

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

Actividad antibacteriana de aceites esenciales solos y en combinación con antibióticos sintéticos frente a *Pseudomonas aeruginosa*

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


Autores:

Mateo Sebastián Coronel Tenesaca

Camila Estefanía Piña Calle

Tutor:

María Paz Moscoso Romo

ORCID:  0000-0002-5736-6201

Cuenca, Ecuador

2023-08-29

Resumen

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram negativo que forma parte del grupo ESKAPE, el cual incluye a las principales bacterias catalogadas como prioridad en cuanto a la necesidad de desarrollo de nuevos agentes antibacterianos debido al aumento de resistencia antimicrobiana. La producción de biofilms y la resistencia intrínseca a antibióticos, son mecanismos de resistencia naturales de *P. aeruginosa* frente a la farmacoterapia convencional. Esta bacteria se ha relacionado con infecciones en pacientes inmunocomprometidos, particularmente en aquellos que están hospitalizados, debido al desarrollo de biopelículas en catéteres, respiradores artificiales o prótesis. En el presente estudio se realizó la obtención de aceites esenciales de dos plantas medicinales, *Clinopodium nubigenum* (tipo) y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) mediante hidrodestilación. Posteriormente, mediante el empleo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, se realizó la determinación de la actividad antimicrobiana mediante el método de microdilución en caldo y del posible efecto sinérgico con antibióticos convencionales mediante el método de tablero de ajedrez. Los resultados de este trabajo muestran que ambos aceites esenciales presentan actividad frente a la bacteria ya mencionada, siendo de 4096 µg/mL para el *Clinopodium nubigenum* (tipo) y 1024 µg/mL para *Cymbopogon citratus* (hierba luisa). En cuanto a la actividad sinérgica, el aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* (tipo) y ciprofloxacino mostraron un efecto sinérgico, con reducción de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) en 1/512 (8 µg/mL) y del segundo a 1/4 (0.03125 µg/mL). Por otro lado, los datos obtenidos del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) mostraron un efecto de indiferencia con el antibiótico probado.

Palabras clave: pseudomonas aeruginosa, aceite esencial, tipo, hierba luisa, sinergismo

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is a gram-negative bacillus that belongs to the ESKAPE group, which includes the main bacteria classified as a priority in the development of new antimicrobial agents due to the increasing antimicrobial resistance. The production of biofilms and intrinsic resistance to antibiotics are natural resistance mechanisms of *P. aeruginosa* against conventional pharmacotherapy. This bacterium has been linked to infections in immunocompromised patients, particularly those who are hospitalized, due to the development of biofilms on catheters, artificial respirators, or prosthetic devices. In this study, essential oils were obtained from two medical plants, *Clinopodium nubigenum* (tipo) y *Cymbopogon citratus* (lemon grass) through hydro-distillation. Subsequently, the antimicrobial activity was determined against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, using the broth microdilution method, and the potential synergism effect with conventional antibiotics was assessed using the checkerboard method. The results of this dissertation demonstrate that both essential oils have activity against the mentioned bacteria, with *Clinopodium nubigenum* (tipo) essential oil an activity of 4096 µg/mL and *Cymbopogon citratus* (lemon grass) at 1024 µg/mL. Regarding the synergism activity, *Clinopodium nubigenum* (tipo) essential oil and Ciprofloxacin showed a synergistic effect, with a reduction in the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) to 1/512 (8 µg/mL) and to 1/4 (0.03125 µg/mL) respectively. On the other hand, the data obtained from *Cymbopogon citratus* (lemon grass) essential oil showed an indifference effect with the antibiotic evaluated.

Keywords: pseudomonas aeruginosa, essential oil, tipo, lemon grass, synergism

Índice de contenido

Resumen	2
Abstract	3
Dedicatoria	9
Agradecimiento	10
Introducción	11
Objetivos	14
Objetivo general	14
Objetivos específicos	14
1. Marco Teórico	15
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
1.2 Plantas medicinales	18
1.3 Aceites esenciales	21
1.4 Métodos para determinación de actividad antimicrobiana	23
2. Metodología	26
2.1 Recolección de material vegetal	26
2.2 Extracción de aceites esenciales por hidrodestilación	26
2.3 Preparación del criostock	27
2.4 Determinación de la concentración inhibitoria mínima de los aceites esenciales mediante microdilución en caldo	28
2.5 Confirmación de la concentración inhibitoria mínima del antibiótico mediante microdilución en caldo	31
2.6 Determinación de sinergismo o antagonismo mediante método de checkerboard	32
2.7 Análisis estadístico	36
3. Resultados y discusión	37
3.1 Rendimiento del aceite esencial	37
3.2 Concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales	37
3.3 Concentración mínima inhibitoria del antibiótico	41
3.4 Ensayos de sinergismo entre el aceite esencial de <i>Clinopodium nubigenum</i> y antibiótico mediante técnica de tablero de ajedrez	42

3.5 Ensayos de sinergismo entre el aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i> y antibiótico mediante técnica de tablero de ajedrez	47
4. Conclusiones y recomendaciones	54
4.1 Conclusiones	54
4.2 Recomendaciones	54
5. Referencias	55
6. Anexos	66
Anexo A	66
Sitio de recolección de <i>Clinopodium nubigenum</i> (tipo) en Rañas, Azuay – Páramo Andino	66
Anexo B	67
Equipo de hidrodestilación con Trampa de Clevenger para extracción de aceites esenciales	67
Anexo C	68
Microplaca con resazurina que muestra la MIC de ciprofloxacino.	68
Anexo D	69
Absorbancias de las microplacas por el método del tablero de ajedrez para el aceite esencial de <i>Clinopodium nubigenum</i> (tipo)	69
Anexo E	71
Absorbancias de las microplacas por el método del tablero de ajedrez para el aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i> (hierba luisa)	71

Índice de figuras

Figura 1 A. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 en cultivo. Gram, 100X B. Estructura <i>P. aeruginosa</i>	16
Figura 2 Cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en agar Mueller-Hinton con la producción de pioverdina	16
Figura 3 Representación esquemática de los mecanismos de resistencia intrínsecos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
Figura 4 <i>Cymbopogon citratus</i> (hierba luisa)	19
Figura 5 <i>Clinopodium nubigenum</i> (tipo)	20
Figura 6 Esquema de la distribución en la microplaca para el screening de la MIC de aceites esenciales	30
Figura 7 Esquema de distribución en la microplaca para la determinación de la MIC de aceites esenciales	31
Figura 8 Técnica de Checkerboard. Esquema de distribución de las diluciones Aceite esencial – Antibiótico	34
Figura 9 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los aceites esenciales.....	39
Figura 10 Promedio del porcentaje de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> frente a la combinación aceite esencial <i>Clinopodium nubigenum</i> (tipo)-ciprofloxacino en comparación al punto de corte (20%)	45
Figura 11 Promedio del porcentaje de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> frente a la combinación aceite esencial <i>Cymbopogon citratus</i> (hierba luisa)-ciprofloxacino en comparación al punto de corte (20%)	51

Índice de tablas

Tabla 1 Diluciones para la determinación de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales de plantas medicinales en screening	29
Tabla 2 Rango de concentraciones para la microdilución de ciprofloxacino. Concentración comercial y concentración de la solución intermedia (SI)	32
Tabla 3 Volúmenes para la preparación de soluciones de los aceites esenciales	33
Tabla 4 Volúmenes para la preparación de soluciones de antibióticos (ciprofloxacino)	33
Tabla 5 Interpretación del sinergismo, antagonismo o indiferencia según la Σ FIC	35
Tabla 6 Rango de concentraciones estimadas para la determinación de la MIC por microdilución en caldo de los aceites esenciales de <i>Clinopodium nubigenum</i> (tipo) y <i>Cymbopogon citratus</i> (hierba luisa)	38
Tabla 7 Porcentaje de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> frente a la combinación aceite esencial de <i>Clinopodium nubigenum</i> (tipo)-ciprofloxacino, Réplica 1.....	43

Tabla 8 Porcentaje de crecimiento de *P. aeruginosa* frente a la combinación aceite esencial *Clinopodium nubigenum* (tipo)-ciprofloxacino, Réplica 243

Tabla 9 Porcentaje de crecimiento de *P. aeruginosa* frente a la combinación aceite esencial *Clinopodium nubigenum* (tipo)-ciprofloxacino, Réplica 344

Tabla 10 Promedio del porcentaje de crecimiento de *P. aeruginosa* frente a la combinación aceite esencial *Clinopodium nubigenum* (tipo)-ciprofloxacino44

Tabla 11 Promedio, desviación estándar y porcentaje de coeficiente de variación del porcentaje de crecimiento de *P. aeruginosa* frente a la combinación aceite esencial *Clinopodium nubigenum* (tipo)-ciprofloxacino en el pocillo E246

Tabla 12 Porcentaje de crecimiento de *P. aeruginosa* frente a la combinación aceite esencial *Cymbopogon citratus* (hierba luisa)-ciprofloxacino, Réplica 148

Tabla 13 Porcentaje de crecimiento de *P. aeruginosa* frente a la combinación aceite esencial *Cymbopogon citratus* (hierba luisa)-ciprofloxacino, Réplica 248

Tabla 14 Porcentaje de crecimiento de *P. aeruginosa* frente a la combinación aceite esencial *Cymbopogon citratus* (hierba luisa)-ciprofloxacino, Réplica 349

Tabla 15 Promedio del porcentaje de crecimiento de *P. aeruginosa* frente a la combinación aceite esencial *Cymbopogon citratus* (hierba luisa)-ciprofloxacino49

Tabla 16 Promedio, desviación estándar y porcentaje de coeficiente de variación del porcentaje de crecimiento de *P. aeruginosa* frente a la combinación aceite esencial *Cymbopogon citratus* (hierba luisa)-ciprofloxacino en el pocillo B1050

Dedicatoria

El presente trabajo de titulación es dedicado a mis padres, Iván y Eulalia, por todo el apoyo durante toda mi vida académica de todas las maneras posibles para poder culminar con éxito esta carrera. De igual forma a mis amigas que estuvieron en todo este proceso y lo hicieron más placentero con su ayuda, consejos y momentos compartidos.

A Camila Piña, por compartir conmigo este largo camino, hace cinco años al comenzar la carrera hasta este momento, y a pesar de todas las dificultades, lo logramos.

Mateo Coronel

El presente trabajo de titulación está dedicado a mis padres, Catalina y Gonzalo, quienes me apoyaron en cada paso de este proceso; ellos con amor, paciencia, palabras de apoyo y sacrificio inmensurable, me apoyaron e impulsaron en toda mi trayectoria académica. A mi hermano, mi cuñada y mis sobrinos, así como a Sebastián, por darme momentos de alegría que me permitieron continuar cada día.

A Mateo Coronel, por compartir conmigo este desafío y a todos mis amigos, quienes supieron ayudarme y darme aliento en cada uno de los momentos difíciles de estos últimos cinco años. Por su apoyo y cariño incondicional, así como por cada momento de risas y pláticas que me permitieron mantenerme firme en este proceso.

Camila Piña

Agradecimiento

Agradecemos a nuestras familias, por su gran apoyo y sacrificio, por siempre estar pendientes de nosotros y confiar en nuestras capacidades, así como a la Bqf. María Paz Moscoso y Bqf. Andrea Abril, por guiarnos en todos estos meses y brindarnos de sus conocimientos, lo cual nos permitió tener un buen desempeño en la realización del presente trabajo de titulación.

Agradecemos a la Universidad de Cuenca, así como a todos nuestros docentes por todos los conocimientos brindados, tanto teóricos, prácticos, así como principios y valores que incorporamos a nuestra vida diaria.

Mateo y Camila

Introducción

En los últimos años ha aumentado la preocupación en cuanto al incremento en la resistencia antimicrobiana a nivel mundial. Se considera que para el año 2050, la principal causa de muerte alrededor del mundo serán las infecciones causadas por microorganismos multirresistentes. Debido a la gravedad que representa la resistencia antimicrobiana para la salud pública, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2017 publicó una lista de patógenos prioritarios resistentes a múltiples antibióticos que están emergiendo rápidamente, y para los cuales es necesario la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas, ya que, se han convertido en una causa importante de infecciones hospitalarias y comunitarias, siendo una grave amenaza para la salud pública. En el grupo de prioridad crítica se encuentran *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacteriaceae*. En el grupo de prioridad alta, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter spp*, *Salmonella spp* y *Neisseria gonorrhoeae*. Por último, en el grupo de prioridad media se encuentran *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Shigella spp* (Asokan et al., 2019).

A partir de la lista de prioridad mencionada, se genera un grupo de bacterias denominado “ESKAPE”, cuyo nombre se debe a las principales bacterias que la componen, las cuales han sido catalogadas como prioridad en cuanto a la necesidad de desarrollo de nuevos antibacterianos por el aumento de resistencia antimicrobiana: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp* (De Oliveira et al., 2020; Holubar, 2020; Tacconelli et al., 2018; Mulani et al., 2019). La importancia del estudio de este grupo de bacterias radica en su presencia en infecciones nosocomiales, en especial con las bacterias de prioridad crítica. En Ecuador se han realizado varios estudios para determinar la prevalencia de bacterias de este grupo; en los cuales, bacilos Gram negativos no fermentadores como *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*, han presentado una prevalencia de 4% y 8% respectivamente. La mayor incidencia de casos en Ecuador de *Pseudomonas aeruginosa* hace que sea de relevancia en el estudio (Ronquillo, 2016; Barbecho Coraisaca, 2021).

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria de gran relevancia en cuanto a la necesidad de identificar nuevas sustancias con actividad antimicrobiana contra esta. La producción de biofilms y la resistencia intrínseca a antibióticos, son uno de los mecanismos de resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* ante la farmacoterapia convencional (Reynolds & Kollef, 2021). La terapia antimicrobiana para el tratamiento de

infecciones nosocomiales de esta bacteria Gram negativa es una tarea difícil debido a, como ya se mencionó, presenta resistencia intrínseca a los antimicrobianos usados convencionalmente. Se presenta como un problema, sumado a esto, el aumento en la prevalencia de cepas multirresistentes que exhiben resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos incluidos carbapenémicos, tetraciclinas, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y polimixinas, (Reynolds & Kollef, 2021), por lo cual es importante buscar alternativas terapéuticas para el tratamiento de este tipo de infecciones. (Stojanović-Radić et al., 2016).

Las plantas medicinales son usadas desde la antigüedad para solucionar dolencias y son una fuente rica de principios activos con potencial acción farmacológica. Se han realizado varios estudios con productos naturales para la identificación de posibles usos basándose en sus propiedades biológicas. Entre los componentes más importantes de estos productos se encuentran a los aceites esenciales, los cuales han sido reportados como potenciales antimicrobianos (Bermúdez-Vásquez, Granados-Chinchill & Molina; 2019).

Los aceites esenciales al ser compuestos lipofílicos tienen la capacidad de atravesar la pared celular, así como la membrana citoplasmática bacteriana y se considera que su actividad antimicrobiana como tal, está atribuida principalmente a la presencia de terpenos que causan alteración de estructuras internas como polisacáridos, fosfolípidos y ácidos grasos (Murbach Teles Andrade et al., 2014). Sin embargo, la diferente permeabilidad y composición de las estructuras externas de las bacterias generan diferencias en la acción de estos productos naturales (Stojanović-Radić et al., 2016). En la literatura se indica que las bacterias Gram positivas resultan ser más sensibles a productos naturales que las Gram negativas, por esta razón, es de gran importancia continuar con la búsqueda de nuevos antimicrobianos de origen natural para el tratamiento de infecciones generada por esta clase de bacterias (Murbach Teles Andrade et al., 2014).

De manera experimental se ha observado amplia actividad antimicrobiana de aceites esenciales de orégano, planta de té, canela, menta, romero, entre otras. Lo que tienen en común estos aceites esenciales son los metabolitos secundarios como: timol, carvacrol, curcumin, cinnamaldehyde, eugenol, entre otros (Luciardi et al., 2016; Stojanović-Radić et al., 2016); sin embargo, en el Grupo de Plantas Medicinales y Productos Naturales del Departamento de Biociencias de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y *Clinopodium nubigenum* (tipo), han mostrado actividad antibacteriana ante Enterobacterales, pero no se conoce su actividad ante no Enterobacterales, del que *Pseudomonas aeruginosa* es su principal

representante, por lo que es importante determinar si los aceites esenciales de *Clinopodium nubigenum* (tipo) y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) presentan actividad antibacteriana *in vitro* en este género bacteriano solo y en combinación con antibióticos empleados en la terapia farmacológica convencional, ya que en ciertas ocasiones los aceites esenciales no presentan efectos de inhibición significativos empleados de manera individual, sin embargo, al combinarlos con antibióticos convencionales, se puede presentar mayor actividad que por separado (Buldain, Buchamer, Marchetti, Aliverti, Borja & Mestorino, 2017).

Objetivos

Objetivo general

Determinar la actividad antibacteriana de aceites esenciales de plantas del sur de Ecuador y su posible sinergismo con antibióticos sintéticos ante *Pseudomonas aeruginosa*.

Objetivos específicos

- Evaluar la actividad antibacteriana de aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y *Clinopodium nubigenum* (tipo), obtenidos de plantas del sur de Ecuador ante *Pseudomonas aeruginosa* mediante la técnica de microdilución en caldo.
- Evaluar efectos sinérgicos o antagónicos de aceites esenciales combinados con terapia antimicrobiana convencional ante *Pseudomonas aeruginosa*.

