecuador), cabina de seguridad biológica de Labconco Logic A, Modelo 3430001 (Cansas, Estados Unidos), biofreezer de Fisher Scientific R134A (Massachusetts, Estados Unidos), baño maría de Branson (Misuri, Estados Unidos), vórtex de Fisher (Massachusetts, Estados Unidos), homogeneizador de placas de Thermo Scientific - Barnstead (Massachusetts, Estados Unidos), lector de microplacas de Biotek (Vermont, Estados Unidos), destilador de Thermo Scientific – Barnstead (Massachusetts, Estados Unidos), centrifugadora de Sigma-Aldrich (California, Estados Unidos), manta eléctrica Thermo Scientific - Barnstead (Massachusetts, Estados Unidos), pipetas automáticas y multicanal de Glassco (Haryana, India).

## 2.2 Cepas bacterianas utilizadas

*Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* portadora de betalactamasas de espectro

extendido BAA-2469 obtenidas del Laboratorio de Microbiología del Grupo de Plantas Medicinales y Productos Naturales del Departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca.

## **2.3 Métodos**

### **2.3.1 Procesamiento de la droga vegetal**

Tanto las plantas recolectadas en campo, así como las adquiridas del mercado 10 de agosto fueron transportadas en fundas de papel al Laboratorio de Plantas Medicinales y Productos Naturales del Departamento de Biociencias. Posteriormente, basado en los Procedimientos Normalizados de Trabajo (PNT) n° 0007 las plantas fueron seleccionadas, lavadas y secadas hasta peso constante. Finalmente, se almacenaron a temperatura ambiente en fundas de papel hasta su procesamiento.

### **2.3.2 Obtención del aceite esencial**

#### **2.3.2.1 Trituración**

La droga vegetal secada fue triturada en la licuadora con pulsos de 5 s, se repitió este proceso hasta obtener un tamaño de partícula homogéneo de aproximadamente 1 mm.

#### **2.3.2.2 Hidrodestilación**

Según el PNT n° 0007 del Grupo de Plantas Medicinales y Productos Naturales del Departamento de Biociencias: se pesó 100 g de muestra vegetal seca y triturada, la cual se colocó en un balón de fondo redondo con boca esmerilada y se cubrió con 1000 mL de agua destilada. Posteriormente, se ensambló la trampa tipo "Clevenger" para llevar la suspensión a ebullición utilizando una manta eléctrica durante seis ciclos (encendido de 20 min y apagado de 5 min). El vapor producido de la ebullición fue condensado y se suspendió en el tubo recolector del aparato dando como producto una fase oleosa y una acuosa.

El producto oleoso fue recolectado en un tubo limpio, se agregó una cantidad suficiente de sulfato de sodio y se centrifugó a 3000 rpm por 5 min para la adsorción de humedad. Con una pipeta de vidrio (tipo Pasteur) se absorbió el aceite esencial, y se almacenó en viales estériles color ámbar previamente pesados, se tapó y selló con

papel film la boca del vial para evitar que el aceite se volatilice.

### **2.3.3 Determinación de la actividad antibacteriana**

#### **2.3.3.1 Preparación del cryostock**

A partir de lo señalado por el PNT MB OP 006 del Grupo de Plantas Medicinales y Productos Naturales del Departamento de Biociencias se descongeló usando choque térmico cada cepa bacteriana (*E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* portadora de BLEE) cryo-conservada en leche descremada. Posteriormente, se colocó la suspensión bacteriana en el centro de una caja Petri con medio Mueller Hinton, y con el asa estéril se distribuyó por toda la caja para asegurar un correcto aislamiento de las colonias, a continuación, se incubó a 37 °C por 24 h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, a partir de las colonias aisladas se preparó una solución madre con agua destilada estéril, de la cual se prepararon diluciones desde  $10^1$  a  $10^{10}$  y de la dilución de  $10^4$  a  $10^7$  se procedió a sembrar 10, 50, 100 y 100  $\mu$ L respectivamente por duplicado en agar Mueller Hinton, para después incubar a 37 °C por 24 h. Se determinó las UFC/mL de la solución madre mediante el recuento de colonias de cada caja.

Finalmente, se preparó una solución con TSB, glicerol y el volumen de inóculo bacteriano de la solución madre, necesario para llegar a una concentración de  $5 \times 10^6$  UFC/mL. La solución fue distribuida en diferentes cryotubos.

#### **2.3.3.2 Determinación del peso del aceite esencial**

Según el PNT MB OP 006 del Grupo de Plantas Medicinales y Productos Naturales del Departamento de Biociencias se preparó una solución de 980,8  $\mu$ L de TSB + Tween 80 al 0,5 % con 19,2  $\mu$ L del aceite esencial para completar un volumen total de 1 mL.

Con el objetivo de obtener una CI 50 % y 90 % en unidades de p/v (Rasooli et al., 2021) se procedió a pesar 19,2  $\mu$ L del aceite esencial utilizando como muestra de ensayo *Mentha spicata*. El peso obtenido fue de 16,97 mg, el cual se diluyó con 980,8  $\mu$ L de TSB + Tween 80 al 0,5 % para completar 1 mL, a partir de esta solución se preparó 5 diluciones hasta obtener concentraciones de 8.49, 4.24, 2.12, 1.29 y 0.53 mg/mL respectivamente.



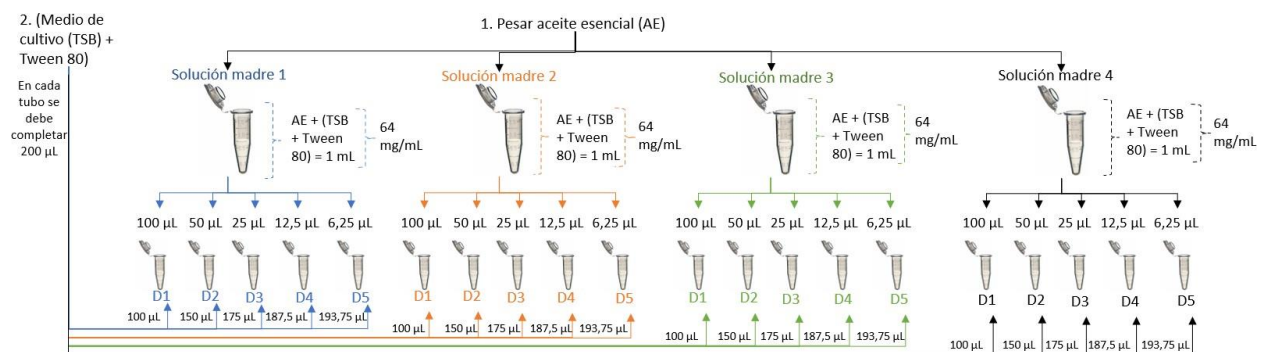
Se colocó 100  $\mu\text{L}$  de cada dilución en los pocillos de una microplaca (sección 2.3.3.3) hasta obtener una concentración de 4.24, 2.12, 1.06, 0.53 y 0,27 mg/mL y se utilizó como indicador MTT (sección 2.3.5.2). A partir de lo cual se obtuvo absorbancias elevadas que no permitían obtener un porcentaje de inhibición (% I) adecuado para calcular la CI 90%, por ende, se procedió a aumentar la concentración del mismo tomando como referencia 4 mg/mL con dos concentraciones mayores a esta (8 y 16 mg/mL) y dos menores (2 y 1 mg/mL).

Finalmente, se realizó un ensayo con concentraciones finales del aceite esencial de 16, 8, 4, 2 y 1 mg/mL y se obtuvo resultados aptos para calcular el % I y posteriormente la CI 50 % y 90%.

### 2.3.3.3 Microdilución

Inicialmente se preparó una solución a una concentración de 64 mg/mL del aceite esencial y TSB + Tween 80 al 0,5 %. De esta solución se realizó 4 réplicas y de las cuales se preparó diluciones seriadas respectivamente (Figura 1).

**Figura 1.** Diagrama de flujo de la preparación de diluciones. Fuente: Autores.



En la microplaca, se agregó 100  $\mu\text{L}$  de cada dilución previamente preparadas y homogeneizadas (Figura 3).

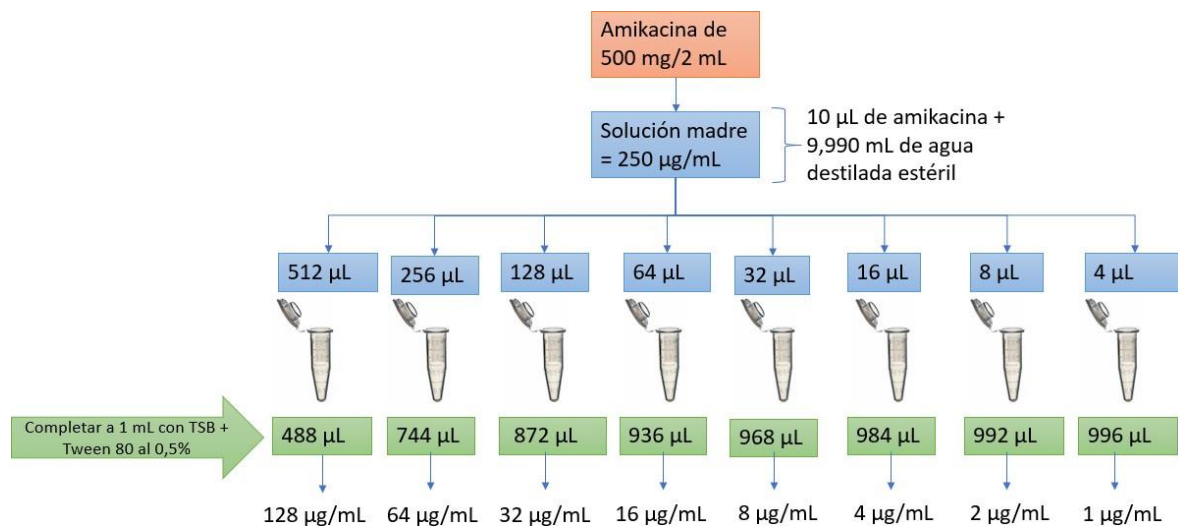
### Preparación del inóculo bacteriano

A partir de un cryostock de  $5 \times 10^6$  UFC/mL se preparó una dilución de un volumen final de 11 mL con TSB + Tween 80 al 0,5% para llegar a una concentración de  $1 \times 10^5$  UFC/mL.

