



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA  
SEDE QUITO  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIFÚNGICA DE 4-  
TERPINEOL,  $\beta$ -EUDESMOL, TIMOL, CITRAL Y DODECENAL, MOLÉCULAS  
PURAS DE ACEITES ESENCIALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:  
INGENIERAS EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTOR: MARÍA JOSÉ GUERRERO VÁSQUEZ**

**AUTOR: STEFANNY ALEJANDRA QUINTEROS ENDARA**

**TUTOR: PACO FERNANDO NORIEGA RIVERA**

**QUITO-Ecuador**

**2022**

## **CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Nosotros, María José Guerrero Vásquez con documento de identificación N° 1004471734 y Stefanny Alejandra Quinteros Endara con documento de identificación N° 1726598442; manifestamos que:

Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Quito, 04 de mayo del año 2022

Atentamente,

-----  
María José Guerrero Vásquez  
1004471734

-----  
Stefanny Alejandra Quinteros Endara  
1726598442

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE  
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotros, María José Guerrero Vásquez con documento de identificación No.1004471734 y Stefanny Alejandra Quinteros Endara con documento de identificación No.1726598442, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del Trabajo experimental: “Evaluación De La Actividad Antimicrobiana Y Antifúngica De 4-Terpineol,  $\beta$ -Eudesmol, Timol, Citral Y Dodecenal, Moléculas Puras De Aceites Esenciales”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingenieras en Biotecnología, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 04 de mayo del año 2022

Atentamente,

-----  
María José Guerrero Vásquez  
1004471734

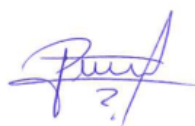
-----  
Stefanny Alejandra Quinteros Endara  
1726598442

## CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Paco Fernando Noriega Rivera con documento de identificación N° 0602421323 docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: Evaluación De La Actividad Antimicrobiana Y Antifúngica De 4-Terpineol,  $\beta$  - Eudesmol, Timol, Citral Y Dodecenal, Moléculas Puras De Aceites Esenciales, realizado por María José Guerrero Vásquez con documento de identificación N° 1004471734y por Stefanny Alejandra Quinteros Endara con documento de identificación N° 1726598442, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 04 de mayo del año 2022

Atentamente,



-----  
Paco Fernando Noriega Rivera

0602421323

## **Dedicatoria y agradecimiento**

Dedicamos esta tesis a nuestros padres, Isabel, Martha y Xavier, abuelos y familia en general que sin su apoyo nunca habríamos llegado a cumplir este sueño ni a tener las grandes oportunidades que vienen en camino, a nuestro tutor Paquito por siempre estar presente, por alentarnos a superarnos y que a pesar de las dificultades ha sabido enseñarnos a manejarlo de la mejor manera, a nuestros amigos Los Pochinos, Andre y Paulis y amigos más cercanos por alegrarnos cuando más lo necesitábamos, por ser quienes nos han dado una mano a lo largo de la carrera y creer en nosotras y por último agradecemos a nuestras mascotas Emma, Matilde, Filemon, Kira, Soledad, Nena, Pancho, Frijolito, Ramona y Meche por todo el apoyo emocional brindado en el hermoso proceso.

## Resumen

Muchos productos naturales han demostrado tener una muy interesante actividad antimicrobiana, destacándose entre estos a los aceites esenciales, que en dependencia del tipo de metabolitos presentes y de la concentración de los mismos han demostrado inhibir o anular en crecimiento de bacterias y hongos. Dentro de las biomoléculas presentes en los aceites esenciales existen algunas que por su elevada actividad se destacan entre las que se tiene a: trans-2-dodecenal, timol,  $\beta$ - eudesmol, citral y 4-terpineol.

La presente investigación determinó su capacidad bactericida en cepas Gram +, Gram- y en una levadura mediante la técnica de microplacas, obteniéndose valores de su concentración mínima inhibitoria (CMI) y de índice de inhibición al 50 %  $IC_{50}$ , adicionalmente como una comprobación se empleó el método de Kirby Bauer o discos de difusión.