1. Marco Teórico

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

1.1.1 Definición

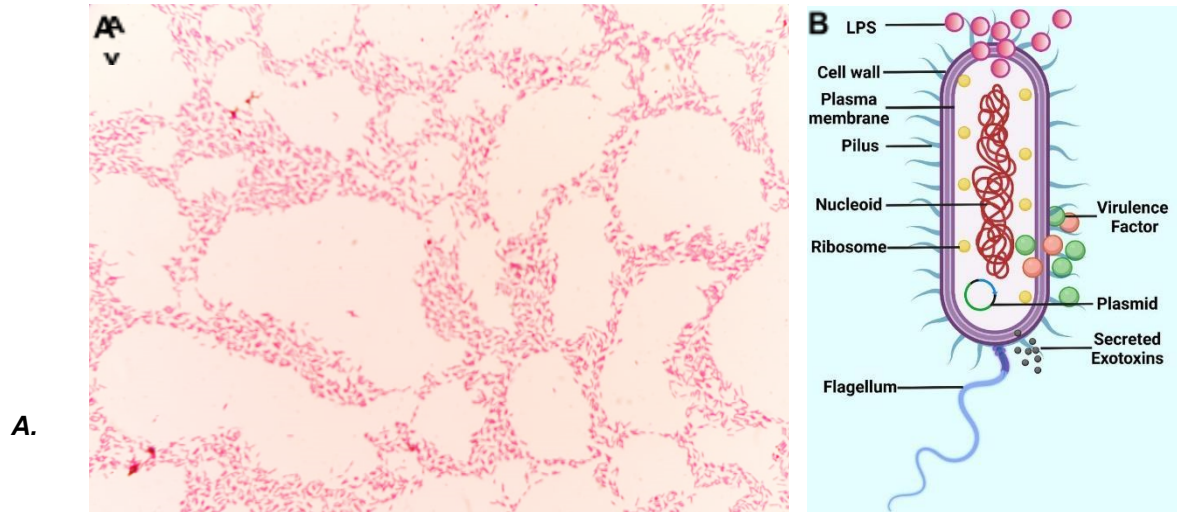
El género *Pseudomonas* se trata de bacilos Gram negativos aerobios, móviles pertenecientes a la familia *Pseudomonadaceae*. Estos microorganismos tienen extensa distribución a nivel de suelo, agua, plantas y animales. Son no fermentadores de glucosa, catalasa positivos y presentan flagelos que les dan la movilidad anteriormente mencionada. Se puede mencionar diversas especies dentro de este género, por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* y algunas especies pueden producir pigmentos, como es el caso de *P. aeruginosa* que sintetiza piocianina (azul) y en ciertos casos pioverdina (verde fluorescente), piorrubina (rojo oscuro) y piomelanina (negro) (Pinzón-Junca, 2019; c).

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria con forma de bastón y mide alrededor de 0.6 x 2 µm (Figura 1). Se encuentra extensamente distribuido a nivel de la naturaleza y puede encontrarse en medios húmedos en hospitales. Al realizar su cultivo, genera colonias redondas y lisas con una coloración verde fluorescente (Figura 2) o azul no fluorescente y, en otras ocasiones, puede sintetizar piorrubina o piomelanina. Para su crecimiento requiere temperaturas entre 37 °C a 42 °C y para su reconocimiento se debe tomar en cuenta que es oxidasa positiva y no fermentadora de carbohidratos (Jawetz et al., 2020).

Pseudomonas aeruginosa es considerado un microorganismo oportunista por ser uno de los principales agentes causantes de enfermedades nosocomiales en hospitalización, cirugía, neonatología y cuidados intensivos. Esta bacteria se ha relacionado con infecciones en pacientes inmunocomprometidos, particularmente en aquellos que están hospitalizados, debido al desarrollo de biopelículas en catéteres, respiradores artificiales o prótesis; de igual manera se asocia con infecciones graves en pacientes con fibrosis quística, con diabetes mellitus o en edad avanzada; así como con infecciones óticas. Además de esto, presenta una gran resistencia intrínseca por múltiples mecanismos, uno de ellos la mutación o incorporación de genes de resistencia (Sanz García, 2020; Ena-Muñoz & Burgos-Sánchez, 2018).

Figura 1

A. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en cultivo. Gram, 100X. B. Estructura *P. aeruginosa*.



Bacilos gramnegativos medianos y delgados a partir de cultivo de agar Mueller-Hinton. B. Figura adaptada de Anjum et al., 2023.

Figura 2

Cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* en agar Mueller-Hinton con la producción de pioverdina

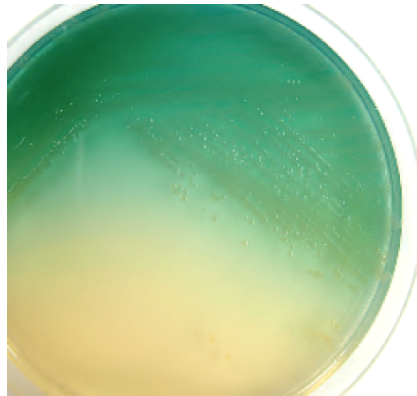


Figura adaptada de Jawetz et al., 2020.

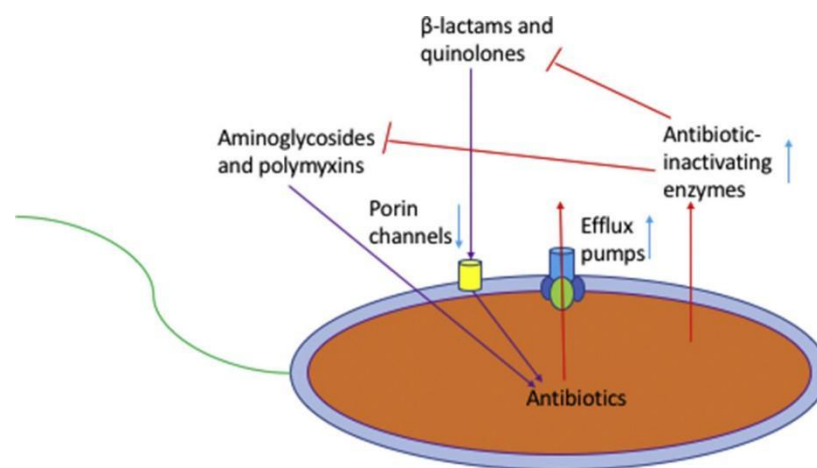
1.1.2 Mecanismos de resistencia

Pseudomonas aeruginosa puede presentar mecanismos de resistencia intrínsecos, adquiridos o adaptativos. Los intrínsecos incluyen la permeabilidad baja de la membrana externa, bombas de expulsión y producción de enzimas que inactivan a los antibióticos como las β -lactamasas

(Figura 3). La resistencia adquirida se genera debido a la transferencia horizontal de genes de resistencia que presentan mutaciones, las cuales pueden llevar a una absorción reducida de los fármacos, modificaciones en los sitios diana de estos, sobreexpresión de las bombas de expulsión, así como de enzimas que los inactivan. Por último, la resistencia adaptativa se relaciona con la formación de biofilms, el cual actúa como barrera para el paso de antibióticos (Pang, Raudonis, Glick, Lin & Cheng ,2019).

Figura 3

Representación esquemática de los mecanismos de resistencia intrínsecos de Pseudomonas aeruginosa



La resistencia intrínseca de P. aeruginosa incluye baja permeabilidad de membrana mediada por porinas, bombas de expulsión y producción de enzimas que inactivan antibióticos. Adaptada de Pang, Raudonis, Glick, Lin & Cheng ,2019.

1.1.3 Farmacoterapia ante *Pseudomonas aeruginosa*

Las estrategias terapéuticas para el tratamiento actual de infecciones causadas por *P. aeruginosa* se basan en aminoglucósidos en combinación con cefalosporinas (tobramicina más ceftazidima) o ureidopenicilinas con inhibidores de β -lactamasas (piperacilina-tazobactam), y según el tipo de infección se puede considerar las fluoroquinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino), fosfomicina y carbapenémicos. Se han probado medicamentos para inhibir las β -lactamasas como lo es la ceftazidima-avibactam con buenos resultados para infecciones complicadas (Mulani et al., 2019). Los carbapenémicos son uno de los antibióticos que presentan una buena alternativa para el tratamiento de infecciones nosocomiales, pero en los últimos años ha incrementado los reportes de la resistencia a los mismos debido a una

mutación en AmpC con alteración de las porinas que generan un alto nivel de resistencia a los carbapenémicos, y principalmente por la presencia de carbapenemasas, enzimas del tipo de las β -lactamasas, cuyo espectro de acción incluye cefalosporinas y carbapenémicos (Sanz García, 2020; Barbecho Coraisaca, 2021).

Las fluoroquinolonas son un grupo de fármacos de amplio espectro empleados en el tratamiento de diversas infecciones, como las causadas por *P. aeruginosa*, para la cual se administra sobre todo ciprofloxacino y levofloxacino. Su mecanismo de acción es mediante la inhibición de la replicación y transcripción del ADN, actuando sobre la ADN girasa y la topoisomerasa. Los mecanismos de resistencia generados por este agente en contra de las fluoroquinolonas se dan principalmente mediante la alteración del sitio diana de estos, es decir, a nivel de las ya mencionadas ADN girasa y topoisomerasa, así como también mediante la sobreexpresión de bombas de expulsión; no obstante, en algunos casos constituye la terapia de elección para el tratamiento de infecciones causadas por *P. aeruginosa* en caso de resistencia a cefalosporinas y penicilinas en combinación con inhibidores de β -lactamasa (Zhao, Wang, Li, He & Jian, 2020; Brar, Jyoti, Patil & Patil, 2020).

1.2 Plantas medicinales

Las plantas medicinales pueden ser definidas como productos botánicos empleados para prevenir o curar enfermedades, así como para mantener una buena salud. Son importantes para diversas comunidades alrededor del mundo desde el punto de vista económico, social, cultural y ecológico. En Ecuador, se han reportado más de 3118 especies vegetales con propiedades medicinales y en comunidades rurales el uso de estas plantas son el tratamiento o profilaxis principal a diversas enfermedades. La medicina tradicional es definida como el conjunto de conocimientos y prácticas basadas en creencias y experiencias de diferentes culturas utilizadas para mantener la salud, prevenir, mejorar o tratar diferentes enfermedades tanto físicas como mentales, empleando principalmente plantas medicinales en base al saber ancestral y a sus propiedades medicinales (Marshall, 2011; Caballero-Serrano, McLaren, Carrasco, Alday, Fiallos, Amigo & Onaindia, 2019).

Existe gran cantidad de plantas medicinales de tipo aromático que se utilizan en Ecuador; sin embargo, plantas como el *Clinopodium nubigenum* (tipo) y la *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) han cobrado interés en los últimos años debido a sus posibles efectos antimicrobianos.

1.2.1 *Cymbopogon citratus*

Cymbopogon citratus, conocida como “hierba luisa” en Ecuador, es una planta herbácea que pertenece a la familia *Poaceae* y es perenne nativa de Asia, América y África. Adquiere una altura de alrededor de dos metros. Sus hojas son largas, glabras, de hasta un metro de largo y 5-15 mm de ancho aproximadamente (Figura 4). Presenta inflorescencias en pares de racimos, son de 30-60 cm de largo. Es ampliamente utilizado en la comunidad como tratamiento para tos, cefalea, gripe, artritis, malaria, hipertensión arterial, diabetes, entre otros. Se ha descrito que presenta propiedades astringentes, antioxidantes, bactericidas, fungicidas y desinfectantes. Se emplea tópicamente o como infusión (Lawal, Ogundajo, Avoseh & Ogunwande, 2017; Aćimović, Čabarkapa, Cvetković, Stanković, Kiprovski, Gvozdencac & Puvača, 2019).

Figura 4

Cymbopogon citratus (hierba luisa)



Figura adaptada de Medina Caiminagua, 2015.

El aceite esencial obtenido de las hojas de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) está compuesto principalmente por monoterpenos, entre estos destacan el citral (15%, trans-citral es conocido como geranial mientras que cis-citral como neral), geraniol (40%), mirceno y geranilo acetato. También contiene compuestos fenólicos como el ácido p-cumárico y ácido cafeico, taninos como leuteolina y quercetina infusión (Lawal et al., 2017; Aćimović et al., 2019).

1.2.2 *Clinopodium nubigenum*

Clinopodium nubigenum también conocida como “sunfo” o en ciertas regiones como “tipo”, es una planta que pertenece a la familia *Lamiaceae* y crece en la tierra formando tapetes de color café rojizo y hojas verdes alrededor del tallo; posee flores pequeñas de color morado pálido (Figura 5) y se puede encontrar en zonas de clima frío, siendo originaria de la cordillera de los Andes desde los 3200 msnm hasta los 4300 msnm; y se encuentra en Colombia, Ecuador, Perú, Venezuela, Costa Rica y Panamá. En Ecuador se puede encontrar en páramos de la cordillera desde Carchi hasta Loja (Fonseca Chasipanta, 2016).

Figura 5

Clinopodium nubigenum (tipo)



Debido al uso del *Clinopodium nubigenum* (tipo) en varias comunidades indígenas como remedio tradicional, sobre todo a manera de infusión, en casos de malestar estomacal, resfriado común, dolores menstruales, infecciones, así como en casos de disentería (Noriega et al., 2018), esta planta se ha estudiado en la búsqueda de posibles principios activos con actividad antimicrobiana en infecciones producidas por bacterias, virus y hongos.

El aceite esencial obtenido a partir de flores, tallos y ramas de *C. nubigenum* presenta alrededor de 25 componentes, siendo los principales componentes reportados por Paco et al. (2018) el acetato de carvacrol (40,95%), carvacrol (21,21%), pulegona (6,09%) y timol (5,67%). Con recolección antes de la floración, se han presentado otros estudios en los que indican un cambio en la concentración de carvacrol y timol atribuibles a las condiciones climáticas, lugar y condiciones de recolección. También contiene otras sustancias como β -ocimeno trans, p-cimene y γ -terpinene; el resto de los componentes se encuentran en cantidades sumamente menores. En varios artículos se ha reportado su utilización en determinación del efecto antimicrobiano en bacterias Gram positivas indicando un efecto inhibitorio positivo, que es

indicativo de una actividad antimicrobiana con la utilización del aceite esencial (El-seedi et al., 2008).

1.3 Aceites esenciales

1.3.1 Definición

Los aceites esenciales, los cuales son obtenidos a partir de plantas aromáticas, se tratan de mezclas complejas de sustancias volátiles biológicamente activas que son empleados en diversas áreas como en la industria farmacéutica, cosmética, alimentaria, entre otras. Sus componentes son sintetizados principalmente en el citoplasma, así como en los plastidios de las células vegetales por diferentes vías, por ejemplo, por la vía del ácido malónico. Posteriormente, se almacenan en estructuras secretoras de la planta. Entre los componentes principales de los aceites esenciales están los terpenos, los cuales se producen mediante la ruta de los isoprenoides y están compuestos por unidades de isopreno. Los terpenos y terpenoides pueden ser de tipo alcohol (geraniol), aldehído (citral), cetona (alcanfor), fenol (timol), grupos éter (eucaliptol) e hidrocarburos (cimeno). Su amplio uso se da debido a que ha mostrado un potencial farmacológico beneficioso en la terapéutica de diversas enfermedades, sobre todo por su acción antimicrobiana. Esta acción mencionada se puede atribuir al hecho de que los aceites esenciales tienen la capacidad de penetrar a través de las membranas celulares bacterianas y generar alteraciones. Entre otros de sus usos se puede mencionar su incorporación en la fórmula de preparación de perfumes, así como en la aromatización de alimentos (Aumeeruddy-Elalfi et al., 2016; Wińska et al., 2019; Guimarães et al., 2019).

La extracción de aceites esenciales se puede dar por diversos métodos, entre los cuales los tradicionales son la hidroddestilación, prensado en frío, extracción por solventes volátiles, entre otros. También existen otros métodos menos difundidos como extracción con fluidos supercríticos, extracción con solventes asistida con membranas, extracción de líquidos a presión y extracción asistida por ultrasonido (Aumeeruddy-Elalfi et al., 2016).

1.3.2 Métodos de extracción de aceites esenciales

Para la extracción de los distintos compuestos fitoquímicos se debe considerar su naturaleza química para el mejor método extractivo, que permita escoger los reactivos más afines a la polaridad, cuando se habla de componentes lipofílicos se indica la naturaleza apolar de los compuestos. Por lo cual se van a indicar los métodos extractivos más utilizados para la obtención de aceites esenciales (Navarrete et al., 2009).

1.3.2.1 Hidrodestilación

Este método es uno de los más utilizados, se basa en la utilización del vapor del agua para la extracción del aceite esencial por medio de la alteración en el citoplasma de las células vegetales. El aceite esencial, al ser volátil, se transporta junto con el vapor de agua y, mediante la condensación, se obtiene los dos líquidos que por diferencia de densidad se obtiene una separación rápida en dos fases, con posterior eliminación de la fase acuosa para obtener el aceite esencial (Sevillano et al., 2019). En este método se debe controlar la temperatura debido a que ciertos compuestos presentes en los aceites esenciales son altamente volátiles y no podrán ser recuperados por este método extractivo, por lo cual dependiendo de los tipos de compuestos que se espera a obtener en el aceite esencial, se deberá realizar las consideraciones para evitar la oxidación e hidrólisis. Como ventaja se presenta que es de bajo costo, con un buen rendimiento de extracción, y desventaja es que solo sirve para compuestos que son hidrosolubles y termoestables (Aumeeruddy-Elalfi et al., 2016).