## Preparación de controles

Control positivo: Se partió de una presentación comercial de amikacina de 250 mg/mL, la cual fue diluida con agua destilada hasta obtener una solución de 250 µg/mL y se preparó diluciones seriadas utilizando TSB + Tween 80 al 0,5% (Figura 2).

**Figura 2.** Preparación del control de antibiótico. Fuente: Autores.



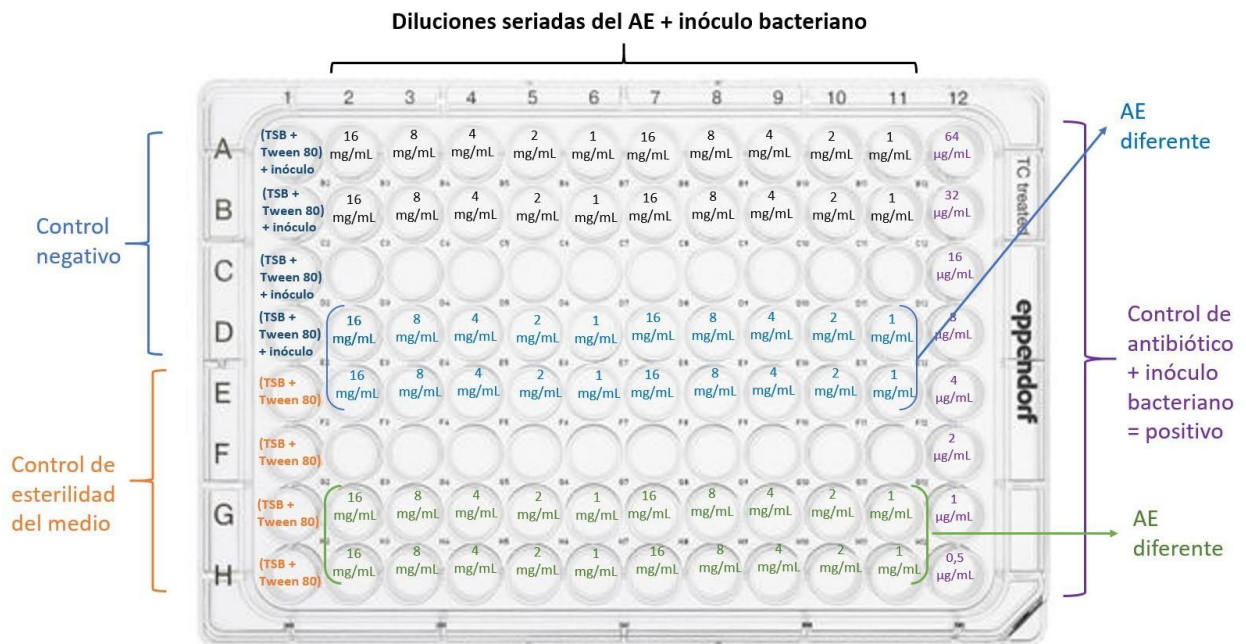
Control negativo: (TSB + Tween 80 al 0,5%) + inóculo bacteriano.

Control de esterilidad del medio: TSB + Tween 80 al 0,5%.

En cada pocillo de la microplaca se colocó 100 µL de cada control de acuerdo a la Figura 3.

Finalmente, se agregó 100 µL del inóculo bacteriano ( $1 \times 10^5$  UFC/mL) en los pocillos de las diferentes diluciones del AE, del control positivo y del control negativo hasta obtener una concentración final del inóculo de  $5 \times 10^4$  UFC/mL. En cada microplaca se realizó la microdilución de tres AE diferentes (Figura 3).

**Figura 3.** Preparación de la microplaca. Fuente: Autores.



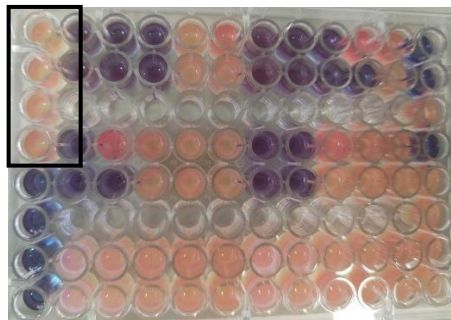
La microplaca se selló con film e incubó a 37 °C por 22 h a homogeneización constante.

### 2.3.4 Pruebas preliminares para el uso de indicadores MTT y resazurina

#### 2.3.4.1 Tiempo de incubación y homogeneización de la microplaca con resazurina

Invitrogen, 2011 recomienda un tiempo de incubación entre 10 min y 2 h, sin embargo, al incubar la microplaca durante 2 h a homogeneización constante se observó la formación de dos fases en la solución de cada pocillo, razón por la cual se procedió a homogeneizar con una pipeta multicanal inmediatamente después de colocar el indicador; no obstante, el fenómeno persistió (Ilustración 1).

**Ilustración 1.** Formación de dos fases utilizando resazurina. Fuente: Autores.



Por lo tanto, para mejorar la homogeneización, la microplaca se colocó en el lector de microplacas a velocidad rápida en la opción de doble orbital y se realizaron lecturas en intervalos de 10 min durante 2 h, en donde se observó que la doble fase se formaba a partir de los 20 min.

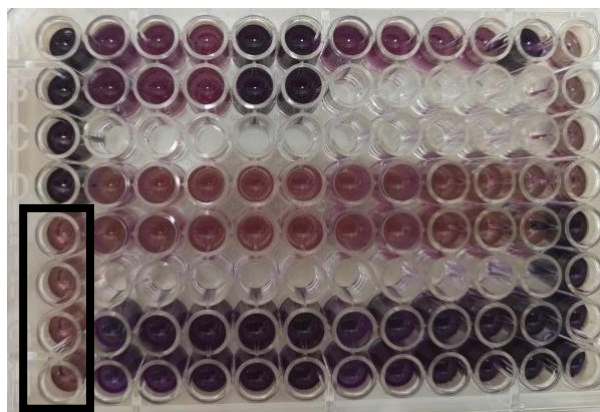
Finalmente, de acuerdo a los ensayos realizados se definió que el tiempo de incubación óptimo es de 10 minutos.

#### **2.3.4.2 Tiempo de incubación de la microplaca con MTT**

Requena et al., 2019 estableció el tiempo de incubación de 4 h, sin embargo, se observó que al final de las 4 h el control de esterilidad del medio perdía estabilidad (cambio de coloración), por lo cual se realizó una lectura de la microplaca en intervalos de 30 min durante 2 h, a partir de lo cual se observó que hasta los 30 min el control negativo mantenía su coloración normal, sin embargo, a los 60, 90 y 120 min las absorbancias aumentaban respectivamente (Ilustración 2).

Por lo tanto, se definió que el tiempo de incubación óptimo sea de 30 min.

**Ilustración 2.** Cambio de coloración del control de esterilidad del medio después de los 30 min. Fuente: Autores.

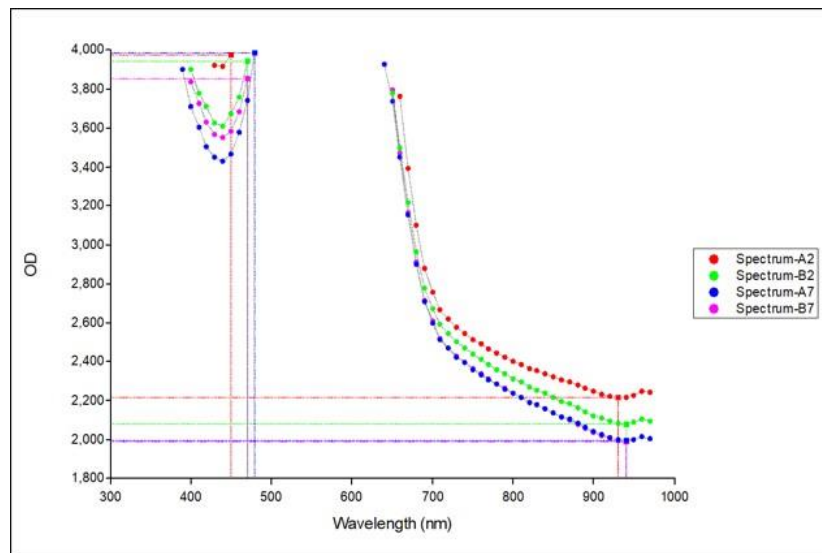


### 2.3.4.3 Longitud de onda para la lectura de la microplaca con MTT

Se preparó una microplaca utilizando el aceite esencial de *Mentha spicata* con el objetivo de realizar un barrido espectral en un rango de 300 a 970 nm y las lecturas en intervalos de 10 min.

A partir de 460 nm aproximadamente, se observó que se excede el límite de la densidad óptica que se puede cuantificar. Mientras que las curvas en una longitud de onda de 450 nm siguen una misma tendencia con una pequeña dispersión entre ellas (Figura 4).

**Figura 4.** Barrido espectral de microplaca utilizando MTT



Nota: OD = densidad óptica, wavelength = longitud de onda, spectrum – (A2, B2, A7, B7) = réplicas del aceite esencial de *Mentha spicata* (menta).

Finalmente, se determinó que la longitud de onda óptima de absorción es 450 nm.

### 2.3.5 Indicadores para la cuantificación de la actividad antibacteriana

Se prepararon duplicados de cada microplaca con los aceites esenciales, a la una se le agregó resazurina y a la otra MTT.