Los resultados demuestran que todas las moléculas poseen valores CMI muy bajos, por debajo de los 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , lo que se traduce en una alta actividad antimicrobiana. Los mejores resultados se dieron sin embargo de la siguiente manera: para *S. aureus*, las moléculas Citral y Trans-2-dodecenal presentan alta actividad inhibitoria con CMI de 12,01 y 6,01  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e  $IC_{50}$  de 14 y 180  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente, para *E. coli*, la molécula Citral el CMI fue de 24,05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e  $IC_{50}$  de 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y para *C. albicans* las moléculas con más actividad fueron Trans-2-dodecenal con un CMI de 6,00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y  $\beta$ - eudesmol CMI con 21,81  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e  $IC_{50}$  de 90 y 140  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Estos resultados alentadores ponen en evidencia a este grupo de moléculas, como a los aceites esenciales que las contengan, como fuentes alternativas para posibles nuevos tratamientos en contra de infecciones antimicrobianas

**Palabras clave:** Actividad inhibitoria, CMI, metabolitos de aceites esenciales, resistencia antimicrobiana.

## Abstract

Many natural products have been shown to have a very interesting antimicrobial activity, among which essential oils stand out. Depending on the type of metabolites present and their concentration, they have been shown to inhibit or nullify the growth of bacteria and fungi. Among the biomolecules present in essential oils some stand out for their high activity: trans-2-dodecenal, thymol,  $\beta$ - eudesmol, citral, and 4-terpineol.

The present investigation determined their bactericidal capacity in Gram +, Gram- strains, and in yeast employing the microplate technique, obtaining values of their minimum inhibitory concentration (MIC) and inhibition index at 50 %  $IC_{50}$ , additionally, as check, the Kirby Bauer method or diffusion discs were used.

The results show that all the molecules have very low MIC values, below 200  $\mu\text{g/mL}$ , which translates into high antimicrobial activity. The best results were however as follows: for *S. aureus*, the Citral and Trans-2-dodecenal molecules show high inhibitory activity with MICs of 12,01 and 6,01  $\mu\text{g/mL}$  and  $IC_{50}$  of 14 and 180  $\mu\text{g /mL}$  respectively, for *E. coli*, the Citral molecule MIC was 24.05  $\mu\text{g/mL}$  and  $IC_{50}$  of 40  $\mu\text{g /mL}$  and for *C. albicans* the most active molecules were Trans-2-dodecenal with a MIC of 6.00  $\mu\text{g/mL}$  and  $\beta$ - eudesmol MIC with 21,81  $\mu\text{g/mL}$  and  $IC_{50}$  of 90 and 140  $\mu\text{g /mL}$ . These encouraging results highlight this group of molecules, as well as essential oils containing them, as alternative sources for possible new treatments against antimicrobial infections

**Keywords:** Inhibitory activity, MIC, essential oil metabolites, antimicrobial resistance.

## Índice de contenidos

1. Introducción .....	1
2. Fundamentación teórica.....	3
2.1 Actividad Antimicrobiana .....	3
2.2 Resistencia bacteriana.....	3
2.2.1 Mecanismos de resistencia .....	4
2.2.2 Problemas en la salud pública .....	4
2.3 Microorganismos en evaluación .....	5
2.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	5
2.3.2 <i>Escherichia coli</i> .....	6
2.3.3 <i>Candida albicans</i> .....	7
2.4 Propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales.....	8
2.5 Moléculas de aceites esenciales evaluadas.....	9
2.5.1 Citral .....	9
2.5.2 4-terpineol.....	12
2.5.3 $\beta$ -Eudesmol.....	15
2.5.4 Trans-2-dodecenal.....	16
2.5.5 Timol.....	17
2.6 Evaluación de la Actividad Antimicrobiana y Antifúngica .....	19
2.6.1 Método de Kirby Bauer .....	19
2.6.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) .....	20
3. Materiales y métodos.....	22
3.1 Moléculas .....	22
3.2 Actividad Antimicrobiana .....	22
3.2.1 Reactivación de cepas microbianas.....	22
3.2.2 Preparación de controles.....	23
3.3 Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) .....	23
3.4 Método de Kirby Bauer .....	27
3.5 Análisis estadístico .....	28
4. Resultados y Discusión.....	29
4.1 Evaluación de (CMI) .....	29
4.2 Discos de difusión.....	40