1.3.2.2 Extracción con disolventes volátiles

Este método extractivo se utilizan disolventes orgánicos volátiles como alcoholes o cloroformo que permiten una disolución adecuada de los compuestos que se desean extraer en el aceite esencial. Las principales desventajas de este método es que se obtienen una cantidad considerable de impurezas en el aceite esencial que debe someterse a purificación para eliminar los residuos de los solventes utilizados (Navarrete et al., 2009).

1.3.2.3 Extracción con fluidos supercríticos

Este método extractivo se basa en la utilización de un fluido en estado supercrítico como es el CO₂ que entra en contacto con la muestra triturada para que el aceite esencial sea solubilizado y el fluido supercrítico sea eliminado. La ventaja de este método permite la extracción de un aceite esencial de mayor pureza, además que presenta un mejor rendimiento en comparación con otros métodos. La diferencia está en el costo, ya que requiere un equipo especializado, lo cual eleva el costo de manera exponencial (García-Salinas et al., 2018).

1.3.2.4 Extracción por prensado

Este método extractivo se basa en la utilización de fuerza mecánica para obtener el aceite esencial al aplicarla en las estructuras recolectadas de la planta de las que se desea obtener el aceite esencial (Navarrete et al., 2009).

1.3.2.5 Extracción con enflorado

Este método es utilizado para la extracción de aceites esenciales cuando se debe realizar desde las flores principalmente, con la utilización de grasa, la cual será el vehículo para solubilizar el aceite esencial, y finalmente la grasa debe ser purificada para la extracción del aceite. Este método presenta varias desventajas, por no ser un método de alto rendimiento, la dificultad que se puede presentar al separar la grasa y el aceite, además de presentar un mayor costo (Sevillano et al., 2019).

1.3.3 Actividad de los aceites esenciales como antimicrobianos

Los aceites esenciales presentan en ciertas ocasiones, actividad antimicrobiana mediante diferentes mecanismos y actuando en sitios diferentes, en los cuales actúan los antibióticos ya conocidos, por lo que se sugiere su combinación. Por ejemplo, ciertos componentes de los aceites esenciales pueden generar la ruptura de la membrana celular del agente bacteriano o aumentar su permeabilidad, por lo que se podría volver más sensible a un fármaco (Álvarez-Martínez, Barraón-Catalán, Herranz-López & Micol; 2021).

En el estudio de los aceites esenciales como posibles agentes antimicrobianos al inhibir el crecimiento de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, se ha buscado determinar cuál es el componente responsable mayoritariamente de la acción antimicrobiana, para lo cual se utilizan diversas técnicas de extracción ya descritas para la obtención de extractos tanto acuosos como oleosos, para poder determinar el compuesto responsable de la actividad (García-Salinas et al., 2018).

1.4 Métodos para determinación de actividad antimicrobiana

La determinación de la actividad antimicrobiana se puede realizar por varios métodos, siendo la dilución en caldo, la técnica estándar para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC, *minimal inhibitory concentration*). La MIC es la concentración más baja con la cual el agente antimicrobiano, en condiciones *in vitro*, evita por completo el crecimiento visible del

microorganismo de prueba. Esta concentración se expresa en mg/L ($\mu\text{g}/\text{mL}$) (Vanegas et al., 2021, Kowalska-Krochmal & Dudek-Wicher, 2021).

1.4.1. Difusión por disco

Este método emplea discos impregnados en cierta concentración de antibiótico o agente antimicrobiano. Para realizar este método se requiere preparar un inóculo equivalente a 0,5 en la escala de McFarland. La determinación de la MIC se va a realizar de acuerdo con zonas de inhibición o puntos de corte (breakpoints) generadas alrededor del disco. Para la determinación con extractos se requiere impregnar discos de papel de seis milímetros de diámetro con 15 mL de la dilución y colocarlos sobre placas de Petri con Agar Mueller-Hinton, en el cual previamente ya se ha extendido el inóculo bacteriano. Sin embargo, se debe considerar la volatilidad de los aceites esenciales (Kowalska-Krochmal & Dudek-Wicher, 2021; Kačániová, Terentjeva, Vukovic, Puchalski, Roychoudhury, Kunová, Klůga, Tokár, Kluz & Ivanišová, 2017).

1.4.2 Dilución en caldo y en agar

Para la determinación de la MIC por métodos de dilución se requiere la preparación inicial de una solución madre a cierta concentración del agente antimicrobiano, es decir, antibiótico o aceite esencial. Luego, se generan diluciones a partir de esta para poder evaluar la actividad antimicrobiana de estas. Se puede generar macro o microdilución en caldo, así como diluciones en agar. En este último se requiere agregar 19 mL de Agar Mueller-Hinton por un mililitro de preparación, esto antes de que se solidifique de manera que se pueda verter en placas de Petri. En los otros dos casos se pueden emplear tubos o microplacas, este último en el caso de microdilución, que contienen concentraciones crecientes de la sustancia analizada (Kowalska-Krochmal & Dudek-Wicher, 2021; Ramirez & Marin, 2009).

1.4.2.1 Microdilución en caldo

El Manual M07 del CLSI (CLSI, *Clinical & Laboratory Standards Institute*) (CLSI, 2018), indica la técnica de referencia para realizar la microdilución en caldo, la cual se basa en la inhibición del crecimiento bacteriano en medio líquido debido a la presencia de una sustancia antibacteriana, y, al ser microdilución, se requiere de una placa de microtitulación que cuenta con 96 pocillos de poliestireno. Se debe preparar soluciones del agente antimicrobiano del cual se requiere determinar su efecto en volúmenes de 50 a 100 μL , los cuales se colocan junto con el volumen del inóculo bacteriano de 50 μL en cada pocillo o según se indique en el esquema de dilución

de las guías de referencia (CLSI, 2018). Como medio de cultivo se sugiere caldo Mueller Hinton debido al rápido crecimiento de microorganismos aerobios o anaerobios facultativos, además de que permite alta reproducibilidad de los datos (Wiegand et al., 2008).

1.4.2.2 Método checkerboard (tablero de ajedrez)

El método de checkerboard o tablero de ajedrez es una técnica de microdilución que permite la prueba de hasta 77 combinaciones de agentes antimicrobianos en distintas concentraciones. Es un método de dos dimensiones que se emplea con la finalidad de determinar interacciones *in vitro* entre dos o más agentes antimicrobianos, cuyas concentraciones son calculadas de manera algebraica e interpretadas como sinergismo, indiferencia o antagonismo, según la actividad que presenten las combinaciones si son mayores, equivalentes o menores a las actividades de cada agente antimicrobiano por sí solo. Esta técnica es utilizada cuando se desconoce la interacción que pueden presentar entre sí los agentes antimicrobianos, especialmente cuando se desarrollan nuevos agentes (Bellio et al., 2021; Leber, 2016).

El efecto fenotípico que pueden presentar las combinaciones de antimicrobianos pueden ser evaluadas de distintas formas; una de ellas es por medio de la turbidez observada de manera directa en los pocillos, la otra mediante el uso de agentes que generen un cambio de coloración según crecimiento bacteriano, por ejemplo con la Resazurina, que genera fluorescencia relacionada con la viabilidad de las células bacterianas, la cual puede medirse por absorbancia, el cual es el tercer método de medición del crecimiento bacteriano, por medio del cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento (Cokol-Cakmak & Cokol, 2019; Leber, 2016).

2. Metodología

2.1 Recolección de material vegetal

Clinopodium nubigenum (tipo) se recolectó en la localidad de Rañas, provincia del Azuay a una latitud de 3204 msnm, de coordenada X 714338 y coordenada Y 9640227 durante el mes de febrero, por lo tanto, se trabajó con material vegetal silvestre fresco (Anexo 1). Se emplearon buenas prácticas de agricultura para la recolección.

Cymbopogon citratus (*Hierba luisa*) se adquirió en el Mercado 12 de abril en Cuenca, provincia del Azuay.

El material recolectado y comprado fue transportado en bolsas de papel hasta el Laboratorio de Plantas Medicinales y Productos Naturales del Departamento de Biociencias de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca para el proceso de limpieza y lavado, empleando primero agua corriente y luego agua destilada por sumergimiento durante diez minutos. El material así lavado, se dejó escurrir y se secó levemente empleando papel absorbente para su posterior uso.

2.2 Extracción de aceites esenciales por hidrodestilación

Se realizó la extracción de los aceites esenciales mediante hidrodestilación con trampa de Clevenger (Anexo 2). Una vez armado el equipo, se siguió el procedimiento indicado en el Procedimiento Normalizado de Trabajo (PNT) N° OG 007 del Laboratorio de Análisis Fitoquímico del Grupo de Plantas Medicinales y Productos Naturales del Departamento de Biociencias de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca. Se colocaron 100 gramos de material vegetal fresco y se añadió 1000 mL de agua destilada empleando un balón de aforo de 2000 mL. Se colocó en el equipo y se procedió a iniciar la corrida, se dejó hervir por tres horas. El aceite esencial se recolectó en tubos tapa rosca y, al finalizar todas las corridas necesarias, se colocó la cantidad suficiente de sulfato de sodio anhidro y se centrifugó por diez minutos a 1500 rpm. Se separó el aceite esencial de la fase acuosa y se distribuyó en viales ámbar previamente pesados, colocando 200 μ L en cada uno. Los viales se almacenaron a -80 °C.

Para el cálculo del rendimiento del aceite esencial a partir del material vegetal procesado, se empleó la Ecuación 1; en tanto que para la determinación de la densidad de los aceites esenciales se pesaron viales vacíos, se colocaron cantidades iguales del aceite esencial en cada uno y se pesaron nuevamente y se empleó la Ecuación 2.

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Peso aceite esencial}}{\text{Peso material vegetal fresco}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Densidad} = \frac{\text{Peso (g)}}{\text{Volumen (ml)}} \quad (2)$$

2.3 Preparación del criostock

2.3.1 Reconstitución y criopreservación de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, Lote 353-496-21, marca KWIK STIK™, fue reconstituida según recomendaciones del fabricante. La siembra masiva se realizó en placas de Petri con agar tripticasa soya en condiciones estériles y se incubó a 37 °C por 18-24 horas en aerobiosis. Transcurrido ese tiempo se observó la presencia de crecimiento bacteriano compatible con la morfología macroscópica de la cepa en estudio.

La criopreservación de *P. aeruginosa* ATCC 27853 se realizó en leche descremada estéril distribuida en tubos Eppendorf estériles a partir de cultivo puro. Los tubos madre (TM) se almacenaron a -80 °C.

2.3.2 Recuento de células viables

Para el recuento de células viables expresadas en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) en el tubo madre (TM), se prepararon diluciones seriadas a partir de él. Para esto, en un tubo se colocó 2700 µL de agua destilada y 300 µL de la solución del TM preparando así el tubo 1 (T1), se homogeneizó en el vórtex obteniendo así una dilución 10⁻¹. En el siguiente tubo (T2) se colocó 2700 µL de agua destilada y 300 µL del T1, se homogeneizó en vórtex obteniendo así una dilución 10⁻². Se realizó el mismo procedimiento hasta llegar a la dilución 10⁻¹⁰. Las diluciones correspondientes de 10⁻⁷ a 10⁻¹⁰ se sembraron mediante siembra masiva en placas de Petri con agar Mueller-Hinton y se incubaron a 37 °C por 18-24 horas en aerobiosis. El ensayo se realizó por triplicado. El número de UFC/mL en el tubo madre se determinó mediante el promedio del recuento de colonias de cada placa correspondiente a la dilución sembrada.

2.3.3 Preparación del criostock

En un tubo se colocó 36,777 mL de caldo nutritivo, 5 mL de glicerol y 8,223 mL de la solución del TM. Se homogeneizó en el vórtex. Se colocó 1 mL de la preparación anterior en tubos Eppendorf estériles y se almacenó a -80 °C hasta su uso. Se trabajó con una concentración de 1,525 x 10⁷ UFC/mL.

2.4 Determinación de la concentración inhibitoria mínima de los aceites esenciales mediante microdilución en caldo

Para la determinación de la MIC de los aceites esenciales, se siguió el PNT N°07 del Laboratorio de Microbiología del Grupo de Plantas Medicinales y Productos Naturales del Departamento de Biociencias de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, correspondiente al método de microdilución en caldo. Para esto se realizó una preparación de 39,800 mL de caldo Mueller Hinton (MHB) con 200 μ L de Tween 80, homogeneizando hasta mezcla completa.

La determinación del rango de actividad antimicrobiana de aceites esenciales de plantas medicinales en los casos que no se conoce por literatura un rango determinado a comprobar, se realiza mediante un screening con un amplio rango de concentraciones. En el presente estudio se realizó en el rango de 16384 μ g/mL a 0,5 μ g/mL. Los rangos pueden variar según la actividad observada del aceite esencial.

2.4.1 Preparación de la emulsión del aceite esencial y sus diluciones

Las soluciones madre (SM) se prepararon con la finalidad de tener una solución de menor concentración para facilitar la preparación de las diluciones, además de solventar la variabilidad del pipeteo de volúmenes muy pequeños. Los cálculos para la emulsión madre se realizaron según la concentración inicial del aceite esencial de la planta medicinal en estudio a partir de su densidad determinada en el punto 2.2. y de acuerdo con la concentración final a la cual se deseaba llegar en cada pocillo tomando en cuenta que esta concentración se diluye a la mitad al dispensar 100 μ L del inóculo bacteriano.

La preparación de las emulsiones de los aceites esenciales se realizó en un tubo Eppendorf donde se pipeteó el volumen de aceite esencial para la solución madre y la mezcla o MHB + Tween 80; se llevó a Baño María a 12°C con sonicación activada con homogeneización cada ocho minutos en vórtex para una distribución homogénea (el tiempo de este procedimiento depende del aceite esencial de la planta medicinal).

En la Tabla 1 se indican las diluciones a partir de la SM para la preparación de cada concentración a probar, tomando en cuenta que las diluciones deben tener el doble de la concentración requerida en los pocillos.

La concentración de la emulsión madre de los aceites esenciales de las plantas medicinales para tener una concentración final en el pocillo de 16384 μ g/mL provino de una solución de 32768 μ g/mL. En las soluciones posteriores a la octava dilución se presentó una dificultad para

la toma volúmenes pequeños, por lo cual se preparó otra solución madre (SM2), la cual fue de 128 µg/mL, para conseguir una concentración final del pocillo de 64 µg/mL.

Tabla 1

Diluciones para la determinación de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales de plantas medicinales en screening

Nº	Concentración AE (µg/mL)	Preparación dilución AE		Concentración final AE (µg/mL)
		SM (µl)	MHB + Tween 80 (µl)	
T1	32768 (SM)	350	350	16384
T2	16384	175	525	8192
T3	8192	87,5	612,5	4096
T4	4096	43,7	656,3	2048
T5	2048	21,9	678,1	1024
T6	1024	10,9	689,1	512
T7	512	5,5	694,5	256
T8	256	2,7	697,3	128
t1	128 (SM2)	350	350	64
t2	64	175	525	32
t3	32	87,5	612,5	16
t4	16	43,7	656,3	8
t5	8	21,9	678,1	4
t6	4	10,9	689,1	2
t7	2	5,5	694,5	1
t8	1	2,7	697,3	0,5

AE: Aceite esencial. SM: Solución madre. SM2: Solución madre 2

2.4.2 Preparación de inóculo bacteriano

Se preparó el inóculo bacteriano con base a la concentración de bacterias que debía tener cada pocillo de la microplaca, de modo que cada uno tuviese una concentración de 1×10^6

UFC/mL. Para esto se tomó 0,6557 mL del criostock y se colocó en 9,3443 mL de MHB + Tween 80 para un volumen final de 10 mL.

2.4.3 Preparación de la microplaca

Un volumen de 100 µL de la solución del aceite esencial se distribuyó en los pocillos de la microplaca según la Figura 6, e inmediatamente se adicionó 100 µL del inóculo bacteriano preparado en el apartado 2.3.2 para obtener la concentración final deseada en el pocillo correspondiente de cada aceite esencial. Se realizó este procedimiento por triplicado en cada determinación de la concentración de screening T8-T1 y t8-t1. Se colocó el film de sellado para evitar la evaporación de compuestos volátiles del aceite esencial e inmediatamente se incubó a 35°C ± 2°C por 18-24 horas, en agitación constante.

Luego del screening, se determinó el rango de actividad antimicrobiana del aceite esencial, por lo cual se realizó una nueva microdilución con estos rangos para la determinación de la MIC del aceite esencial. Para los aceites esenciales de los cuales por literatura se conoce su actividad antimicrobiana, se debe realizar la comprobación de la MIC mediante la ampliación de una concentración por arriba y tres por debajo de la concentración indicada como MIC, según la Figura 7.