#### 2.3.5.1 Microplacas con resazurina

Posterior a la incubación de la microplaca, se agregó 20  $\mu$ L de resazurina (40 mg/mL)

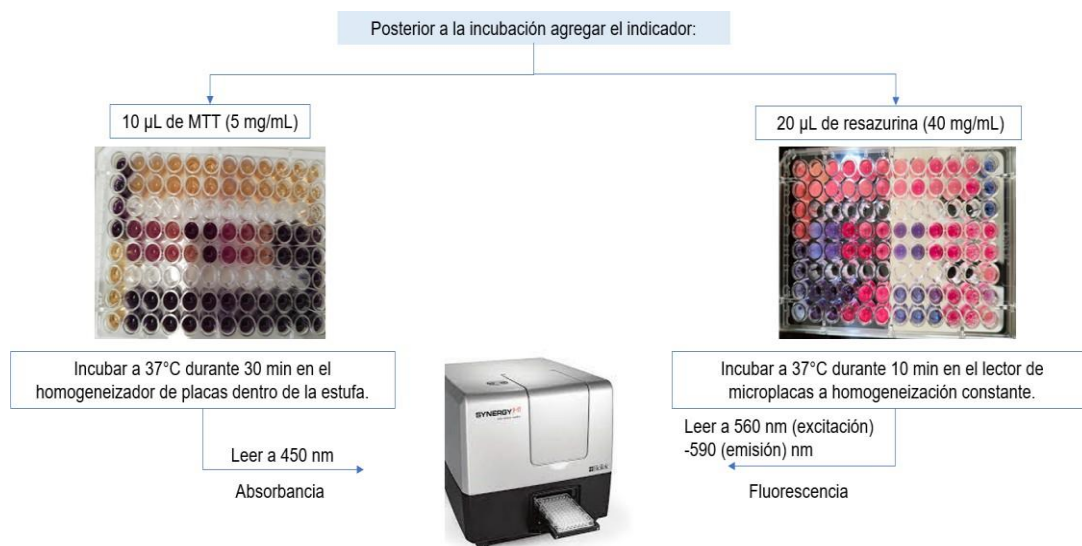


en cada pocillo. Se homogenizaron con una pipeta multicanal y se incubó a una temperatura de 37 °C, con agitación constante (doble orbital) durante 10 min en el lector de microplacas. Finalmente, la lectura se realizó a una longitud de onda de 560 nm (excitación), y a 590 nm (emisión) (Invitrogen, 2011) (Figura 5).

## 2.3.5.2 Microplacas con MTT

Una vez finalizada la incubación de la microplaca se agregó 10 µL de MTT a una concentración de 5 mg/mL (Requena et al., 2019). Posteriormente, se homogeneizó con una pipeta multicanal e incubó a 37 °C con homogeneización constante dentro de la estufa durante 30 min. Por último, se realizó la lectura a una longitud de onda de 450 nm (Figura 5).

**Figura 5.** Diagrama de microplacas con cada indicador y su respectiva lectura.



## 2.4 Análisis estadístico

Una vez obtenidas las lecturas de los pocillos del control positivo, negativo, de esterilidad del medio y de cada aceite a las diferentes concentraciones frente a *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* portadora de BLEE, se procedió a calcular el promedio ( $\bar{X}$ ), la desviación estándar ( $\sigma$ ) y el coeficiente de variación (% CV) de las diferentes réplicas con el propósito de analizar los resultados que presentan mayor variabilidad según el indicador (MTT o resazurina) utilizado y definir qué datos son óptimos para determinar la CI 50 % y 90 %.

Además, se seleccionó las lecturas del  $\bar{X}$  menor de las repeticiones de las diferentes microplacas del control de antibiótico y el  $\bar{X}$  más bajo de las absorbancias de las réplicas de las diferentes diluciones de cada aceite esencial frente a *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* portadora de BLEE para definir como variable independiente: el control positivo, los AE de canela, cedrón, hierba luisa, menta, jengibre y como variable dependiente sus respectivas absorbancias.

A partir de los datos seleccionados se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía, en el cual se compararon las variables entre sí, con el objetivo de conocer si existe variabilidad entre las muestras. Posteriormente, se realizó un análisis post - hoc como es el test de Tukey para conocer específicamente entre que variables existen diferencias estadísticamente significativas y analizar si los AE presentan actividad equivalente a la del antibiótico. El nivel de significancia establecido fue 0,05. El análisis estadístico se realizó en el software Rstudio versión 2022.07.02 Build 576.

También se aplicó el método ANOVA y test Tukey utilizando como variable independiente el control negativo y los AE previamente mencionados, con el objetivo de analizar si los AE presentan inhibición.

## 2.5 Cálculos

Con base en las lecturas obtenidas de las microplacas se procedió a calcular el % I según la ecuación 1. Posteriormente, se realizó un promedio del % I de las réplicas de cada dilución, para por medio de la ecuación 2 y 3 establecida por el Grupo de Plantas Medicinales y Productos Naturales del Departamento de Biociencias calcular la CI 50 % y la CI 90 % respectivamente.

**Ecuación 1.** Fórmula utilizada para calcular el % I.

$$\%I = \frac{(x - y)}{(x - z)} \times 100 \%$$

Donde:

$x$  = Promedio de las lecturas del control negativo.

$y$  = Resultado de la lectura de cada dilución.

$z$  = Promedio de las lecturas del control de esterilidad del medio.

**Ecuación 2.** Fórmula utilizada para calcular la CI 50 %.

$$CI\ 50\ \% = \text{Exp} \left( LN(a) - \left( \frac{c - 50}{c - d} \right) \times LN\left(\frac{c}{b}\right) \right)$$

Donde:

$a$  = Concentración del aceite esencial del promedio del %I >50%.

$b$  = Concentración del aceite esencial del promedio del %I <50%.

$c$  = Promedio del %I >50%.

$d$  = Promedio del %I <50%.

**Ecuación 3.** Fórmula utilizada para calcular el CI 90 %.

$$CI\ 90\ \% = \text{Exp} \left( LN(a) - \left( \frac{c - 90}{c - d} \right) \times LN\left(\frac{c}{b}\right) \right)$$

Donde:

$a$  = Concentración del aceite esencial del promedio del %I >90%.

$b$  = Concentración del aceite esencial del promedio del %I <90%.

$c$  = Promedio del %I >90%.

$d$  = Promedio del %I <90%.3



## 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Lecturas de los controles de la microplaca con MTT y resazurina.

Se realizó la lectura de los pocillos de los 9 AE en 3 microplacas diferentes, en cada microplaca se obtuvo lecturas a diferentes concentraciones del control positivo, de 4 repeticiones del control negativo y del control de esterilidad del medio. A partir de estas lecturas se calcularon el  $\bar{X}$ , la  $\sigma$  y el CV de los datos obtenidos (Tablas de la 6 a la 13).

**Tabla 6.** Resultados del control positivo utilizando como cepa bacteriana *E. coli*

Concentración del antibiótico $\mu\text{g/mL}$	Microplacas con MTT					
	Control positivo					
	Microplaca 1	Microplaca 2	Microplaca 3	$\bar{X}$	$\sigma$	CV (%)
64	0,489	0,472	0,454	0,471	0,0175	3,7
32	0,504	0,521	0,51	0,512	0,009	1,7
16	0,516	0,509	0,568	0,531	0,032	6,1
8	1,797	1,867	1,728	1,798	0,070	3,9
4	3,411	2,937	2,902	3,083	0,284	9,2
2	3,674	3,085	3,266	3,342	0,302	9,0
1	3,708	3,188	3,27	3,389	0,280	8,3
0,5	3,559	3,166	3,105	3,277	0,246	7,5

**Tabla 7.** Resultados del control positivo utilizando como cepa bacteriana *E. coli*

Concentración del antibiótico $\mu\text{g/mL}$	Microplacas con resazurina					
	Control positivo					
	Microplaca 1	Microplaca 2	Microplaca 3	$\bar{X}$	$\sigma$	CV (%)
64	3448	3634	3206	3429,33	214,61	6,3
32	3437	3645	3188	3423,33	228,81	6,7
16	3494	3610	3221	3441,67	199,71	5,8
8	3422	3585	20587	9198,00	9863,50	107,2
4	7261	38628	22765	22884,67	15683,84	68,5
2	23043	41320	43891	36084,67	11367,34	31,5
1	19493	33447	43913	32284,33	12251,45	37,9
0,5	22465	32135	44570	33056,67	11081,28	33,5

**Tabla 8.** Resultados del control negativo utilizando como cepa bacteriana *E. coli*

	Microplacas con MTT	Microplacas con resazurina
	Control negativo	Control negativo

Repeticiones	Microplaca 1	Microplaca 2	Microplaca 3	Microplaca 1	Microplaca 2	Microplaca 3
Repetición 1	2,916	2,863	3,541	25762	41768	20380
Repetición 2	3,536	2,831	3,435	28425	37228	34066
Repetición 3	3,414	3,147	3,117	21931	22362	29729
Repetición 4	3,504	3,179	3,042	15292	29127	8973
$\bar{X}$	3,343	3,005	3,284	22852,5	32621,25	23287
$\sigma$	0,289	0,183	0,242	5701,70	8609,05	11120,96
CV (%)	8,6	6,1	7,4	25,0	26,4	47,8

**Tabla 9.** Resultados del control de esterilidad del medio utilizando como cepa bacteriana *E. coli* ATCC 25922 e indicador MTT y resazurina.

Repeticiones	Microplacas con MTT			Microplacas con resazurina		
	Control de esterilidad del medio			Control de esterilidad del medio		
	Microplaca 1	Microplaca 2	Microplaca 3	Microplaca 1	Microplaca 2	Microplaca 3
Repetición 1	0,581	0,718	0,715	3513	3348	3164
Repetición 2	0,587	0,658	0,561	3465	3407	3286
Repetición 3	0,598	0,607	0,535	3364	3472	3273
Repetición 4	0,584	0,648	0,597	3365	3607	3295
$\bar{X}$	0,588	0,658	0,602	3426,75	3458,5	3254,5
$\sigma$	0,007	0,046	0,080	74,50	111,20	61,01
CV (%)	1,3	7,0	13,2	2,2	3,2	1,9

**Tabla 10.** Resultados del control positivo utilizando como cepa bacteriana *E. coli*

Concentración del antibiótico $\mu\text{g/mL}$	Microplacas con MTT					
	Control positivo					
	Microplaca 1	Microplaca 2	Microplaca 3	$\bar{X}$	$\sigma$	CV (%)
64	0,427	0,541	0,489	0,49	0,06	11,8
32	0,476	0,556	0,575	0,54	0,05	9,8
16	0,479	0,593	0,536	0,536	0,057	10,6
8	0,501	0,566	0,5335	0,533	0,0325	6,1
4	3,015	2,377	2,867	2,75	0,33	12,1
2	3,182	3,015	3,308	3,17	0,15	4,6
1	3,198	3,283	3,495	3,33	0,15	4,6
0,5	3,274	3,247	3,352	3,29	0,05	1,7

**Tabla 11.** Resultados del control positivo utilizando como cepa bacteriana *E. coli*

Concentración del antibiótico $\mu\text{g/mL}$	Microplacas con resazurina					
	Control positivo					
	Microplaca 1	Microplaca 2	Microplaca 3	$\bar{X}$	$\sigma$	CV (%)
64	4654	3199	3241	3698,00	828,19	22,4
32	4307	3229	3243	3593,00	618,38	17,2
16	46671	3233	3257	17720,33	25072,02	141,5
8	3507	41935	3284	16242,00	22251,07	137,0
4	21604	40752	13833	25396,33	13854,40	54,6
2	16086	25520	29460	23688,67	6872,50	29,0
1	20622	46328	32499	33149,67	12865,35	38,8

0,5	22544	22999	41340	28961,00	10722,94	37,0
-----	-------	-------	-------	----------	----------	------

**Tabla 12.** Resultados del control negativo utilizando como cepa bacteriana *E. coli*

Repeticiones	Microplaca con MTT			Microplaca con resazurina		
	Control negativo			Control negativo		
	Microplaca 1	Microplaca 2	Microplaca 3	Microplaca 1	Microplaca 2	Microplaca 3
Repetición 1	3,513	3,176	3,087	55038	33246	27681
Repetición 2	3,18	3,3	3,438	26798	29796	26554
Repetición 3	3,485	3,439	2,627	37294	27606	23240
Repetición 4	3,346	3,362	3,592	32400	20041	20008
$\bar{X}$	3,381	3,319	3,186	37882,5	27672,25	24370,75
$\sigma$	0,153	0,111	0,428	12214,49	5592,18	3465,86
CV (%)	4,5	3,3	13,4	32,2	20,2	14,2

**Tabla 13.** Resultados del control de esterilidad del medio utilizando como cepa bacteriana *E. coli* portadora de BLEE e indicador MTT y resazurina.

Repeticiones	Microplacas con MTT			Microplacas con resazurina		
	Control de esterilidad del medio			Control de esterilidad del medio		
	Microplaca 1	Microplaca 2	Microplaca 3	Microplaca 1	Microplaca 2	Microplaca 3
Repetición 1	0,536	0,873	0,397	4014	3161	3332
Repetición 2	0,558	0,649	0,51	4057	3138	3313
Repetición 3	0,516	0,761	0,546	4476	3131	3210
Repetición 4	0,537	0,761	0,484	5871	3160	3243
$\bar{X}$	0,537	0,761	0,484	4604,5	3147,5	3274,5
$\sigma$	0,017	0,091	0,063	869,67	15,29	57,56
CV (%)	3,2	12,0	13,1	18,9	0,5	1,8

### 3.2 Lecturas de los pocillos con los AE frente a *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* portadora de BLEE utilizando como indicadores MTT y resazurina.

Se obtuvieron las lecturas de los pocillos con los AE a diferentes concentraciones de las cuales se realizaron 4 repeticiones y solo en el caso del AE del cedrón se realizaron 3 repeticiones por cada concentración debido a la disponibilidad del mismo.

A partir de estas lecturas se calculó el CV de los datos obtenidos (Tabla 14,15).

**Tabla 14.** Resultados de las lecturas de los pocillos con los AE frente a *E. coli* ATCC 25922 utilizando como indicadores MTT y resazurina.

A	R	Microplaca con MTT					Microplaca con Resazurina				
		Concentración (mg/mL)					Concentración (mg/mL)				
		16	8	4	2	1	16	8	4	2	1
	R1	3,52	3,6	3,603	3,579	3,582	13127	40421	43547	45524	46551
	R2	3,395	3,548	3,502	3,509	2,89	40944	14152	44322	46244	31967
	R3	3,576	3,525	3,428	3,522	3,55	11370	13304	35873	16338	21202

	R4	3,355	3,485	3,57	3,633	3,002	16389	12776	22896	28175	32056
	$\bar{x}$	3,462	3,540	3,526	3,561	3,256	20457,5	20163,25	36659,5	34070,25	32944
	$\sigma$	0,104	0,048	0,078	0,057	0,361	13815,1	13517,1	9936,5	14475,0	10404,6
	CV (%)	3,0	1,4	2,2	1,6	11,1	67,5	67,0	27,1	42,5	31,6
CANELA	R1	1,481	1,548	1,064	0,623	0,581	1784	1692	2001	2697	3140
	R2	1,805	1,583	0,977	0,659	0,627	1488	1500	1957	2855	3128
	R3	1,449	1,491	1,093	0,624	0,593	1729	1717	1994	2646	3082
	R4	1,532	1,541	1,05	0,639	0,6	1408	1509	2098	2819	3168
	$\bar{x}$	1,567	1,541	1,046	0,636	0,600	1602,25	1604,5	2012,5	2754,25	3129,5
	$\sigma$	0,162	0,038	0,049	0,017	0,019	182,47	115,98	60,18	98,89	35,83
	CV (%)	10,4	2,5	4,7	2,6	3,2	11,4	7,2	3,0	3,6	1,1
CEDRÓN	R1	1,017	0,711	0,613	2,561	2,586	5071	4651	4296	49487	49235
	R2	0,91	0,671	0,605	2,314	2,781	5501	4804	4498	4172	40645
	R3	0,987	0,664	0,623	2,067	2,378	4990	4603	4434	47751	43117
	$\bar{x}$	0,971	0,682	0,614	2,314	2,582	5187,3	4686,0	4409,3	33803,3	44332,3
	$\sigma$	0,055	0,025	0,009	0,247	0,202	274,6	105,0	103,2	25676,2	4422,1
	CV (%)	5,7	3,7	1,5	10,7	7,8	5,3	2,2	2,3	76,0	10,0
HIERBA LUISA	R1	0,903	0,781	0,681	0,637	2,652	5226	4744	4075	3949	47669
	R2	0,928	0,772	0,702	0,654	3,416	5510	4758	4336	3984	23214
	R3	0,844	0,772	0,691	0,622	3,018	5183	4640	4249	3684	46515
	R4	0,988	0,705	0,683	0,628	3,443	4929	4381	4179	3878	47389
	$\bar{x}$	0,916	0,758	0,689	0,635	3,132	5212,00	4630,75	4209,75	3873,75	41196,75
	$\sigma$	0,060	0,035	0,010	0,014	0,375	238,00	174,62	110,43	133,97	11998,57
	CV (%)	6,5	4,7	1,4	2,2	12,0	4,6	3,8	2,6	3,5	29,1
JENGIBRE	R1	0,779	0,678	0,622	0,608	3,475	4067	3976	3772	3688	45598
	R2	0,784	0,685	0,627	0,602	2,628	3373	3779	3769	16845	47481
	R3	0,789	0,676	0,631	0,601	3,466	4013	3984	3701	47947	11120
	R4	0,784	0,694	0,617	0,598	3,582	3125	3773	3718	3640	10934
	$\bar{x}$	0,784	0,683	0,624	0,602	3,288	3644,5	3878	3740	18030	28783,25
	$\sigma$	0,004	0,008	0,006	0,004	0,443	468,29	117,85	35,92	20890,16	20517,70
	CV (%)	0,5	1,2	1,0	0,7	13,5	12,8	3,0	1,0	115,9	71,3
LIMÓN	R1	3,714	3,249	2,992	2,879	2,802	22694	23512	38022	28764	23249
	R2	3,92	3,628	3,225	3,099	3,2	33578	21071	38492	45091	48787
	R3	3,993	3,721	3,474	3,282	3,17	12861	14885	18356	21472	21147
	R4	3,898	3,455	3,479	3,335	3,224	18695	16959	19287	22544	46977
	$\bar{x}$	3,881	3,513	3,293	3,149	3,099	21957,0	19106,8	28539,3	29467,8	35040,0
	$\sigma$	0,119	0,208	0,233	0,206	0,199	8736,3	3903,0	11229,2	10900,3	14871,8
	CV (%)	3,1	5,9	7,1	6,6	6,4	39,8	20,4	39,3	37,0	42,4
MENTA	R1	0,587	0,625	1,915	2,832	2,752	3053	3139	11188	36697	38923
	R2	0,709	0,567	1,575	2,741	2,422	3031	3221	3284	37196	43156
	R3	0,601	0,561	1,813	2,684	2,818	3062	3123	30019	43894	43804
	R4	0,632	0,578	1,948	2,289	2,783	3048	3146	14882	41894	43963
	$\bar{x}$	0,632	0,583	1,813	2,637	2,694	3048,5	3157,3	14843,3	39920,3	42461,5
	$\sigma$	0,055	0,029	0,169	0,240	0,183	13,0	43,6	11214,3	3535,4	2384,7
	CV (%)	8,6	5,0	9,3	9,1	6,8	0,4	1,4%	75,6	8,9	5,6
PACHULÍ	R1	3,492	3,49	3,197	2,775	2,551	12260	11539	13690	15799	17610
	R2	3,68	3,386	2,942	3,172	2,563	11362	10959	11759	43224	45409
	R3	3,586	3,888	3,48	3,212	3,098	10048	35977	40753	16109	15892
	R4	3,586	3,749	3,4	3,192	3,151	21649	9170	40531	44666	18017
	$\bar{x}$	3,586	3,628	3,255	3,088	2,841	13829,75	16911,25	26683,25	29949,5	24232
	$\sigma$	0,133	0,231	0,240	0,209	0,328	5291,4	12750,4	16137,7	16171,8	14148,0
	CV (%)	3,7	6,4	7,4	6,8	11,6	38,3	75,4	60,5	54,0	58,4
T	R1	3,369	2,441	2,119	2,43	2,713	2308	3978	39932	24141	28229
	R2	3,307	2,617	2,086	2,061	2,358	2071	13141	3018	38590	28744
	R3	3,015	2,617	2,095	2,899	3,047	2258	3888	45464	42469	12930
	R4	3,34	2,792	2,1	2,099	2,535	1724	4802	28353	46291	26575

$\bar{x}$	3,258	2,617	2,100	2,372	2,663	2090,3	6452,3	29191,8	37872,8	24119,5
$\sigma$	0,164	0,143	0,014	0,388	0,294	264,6	4478,1	18849,5	9679,3	7516,8
CV (%)	5,0	5,5	0,7	16,4	11,0	12,7	69,4	64,6	25,6	31,2

**Tabla 15.** Resultados de las lecturas de los pocillos con los AE frente a *E. coli* portadora de BLEE utilizando como indicadores MTT y Resazurina.