Figura 6

Esquema de la distribución en la microplaca para el screening de la MIC de aceites esenciales

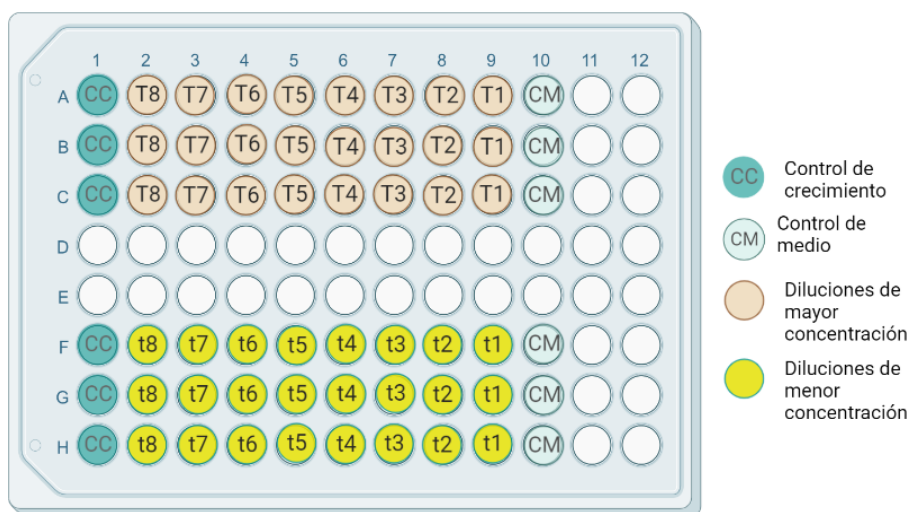
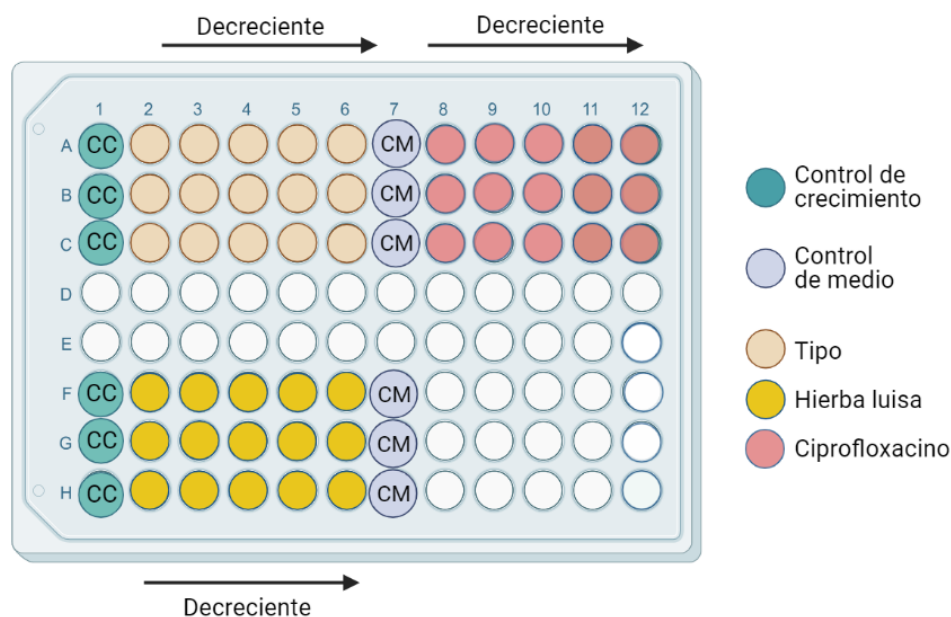


Figura 7

Esquema de distribución en la microplaca para la determinación de la MIC de aceites esenciales



2.5 Confirmación de la concentración inhibitoria mínima del antibiótico mediante microdilución en caldo

Se empleó como antibiótico convencional ciprofloxacino (Proflox 200 (1%), Interpharm S.A.) y para determinar la MIC se siguió lo indicado en el manual M07 del CLSI (CLSI, 2018). Debido a la elevada concentración inicial del antibiótico, se realizó la preparación de una solución intermedia (SI) de ciprofloxacino tomando 100 μL del antibiótico más 9900 μL de solución salina y se homogeneizó en vórtex. Para la comprobación de su actividad se realizó una ampliación de dos concentraciones por arriba y por debajo de la MIC indicada en la CLSI para *Pseudomonas aeruginosa* de $\leq 0,5 \mu\text{g/mL}$ (CLSI, 2023). A partir de la SI se preparó la solución madre de la cual se obtuvieron las siguientes diluciones indicada en la Tabla 2. La determinación de la MIC para el antibiótico se realizó en la misma microplaca que los aceites esenciales (Figura 7).

Tabla 2

Rango de concentraciones para la microdilución de ciprofloxacino. Concentración comercial y concentración de la solución intermedia (SI)

Ciprofloxacino	
Rango ($\mu\text{g/mL}$)	0.500 – 0.03
Concentración comercial	10 mg/mL
Concentración SI	2 $\mu\text{g/mL}$

2.6 Determinación de sinergismo o antagonismo mediante método de checkerboard

2.6.1 Preparación de microplacas

La determinación de sinergismo o antagonismo entre el aceite esencial (*Clinopodium nubigenum* o *Cymbopogon citratus*) con el ciprofloxacino se realizó con base al procedimiento indicado por Leber (2016) con algunas modificaciones. Para la preparación de la solución madre del aceite esencial, se siguió el procedimiento indicado en el punto 3.4, realizando un cambio en el volumen de pipeteo ya que en la microplaca se realizó una doble dilución al emplear tanto 50 μL aceite esencial como del antibiótico en el mismo pocillo como se indica en la Figura 9. Al haber mayor dilución, la solución madre debe ser de una concentración el cuádruple a lo requerido en la concentración final del primer pocillo. Como diluyente se empleó medio MHB + Tween 80 en proporción como se indicó en la técnica de microdilución en caldo, siguiendo lo indicado en las Tabla 3 y Tabla 4.

La preparación del inóculo bacteriano se realizó con base a la concentración de bacterias que debía tener cada pocillo de la microplaca, de modo que cada uno tuviese una concentración de 1×10^6 UFC/mL. Para esto se tomó 0,72131 mL del criostock y se colocó en 10,279 mL de MHB + Tween 80 para un volumen final de 11 mL.

Tabla 3

Volúmenes para la preparación de soluciones de los aceites esenciales

Concentración final ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Volumen SM-AE (μL)	Volumen MHB + Tween 80 (μL)	Volumen Total (μL)
MIC	250	250	500
1/2 MIC	125	375	500
1/4 MIC	62,5	437,5	500
1/8 MIC	31,3	468,7	500
1/16 MIC	15,6	484,4	500
1/32 MIC	7,8	492,2	500
1/64 MIC	3,9	496,1	500
1/128 MIC	1,95	498,05	500
1/256 MIC	0,98	499,02	500
1/512 MIC	0,49	499,51	500

Se prepararon 500 μL de cada dilución del aceite esencial ya que se emplearon 450 μL en total en toda la distribución de la microplaca.

Tabla 4

Volúmenes para la preparación de soluciones de antibióticos (ciprofloxacino)

Concentración final ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Volumen SM-CIP (μL)	Volumen MHB + Tween 80 (μL)	Volumen Total (μL)
MIC	350	350	700
1/2 MIC	175	525	700
1/4 MIC	87,5	612,5	700

1/8 MIC	43,7	656,3	700
1/16 MIC	21,9	678,1	700
1/32 MIC	10,9	689,1	700

Se prepararon 700 μ l de cada dilución ya que se emplearon 650 μ L en total para toda la microplaca.

En la microplaca de 96 pocillos, en la fila correspondiente a los espacios del 1 al 12 se colocaron diluciones del aceite esencial y en la columna correspondiente a los espacios de la A a la H, las del antibiótico. Se dispensó 50 μ L del antibiótico y 50 μ L del aceite esencial en el pocillo de acuerdo con la Figura 8.

Posteriormente a cada pocillo se adicionó 100 μ L del inóculo bacteriano, excepto en el control de medio (CM) correspondiente al pocillo H12 (Figura 8). Paralelamente se preparó otra microplaca denominada placa espejo de la misma manera que la placa principal exceptuando la colocación del inóculo bacteriano. Se colocó film de sellado para placas en ambas y se llevó a incubación a 35 °C \pm 2 con agitación constante por 18-24 horas. Para la lectura se retiró el film de las dos placas y se realizó la lectura el lector de placas a una absorbancia de 600 nm.

Figura 8

Técnica de Checkerboard. Esquema de distribución de las diluciones Aceite esencial – Antibiótico

		Aceite esencial (µg/mL) →											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Antibiótico (µg/mL) ↓	A	CC	1/512	1/256	1/128	1/64	1/32	1/16	1/8	1/4	1/2	MIC	2 MIC
	B	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32
	C	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16
	D	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8
	E	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4
	F	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2
	G	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC
	H	2 MIC	2 MIC	2 MIC	2 MIC	2 MIC	2 MIC	2 MIC	2 MIC	2 MIC	2 MIC	2 MIC	2 MIC
		1/512	1/256	1/128	1/64	1/32	1/16	1/8	1/4	1/2	MIC	2 MIC	CM

Lo delimitado por las líneas gruesas representan los 96 pocillos de las microplacas. En cada una se colocó 50 µL de la concentración correspondiente de aceite esencial (1-12) así como de antibiótico (A-H). CC: Control de crecimiento. CM: Control de medio.

2.6.2 Determinación del porcentaje de crecimiento

Una vez realizada las lecturas de la placa espejo y de la placa de ensayo, se determinó el porcentaje de crecimiento con base a las absorbancias obtenidas según la Ecuación 3.

$$\% \text{ crecimiento} = \frac{\text{Absorbancia pocillo \# principal} - \text{Absorbancia pocillo \# espejo}}{\text{Absorbancia control de crecimiento} - \text{Absorbancia pocillo espejo}} \quad (3)$$

Se identificaron los pocillos cuyo crecimiento fue menor al 20%, los cuales fueron de interés para la determinación de una posible interacción entre el aceite esencial y el ciprofloxacino, para lo cual existen varios métodos de determinación del punto de interés. El método seleccionado para este procedimiento es el conocido como menor-menor, el cual se basa en la determinación el pocillo que presente un porcentaje de crecimiento menor a 20% y sea el

pocillo que representa la mezcla de menor concentración de aceite esencial y menor concentración del antibiótico, con una actividad antimicrobiana mayor a la que se puede observar en la Columna 1 para el caso de los antibióticos y en la Fila 1 para el aceite esencial correspondientes a las concentraciones solas de cada uno (Bonapace et al., 2002).

Una vez determinado el punto de interés, se determinó la Fracción Mínima Inhibitoria (FIC) de este, de acuerdo con la Ecuación 4 y Ecuación 5, empleando las concentraciones que indica el pocillo de interés tanto para el antibiótico como para el aceite esencial.

$$FIC_{\text{antibiótico}} = \frac{MIC_{\text{antibiótico en combinación}}}{MIC_{\text{antibiótico solo}}} \quad (4)$$

$$FIC_{\text{aceite esencial}} = \frac{MIC_{\text{aceite esencial en combinación}}}{MIC_{\text{aceite esencial solo}}} \quad (5)$$

Luego se determinó la ΣFIC sumando la FIC del antibiótico empleando la Ecuación 6 y del aceite esencial. Los resultados obtenidos se interpretaron de acuerdo con la Tabla 5.

$$\Sigma FIC = FIC_{\text{antibiótico}} + FIC_{\text{aceite esencial}} \quad (6)$$

Tabla 5

Interpretación del sinergismo, antagonismo o indiferencia según la ΣFIC

Valor ΣFIC	Interpretación
$\Sigma FIC \leq 0.5$	Sinergismo
$0.5 < \Sigma FIC \leq 4$	Indiferencia
$\Sigma FIC > 0.4$	Antagonismo

2.7 Análisis estadístico

Tras la obtención de los valores de MIC de los aceites esenciales y del antibiótico empleado (ciprofloxacino), se determinó el promedio (\bar{X}), desviación estándar (σ) y el coeficiente de variación expresado como porcentaje (%CV). En cuanto a los resultados del tablero de ajedrez, tras obtener las lecturas de absorbancia de cada placa, se calculó el porcentaje de crecimiento de cada pocillo de cada réplica según la Ecuación 3 y, posteriormente, se obtuvo el promedio para cada pocillo. Se analizaron los valores obtenidos en comparación al punto de corte (20%) mostrando una gráfica que indica cada combinación y el porcentaje de crecimiento obtenido.

Para esto se empleó el software RStudio 4.3.1 2023.06.0 Build 421. Una vez establecido el pocillo de interés, se determinó la σ y el %CV.

3. Resultados y discusión

3.1 Rendimiento del aceite esencial

La información con respecto al rendimiento de los aceites esenciales en la mayoría de los casos suele ser nula o escasa, por lo que es importante informar el rendimiento de cada uno de los aceites esenciales obtenidos en el presente estudio. Así; para *Clinopodium nubigenum* (tipo), a partir de 200 gramos de material vegetal fresco se obtuvo 873,426 μ L (0,8188 g) de aceite esencial después de la extracción por hidrodestilación con un porcentaje de rendimiento de 0,409%.

Gilardoni, Malagon, Morocho, Negri, Tosi, Guglielminetti, Vidari, & Finzi (2011) mencionan que al obtener aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* (tipo) obtuvieron un rendimiento reportado como alrededor de 1%. La variación se puede deber a diversos factores como época del año, coordenadas y hora de recolección, ya que, en el presente estudio, la materia vegetal fue recolectado en el mes de febrero, que según el clima del sur del Ecuador (Rañas, Azuay) corresponde a época lluviosa, lo que puede interferir con el rendimiento según lo reportado en la literatura.

Con respecto al rendimiento de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa), a partir de 200 gramos de material vegetal fresco se obtuvo 897,627 μ L (0,7962 g) de aceite esencial después de la extracción por hidrodestilación con un porcentaje de rendimiento de 0,398%.

Tintino, Lucena, Figueredo, de M. Oliveira, Dos S. Aguiar, do N. Cardoso, A. de Aquino, C. Andrade, M. coutinho, & F. Matias (2015) mencionan que al realizar la obtención de aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) mediante hidrodestilación empleando la trampa de Clevenger, obtuvieron un rendimiento de 0.49%, resultado cercano al porcentaje obtenido en el presente estudio, tomando en cuenta que la cantidad y composición del aceite esencial varía de acuerdo a la zona geográfica, época del año y hora de recolección.

3.2 Concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales

El grupo de Plantas Medicinales y Productos Naturales del Departamento de Biociencias de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca cuenta con información de la concentración mínima inhibitoria de aceites esenciales ante Enterobacterales; sin embargo, no ante no Enterobacterales, en el cual, *Pseudomonas aeruginosa* es su principal representante.

Para determinar la MIC de los aceites esenciales de *Clinopodium nubigenum* (tipo) y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) se escogió un rango de concentraciones máximas y

mínimas (Tabla 6) con base a los criterios establecidos en la metodología, lo que permitió determinar el valor de la MIC de cada aceite esencial ante *P. aeruginosa*.

Tabla 6

Rango de concentraciones estimadas para la determinación de la MIC por microdilución en caldo de los aceites esenciales de *Clinopodium nubigenum* (tipo) y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa)

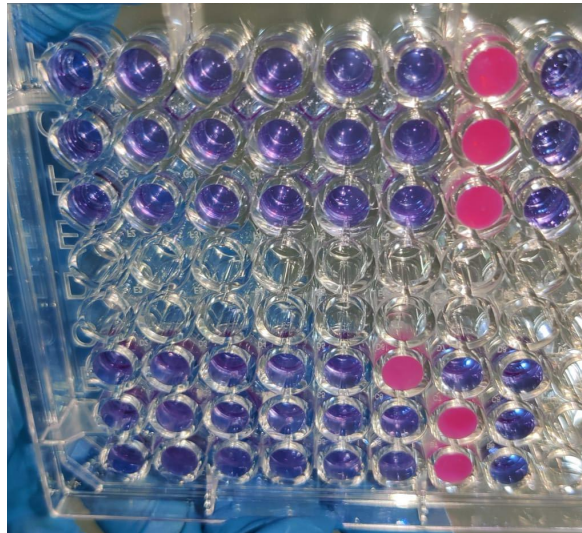
Aceite esencial	Rango ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Clinopodium nubigenum</i> (tipo)	8192 - 512
<i>Cymbopogon citratus</i> (hierba luisa)	2048 - 128

La concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* (tipo) por la técnica de microdilución en caldo y mediante a el empleo de resazurina frente a *P. aeruginosa* fue de 4096 $\mu\text{g/mL}$. Por lo tanto, la determinación fue de manera visual (Figura 9).

El aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* (tipo) posee dos componentes principales, el carvacrol y timol en base a los cuales se han desarrollado estudios de actividad antimicrobiana comprobada en la inhibición del crecimiento principalmente de bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae*, atribuyéndose está actividad principalmente al carvacrol y en menor medida al timol (Paco et al., 2018).

Figura 9

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los aceites esenciales



Microdilución en placa con resazurina para observar inhibición de crecimiento para la determinación de la MIC.

Cox & Markham (2007), mencionan que el carvacrol, uno de los principales componentes del aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* (tipo), tiene capacidad de alterar la capa externa de lipopolisacáridos de *P. aeruginosa* de manera que esta no puede expulsar el componente una vez ha ingresado a la célula bacteriana. Mohammadzamani, Khorshidi, Khaledi, Shakerimoghaddam, Moosavi, & Piroozmand (2020) determinaron que la MIC del carvacrol frente a *P. aeruginosa* fue de 0,01 µg/mL.

En el presente estudio se evidencia que el aceite esencial del *Clinopodium nubigenum* (tipo) presenta actividad frente a *P. aeruginosa*, sin embargo, se indica que la efectividad del aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* (tipo) es proporcional a la concentración de carvacrol en él, siendo las concentraciones de hasta 32 µg/mL consideradas como actividad antimicrobiana buena (Kowalska-Krochmal & Dudek-Wicher, 2021), en contraste con la actividad del aceite esencial del *Clinopodium nubigenum* (tipo) extraído en el presente estudio que presenta una MIC 128 veces mayor al criterio de consideración de actividad antimicrobiana, lo cual se enmarca en una actividad antimicrobiana deficiente.