	R	Microplaca con MTT					Microplaca con Resazurina				
		Concentración (mg/mL)					Concentración (mg/mL)				
		16	8	4	2	1	16	8	4	2	1
ANÍS	R1	2,631	2,894	3,006	2,572	3,306	43273	40979	35871	26996	45401
	R2	2,914	2,714	3,012	2,578	2,517	41262	40404	37549	32333	29095
	R3	2,856	2,85	2,586	3,168	3,24	44684	38852	34047	35599	18863
	R4	2,889	2,83	3,056	2,542	2,583	40537	40761	41436	27624	36224
	$\bar{x}$	2,8225	2,822	2,915	2,715	2,912	42439	40249	37226	30638	32395,8
	$\sigma$	0,130	0,077	0,220	0,302	0,419	1892	961,02	3150,2	4075,7	11222,3
	CV (%)	4,6	2,7	7,6	11,1	14,4	4,5	2,4	8,5	13,3	34,6
CANELA	R1	1,627	1,652	0,948	0,669	0,625	1563	1500	2427	2692	2933
	R2	1,726	1,487	0,972	0,669	0,615	1662	1685	2435	2705	2959
	R3	1,828	1,583	1,283	0,692	0,625	1591	1489	2313	2660	2926
	R4	1,723	1,585	1,126	0,673	0,625	1529	1594	2461	2731	2935
	$\bar{x}$	1,726	1,577	1,127	0,676	0,623	1586,3	1567	2403	2697	2938,25
	$\sigma$	0,082	0,068	0,156	0,011	0,005	56,506	91,6988	79,019	29,518	14,3614
	CV (%)	4,8	4,3	13,8	1,6	0,8	3,6	5,9	3,3	1,1	0,5
CEDRÓN	R1	0,658	0,624	0,602	2,204	2,049	7689	5615	5297	28038	41120
	R2	0,817	0,69	0,597	1,92	2,454	5763	4396	4184	45889	45146
	R3	0,837	0,704	0,576	2,156	2,032	6045	4807	3732	19971	18698
	R4	0,877	0,702	0,591	2,027	2,178	5388	4922	4370	3701	21668
	$\bar{x}$	0,7973	0,680	0,592	2,077	2,178	6221,3	4935	4395,8	24400	31658
	$\sigma$	0,0961	0,038	0,011	0,128	0,195	1014,8	506,45	657,85	17541	13406,7
	CV (%)	12,1	5,6	1,9	6,2	9	16,3	10,3	15,0	71,9	42,3
HIERBA LUISA	R1	0,965	0,76	0,666	2,761	3,134	4720	4457	3933	44038	46122
	R2	0,943	0,709	0,599	3,023	2,533	4353	3984	3642	47032	46716
	R3	1,148	0,799	0,69	2,679	2,859	4714	4357	3966	3635	47037
	R4	1,216	0,755	0,601	2,254	3,1	4007	4025	3857	44367	37446
	$\bar{x}$	1,068	0,756	0,639	2,679	2,907	4448,5	4205,75	3849,5	34768	44330,3
	$\sigma$	0,1348	0,037	0,046	0,319	0,277	340,71	236,535	145,67	20799	4605,13
	CV (%)	12,6	4,9	7,2	11,9	9,5	7,7	5,6	3,8	59,8	10,4
JENGIBRE	R1	0,621	0,57	2,325	2,591	3,069	3947	39968	34900	13900	15964
	R2	0,584	0,575	2,671	2,125	3,029	3533	3324	39153	36115	36303
	R3	0,649	0,593	2,276	2,976	2,975	3827	3487	20955	13135	16859
	R4	0,595	0,542	2,027	2,672	3,044	3465	3436	22515	14316	23672
	$\bar{x}$	0,6123	0,570	2,325	2,591	3,029	3693	12553,8	29381	19367	23199,5
	$\sigma$	0,029	0,021	0,2652	0,352	0,04	230,98	18276,3	9020,2	11176	9389,34
	CV (%)	4,7	3,7	11,4	13,6	1,3	6,3	145,6	30,7	57,7	40,5
LIMÓN	R1	3,908	3,468	3,011	2,76	2,575	9273	28309	31698	35007	31099
	R2	3,908	3,556	3,498	3,488	3,157	12283	10938	32323	19070	16630
	R3	3,893	3,663	3,137	2,744	2,659	17247	28043	10915	13174	34592
	R4	3,999	3,577	3,64	3,5	2,521	21118	31353	12323	14624	41288
	$\bar{x}$	3,927	3,566	3,322	3,123	2,728	14980	24660,8	21815	20469	30902,3
	$\sigma$	0,0485	0,080	0,296	0,428	0,292	5249,1	9270,91	11790	10012	10411,8
	CV (%)	1,2	2,2	8,9	13,7	10,7	35,0	37,6	54,0	48,9	33,7
R1	0,607	0,576	2,129	2,811	2,869	2938	3026	3124	40226	34561	

	<b>R2</b>	0,657	0,554	2,063	2,301	2,88	2910	3009	13939	41910	39184
	<b>R3</b>	0,583	0,567	2,217	2,555	2,772	2930	2998	32176	41501	34555
	<b>R4</b>	0,577	0,556	2,016	2,68	2,999	2974	3009	3250	41432	39621
	<b><math>\bar{x}</math></b>	0,606	0,563	2,106	2,587	2,88	2938	3010,5	13122	41267	36980,3
	<b><math>\sigma</math></b>	0,0364	0,010	0,087	0,217	0,093	26,733	11,5614	13676	725,51	2802,66
	<b>CV (%)</b>	6,0	1,8	4,1	8,4	3,2	0,9	0,4	104,2	1,8	7,6
<b>PACHULÍ</b>	<b>R1</b>	3,617	3,528	3,426	3,343	3,214	24416	16290	16756	20372	20573
	<b>R2</b>	3,616	3,379	3,535	2,575	3,287	25670	15717	15656	16689	36816
	<b>R3</b>	3,615	3,437	2,926	2,647	3,248	26763	14055	16328	19735	18708
	<b>R4</b>	3,943	3,527	3,265	3,266	3,288	33727	16394	31940	34176	21190
	<b><math>\bar{x}</math></b>	3,6978	3,468	3,288	2,958	3,259	27644	15614	20170	22743	24321,8
	<b><math>\sigma</math></b>	0,1635	0,073	0,266	0,403	0,035	4167,2	1081,12	7859,7	7789,6	8396,06
	<b>CV (%)</b>	4,4	2,1	8,1	13,6	1,1	15,1	6,9	39,0	34,3	34,5
<b>TIPO</b>	<b>R1</b>	3,348	1,346	2,031	2,422	3,106	2143	2468	41448	32002	41420
	<b>R2</b>	3,182	1,3823	2,473	2,989	2,288	1999	2404	38941	42597	42900
	<b>R3</b>	3,205	1,49	1,947	2,179	2,726	2050	2456	41514	40895	42034
	<b>R4</b>	3,492	1,311	1,93	2,097	3,058	1865	2529	38955	42097	37513
	<b><math>\bar{x}</math></b>	3,3068	1,382	2,095	2,422	2,795	2014,3	2464,25	40215	39398	40966,8
	<b><math>\sigma</math></b>	0,1437	0,077	0,256	0,403	0,378	115,99	51,3314	1462,7	4982	2381,2
	<b>CV (%)</b>	4,3	5,6	12,2	16,6	13,5	5,8	2,1	3,6	12,6	5,8

La mayoría de las lecturas obtenidas de los pocillos de los controles y los AE frente a *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* portadora de BLEE con resazurina presentan un CV mayor al 15 % (Taverniers et al., 2004), a diferencia de los resultados obtenidos con MTT. Es decir que los resultados utilizando como indicador resazurina presentaron mayor variabilidad, por lo tanto, no se consideran datos fiables para aplicar el método ANOVA, el test de Tukey y determinar el %, la CI 50 % y 90 %.

La variabilidad de los resultados obtenidos con resazurina puede deberse a la composición del aceite esencial, ya que aparte de terpenos, monoterpenos y sesquiterpenos pueden contener en su estructura química aldehídos y cetonas. Csepregi et al., 2018 menciona a la ciclodextrina como una molécula que presenta interferencia con la resorufina (fluorescencia), debido a que la ciclodextrina es un hidrato de carbono que a la vez presenta aldehídos y cetonas, por lo tanto, la señal de fluorescencia aumenta generando errores en las lecturas obtenidas. Además, según Luzak et al., 2022 determina que la pureza del reactivo Presto blue puede verse afectada por la contaminación del mismo con resorufina al estar el reactivo por mucho tiempo expuesto a la luz. Mismo que puede causar auto fluorescencia antes del ensayo.

### 3.3 Análisis estadístico

A partir del método ANOVA el valor de  $p$  obtenido del análisis del control positivo y los AE de canela, cedrón, hierba luisa, menta y jengibre frente a *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* portadora de BLEE fue de  $6.27 \times 10^{-8}$  y  $6.46 \times 10^{-5}$  respectivamente.

Se realizó el test de Tukey y se obtuvieron valores de  $p < 0,05$  con respecto al análisis del control positivo frente a los AE, es decir que existe una diferencia significativa entre todos los AE tanto frente a *E. coli* ATCC 25922 como a *E. coli* portadora de BLEE con respecto al control positivo. Por lo tanto, se podría determinar que estos AE no presentan mejor actividad antibacteriana que el antibiótico.