La actividad antimicrobiana de *Clinopodium nubigenum* (tipo) se le atribuye principalmente al carvacrol, un fenol monoterpenoide que en su aceite esencial se encuentra en una concentración de aproximadamente 21.21% según lo reportado (Paco et al., 2018), sin

embargo, su concentración puede variar debido a factores ambientales y de recolección de la planta (Noriega et al., 2018). Las condiciones climáticas y geográficas pueden alterar la concentración de los componentes en un aceite esencial, si bien no existen datos con respecto a la variabilidad de la concentración del carvacrol en el *Clinopodium nubigenum* (tipo) con relación a las condiciones geográficas, se ha evidenciado que en aceites esenciales de plantas aromáticas pertenecientes a la familia *Lamiaceae* (Bakha, et al., 2020) su concentración varía con la altura, factor que puede atribuir la concentración del carvacrol, y por tanto el valor de la Concentración Mínima Inhibitoria según lo reportado.

Cabe mencionar que los compuestos fenólicos pueden interaccionar con la membrana celular por su carácter lipofílico y acumularse en esta zona. Al insertarse, generan cambios en las propiedades físico-químicas de las mismas debido a su capacidad para liberar protones. Por lo tanto, disminuye la integridad de la membrana. Se ha atribuido la presencia del grupo hidroxilo libre al efecto antimicrobiano que presenta, en este caso, el carvacrol y el timol (Ben Arfa, Combes, Preziosi-Belloy, Gontard & Chalier, 2006).

El alcance del presente estudio no estaba orientado a determinar la composición del aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* (tipo), por lo que no se conoce la concentración del carvacrol o timol en el aceite esencial; sin embargo, es probable que el carvacrol este en baja concentración debido al valor alto de MIC y, por tanto, se requería una concentración elevada de carvacrol en el aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* (tipo) para que la MIC se reduzca.

El mecanismo de acción de los aceites esenciales es la destrucción de la membrana celular bacteriana, es por eso que se ha observado una mayor relación con la actividad antimicrobiana en bacterias Gram positivas al tener una estructura de membrana menos compleja en relación con las bacterias Gram negativas, sin embargo, se ha observado que si ha presentado una actividad antimicrobiana en Enterobacterales como *Escherichia coli*, *Serratia sp*, *Enterobacter sp*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis* (García-Salinas et al., 2018; Kachur & Suntres, 2019). En otros estudios se ha indicado que el carvacrol no se relaciona con la generación de resistencia en el género *Streptococcus*, y se ha observado la posibilidad de un sinergismo con antibióticos sintéticos como eritromicina, presentando excelentes resultados al potenciar la acción de la eritromicina en cepas resistentes a esta, sin observar antagonismo, utilizando el carvacrol purificado (Magi et al., 2015; Wesseling & Martin, 2022; Wijesundara et al., 2021).

En la literatura se ha reportado que el timol presenta una actividad antimicrobiana comprobada ante bacterias Gram positivas y Gram negativas, además de presentar una actividad importante

contra la formación de biofilm, y presentar sinergismo entre el carvacrol-timol con antibióticos sintéticos, siendo su mecanismo de acción por medio de la ruptura de la membrana celular bacteriana que causa la lisis de la bacteria, además de la inhibición de bombas de expulsión, inhibición de motilidad bacteriana y la inhibición de la formación de biofilms relacionadas con *P. aeruginosa* (El-seedi et al., 2008; Kachur & Suntres, 2019).

Para *Cymbopogon citratus* (hierba luisa), se determinó que la concentración mínima inhibitoria de su aceite esencial por la técnica de microdilución en caldo y mediante el empleo de resazurina frente a *P. aeruginosa*, es decir, de manera visual (*Figura 9*). El resultado obtenido al trabajar por triplicado fue de 1024 µg/mL. Tintino et al. (2015) menciona que el valor obtenido de la MIC de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) probado frente a cepas resistentes de *Pseudomonas aeruginosa* fue ≥ 1024 µg/mL, teniendo como punto de corte este valor. Según Cox & Markham (2007), al realizar un ensayo empleando linalool y citral, componentes del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa), ambos mostraron inhibición de crecimiento en ensayos de ocho horas indicando que posiblemente el compuesto pudo penetrar en la membrana celular de la bacteria. Sin embargo, al prolongar el ensayo a 24 horas, *P. aeruginosa* mostró cierta tolerancia al compuesto. Se debe tomar en cuenta que en el estudio mencionado se trabajó con cepas resistentes, por lo que el comportamiento puede ser diferente. Por otro lado, Mangalagiri, Panditi & Jeevigunta (2021) realizaron un estudio donde indican que el citral, uno de los componentes principales del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) muestra importante actividad bactericida, el cual puede ser el responsable de la actividad antibacteriana presentada por este aceite. Otro de los compuestos presentes en el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) es el geraniol, el cual actúa en la membrana bacteriana al adherirse a los lípidos presentes en esta, generando así una mayor permeabilidad que provocará la destrucción celular, al cual se suma al efecto antibombas de expulsión (Lira et al., 2020). Se ha indicado en la literatura que este compuesto interviene en los factores de virulencia de *P. aeruginosa*, especialmente en la formación de biofilms, el cual es uno de los principales mecanismos de resistencia frente a antibióticos sintéticos (Li et al., 2023). De la misma manera, Álvarez-Martínez et al. (2021), reportan que la quercetina, componente que puede estar presente en el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa), presenta actividad contra *P. aeruginosa* mediante inhibición de la enzima FabZ, la cual actúa en la síntesis de ácidos grasos.

3.3 Concentración mínima inhibitoria del antibiótico

La concentración mínima inhibitoria determinada para el ciprofloxacino empleado como antibiótico convencional en el presente estudio fue de 0,125 µg/mL, valor obtenido tras realizar microdilución en caldo y el empleo de resazurina (Anexo 3). Jayaraman, Sakharkar, Lim, Tang & Sakharkar (2010), indican que el valor obtenido de la MIC de este antibiótico para *P. aeruginosa* es igual a 0,125 µg/mL para la mayoría de las cepas con las que estos investigadores trabajaron, lo que se evidencia en el presente estudio y cuyo valor está por debajo de la MIC reportada en la CLSI frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853 (CLSI, 2023).

3.4 Ensayos de sinergismo entre el aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* y antibiótico mediante técnica de tablero de ajedrez

Los ensayos de sinergismo se realizaron entre el aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* (tipo) y el antibiótico (ciprofloxacino), y se obtuvieron los datos de las lecturas de la placa espejo y placa problema para cada ensayo realizado por triplicado (Anexo 4). Con los resultados de las lecturas obtenidos, se procedió a realizar el cálculo del porcentaje de crecimiento utilizando la Ecuación (3) con la finalidad de evidenciar la presencia de sinergismo, antagonismo o indiferencia entre el aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* (tipo) y el ciprofloxacino frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Los datos del porcentaje de crecimiento para la combinación de aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* (tipo)-ciprofloxacino de cada réplica se indican en las Tablas de la 7 a la 9, y su promedio en la Tabla 10, con la cual se realiza el análisis respectivo.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la Tabla 10 y en base al método menor-menor seleccionado para el procedimiento, el pocillo de interés corresponde al E2, con porcentaje de crecimiento de 9,661, el cual se obtuvo empleando 1/512 MIC (8 µg/mL) de aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* (tipo) y 1/4 MIC (0,03125 µg/mL) de ciprofloxacino.

Tabla 7

Porcentaje de crecimiento de *P. aeruginosa* frente a la combinación aceite esencial *Clinopodium nubigenum* (tipo)-ciprofloxacino, Réplica 1

Concentración (µg/mL)		0	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	A	100,00 0	25,341	6,741	2,645	1,195	9,556	6,655	9,130	10,324	6,314	49,403	-56,399
0.0039	B	9,556	7,509	12,628	8,020	4,693	9,130	9,983	14,932	12,201	14,590	12,287	9,898
0.0078	C	3,669	11,860	6,655	7,594	7,594	10,580	12,201	9,898	15,700	21,672	15,529	10,751
0.0156	D	0,512	2,730	13,225	9,044	4,693	4,266	5,717	6,485	8,618	16,468	12,969	92,491
0.0312	E	-7,509	6,741	-0,597	2,048	0,597	-5,290	0,597	-0,939	12,713	5,290	4,522	86,433
0.0625	F	0,597	5,973	14,164	-0,683	6,399	-2,218	20,990	4,096	10,410	11,775	12,884	56,143
0.125	G	-13,396	-7,423	7,167	1,877	4,010	-1,536	2,645	-7,850	-2,218	3,754	-2,560	34,215
0.25	H	-15,785	-16,297	-15,017	-10,495	-11,263	-6,997	-11,177	-9,727	-5,375	-9,727	-5,205	-3,669

Tabla 8

Porcentaje de crecimiento de *P. aeruginosa* frente a la combinación aceite esencial *Clinopodium nubigenum* (tipo)-ciprofloxacino, Réplica 2

Concentración (µg/mL)		0	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	A	100,00 0	113,13 4	125,90 6	29,529	24,638	30,254	23,279	16,304	22,373	23,007	62,862	28,080
0.0039	B	19,565	21,558	19,565	19,022	20,380	19,384	18,841	18,569	19,565	25,453	23,098	74,004
0.0078	C	20,562	13,043	8,243	8,967	10,326	10,688	13,949	15,580	19,746	17,935	8,605	15,127
0.0156	D	12,500	9,239	6,793	7,246	4,167	6,522	9,420	6,975	5,344	5,435	0,453	13,768
0.0312	E	11,141	8,605	1,359	4,710	2,083	4,710	8,424	0,453	2,808	8,786	12,138	11,232
0.0625	F	-4,257	2,355	-1,812	-3,714	-5,797	-3,623	-1,449	-3,804	-0,272	2,536	-1,630	18,569
0.125	G	-8,877	-7,609	-7,790	-3,986	-14,764	-12,047	-7,609	-9,873	-9,783	-13,949	-12,500	-6,159
0.25	H	-1,087	-9,420	-10,779	-12,138	-12,319	-10,145	-13,859	-9,783	-8,514	-7,699	-13,859	-7,609

Tabla 9

Porcentaje de crecimiento de *P. aeruginosa* frente a la combinación aceite esencial *Clinopodium nubigenum* (tipo)-ciprofloxacino, Réplica 3

Concentración (µg/mL)		0	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	A	100,00 0	45,588	39,973	38,770	173,12 8	153,61 0	47,995	45,588	37,834	207,62 0	56,952	-97,193
0.0039	B	52,273	39,706	41,444	51,203	210,02 7	53,075	194,38 5	50,535	42,246	45,722	120,58 8	179,01 1
0.0078	C	152,80 7	44,251	39,305	49,599	53,075	177,67 4	55,080	51,872	46,791	156,41 7	33,289	134,75 9
0.0156	D	75,936	10,294	47,326	47,861	161,36 4	51,070	145,58 8	51,872	47,460	46,524	32,888	176,20 3
0.0312	E	101,07 0	13,636	39,706	47,861	45,187	47,594	48,262	48,262	46,658	56,016	17,246	48,930
0.0625	F	12,299	20,187	35,428	35,829	36,364	32,888	35,695	37,433	34,893	40,241	21,123	106,28 3
0.125	G	7,888	21,257	22,727	22,460	21,524	20,856	20,187	24,198	21,925	22,594	7,620	38,636
0.25	H	5,749	8,289	10,160	12,032	9,358	24,198	13,904	10,695	9,225	11,898	1,604	9,091

Tabla 10

Promedio del porcentaje de crecimiento de *P. aeruginosa* frente a la combinación aceite esencial *Clinopodium nubigenum* (tipo)-ciprofloxacino

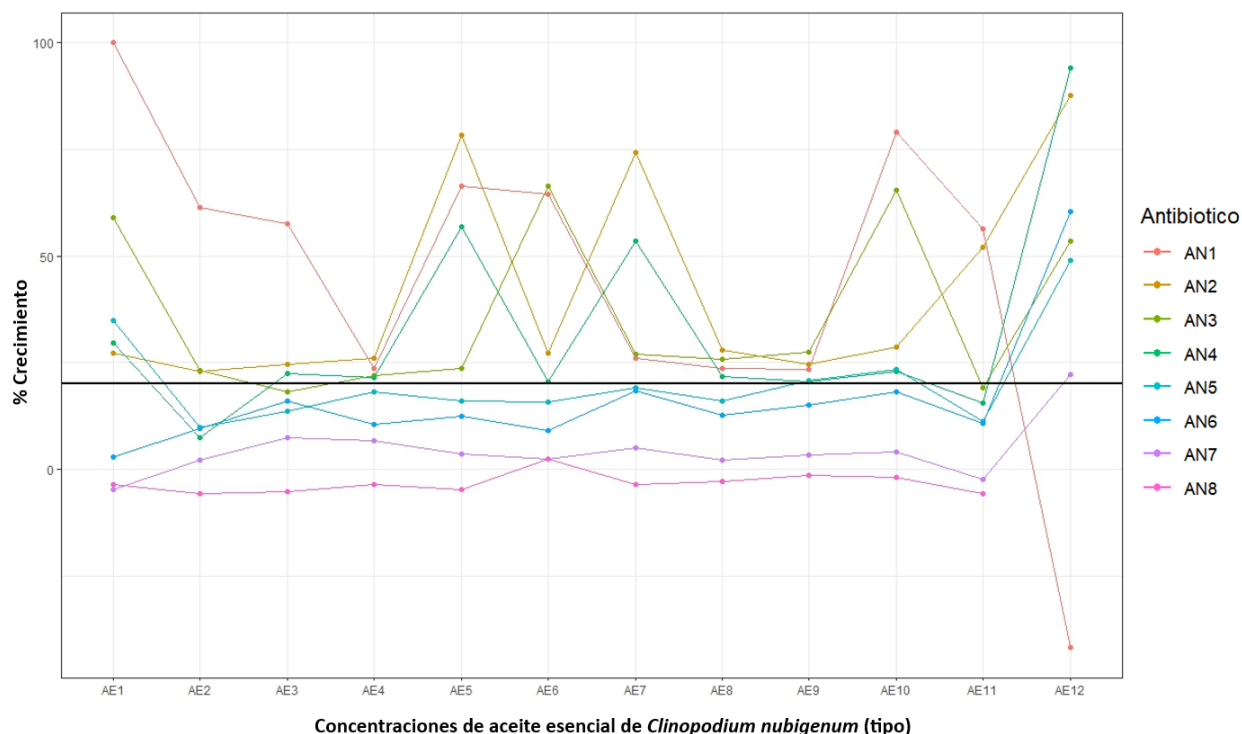
Concentración (µg/mL)		0	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	A	100,00 0	61,355	57,540	23,648	66,320	64,473	25,976	23,674	23,511	78,981	56,406	-41,837
0.0039	B	27,131	22,924	24,546	26,082	78,367	27,196	74,403	28,012	24,671	28,588	51,991	87,637
0.0078	C	59,013	23,052	18,068	22,053	23,665	66,314	27,077	25,783	27,412	65,341	19,141	53,546
0.0156	D	29,649	7,421	22,448	21,384	56,741	20,619	53,575	21,777	20,474	22,809	15,437	94,154
0.0312	E	34,901	9,661	13,489	18,206	15,956	15,671	19,094	15,925	20,726	23,364	11,302	48,865

0.0625	F	2,880	9,505	15,927	10,478	12,322	9,015	18,412	12,575	15,010	18,184	10,792	60,332
0.125	G	-4,795	2,075	7,368	6,784	3,590	2,424	5,075	2,158	3,308	4,133	-2,480	22,231
0.25	H	-3,708	-5,809	-5,212	-3,533	-4,741	2,352	-3,711	-2,938	-1,555	-1,843	-5,820	-0,729

Los pocillos de color rojo indican porcentaje de crecimiento mayor al punto de corte (20%). El pocillo de color verde es el tomado para la determinación de la FIC.

El cálculo de la Fracción Mínima Inhibitoria (FIC) del pocillo de interés determinado, se realizó mediante el empleo de la Ecuación 4 y Ecuación 5 para el ciprofloxacino y aceite esencial respectivamente. La FIC para el ciprofloxacino fue de 0,25 y la del aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* (tipo) de $1,953 \times 10^{-3}$. La $\sum FIC$ correspondiente aceite esencial *Clinopodium nubigenum* (tipo)-ciprofloxacino fue de 0,252 que según interpretación con la Tabla 5, corresponde a **sinergismo**.

Figura 10
Promedio del porcentaje de crecimiento de *P. aeruginosa* frente a la combinación aceite esencial *Clinopodium nubigenum* (tipo)-ciprofloxacino en comparación al punto de corte (20%)



En la Figura 10, se puede observar los resultados del porcentaje de crecimiento obtenidos de acuerdo con cada mezcla. El punto de corte (20% de crecimiento) está representado por la línea de referencia (negra) en la gráfica. AE representa concentraciones de aceite esencial y AN concentraciones de antibiótico, en este caso, ciprofloxacino. La combinación AE1 + AN1 representa el pocillo del control de crecimiento (100%). AN2 hasta AN8 representan concentraciones de antibiótico desde 1/32 MIC hasta 2MIC. AE2 hasta AE12 representan concentraciones de aceite esencial desde 1/512 MIC hasta 2MIC.

Al realizar el análisis de la Figura 10, se puede observar que existe menor porcentaje de crecimiento de *P. aeruginosa* ATCC 27853; es decir, mayor inhibición, al emplear mayor cantidad de los agentes (aceite esencial y antibiótico). Sin embargo, se observa que hay mezclas que emplean concentraciones menores que cumplen con un porcentaje de crecimiento menor al 20%, no obstante, el punto de interés del presente estudio corresponde a la mezcla AE2 + AN5 con base al método menor-menor.