También se determinó el valor de  $p < 2 \times 10^{-16}$  del análisis del control negativo y los AE de canela, cedrón, hierba luisa, menta y jengibre tanto frente a *E. coli* ATCC 25922 como a *E. coli* portadora de BLEE. Es decir que las medias de las absorbancias de cada variable independiente son diferentes. Al aplicar el test de Tukey a partir de los datos utilizados en el método ANOVA se obtuvo valores de  $p < 0,05$  y se podría determinar que los AE no presentan mejor actividad que el antibiótico, sin embargo, sí podrían presentar actividad contra *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* portadora de BLEE por su gran diferencia estadísticamente significativa frente al control negativo.

### 3.4 Resultados del %I, CI 50 % y CI 90 %

El rango de acción de los AE contra las bacterias puede alcanzar valores que inhiben el crecimiento bacteriano (bacteriostáticos) o en concentraciones altas los AE pueden ser más “agresivos” dando lugar a la disminución de células bacterianas (bactericidas) (Faleiro, 2011). Para analizar estos efectos sobre la población bacteriana es necesario realizar una curva (Figura 6).

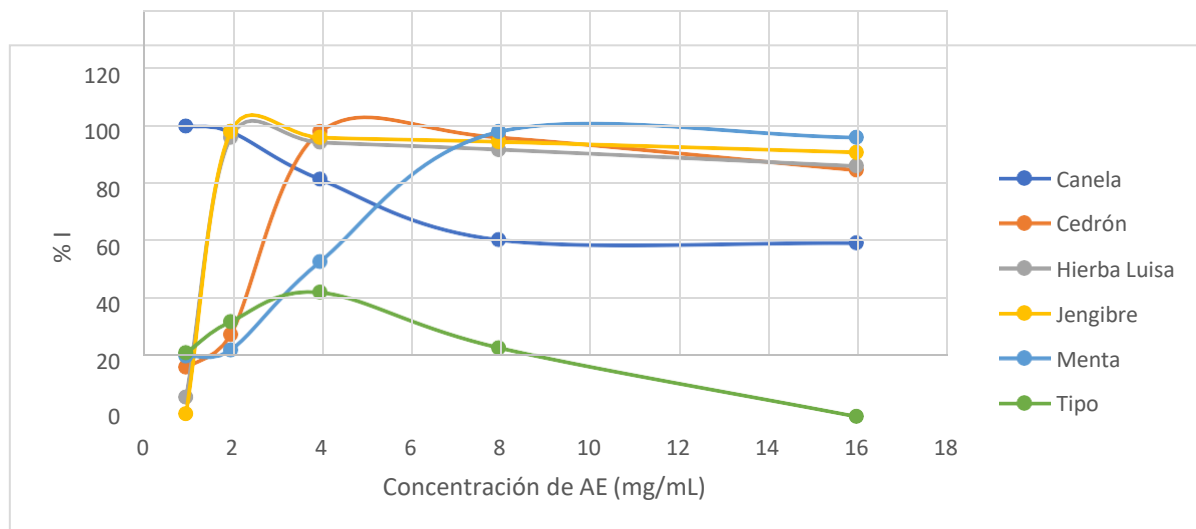
En la figura 6 se observó como el AE de canela podría tener un efecto bactericida debido a que al aumentar la concentración del aceite existió disminución de la población bacteriana. En cambio, en el caso de los AE de hierba luisa y jengibre en un rango de concentración de 1 a 2 mg/mL existió inhibición del crecimiento de *E. coli* ATCC 25922, de igual forma sucede con el AE de cedrón en concentraciones de 1 a 4 mg/mL y el aceite esencial de menta entre 1 y 8 mg/mL, sin embargo, a concentraciones mayores en el caso de estos cuatro AE la población bacteriana



decrece, por lo tanto, se podría determinar que estos AE a concentraciones mayores presentan actividad bactericida.

El AE de tipo frente a *E. coli* ATCC 25922 presenta una tendencia diferente a los demás AE, puesto que en concentraciones de 1 a 4 mg/mL se podría determinar que genera inhibición, sin embargo, a una concentración de 8 mg/mL se observó que la población bacteriana decrece, por lo tanto, el aceite no llega a inhibir más allá del 44,14% del crecimiento de la población de *E. coli*.

**Figura 6.** Efecto de la concentración de los AE de canela, cedrón, hierba luisa, jengibre, menta y tipo sobre *E. coli* ATCC 25922. Fuente: autores.



Nota: % I = porcentaje de inhibición del crecimiento de *E. coli* ATCC 25922, AE = aceites esenciales.

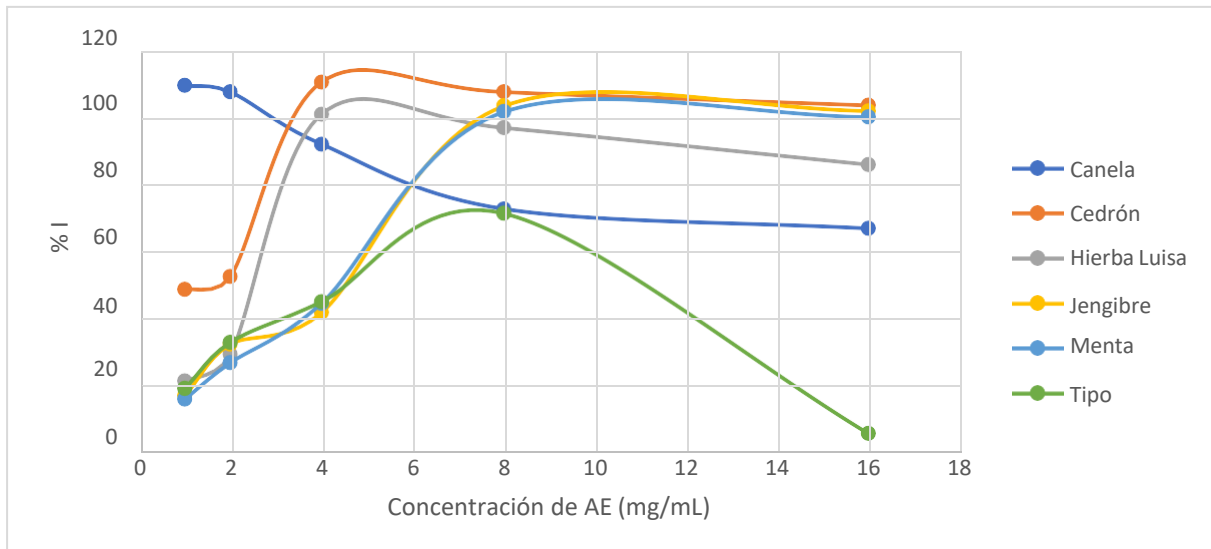
El aceite esencial de canela frente a *E. coli* portadora de BLEE se podría decir que presentó un efecto bactericida, los AE de jengibre y menta en cambio, en un rango de concentraciones entre 1 y 8 mg/mL se podría determinar que inhibieron el crecimiento bacteriano al igual que los AE de hierba luisa y cedrón en concentraciones de 1 a 4 mg/mL aproximadamente, sin embargo, observamos que a concentraciones mayores la población bacteriana disminuyó (Figura 7).

A concentraciones menores a 8 mg/mL se podría estimar que el aceite esencial de tipo tiene un efecto bacteriostático y a una concentración de 16 mg/mL presentaría



tener un efecto bactericida.

**Figura 7.** Efecto de la concentración de los AE de canela, cedrón, hierba luisa, jengibre, tipo y menta sobre *E. coli* portadora de BLEE. Fuente: autores.



Nota: % I = porcentaje de inhibición del crecimiento de *E. coli* portadora de BLEE, AE = aceites esenciales.

Los AE de anís, limón y pachulí no se encuentran graficados debido a que no presentaron porcentajes de inhibición mayores a 1 por lo tanto no podrían ser considerados como AE con actividad antibacteriana a concentraciones menores a 16 mg/mL.

Una vez determinado el % I se obtuvo la CI 50 % y 90 % (Tabla 16).

**Tabla 16.** Resultados de la CI 50 % y CI 90 % frente a *E. coli* ATCC 25922 y portadora de BLEE.

Aceite esencial	AE frente a <i>E. coli</i> ATCC 25922		AE frente a <i>E. coli</i> portadora de BLEE	
	CI 50 % (mg/mL)	CI 90 % (mg/mL)	CI 50 % (mg/mL)	CI 90 % (mg/mL)
Anís	Mayor a 16		Mayor a 16	
Canela	Menor a 1		Menor a 1	
Cedrón	2,43	3,57	2,12	3,32
Hierbaluisa	1,38	1,87	2,55	3,75
Jengibre	1,40	1,86	4,62	7,24

Limón	Mayor a 16		Mayor a 16	
Menta	3,58	6,80	4,51	7,34
Pachulí	Mayor a 16		Mayor a 16	
Tipo	Menor a 8		Menor a 16	

La actividad antibacteriana de cada aceite esencial depende de su composición y concentración, los cuales pueden variar debido a diferentes factores genéticos o extrínsecos como el medio ambiente, el método de extracción o condiciones de almacenamiento (Reyes et al., 2015). Lo cual influye en la CMI obtenida de cada aceite esencial con respecto a la bibliografía encontrada.

El aceite esencial de anís frente a *E. coli* obtenida de una infección urogenital presentó una CMI de 25 mg/mL (Maofari et al., 2013). En el presente estudio se obtuvo una CI 90 % mayor a 16 mg/mL frente a *E. coli* ATCC 25922, al comparar ambos datos se podría estimar que a una concentración mayor a 16 mg/mL el aceite esencial de anís podría presentar actividad frente a *E. coli* ATCC 25922.

Sim et al., 2019 señala que el aceite esencial de canela presenta actividad antibacteriana con una CMI de 307 µg/mL frente a *E. coli* ATCC 25922 y una CMI de 615 µg/mL frente a *E. coli* productora de BLEE, al comparar estos resultados con respecto a los obtenidos de la tabla 16 se puede determinar que a concentraciones menores el aceite de este estudio podría presentar actividad bacteriostática.

El valor de la CI 90 % obtenido del aceite esencial de cedrón frente a *E. coli* ATCC 25922, fue de 3,57 mg/mL este valor es concordante con el resultado reportado por Oukerrou et al., 2017, quien estimó la actividad antibacteriana del aceite esencial de cedrón frente a *E. coli* ATCC 25922 y presentó una CMI que varió de  $2,84 \pm 0,83$  a  $3,73 \pm 1,00$  mg/mL según las diferentes regiones de Marruecos. Razón por la cual se podría estimar que el aceite esencial de cedrón presenta actividad antibacteriana frente a *E. coli* ATCC 25922.

La CI 90 % obtenida del aceite esencial de cedrón frente a *E. coli* portadora de BLEE fue de 3,32 mg/mL por lo que se podría considerar que el aceite también tiene actividad antibacteriana contra *E. coli* resistente a antibióticos betalactámicos.

Al estudiar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Cymbopogon schoenanthus* en Brasil frente a *E. coli* ATCC 25922 se obtuvo una CI 50 % de 1,98 mg/mL y una CI 90 % de 2,10 mg/mL (Murbach, Nunes, da Silva, et al., 2014) y de *Cymbopogon flexuosos* en India frente a la misma cepa bacteriana una CMI de 0,5482 mg/mL (Ainarayana et al., 2012). En la tabla 16 se muestra que la CI 50 % del aceite esencial de hierba luisa fue de 1,38 mg/mL y la CI 90 % fue de 1,87 mg/mL frente a *E. coli* ATCC 25922. Al analizar todos los valores mencionados se podría determinar que el aceite esencial de hierba luisa de la India presenta una mayor actividad antibacteriana frente a *E. coli* ATCC 25922 que el aceite del presente estudio y la CI 50 % y 90 % obtenidas son ligeramente menores a las obtenidas del aceite esencial de hierba luisa de Brasil, por lo tanto se podría definir que el aceite esencial de hierba luisa presenta actividad antibacteriana a pesar de ser de distintas especies y sus concentraciones mínimas inhibitorias podrían diferir por distintos factores extrínsecos. De igual forma según los datos obtenidos de la tabla 16 se podría estimar que *E. coli* productora de BLEE es sensible al aceite esencial de hierba luisa.

La CMI de 0,31 mg/mL obtenida del aceite esencial del rizoma de jengibre (Malasia) frente a *E. coli* ATCC 25922 determinó que la bacteria es sensible al aceite esencial (Sivasothy et al., 2011), sin embargo al comparar con la CI 90 % de la tabla 16, se determinó que el aceite esencial de jengibre (Malasia) podría presentar una mejor actividad antibacteriana frente a *E. coli* ATCC 25922, lo cual se puede deber a diferentes factores extrínsecos (como condiciones de cultivo y manejo, etc.). La CI 90% obtenida frente a *E. coli* BLEE fue de 7,24 mg/mL determinando que el aceite esencial de jengibre puede presentar actividad antibacteriana contra *E. coli* portadora de BLEE, pero es mayor frente a *E. coli* ATCC 25922.

La CI 50 % y CI 90 % del aceite esencial de limón obtenido frente a *E. coli* ATCC 25922 fue mayor a 16 mg/mL y Murbach, Nunes, da Silva, et al., 2014 reportan concentraciones inhibitorias tanto al 50% como 90% mayores a 25,2 mg/mL, datos con los cuales se podría determinar que el aceite esencial no es activo a las concentraciones probadas en la presente investigación frente a *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* portadora de BLEE (Tabla 16).

La CI 90 % obtenida del aceite esencial de menta frente a *E. coli* ATCC 25922 fue de

6,80 mg/mL, en cambio, frente a *E. coli* portadora de BLEE fue de 7,34 mg/mL. Al comparar estos valores con la CMI de 0,21 mg/mL obtenida por Hussain et al., 2011 en Pakistán, se podría estimar que el aceite esencial obtenido en este país presenta una mayor actividad antibacteriana frente a *E. coli* ATCC 25922, esto se podría deber a diferentes factores extrínsecos. Analizando la bibliografía y los datos obtenidos (Tabla 16) se podría definir que el aceite esencial de menta frente a *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* portadora de BLEE presenta una baja actividad antibacteriana en comparación con los datos obtenidos por Hussain et al., 2011.

La CI 50 % y CI 90% del aceite esencial de pachulí obtenido frente a *E. coli* ATCC 25922 fue mayor a 16 mg/mL. Murbach, Nunes, da Silva, et al., 2014 reportaron una CI 50 % y CI 90 % frente a *E. coli* ATCC 25922 mayor a 30,27 mg/mL, al analizar ambos datos se podría estimar que el aceite esencial a concentraciones menores a 30,27 mg/mL no presenta actividad antibacteriana frente a *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* portadora de BLEE (Tabla 16).

La CI 50% y 90 % del aceite esencial del “tipo” frente a *E. coli* ATCC 25922 a concentraciones menores a 8 mg/mL se podrían determinar en un rango con intervalos cercanos entre las diferentes concentraciones, de igual forma frente a *E. coli* productora de BLEE a una concentración menor a 16 mg/mL. El aceite esencial del presente estudio se podría estimar que presenta mejor actividad antibacteriana que el reportado por Gómez, 2017 con una CMI de 132 mg/mL.

## 4 CONCLUSIONES

A partir del coeficiente de variación se determinó que el indicador resazurina presenta mayor variabilidad con respecto al MTT, por lo tanto, no se utilizó para aplicar el método ANOVA, el test de Tukey, el %I, la CI 50 % y la CI 90%.

Con el método ANOVA y test de Tukey se determinó que los AE de canela, cedrón, hierba luisa, jengibre y menta no tienen una mejor actividad que el control positivo, sin embargo, si producen inhibición del crecimiento bacteriano.

En base a las diferentes concentraciones de los AE y el % I se logró analizar que los AE de cedrón, hierba luisa, jengibre, menta y tipo podrían tener un efecto bacteriostático o bactericida, en comparación con la canela que a las concentraciones

estudiadas solo mantuvo su efecto bactericida.

Se puede estimar que los AE de canela, cedrón, hierba luisa, menta, jengibre y tipo presentan actividad antibacteriana frente a *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* portadora de BLEE. Por otra parte, los AE de anís, limón y pachulí no mostraron actividad a concentraciones menores a 16 mg/mL frente a *E. coli* BLEE.

## 5 RECOMENDACIONES

Realizar un análisis cromatográfico de cada aceite esencial para determinar si contiene moléculas que puedan interferir con el indicador resazurina.

Disminuir la concentración inicial de los AE y que el intervalo de cada dilución sea más cercano entre sí.

Analizar a mayores concentraciones los aceites esenciales de anís, limón y pachulí con el objetivo de conocer si presentan actividad antibacteriana.

Realizar una inspección visual y un análisis de la microplaca preparada después de la incubación antes de colocar los indicadores.

## 6 BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, J., Salinas, R., Martínez, B., Cerdá, A., Gómez, B., & Nuñez, E. (2020). *Alimentos de la región de Murcia: Limón* (Vol. 1). Universidad Católica de Murcia (UCAM).
- Adinarayana, G., Rahul, G., Ravi Kiran, S., Syamsundar, K., & Rajeswara Rao, B. (2012). Evaluation of antimicrobial potential of field distilled and water-soluble essential oils of *Cymbopogon flexuosos*. *Journal of Pharmacognosy*, 3(2), 142–146.
- Aguilar, D. (2015). E. coli BLEE, la enterobacteria que ha atrevasado barreras. *Revista De Investigación Médica*, 22(2), 57–63.
- Ancalla, L., & Uriarte, L. (2018). *Efecto de la ingesta de jugo de limón (Citrus x limon) y jengibre (Zingiber officinale) sobre el perfil lipídico en ratas hipercolesterolemicas inducidas experimentalmente*. [Universidad Nacional San Agustín de Arequipa]. <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/5745/NUaninl.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Andrade, Y. (2017). *Proceso de extracción supercrítica del aceite esencial de Jamaica (Pimenta dioica L derri)*. Universidad Autónoma del Estado de México.
- Azurero, A., Jaramillo, C., San Martin, D., & D'Armas, H. (2016). Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador. *Revista Ciencia Unemi*, 9(20), 11–18.
- Bayas, A. M. I. (2018). "ESTUDIO DEL PERFIL FITOQUÍMICO Y POSIBLES APLICACIONES DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS, ETÉREO Y ACUOSO DEL SUNFO (*Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze)". *Universidad Técnica De Cotopaxi Facultad*, 1, 101.
- Benkova, M., Soukup, O., & Marek, J. (2020). Antimicrobial susceptibility testing: currently used methods and devices and the near future in clinical practice. *Journal of Applied Microbiology*, 129(4), 806–822. <https://doi.org/10.1111/jam.14704>

- Calvache, D., Rodríguez, R., & Troya, J. (2018). Determinación de propiedades térmicas de aceites esenciales. *Congreso de Ciencia y Tecnología ESPE*, 13(1), 205–207. <https://doi.org/10.24133/cctespe.v13i1.736>
- Can Başer, K. H., & Buchbauer, G. (2015). Handbook of essential oils: Science, technology, and applications, second edition. In *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications, Second Edition*. <https://doi.org/10.1201/b19393>
- Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines*, 4(3), 58. <https://doi.org/10.3390/medicines4030058>
- Csepregi, R., Lemli, B., Kunsági-Máté, S., Szente, L., Kőszegi, T., Némethi, B., & Poór, M. (2018). Complex Formation of Resorufin and Resazurin with B-Cyclodextrins: Can Cyclodextrins Interfere with a Resazurin Cell Viability Assay? *Molecules*, 23(2), 382. <https://doi.org/10.3390/molecules23020382>
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3). <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>
- Eloff, J. N. (2019). Avoiding pitfalls in determining antimicrobial activity of plant extracts and publishing the results. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1), 106. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2519-3>
- Faleiro, M. (2011). The mode of antibacterial action of essential oils . *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, 1(1), 1143–1156.
- Gadisa, E., Weldearegay, G., Desta, K., Tsegaye, G., Hailu, S., Jote, K., & Takele, A. (2019). Combined antibacterial effect of essential oils from three most commonly used Ethiopian traditional medicinal plants on multidrug resistant bacteria. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2429-4>
- García, F. (2014). *Evaluación de los efectos del proceso de secado sobre la calidad*

de la Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) y la Hierbabuena (*Mentha spicata*).  
[Universidad Nacional de Colombia].  
<https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/53841383/822137.2014-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1643228253&Signature=SUcFAR7rePUfMdN2-vyu5rJ5Zb3nSva8f0FsNuYsbrtrqINHCG0W~NVRPMcENxyyngjj0K-SWWPV71v4MMSE5f4sJa1FhxDNZoOEBfjJietQp2NSdHw~CTxOjwOSt-sgZ-MVjKEwx-ZmNQZI>

Gil, A., Van Baren, C. M., Di Leo Lira, P. M., & Bandoni, A. L. (2007). Identification of the genotype from the content and composition of the essential oil of lemon verbena (*Aloysia citriodora* Palau). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8664–8669. <https://doi.org/10.1021/jf0708387>

Gomez, E. (2017). “*SENSIBILIDAD MICROBIANA Y PODER INSECTICIDA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE Clinopodium nubigenum Y Ambrosia arborescens*.” Universidad Técnica del Norte.