Tabla 11

Promedio, desviación estándar y porcentaje de coeficiente de variación del porcentaje de crecimiento de *P. aeruginosa* frente a la combinación aceite esencial *Clinopodium nubigenum* (tipo)-ciprofloxacino en el pocillo E2

Réplica	Porcentaje de crecimiento	\bar{x}	σ	%CV
R1	6,741	9,661	2,912	30,147
R2	8,605			
R3	13,636			

El análisis estadístico del porcentaje de crecimiento en el pocillo de interés E2 presenta gran variabilidad (Tabla 11) y es probable que esta se deba principalmente a que el método de tablero de ajedrez aplicado es un método que por el momento carece de validación en el laboratorio de Microbiología de Plantas Medicinales y Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, siendo el presente estudio el primer acercamiento con la técnica. La validación de la técnica es necesaria ya que, a pesar de emplear un método estandarizado, se debe corroborar que su aplicación en el laboratorio donde va a ser empleado permita la obtención de resultados repetitivos. Los resultados

obtenidos en el presente estudio aportan para iniciar la validación del método en el laboratorio de microbiología (Magnusson & Örnemark, 2014).

A pesar de la variabilidad de los datos, es probable que exista sinergismo entre el aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* (tipo) y el ciprofloxacino. Fadli, Saad, Sayadi, Chevalier, Mezrioui, Pagès & Hassani (2012) realizaron un estudio similar empleando aceite esencial de *Thymus maroccanus* y *Thymus broussonetii*, los cuales tienen como componente principal el carvacrol, de la misma manera que el aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* (tipo), e indican que su aceite esencial mostró sinergismo con diversos antibióticos frente a *P. aeruginosa* por la capacidad del carvacrol y timol de alterar la membrana lipopolisacárida, permitir la salida de electrolitos y ATP así como alteración de la ATPasa, aumentando así la sensibilidad al antibiótico. Esto lo consigue, gracias a su naturaleza lipofílica, de manera que se pueden acumular en la membrana y por la interacción del grupo hidroxilo libre que genera transferencia de protones (Ben Arfa et al., 2006). Esto concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio, ya que el aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* (tipo), planta nativa de Ecuador, presenta actividad sinérgica con ciprofloxacino disminuyendo la MIC de esta a 1/4 MIC (0,03125 µg/mL) del antibiótico solo. Eliopoulos & Eliopoulos (1988) indican que la actividad sinérgica en el modelo de tablero de ajedrez debe presentarse de manera en la que los dos componentes antimicrobianos disminuyan su concentración en 1/4 de MIC para presentar una actividad sinérgica significativa, lo cual se puede observar entre el aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* (tipo) con ciprofloxacino; lo cual también se ve representado por la sumatoria de FIC que indica la interacción sinérgica.

3.5 Ensayos de sinergismo entre el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* y antibiótico mediante técnica de tablero de ajedrez

Los ensayos de sinergismo se realizaron entre el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y el antibiótico (ciprofloxacino), y se obtuvieron los datos de las lecturas de la placa espejo y placa problema para cada ensayo realizado por duplicado (Anexo 5). Con los resultados de las lecturas obtenidos, se procedió a realizar el cálculo del porcentaje de crecimiento utilizando la Ecuación (3) con la finalidad de evidenciar la presencia de sinergismo, antagonismo o indiferencia entre el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y el ciprofloxacino frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Los datos del porcentaje de crecimiento para la combinación de aceite esencial *Cymbopogon citratus* (hierba luisa)-ciprofloxacino se indican en las Tablas de la 12 a la 14, y su promedio en la Tabla 15, con la cual se realiza el análisis respectivo.

El análisis de los datos del porcentaje de crecimiento de *P. aeruginosa* ante la combinación aceite esencial *Cymbopogon citratus* (hierba luisa)-ciprofloxacino llevó a los autores a eliminar los resultados correspondientes a la Tabla 14, debido a errores que se evidencian en el control del medio. Con base a esto, el promedio del porcentaje de crecimiento se realizó entre los resultados obtenidos en las Tablas 12 y 13 y los resultados se expresan en la Tabla 15.

Tabla 12

Porcentaje de crecimiento de *P. aeruginosa* frente a la combinación aceite esencial *Cymbopogon citratus* (hierba luisa)-ciprofloxacino, Réplica 1

Concentración (µg/mL)		0	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	A	100,00 0	-54,500	25,000	25,500	30,800	32,100	36,200	35,100	23,200	115,80 0	19,400	48,200
0.0039	B	24,400	28,000	23,700	24,300	28,000	30,900	36,400	38,100	33,900	17,100	13,300	54,100
0.0078	C	26,300	21,500	23,000	22,700	25,000	26,800	30,100	32,000	32,200	21,500	15,000	20,100
0.0156	D	19,500	25,300	25,400	24,900	25,800	24,900	29,700	35,600	32,100	21,100	15,200	14,900
0.0312	E	15,800	25,000	25,200	22,600	22,400	25,000	22,200	33,800	29,400	21,600	13,600	89,600
0.0625	F	11,200	16,500	18,300	14,900	15,500	19,200	23,100	23,700	21,400	16,100	14,400	17,000
0.125	G	-2,200	6,300	5,700	10,200	5,900	4,000	10,900	12,200	12,400	13,600	32,700	12,100
0.25	H	0,400	-2,700	-2,800	-3,700	-0,400	-4,000	-3,500	3,200	3,500	3,600	7,500	-5,100

Tabla 13

Porcentaje de crecimiento de *P. aeruginosa* frente a la combinación aceite esencial *Cymbopogon citratus* (hierba luisa)-ciprofloxacino, Réplica 2

Concentración (µg/mL)		0	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

0	A	100,00 0	156,22 9	138,28 6	135,54 3	138,05 7	149,82 9	138,51 4	152,22 9	18,057	11,086	8,229	23,086
0.0039	B	22,171	25,600	23,314	35,086	25,714	29,029	28,914	27,886	24,914	17,714	13,029	53,143
0.0078	C	159,42 9	26,400	29,600	29,943	28,114	29,829	28,457	25,829	24,457	128,22 9	10,971	73,371
0.0156	D	126,40 0	23,886	26,286	31,200	23,086	29,943	28,914	29,829	24,000	17,600	8,686	6,286
0.0312	E	10,514	19,886	18,971	22,629	22,171	20,229	84,114	121,14 3	22,629	14,057	4,914	4,571
0.0625	F	-5,829	9,257	15,314	12,686	12,914	14,971	12,571	11,543	8,114	11,429	3,543	2,857
0.125	G	-9,257	-5,029	-3,429	-4,457	-1,600	-5,714	-3,200	-3,086	-1,143	4,114	4,000	1,029
0.25	H	-5,829	-7,200	-6,857	-13,829	-11,200	-16,914	-13,371	-16,343	-17,257	-0,686	-2,400	-4,114

Tabla 14

Porcentaje de crecimiento de *P. aeruginosa* frente a la combinación aceite esencial *Cymbopogon citratus* (hierba luisa)-ciprofloxacino, Réplica 3

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)		0	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	A	100,00 0	21,123	19,111	17,770	17,435	107,62 8	15,675	19,111	0,251	77,284	4,443	2,263
0.0039	B	105,44 8	22,464	21,207	17,016	18,106	17,435	16,597	16,597	16,932	13,328	7,879	64,711
0.0078	C	19,363	21,123	19,531	19,111	18,944	14,837	17,016	14,669	13,244	9,053	9,137	6,203
0.0156	D	12,070	20,704	20,956	20,285	18,944	18,273	19,028	18,022	9,220	7,209	10,478	9,556
0.0312	E	10,226	18,189	19,698	15,842	18,441	17,100	15,507	16,429	14,501	14,920	11,148	47,527
0.0625	F	-1,676	10,478	14,250	14,920	15,759	15,842	15,004	10,729	13,915	17,519	12,154	7,293
0.125	G	-5,616	4,191	5,784	6,622	10,478	5,700	6,957	3,269	6,622	12,154	7,879	0,168
0.25	H	-7,460	-2,850	-1,341	-2,598	0,754	-3,185	-1,928	-9,304	0,922	0,000	-8,634	61,777

Tabla 15

Promedio del porcentaje de crecimiento de *P. aeruginosa* frente a la combinación aceite esencial *Cymbopogon citratus* (hierba luisa)-ciprofloxacino

Concentración (µg/mL)		0	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	A	100,00 0	50,864	81,643	80,521	84,429	90,964	87,357	93,664	20,629	63,443	13,814	35,643
0.0039	B	23,286	26,800	23,507	29,693	26,857	29,964	32,657	32,993	29,407	17,407	13,164	53,621
0.0078	C	92,864	23,950	26,300	26,321	26,557	28,314	29,279	28,914	28,329	74,864	12,986	46,736
0.0156	D	72,950	24,593	25,843	28,050	24,443	27,421	29,307	32,714	28,050	19,350	11,943	10,593
0.0312	E	13,157	22,443	22,086	22,614	22,286	22,614	53,157	77,471	26,014	17,829	9,257	47,086
0.0625	F	2,686	12,879	16,807	13,793	14,207	17,086	17,836	17,621	14,757	13,764	8,971	9,929
0.125	G	-5,729	0,636	1,136	2,871	2,150	-0,857	3,850	4,557	5,629	8,857	18,350	6,564
0.25	H	-2,714	-4,950	-4,829	-8,764	-5,800	-10,457	-8,436	-6,571	-6,879	1,457	2,550	-4,607

Los pocillos de color rojo indican el porcentaje de crecimiento mayor al punto de corte (20%). El pocillo de color verde es el tomado para la determinación de la FIC.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la Tabla 15 y en base al método menor-menor seleccionado para el procedimiento, el pocillo de interés corresponde al B10, con porcentaje de crecimiento de 17,407, el cual se obtuvo empleando 1/2 MIC (512 µg/mL) de aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y 1/32 MIC (0,00390625 µg/mL) de ciprofloxacino.

El cálculo de la Fracción Mínima Inhibitoria (FIC) del pocillo de interés determinado, se realizó mediante el empleo de la Ecuación 4 y Ecuación 5 para el ciprofloxacino y aceite esencial respectivamente. La FIC para el ciprofloxacino fue de 0,031 y la del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) de 0,5. La ΣFIC correspondiente aceite esencial *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) -ciprofloxacino fue de 0,531 que según interpretación con la Tabla 5, corresponde a **indiferencia**.

En la Figura 11, se puede observar que existe menor porcentaje de crecimiento de *P. aeruginosa*; es decir, mayor inhibición, al emplear concentraciones mayores de aceite esencial y antibiótico. Sin embargo, se observa que hay mezclas que emplean concentraciones menores que cumplen con un porcentaje de crecimiento menor al 20%, no obstante, este porcentaje de crecimiento se evidencia debido a un aumento en la concentración del aceite esencial, lo que establece que el punto de interés en el presente estudio corresponde a la mezcla AE10 + AN2 con base al método menor-menor.

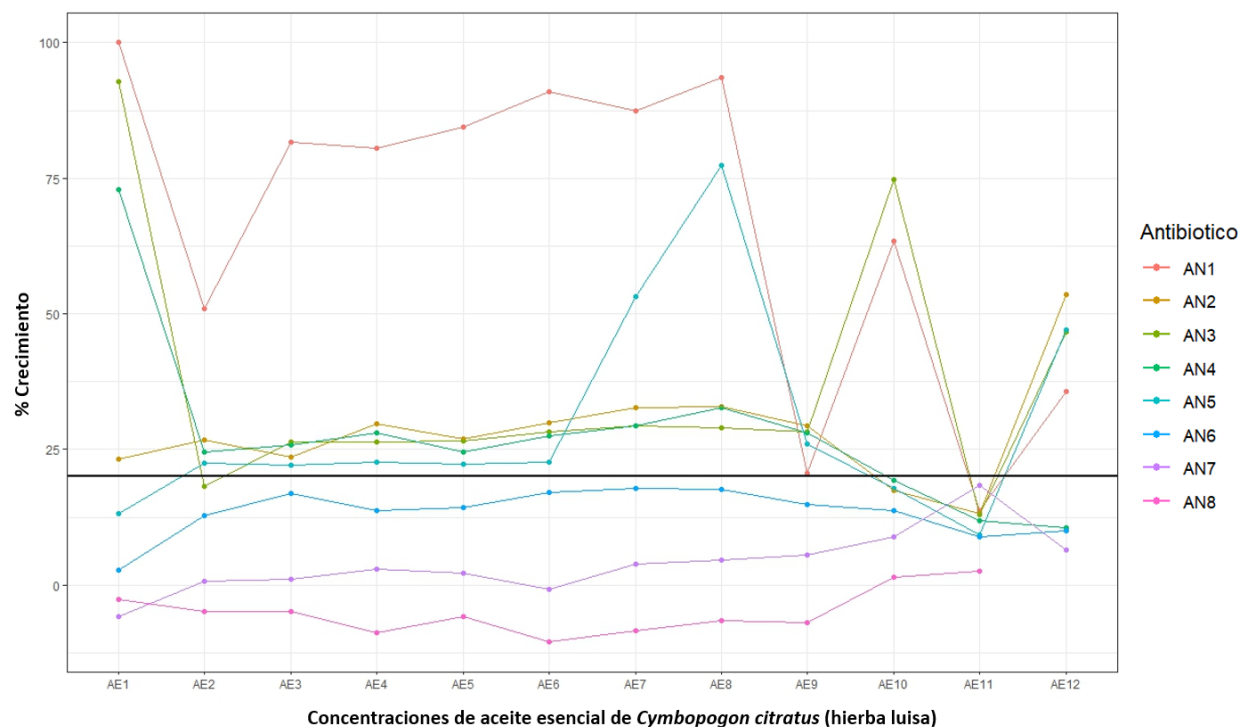
Tabla 16

Promedio, desviación estándar y porcentaje de coeficiente de variación del porcentaje de crecimiento de *P. aeruginosa* frente a la combinación aceite esencial *Cymbopogon citratus* (hierba luisa)-ciprofloxacino en el pocillo B10

Réplica	Porcentaje de crecimiento	\bar{x}	σ	%CV
R1	17,100	17,407	0,434	2,494
R2	17,714			

Figura 11

Promedio del porcentaje de crecimiento de *P. aeruginosa* frente a la combinación aceite esencial *Cymbopogon citratus* (hierba luisa)--ciprofloxacino en comparación al punto de corte (20%)



En la Figura 11, se puede observar los resultados del porcentaje de crecimiento obtenidos de acuerdo con cada mezcla. El punto de corte (20% de crecimiento) está representado por la línea de referencia (negra) en la gráfica. AE representa concentraciones de aceite esencial y AN concentraciones de antibiótico, en este caso, ciprofloxacino. La combinación AE1 + AN1 representa el pocillo del control de crecimiento (100%). AN2 hasta AN8 representan concentraciones de antibiótico desde 1/32MIC hasta 2MIC. AE2 hasta AE12 representan concentraciones de aceite esencial desde 1/512MIC hasta 2MIC.

Como se mencionó anteriormente, la variabilidad de los resultados observados en la Tabla 15 se puede deber principalmente a la falta de validación del método de tablero de ajedrez, por lo que para futuras aplicaciones es importante mencionar la necesidad de realizar una validación del método (Magnusson & Örnemark, 2014)

A pesar de la variabilidad de los datos, se establece que existe una indiferencia entre el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y ciprofloxacino. Álvarez-Martínez et al. (2021), indican que el ácido cafeico, componente del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* presentó actividad sinérgica con ciprofloxacino frente a *Klebsiella pneumoniae*, una bacteria Gram negativa perteneciente a los Enterobacterales al inhibir principalmente bombas de expulsión. *P. aeruginosa*, una bacteria Gram negativa pero no perteneciente a los Enterobacterales, presenta

como mecanismo de resistencia bombas de expulsión; sin embargo, se debe tomar en cuenta que este componente no es uno de los mayoritarios en el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y que la composición, como ya se ha mencionado, puede variar por varios factores; adicionalmente, *P. aeruginosa* cuenta con un mecanismo adicional que incluye cierre de porinas que pueden afectar el ingreso del aceite esencial en presencia del antibiótico. Jayaraman, Sakharkar, Lim, Tang & Sakharkar (2010) obtuvieron patrones similares al buscar interacción entre ciprofloxacino con ciertos compuestos fitoquímicos como ácido gálico y miricetina frente a *P. aeruginosa*. Tetard et al. (2021), mencionan que el empleo de concentraciones subinhibitorias de ciertos componentes de los aceites esenciales, como es el caso del citral, puede causar sobreexpresión de genes encargados de codificar mecanismos de resistencia como el gen *mexY* que permite la expresión de bombas de expulsión, sin embargo, con el tiempo la bacteria lo consume como fuente de carbono y energía y la expresión disminuye nuevamente, pudiendo explicar la indiferencia presentada en nuestro trabajo. En el presente estudio se puede corroborar que tampoco se presenta actividad sinérgica con los componentes de la *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y que, al encontrarse en cantidades no conocidas, pueden ser menores a las requeridas para generar sobreexpresión de bombas de expulsión, de manera que no se produce sinergismo ni antagonismo.

A pesar de que el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) presenta por sí solo actividad frente a *P. aeruginosa*, que se puede atribuir en proporción a sus dos componentes principales como lo son el geraniol (efecto antibombas de expulsión) y al citral, de este último compuesto se conoce que su actividad antibacteriana puede contrarrestar la actividad presentada por el primer compuesto, específicamente en *P. aeruginosa*, debido a la sobreexpresión de bombas de expulsión que en el caso de la combinación con ciprofloxacino impedirían su actividad antimicrobiana. Cabe indicar que se ha observado este fenómeno en esta bacteria específicamente (Bhattamisra et al., 2018; Tetard et al., 2021).

En contraste, la actividad presentada por la interacción del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) con ciprofloxacino se determinó que se genera una indiferencia, lo cual es respaldado en la literatura con lo indicado por Eliopoulos & Eliopoulos (1988), en donde se indica que la actividad indiferente se presenta con una sumatoria de FIC entre $> 0.5 - \leq 4$; y considerando que la disminución de la MIC para el aceite esencial llegó a $1/2$ de la misma, se puede observar que no se presenta una interacción sinérgica entre ambos.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

El aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* (tipo) y de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) presentan actividad antibacteriana frente a *Pseudomonas aeruginosa*, siendo una posible opción la investigación, aislamiento y purificación de los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana. El aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) muestra una mejor actividad que el aceite esencial del *Clinopodium nubigenum* (tipo), al determinarse su concentración mínima inhibitoria en una concentración menor (1024 µg/mL), lo cual puede asociarse a la concentración del compuesto responsable de su actividad antimicrobiana y a su vez al mecanismo de acción de este, que posee mayor efectividad ante la bacteria.

El aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* (tipo) presenta una actividad antibacteriana frente a *P. aeruginosa* a una concentración elevada (4096 µg/mL), por lo cual se considera que no es efectiva frente a esta bacteria por sí solo; sin embargo, en combinación con ciprofloxacino presenta una interacción sinérgica determinada bajo los parámetros establecidos en la literatura, debido a que dicha interacción disminuye la concentración mínima inhibitoria tanto del antibiótico y del aceite esencial al lograr una inhibición del crecimiento bacteriano mayor al 80% con concentraciones menores a las cuales se determinó la MIC de estos agentes por separado.

El aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) mostró una interacción de indiferencia con ciprofloxacino, es decir, que esta interacción no presenta un efecto sinérgico o antagónico significativo frente a la bacteria probada, lo cual se traduce en que no es un camino factible en el estudio de una nueva terapia antimicrobiana frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

4.2 Recomendaciones

- Realizar una validación de la técnica de tablero de ajedrez para su aplicación en el laboratorio de Microbiología del Grupo de Plantas Medicinales y Productos Naturales del Departamento de Biociencias de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca.
- Realizar un análisis cromatográfico de estos aceites esenciales obtenidos bajo las mismas condiciones para poder corroborar cuál es el componente principal e investigar a cuál se le atribuye la acción antibacteriana para poder obtenerlo de manera pura y así analizar su empleo a menores concentraciones.

5. Referencias

- Aćimović, M., Čabarkapa, I., Cvetković, M., Stanković, J., Kiproviski, B., Gvozdenac, S., & Puvača, N. (2019). *Cymbopogon citratus* (DC.) STAPH: CHEMICAL COMPOSITION, ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES, USE IN MEDICINAL AND COSMETIC PURPOSE. *Journal of Agronomy, Technology and Engineering Management*, 2(6), 344–360.
- Álvarez-Martínez, F. J., Barraji3n-Catal3n, E., Herranz-L3pez, M., & Micol, V. (2021). Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 90(153626), 153626. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153626>
- Anjum, H., Arefin, M. S., Jahan, N., Oishee, M. J., Nahar, S., Islam, S., Banerjee, S., Sinha, S., Kumar, S., Haque, M., & Rahman, M. H. (2023). Roles of intrinsic and acquired resistance determinants in multidrug-resistant clinical *Pseudomonas aeruginosa* in Bangladesh. *Bangladesh Journal of Medical Science*, 22(3), 489–507. <https://doi.org/10.3329/bjms.v22i3.66960>
- Asokan, G. V., Ramadhan, T., Ahmed, E., & Sanad, H. (2019). WHO Global Priority Pathogens List: A Bibliometric Analysis of MedlinePubMed for Knowledge Mobilization to Infection Prevention and Control Practices in Bahrain. *Oman Medical Journal*, 34(3), 184–193. <https://doi.org/https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31110624/>
- Aumeeruddy-Elalfi, Z., Gurib-Fakim, A., & Mahomoodally, M. F. (2016). Antimicrobial and Antibiotic Potentiating Activity of Essential Oils From Tropical Medicinal Herbs and Spices. In *Antibiotic Resistance* (pp. 271–289). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803642-6.00013-7>

Bahramsoltani, R., Rostamiasrabadi, P., Shahpiri, Z., Marques, A. M., Rahimi, R., & Farzaei, M.

H. (2018). *Aloysia citrodora* Paláu (Lemon verbena): A review of phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 222(1), 34–51.

<https://doi.org/10.1016/J.JEP.2018.04.021>

Bakha, M., El Mtili, N., Machon, N., Aboukhalid, K., Amchra, F. Z., Khiraoui, A., Gibernau, M.,

Tomi, F., & Al Faiz, C. (2020). Intraspecific chemical variability of the essential oils of Moroccan endemic *Origanum elongatum* L. (Lamiaceae) from its whole natural habitats.

Arabian Journal of Chemistry, 13(1), 3070–3081.

<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2018.08.015>

Barbecho Coraisaca, D. V. (2021). Susceptibilidad antimicrobiana en *Pseudomona* spp., en el

Hospital General Docente Cuenca-Ecuador. *Vive Revista de Salud*, 4(12), 50–65.

<https://doi.org/10.33996/REVISTAVIVE.V4I12.108>

Bellio, P., Fagnani, L., Nazzicone, L., & Celenza, G. (2021). New and simplified method for drug

combination studies by checkerboard assay. *MethodsX*, 8(July), 101543.

<https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101543>

Ben Arfa, A., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N., & Chalier, P. (2006). Antimicrobial

activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied*

Microbiology, 43(2), 149–154. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2006.01938.x>

Bermúdez-Vásquez, M., Granados-Chinchill, F., & Molina, A. (2019). Composición química y

actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Psidium guajava* y *Cymbopogon citratus*.

Agronomía Mesoamericana, 30(1), 147–163.

Bhattamisra, S. K., Kuean, C. H., Chieh, L. B., Yan, V. L. Y., Lee, C. K., Hooi, L. P., Shyan, L. P.,

Liew, Y. K., Candasamy, M., & Sahu, P. S. (2018). Antibacterial activity of geraniol in combination with standard antibiotics against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*

- and helicobacter pylori. *Natural Product Communications*, 13(7), 791–793.
<https://doi.org/10.1177/1934578x1801300701>
- Bonapace, C. R., Bosso, J. A., Friedrich, L. V., & White, R. L. (2002). Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 44(4), 36
- Brar, R. K., Jyoti, U., Patil, R. K., & Patil, H. C. (2020). Fluoroquinolone antibiotics: An overview. *Adesh University Journal of Medical Sciences & Research*, 2(26), 26–30.
https://doi.org/10.25259/aujmsr_12_2020
- Buldain, D., Buchamer, A., Marchetti, L., Aliverti, F., Borja, C., & Mestorino, N. (2017). Efecto antimicrobiano de la combinación de cloxacilina con aceite esencial de Melaleuca armillaris ante Staphylococcus aureus. *Analecta veterinaria*, 37(2), 014.
<https://doi.org/10.24215/15142590e014>
- Caballero-Serrano, V., McLaren, B., Carrasco, J. C., Alday, J. G., Fiallos, L., Amigo, J., & Onaindia, M. (2019). Traditional ecological knowledge and medicinal plant diversity in Ecuadorian Amazon home gardens. *Global Ecology and Conservation*, 17(e00524), e00524. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00524>
- CLSI. (2018). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. 11th ed. CLSI standard M07. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. https://clsi.org/media/1928/m07ed11_sample.pdf
- CLSI. (2023). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 33rd ed. CLSI M100. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cokol-Cakmak, M., & Cokol, M. (2019). *Miniaturized checkerboard assays to measure antibiotic interactions*. In R. Larson & T. Oprea (Eds.), *Bioinformatics and Drug Discovery* (1st ed., pp. 3–9). Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9089-4_1

Consejo Nacional de Salud – Comisión Nacional de Medicamentos e Insumos. (2022). *Cuadro Nacional de Medicamentos Básicos* (11a ed.).

<https://www.conasa.gob.ec/biblioteca-conasa/CNMB-XI/Libro-Cuadro-Medicamentos-Basicos-11a-revision-2022.pdf>

Cox, S. D., & Markham, J. L. (2007). Susceptibility and intrinsic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to selected plant volatile compounds. *Journal of Applied Microbiology*, 103(4), 930–936. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03353.x>

De Oliveira, D. M. P., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N. A., Schembri, M. A., Beatson, S. A., Paterson, D. L., & Walker, M. J. (2020). *Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens*. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(3). <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19>.

Eliopoulos, G. M., & Eliopoulos, C. T. (1988). Antibiotic combinations: Should they be tested? *Clinical Microbiology Reviews*, 1(2), 139–156. <https://doi.org/10.1128/CMR.1.2.139>

El-seedi, H. R., Khattab, A., Gaara, A. H., Mohamed, T. K., Hassan, N. A., & El-kattan, A. E. (2008). Essential Oil Analysis of *Micromeria nubigena* H.B.K. and its Antimicrobial Activity. *Journal of Essential Oil Research*, 20(5), 452–466. [https://doi.org/1041-2905/08/0004-0452\\$14.00/0](https://doi.org/1041-2905/08/0004-0452$14.00/0)

Ena-Muñoz, J., & Burgos-Sánchez, A. (2018). Otitis externa maligna causada por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a ciprofloxacino. *Revista Española de Casos Clínicos en Medicina Interna*, 2018(Suplemento), 19–21. <https://doi.org/10.32818/reccmi.a3s1a9>

Fadli, M., Saad, A., Sayadi, S., Chevalier, J., Mezrioui, N.-E., Pagès, J.-M., & Hassani, L. (2012). Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection - bacteria and their synergistic potential with antibiotics.

- Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 19(5), 464–471. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.12.003>
- Fonseca Chasipanta, E. A. (2016). *EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE SUNFO (CLINOPODIUM NUBIGENUM (KUNTH) KUNTZE) ANTE PATÓGENOS DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS (STAPHYLOCOCCUS AUREUS ATCC: 25923, STREPTOCOCCUS PYOGENES ATCC: 19615, STREPTOCOCCUS P* [Universidad Politécnica Salesiana Quito]. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/13227/1/UPS-QT10425.pdf>
- García-Salinas, S., Elizondo-Castillo, H., Arruebo, M., Mendoza, G., & Irusta, S. (2018). Evaluation of the Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of Different Components of Natural Origin Present in Essential Oils. *Molecules*, 23(1399), 1–18. <https://doi.org/10.3390/molecules23061399>
- Gilardoni, G., Malagon, O., Morocho, V., Negri, R., Tosi, S., Guglielminetti, M., Vidari, G., & Finzi, P. (2011). Phytochemical researches and antimicrobial activity of *Clinopodium nubigenum* Kunth (Kuntze) raw extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia: Orgao Oficial Da Sociedade Brasileira de Farmacognosia*, 21(5), 850–855. <https://doi.org/10.1590/s0102-695x2011005000139>
- Guimarães, A. C., Meireles, L. M., Lemos, M. F., Guimarães, M. C. C., Endringer, D. C., Fronza, M., & Scherer, R. (2019). Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids Present in Essential Oils. *Molecules*, 24(13), 2471. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24132471>
- Holubar, M. (2020). Antimicrobial resistance: a global public health emergency further exacerbated by international travel. *Journal of Travel Medicine*, 27(1). <https://doi.org/10.1093/JTM/TAZ095>
- Ingeniería Agropecuaria, E. (s/f). *UNIVERSIDAD DEL AZUAY*. Edu.ec. Recuperado el 22 de julio de 2023, de <https://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/4274/1/10832.pdf>

Jawetz, Melnick, & Adelberg. (2020). *Microbiología Médica* (McGRAW-HILL/INTERAMERICANA EDITORES (ed.); 28th ed. McGRAW-HILL.

Jayaraman, P., Sakharkar, M.K., Lim, C.S., Tang, T.H., Sakharkar, K.R. (2010). Activity and interactions of antibiotic and phytochemical combinations against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *International Journal of Biological Sciences*, 6(6), 556-568. <https://doi.org/10.7150/ijbs.6.556>.

Kachur, K., & Suntres, Z. (2019). The antibacterial properties of phenolic isomers , carvacrol and thymol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0(0), 1–12. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1675585>

Kowalska-Krochmal, B., & Dudek-Wicher, R. (2021). The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens*, 10(2). <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/pathogens10020165>

Leber, A. (2016). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. In A. Leber (Ed.), American Society For Microbiology (4th ed.). American Society for Microbiology.

Li, W. R., Zeng, T. H., Zhang, Z. Q., Shi, Q. S., & Xie, X. B. (2023). Geraniol attenuates virulence factors by inhibiting quorum sensing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 14(3), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1190619>

Lira, M. H. P. de, Andrade Júnior, F. P. de, Moraes, G. F. Q., Macena, G. da S., Pereira, F. de O., & Lima, I. O. (2020). Antimicrobial activity of geraniol: an integrative review. *Journal of Essential Oil Research*, 32(3), 187–197. <https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1745697>

Luciardi, M. C., Blázquez, M. A., Cartagena, E., Bardón, A., & Arena, M. E. (2016). Mandarin essential oils inhibit quorum sensing and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *LWT - Food Science and Technology*, 68, 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.056>

- Magi, G., Marini, E., & Facinelli, B. (2015). Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol , and synergy of carvacrol and erythromycin , against clinical , erythromycin-resistant Group A Streptococci. *Frontiers in Microbiology*, 6(165), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00165>
- Mangalagiri, N. P., Panditi, S. K., & Jeevigunta, N. L. L. (2021). Antimicrobial activity of essential plant oils and their major components. *Heliyon*, 7(4). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06835>
- Magnusson, B., & Örnemark, U. (Eds.). (2014). *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics* (2a ed.). EURACHEM.
- Marshall, E. (2011). *Health and wealth from Medicinal Aromatic Plants*. FAO. <https://www.fao.org/3/i2473e/i2473e.pdf>
- Medina Caiminagua, M. L. (2015). Determinación del contenido total de hongos en doce especies vegetales cultivadas en Ecuador [Universidad Técnica de Machala]. In *Universidad Técnica de Machala*. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/2774/2/CD000002-TRABAJO COMPLETO-pdf>.
- Mohammadzamani, Z., Khorshidi, A., Khaledi, A., Shakerimoghaddam, A., Moosavi, G. A., & Piroozmand, A. (2020). Inhibitory effects of Cinnamaldehyde, Carvacrol, and honey on the expression of *exoS* and *ampC* genes in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wound infections. *Microbial Pathogenesis*, 140(103946), 103946. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103946>
- Mulani, M., Kamble, E., Kumbar, S., Tawre, M., & Pardesi, K. (2019). Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Frontiers in Microbiology*, 10, 539. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539>

- Murbach Teles Andrade, B. F., Nunes Barbosa, L., Da Silva Probst, I., & Fernandes Júnior, A. (2014). Antimicrobial activity of essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 26(1), 34–40. <https://doi.org/10.1080/10412905.2013.860409>
- Navarrete, C., Gil, J., Durango, D., & Garcia, C. (2009). EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE AGROINDUSTRIALES EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF MANDARIN ESSENTIAL OIL OBTAINED FROM AGRO INDUSTRIAL RESIDUES. *DYNA*, 162(1), 85–92. <http://www.scielo.org.co/pdf/dyna/v77n162/a10v77n162.pdf>
- Noriega, P. F., De Los, T., Mosquera, Á., Osorio, E. A., Guerra, P., & Fonseca, A. (2018). Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy 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>
- Oliva, M., Beltramino, E., Gallucci, N., Casero, C., Zygadlo, J., & Demo, M. (2010). Antimicrobial activity of essential oils of *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton from different regions of Argentina. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9(1), 29–37. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85612108005>
- 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>
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T.-J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 37(1), 177–192. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>

- Rehman, A., Patrick, W. M., & Lamont, I. L. (2019). Mechanisms of ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: New approaches to an old problem. *Journal of Medical Microbiology*, 68(1), 1–10. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000873>
- Reynolds, D., & Kollef, M. (2021). The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update. *Drugs*, 81(18), 2117–2131. <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01635-6>
- Rojas, L., Velasco, J., Díaz, T., Gil, R., Carmona, J., & Usubillaga, A. (2010). Composición química y efecto antibacteriano del aceite esencial de *Aloysia triphylla* (L'Hér.) Britton contra patógenos genito-urinarios. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9(1), 56–62. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85612108007>
- Ronquillo, S. (2016). *UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO E HISTOTECNOLÓGICO PREVALENCIA DE INFECCIONES POR ACINETOBACTER BAUMANNII* [Universidad Central del Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/7887/1/T-UCE-0006-045.pdf>
- Sales Montezuma, G. T., & Foresto, R. (2020). Drug-induced nephrotoxicity. *Revista Da Associação Médica Brasileira*, 66(1), s82–s90. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.66.S1.82>
- Sanz García, F. (2020). *Predicción de la resistencia a antibióticos, intrínseca y adquirida, en Pseudomonas aeruginosa* [Universidad Autónoma de Madrid]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=285550&info=resumen&idioma=SPA>
- Sevillano, R., Siche, R., Castillo Martínez, W., & Silva, E. (2019). Optimización de la extracción por arrastre de vapor de aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) utilizando diseños secuenciales. *Manglar*, 16(1), 53–61. <https://doi.org/10.17268/manglar.2019.008>