Gomez, Sosa, & Lopez. (2016). Extracción asistida con microondas de aceite esencial de acuyo y evaluación de su efecto antifúngico contra *Penicilium expansum*. *Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(1), 173–178.

Hanif, M. A., Nisar, S., Khan, G. S., Mushtaq, Z., & Zubair, M. (2019). Essential Oils. In *Essential Oil Research* (pp. 3–17). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-16546-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-16546-8_1)

Hill, D. (2017). *Manual de química de aceites esenciales* (1st ed., Vol. 1). Doterra.

Hojjati, M., & Barzegar, H. (2017). Chemical Composition and Biological Activities of Lemon (*Citrus limon*) Leaf Essential Oil. *Nutrition and Food Sciences Research*, 4(4). <https://doi.org/10.29252/nfsr.4.4.3>

Hussain, A. I., Anwar, F., Nigam, P. S., Sarker, S. D., Moore, J. E., Rao, J. R., & Mazumdar, A. (2011). Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. *LWT - Food Science and Technology*, 44(4). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.10.005>

Hussain, A. I., Anwar, F., Shahid, M., Ashraf, M., & Przybylski, R. (2010). Chemical



Composition, and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oil of Spearmint (*Mentha spicata* L.) From Pakistan. *Journal of Essential Oil Research*, 22(1), 78–84. <https://doi.org/10.1080/10412905.2010.9700269>

Invitrogen. (2011). Presto Blue Cell Viability Reagent Protocol. In *life technologies*.

Irshad, M., Ali Subhani, M., & Amjad, H. (2012). Biological Importance of Essential Oils. In *Essential Oils- Oils of Nature* (p. 13).

Jeyaratnam, N., Nour, A. H., Kanthasamy, R., Nour, A. H., Yuvaraj, A. R., & Akindoyo, J. O. (2016). Essential oil from Cinnamomum cassia bark through hydrodistillation and advanced microwave assisted hydrodistillation. *Industrial Crops and Products*, 92, 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.07.049>

Klimek-szczykutowicz, M., Szopa, A., & Ekiert, H. (2020). Citrus limon (Lemon) phenomenon—a review of the chemistry, pharmacological properties, applications in the modern pharmaceutical, food, and cosmetics industries, and biotechnological studies. *Plants*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/plants9010119>

Luzak, B., Siarkiewicz, P., & Boncler, M. (2022). An evaluation of a new high-sensitivity PrestoBlue assay for measuring cell viability and drug cytotoxicity using EA.hy926 endothelial cells. *Toxicology in Vitro*, 83, 105407. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2022.105407>

Mahboubi, M. (2021). *Mentha spicata* L. essential oil, phytochemistry and its effectiveness in flatulence. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 11(2), 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.08.011>

Maofari, A., Hajjaji, S., Debbab, A., Zaydoun, S., Ouaki, B., Charof, R., Mennane, Z., Hakiki, A., & Mosaddak, M. (2013). Chemical composition and antibacterial properties of essential oils of *Pimpinella anisum* L. growing in Morocco and Yemen. *Scientific Study & Research*, 14(1), 011–016.

Muntean, D., Licker, M., Alexa, E., Popescu, I., Jianu, C., Buda, V., Dehelean, C. A., Ghiulai, R., Horhat, F., Horhat, D., & Danciu, C. (2019). Evaluation of essential oil obtained from *Mentha piperita* L. against multidrug-resistant strains. *Infection and Drug Resistance*, Volume 12, 2905–

2914.<https://doi.org/10.2147/IDR.S218141>

Murbach, B., Nunes, L., da Silva, I., & Fernandes, A. (2014). Antimicrobial activity of essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 26(1). <https://doi.org/10.1080/10412905.2013.860409>

Murbach, B., Nunes, L., da Silva Probst, I., & Fernandes, A. (2014). Antimicrobial activity of essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 26(1), 34–40. <https://doi.org/10.1080/10412905.2013.860409>

Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451–1474. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>

Orellana, A. (2009). *Agrotecnología para el cultivo del Pachulí*. SENACYT. <https://www.icta.gob.gt/publicaciones/Plantas medicinales/Agrotecnologia para el cultivo del Pachuli.pdf>

Oukerrou, M. A., Tilaoui, M., Mouse, H. A., Leouifoudi, I., Jaafari, A., & Ziad, A. (2017). Chemical Composition and Cytotoxic and Antibacterial Activities of the Essential Oil of *Aloysia citriodora* Palau Grown in Morocco. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/7801924>

Paco, F. N., Tatiana, de L. Á. M., Edison, A. O., Pablo, G., & Andrea, F. (2018). *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze essential oil: Chemical composition, antioxidant activity, and antimicrobial test against respiratory pathogens. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 10(9), 149–157. <https://doi.org/10.5897/jpp2017.0467>

Parikh, J. K., & Desai, M. A. (2011). Hydrodistillation of essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. *International Journal of Food Engineering*, 7(1). <https://doi.org/10.2202/1556-3758.2067>

Peredo, H., Palou, E., & López, A. (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción. *Ingeniería de Alimentos*, 24–32.

Rasooli, I., Saderi, H., MohammadSalehi, R., Dadashi, M., & Owlia, P. (2021).

Standardization of in-vitro methods for determination of antimicrobial properties of essential oils. *Reviews in Medical Microbiology*, 00(00), 1–13. <https://doi.org/10.1097/MRM.0000000000000296>

Raveau, R., Fontaine, J., & Lounès-Hadj Sahraoui, A. (2020). Essential oils as potential alternative biocontrol products against plant pathogens and weeds: A review. *Foods*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/foods9030365>

Requena, R., Vargas, M., & Chiralt, A. (2019). Study of the potential synergistic antibacterial activity of essential oil components using the thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay. *LWT*, 101. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.093>

Reyes, F., Franco, A., Ramírez, N., Palou, E., & López, A. (2015). Essential Oils: Antimicrobial Activities, Extraction Methods, and Their Modeling. *Food Engineering Reviews*, 7(3), 275–297. <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9099-2>

Ríos, J. L. (2016). Essential oils: What they are and how the terms are used and defined. In *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00001-8>

Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2016). Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual*.

Sailema, J. L. (2020). *Characterization of the antimicrobial and antioxidant properties of four native plants of Ecuador (Ilex guayusa, Aloysia citrodora, Clinopodium nubigenum, and Croton lechleri)*.

Sierra, J. (2017). *Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales de anís (Pimpinella anisum L) ecotipo Curahuasi y ecotipo Boliviano en tres cepas de interés*. [Universidad Nacional Micaela Bastidas De Apurímac]. [http://repositorio.unamba.edu.pe/bitstream/handle/UNAMBA/558/T\\_0288.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unamba.edu.pe/bitstream/handle/UNAMBA/558/T_0288.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Sim, J. X. F., Khazandi, M., Pi, H., Venter, H., Trott, D. J., & Deo, P. (2019). Antimicrobial effects of cinnamon essential oil and cinnamaldehyde combined

- with <sc>EDTA</sc> against canine otitis externa pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 127(1), 99–108. <https://doi.org/10.1111/jam.14298>
- Sivasothy, Y., Chong, W. K., Hamid, A., Eldeen, I. M., Sulaiman, S. F., & Awang, K. (2011). Essential oils of *Zingiber officinale* var. *rubrum* Theilade and their antibacterial activities. *Food Chemistry*, 124(2), 514–517. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.062>
- Song, Z., Wei, X., Xie, M., Zhao, X., Sun, J., Mao, Y., Wang, X., & Wang, W. (2022). Study on the microwave extraction process and product distribution of essential oils from citrus peel. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 171(September 2021), 108726. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2021.108726>
- Suquillo, V. (2017). *Elaboración de una forma farmacéutica con el aceite esencial que presente la mejor actividad antifúngica de entre las especies *Pimpinella anisum*, *Syzygium aromaticum*, y *Zingiber officinale* para el tratamiento de los libros del Área Histórica de la Univers [Universidad Central del Ecuador]*. [http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/10807/1/T-UCE\\_0008-QF003-2017.pdf](http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/10807/1/T-UCE_0008-QF003-2017.pdf)
- Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Shafi, K., Bhat, M. A., Prabhakar, A., Shalla, A. H., & Rather, M. A. (2019). A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 134(March), 103580. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103580>
- Taverniers, I., De Loose, M., & Van Bockstaele, E. (2004). Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23(8), 535–552. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.04.001>
- Tejada, P. J., Huarcaya, J. M., Melgarejo, G. C., Gonzales, L. F., Cahuana, J., Pari, R. M., Bohorquez, H. L., & Chacaltana, J. (2015). Caracterización de infecciones por bacterias productoras de BLEE en un hospital de referencia nacional. *Anales de La Facultad de Medicina*, 76(2), 161.

<https://doi.org/10.15381/anales.v76i2.11143>

Torrenegra, Miladys Esther, Pájaro, N. P., & León Méndez, G. (2017). Actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales de diferentes especies del género *Citrus*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 46(2).  
<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v46n2.67934>

Van Beek, T. A., & Joulain, D. (2018). The essential oil of patchouli, *Pogostemon cablin*: A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 33(1), 6–51.  
<https://doi.org/10.1002/ffj.3418>

Ventola, C. (2015). The Antibiotic Resistance Crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4).

Yunge, R. (2011). *Hidrodestilación continua del aceite esencial de Thymus vulgaris L.* Pontificia Universidad Católica de Chile .