- Soares, A., Roussel, V., Pestel-Caron, M., Barreau, M., Caron, F., Bouffartigues, E., Chevalier, S., & Etienne, M. (2019). Understanding Ciprofloxacin Failure in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm: Persister Cells Survive Matrix Disruption. *Frontiers in Microbiology*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02603>
- Sondang, T., Sihotang, U., Dwi, A., Widodo, W., & Dwi Endraswari, P. (2022). Effect of Ciprofloxacin, Levofloxacin, and Ofloxacin on *Pseudomonas aeruginosa*: A case control study with time kill curve analysis. *Annals of Medicine and Surgery*, 82(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2022.104674>
- Stojanović-Radić, Z., Pejčić, M., Stojanović, N., Sharifi-Rad, J., & Stanković, N. (2016). Potential of *Ocimum basilicum* L. and *Salvia officinalis* L. essential oils against biofilms of *P. aeruginosa* clinical isolates. *Cellular and Molecular Biology*, 62(9), 27–32. <https://doi.org/10.14715/cmb/2016.62.9.5>
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outtersson, K., Patel, J., Cavaleri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., ... Zorzet, A. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet. Infectious Diseases*, 18(3), 318–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
- Tetard, A., Foley, S., Mislin, G. L. A., Brunel, J.-M., Oliva, E., Torrealba Anzola, F., Zedet, A., Cardey, B., Pellequer, Y., Ramseyer, C., Plésiat, P., & Llanes, C. (2021). Negative Impact of Citral on Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to Antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, 12, 709838. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.709838>
- Tintino, S. R., F. Lucena, B. F., Figueredo, F. G., de M. Oliveira, C. D., Dos S. Aguiar, J. J., do N. Cardoso, E., A. de Aquino, P. E., C. Andrade, J., M. coutinho, H. D., & F. Matias, E. F. (2015). Evaluation of antibacterial activity of aminoglycosides and modulating the

- essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf. *Acta biologica colombiana*, 20(1), 39–45. <https://doi.org/10.15446/abc.v20n1.41673>
- Vanegas, D., Abril-Novillo, A., Khachatryan, A., Jerves-Andrade, L. J., Peñaherrera, E., Cuzco, N., Wilches, I., Calle, J., & León-Tamariz, F. (2021). Validation of a method of broth microdilution for the determination of antibacterial activity of essential oils. *BMC Research Notes*, 14(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13104-021-05838-8>
- Vélez, E., D'Armas, H., Jaramillo-Jaramillo, C., Echavarría-Vélez, A. P., & Isitua, C. C. (2019). Fitoquímica De *Lippia Citriodora* K cultivada en Ecuador y su actividad biológica.// Phytochemistry of *Lippia citriodora* K grown in Ecuador and its biological activity. *CIENCIA UNEMI*, 12(29), 9–19. <https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol12iss29.2019pp9-19p>
- Wesseling, C. M. J., & Martin, N. I. (2022). Synergy by Perturbing the Gram-Negative Outer Membrane: Opening the Door for Gram-Positive Specific Antibiotics. *ACS Infectious Diseases*, 8(1), 1731–1757. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00193>
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163–175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- Wijesundara, N. M., Lee, S. F., Cheng, Z., Davidson, R., & Vasantha Rupasinghe, H. P. (2021). Carvacrol exhibits rapid bactericidal activity against *Streptococcus pyogenes* through cell membrane damage. *Scientific Reports*, 11(1487), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79713-0>
- Wińska, K., Mączka, W., Łyczko, J., Grabarczyk, M., Czubaszek, A., & Szumny, A. (2019). Essential Oils as Antimicrobial Agents—Myth or Real Alternative? *Molecules*, 24(11). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24112130>

Zhao, L., Wang, S., Li, X., He, X., & Jian, L. (2020). Development of in vitro resistance to fluoroquinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 9(1), 124. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00793-8>

6. Anexos

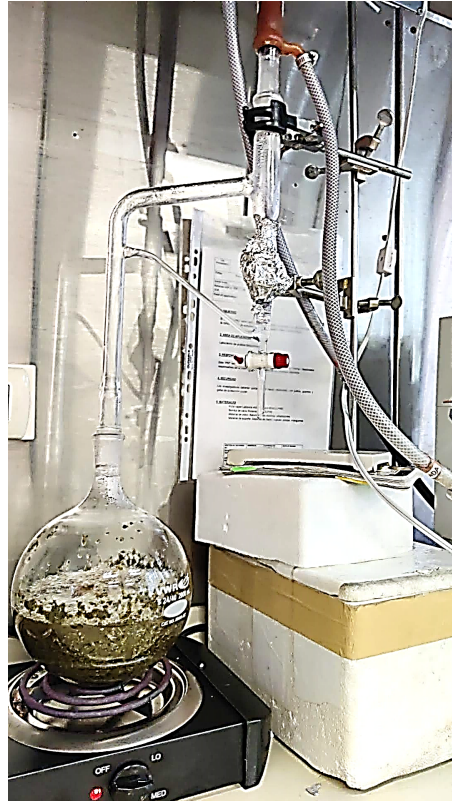
Anexo A

Sitio de recolección de *Clinopodium nubigenum* (tipo) en Rañas, Azuay – Páramo Andino



Anexo B

Equipo de hidrodestilación con Trampa de Clevenger para extracción de aceites esenciales



Anexo C

Microplaca con resazurina que muestra la MIC de ciprofloxacino.



Nota. De izquierda a derecha, se encuentran concentraciones decrecientes de ciprofloxacino. En el pocillo A4 (señalado con rojo) se identifica la MIC del antibiótico: 0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se realizó la determinación por cuadruplicado (A-D). Pocillos A1, B1, C1, D1 son control de crecimiento.

Anexo D

Absorbancias de las microplacas por el método del tablero de ajedrez para el aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* (tipo)

Placa espejo – Réplica 1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,411	0,396	0,412	0,443	0,423	0,435	0,435	0,428	0,388	0,399	0,125	1,017
B	0,404	0,407	0,395	0,444	0,434	0,406	0,398	0,41	0,413	0,392	0,369	0,345
C	0,383	0,412	0,449	0,45	0,448	0,436	0,442	0,446	0,408	0,424	0,38	0,331
D	0,399	0,445	0,454	0,461	0,475	0,48	0,481	0,477	0,448	0,433	0,401	0,306
E	0,38	0,385	0,43	0,453	0,491	0,496	0,485	0,491	0,454	0,441	0,425	0,28
F	0,373	0,37	0,387	0,458	0,43	0,455	0,471	0,488	0,456	0,445	0,412	0,34
G	0,33	0,357	0,324	0,404	0,376	0,408	0,382	0,448	0,452	0,41	0,408	0,317
H	0,316	0,392	0,413	0,382	0,401	0,367	0,365	0,348	0,34	0,352	0,335	0,273

Placa inóculo – Réplica 1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,583	0,693	0,491	0,474	0,437	0,547	0,513	0,535	0,509	0,473	0,704	0,356
B	0,516	0,495	0,543	0,538	0,489	0,513	0,515	0,585	0,556	0,563	0,513	0,461
C	0,426	0,551	0,527	0,539	0,537	0,56	0,585	0,562	0,592	0,678	0,562	0,457
D	0,405	0,477	0,609	0,567	0,53	0,53	0,548	0,553	0,549	0,626	0,553	1,39
E	0,292	0,464	0,423	0,477	0,498	0,434	0,492	0,48	0,603	0,503	0,478	1,293
F	0,38	0,44	0,553	0,45	0,505	0,429	0,717	0,536	0,578	0,583	0,563	0,998
G	0,173	0,27	0,408	0,426	0,423	0,39	0,413	0,356	0,426	0,454	0,378	0,718
H	0,131	0,201	0,237	0,259	0,269	0,285	0,234	0,234	0,277	0,238	0,274	0,23

Placa espejo – Réplica 2												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,235	0,223	0,24	0,246	0,251	0,255	0,249	0,258	0,203	0,189	0,187	0,79
B	0,276	0,272	0,298	0,294	0,291	0,296	0,289	0,285	0,285	0,277	0,214	0,199
C	0,259	0,372	0,422	0,412	0,4	0,386	0,338	0,331	0,312	0,297	0,34	0,216
D	0,324	0,385	0,438	0,443	0,442	0,444	0,435	0,42	0,441	0,435	0,431	0,293
E	0,276	0,371	0,447	0,457	0,454	0,42	0,375	0,444	0,442	0,395	0,332	0,348
F	0,3	0,367	0,437	0,453	0,456	0,439	0,418	0,438	0,434	0,423	0,4	0,265
G	0,301	0,344	0,368	0,326	0,417	0,418	0,355	0,384	0,349	0,378	0,349	0,312
H	0,22	0,287	0,286	0,33	0,343	0,302	0,343	0,316	0,27	0,23	0,295	0,261

Placa inóculo – Réplica 2												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,339	1,472	1,63	0,572	0,523	0,589	0,506	0,438	0,45	0,443	0,881	1,1
B	0,492	0,51	0,514	0,504	0,516	0,51	0,497	0,49	0,501	0,558	0,469	1,016
C	0,486	0,516	0,513	0,511	0,514	0,504	0,492	0,503	0,53	0,495	0,435	0,383
D	0,462	0,487	0,513	0,523	0,488	0,516	0,539	0,497	0,5	0,495	0,436	0,445
E	0,399	0,466	0,462	0,509	0,477	0,472	0,468	0,449	0,473	0,492	0,466	0,472
F	0,253	0,393	0,417	0,412	0,392	0,399	0,402	0,396	0,431	0,451	0,382	0,47
G	0,203	0,26	0,282	0,282	0,254	0,285	0,271	0,275	0,241	0,224	0,211	0,244
H	0,208	0,183	0,167	0,196	0,207	0,19	0,19	0,208	0,176	0,145	0,142	0,177

Placa espejo – Réplica 3												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,303	0,337	0,368	0,366	0,353	0,315	0,294	0,304	0,318	0,31	1,355	2,187
B	0,279	0,384	0,383	0,333	0,325	0,304	0,289	0,282	0,297	0,307	0,363	0,75
C	0,347	0,357	0,391	0,344	0,311	0,291	0,288	0,297	0,305	0,309	0,375	0,573
D	0,358	0,389	0,323	0,33	0,299	0,296	0,292	0,293	0,308	0,304	0,356	0,375
E	0,342	0,34	0,345	0,315	0,308	0,298	0,287	0,295	0,289	0,265	0,452	1,137
F	0,344	0,329	0,325	0,31	0,3	0,331	0,309	0,279	0,312	0,292	0,318	0,379
G	0,324	0,311	0,312	0,322	0,325	0,328	0,32	0,303	0,3	0,316	0,359	0,331
H	0,332	0,319	0,312	0,292	0,307	0,305	0,293	0,302	0,297	0,284	0,37	0,303

Placa inóculo – Réplica 3												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,051	0,678	0,667	0,656	1,648	1,464	0,653	0,645	0,601	1,863	1,781	1,46
B	0,67	0,681	0,693	0,716	1,896	0,701	1,743	0,66	0,613	0,649	1,265	2,089
C	1,49	0,688	0,685	0,715	0,708	1,62	0,7	0,685	0,655	1,479	0,624	1,581
D	0,926	0,466	0,677	0,688	1,506	0,678	1,381	0,681	0,663	0,652	0,602	1,693
E	1,098	0,442	0,642	0,673	0,646	0,654	0,648	0,656	0,638	0,684	0,581	1,503
F	0,436	0,48	0,59	0,578	0,572	0,577	0,576	0,559	0,573	0,593	0,476	1,174
G	0,383	0,47	0,482	0,49	0,486	0,484	0,471	0,484	0,464	0,485	0,416	0,62
H	0,375	0,381	0,388	0,382	0,377	0,486	0,397	0,382	0,366	0,373	0,382	0,371

Anexo E

Absorbancias de las microplacas por el método del tablero de ajedrez para el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa)

Placa espejo – Réplica 1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,219	1,019	0,232	0,249	0,243	0,235	0,237	0,225	0,229	0,227	0,221	0,224
B	0,231	0,248	0,248	0,255	0,246	0,242	0,244	0,247	0,228	0,269	0,242	0,243
C	0,246	0,294	0,286	0,286	0,279	0,268	0,27	0,254	0,246	0,249	0,247	0,225
D	0,271	0,293	0,287	0,281	0,278	0,277	0,3	0,262	0,269	0,259	0,237	0,238
E	0,3	0,29	0,296	0,29	0,276	0,282	0,32	0,275	0,257	0,248	0,256	0,249
F	0,255	0,32	0,306	0,3	0,298	0,27	0,269	0,266	0,263	0,25	0,245	0,242
G	0,316	0,333	0,315	0,314	0,285	0,307	0,289	0,274	0,249	0,25	0,258	0,257
H	0,267	0,314	0,314	0,322	0,263	0,289	0,285	0,26	0,241	0,236	0,242	0,24

Placa inóculo – Réplica 1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,219	0,474	0,482	0,504	0,551	0,556	0,599	0,576	0,461	1,385	0,415	0,706
B	0,475	0,528	0,485	0,498	0,526	0,551	0,608	0,628	0,567	0,44	0,375	0,784
C	0,509	0,509	0,516	0,513	0,529	0,536	0,571	0,574	0,568	0,464	0,397	0,426
D	0,466	0,546	0,541	0,53	0,536	0,526	0,597	0,618	0,59	0,47	0,389	0,387
E	0,458	0,54	0,548	0,516	0,5	0,532	0,542	0,613	0,551	0,464	0,392	1,145
F	0,367	0,485	0,489	0,449	0,453	0,462	0,5	0,503	0,477	0,411	0,389	0,412
G	0,294	0,396	0,372	0,416	0,344	0,347	0,398	0,396	0,373	0,386	0,585	0,378
H	0,271	0,287	0,286	0,285	0,259	0,249	0,25	0,292	0,276	0,272	0,317	0,189

Placa espejo – Réplica 2												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,21	0,222	0,225	0,235	0,245	0,246	0,211	0,231	0,188	0,205	0,214	0,199
B	0,204	0,242	0,252	0,243	0,261	0,255	0,261	0,262	0,251	0,265	0,236	0,209
C	0,228	0,245	0,258	0,262	0,289	0,258	0,277	0,284	0,285	0,278	0,248	0,22
D	0,234	0,247	0,266	0,268	0,292	0,273	0,268	0,275	0,279	0,265	0,264	0,242
E	0,237	0,272	0,287	0,269	0,277	0,288	0,292	0,28	0,28	0,286	0,261	0,257
F	0,215	0,239	0,248	0,281	0,281	0,272	0,29	0,288	0,286	0,273	0,293	0,263
G	0,217	0,213	0,227	0,264	0,266	0,291	0,294	0,281	0,265	0,263	0,259	0,251
H	0,195	0,183	0,193	0,267	0,251	0,279	0,27	0,264	0,267	0,183	0,178	0,201

Placa inóculo – Réplica 2												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

A	1,085	1,589	1,435	1,421	1,453	1,557	1,423	1,563	0,346	0,302	0,286	0,401
B	0,398	0,466	0,456	0,55	0,486	0,509	0,514	0,506	0,469	0,42	0,35	0,674
C	1,623	0,476	0,517	0,524	0,535	0,519	0,526	0,51	0,499	1,4	0,344	0,862
D	1,34	0,456	0,496	0,541	0,494	0,535	0,521	0,536	0,489	0,419	0,34	0,297
E	0,329	0,446	0,453	0,467	0,471	0,465	1,028	1,34	0,478	0,409	0,304	0,297
F	0,164	0,32	0,382	0,392	0,394	0,403	0,4	0,389	0,357	0,373	0,324	0,288
G	0,136	0,169	0,197	0,225	0,252	0,241	0,266	0,254	0,255	0,299	0,294	0,26
H	0,144	0,12	0,133	0,146	0,153	0,131	0,153	0,121	0,116	0,177	0,157	0,165

Placa espejo – Réplica 3												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,197	0,23	0,277	0,315	0,328	0,319	0,305	0,26	0,294	0,289	0,281	0,282
B	0,211	0,227	0,272	0,335	0,329	0,338	0,361	0,371	0,308	0,297	0,299	0,271
C	0,202	0,244	0,262	0,301	0,296	0,339	0,335	0,353	0,341	0,319	0,294	0,279
D	0,212	0,237	0,253	0,266	0,284	0,295	0,302	0,299	0,336	0,317	0,288	0,249
E	0,222	0,238	0,255	0,291	0,255	0,269	0,276	0,273	0,272	0,294	0,285	0,268
F	0,227	0,241	0,251	0,267	0,27	0,253	0,257	0,279	0,276	0,268	0,27	0,273
G	0,221	0,242	0,257	0,264	0,291	0,284	0,28	0,324	0,291	0,278	0,296	0,261
H	0,213	0,232	0,234	0,259	0,244	0,269	0,264	0,284	0,241	0,24	0,259	0,237

Placa inóculo – Réplica 3												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,39	0,482	0,505	0,527	0,536	1,603	0,492	0,488	0,297	1,211	0,334	0,309
B	1,469	0,495	0,525	0,538	0,545	0,546	0,559	0,569	0,51	0,456	0,393	1,043
C	0,433	0,496	0,495	0,529	0,522	0,516	0,538	0,528	0,499	0,427	0,403	0,353
D	0,356	0,484	0,503	0,508	0,51	0,513	0,529	0,514	0,446	0,403	0,413	0,363
E	0,344	0,455	0,49	0,48	0,475	0,473	0,461	0,469	0,445	0,472	0,418	0,835
F	0,207	0,366	0,421	0,445	0,458	0,442	0,436	0,407	0,442	0,477	0,415	0,36
G	0,154	0,292	0,326	0,343	0,416	0,352	0,363	0,363	0,37	0,423	0,39	0,263
H	0,124	0,198	0,218	0,228	0,253	0,231	0,241	0,173	0,252	0,24	0,156	0,974