5. Conclusiones y recomendaciones .....	46
6. Referencias .....	47
7. Anexos .....	53

## Índice de tablas

Tabla 1. Condiciones de cultivo .....	23
Tabla 2. Parámetros para la concentración mínima inhibitoria de Citral, Trans-2-dodecenal y 4-terpineol en µg/mL .....	25
Tabla 3. Parámetros para la concentración mínima inhibitoria del Timol en µg/mL .....	25
Tabla 4. Parámetros para la concentración mínima inhibitoria del β-Eudesmol en µg/mL .....	26
Tabla 5. Porcentaje de inhibición y CMI de las moléculas a evaluar .....	29
Tabla 6. Valores de IC <sub>50</sub> de las 5 moléculas a evaluar .....	37
Tabla 7. Halos de inhibición de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 para la molécula Trans-2-dodecenal al 5 %; 2,5 %; 1,25 % y 0,625 % y control positivo (ampicilina) (Anexo 1) .....	40
Tabla 8. Halos de inhibición de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 para la molécula β-Eudesmol al 5 %; 2,5 %; 1,25 % y 0,625 % y control positivo (ampicilina) (Anexo 1) .....	40
Tabla 9. Halos de inhibición de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 para la molécula 4-Terpineol al 5 %; 2,5 %; 1,25 % y 0,625 % y control positivo (ampicilina) (Anexo 1) .....	41
Tabla 10. Halos de inhibición de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 para la molécula Timol al 5 %; 2,5 %; 1,25 % y 0,625 % y control positivo (ampicilina) (Anexo 1) .....	41
Tabla 11. Halos de inhibición de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 para la molécula Citral al 5 %; 2,5 %; 1,25 % y 0,625 % y control positivo (ampicilina) (Anexo 1) .....	41
Tabla 12. Halos de inhibición de <i>E. coli</i> ATCC 25922 para la molécula Trans-2-dodecenal al 5 %; 2,5 %; 1,25 % y 0,625 % y control positivo (ampicilina) (Anexo 2) .....	42
Tabla 13. Halos de inhibición de <i>E. coli</i> ATCC 25922 para la molécula β-Eudesmol al 5 %; 2,5 %; 1,25 % y 0,625 % y control positivo (ampicilina) (Anexo 2) .....	42
Tabla 14. Halos de inhibición de <i>E. coli</i> ATCC 25922 para la molécula 4-Terpineol al 5 %; 2,5 %; 1,25 % y 0,625 % y control positivo (ampicilina) (Anexo 2) .....	42

Tabla 16. Halos de inhibición de <i>E.coli</i> ATCC 25922 para la molécula Citral al 5 %; 2,5 %; 1,25 % y 0,625 % y control positivo (ampicilina) (Anexo 2) .....	43
Tabla 17. Halos de inhibición de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 para la molécula Trans-2-dodecenal al 5 %; 2,5 %; 1,25 % y 0,625 % y control positivo (ampicilina) (Anexo 3).....	44
Tabla 18. Halos de inhibición de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 para la molécula $\beta$ -Eudesmol al 5 %; 2,5 %; 1,25 % y 0,625 % y control positivo (ampicilina) (Anexo 3).....	44
Tabla 19. Halos de inhibición de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 para la molécula 4-Terpineol al 5 %; 2,5 %; 1,25 % y 0,625 % y control positivo (ampicilina) (Anexo 3).....	44
Tabla 20. Halos de inhibición de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 para la molécula Timol al 5 %; 2,5 %; 1,25 % y 0,625 % y control positivo (ampicilina) (Anexo 3).....	45
Tabla 21. Halos de inhibición de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 para la molécula Citral al 5 %; 2,5 %; 1,25 % y 0,625 % y control positivo (ampicilina) (Anexo 3).....	45

## Índice de figuras

Figura 1. Estructura molecular del citral. ....	9
Figura 2. Estructura molecular de 4-terpineol.....	12
Figura 3. Estructura molecular de $\beta$ -eudesmol.....	15
Figura 4. Estructura molecular de trans-2-dodecenal. ....	16
Figura 5. Estructura molecular del timol.....	17
Figura 6. Análisis estadístico de la concentración mínima inhibitoria de <i>S. aureus</i> vs las moléculas evaluadas.....	29
Figura 7. Análisis estadístico de la concentración mínima inhibitoria de <i>E.coli</i> vs las moléculas evaluadas.....	29
Figura 8. Análisis estadístico de la concentración mínima inhibitoria de <i>C.albicans</i> vs las moléculas evaluadas.....	30
Figura 9. Análisis estadístico IC <sub>50</sub> de <i>S. aureus</i> vs cada molécula evaluada.....	35
Figura 10. Análisis estadístico IC <sub>50</sub> de <i>E.coli</i> vs cada molécula evaluada.....	35
Figura 11. Análisis estadístico IC <sub>50</sub> de <i>C.albicans</i> vs cada molécula evaluada.....	36

## Índice de anexos

- Anexo 1. Antibiogramas de *S. aureus* con las 5 moléculas evaluadas. A. 4-terpeneol. B. Citral. C. Timol. D. B-eudesmol. E. trans-2-dodecenal .....**Error! Bookmark not defined.**
- Anexo 2. Antibiogramas de *E.coli* con las 5 moléculas evaluadas. A. 4-terpeneol. B. Citral. C. Timol. D. B-eudesmol. E. trans-2-dodecenal .....**Error! Bookmark not defined.**
- Anexo 3. Antibiogramas de *C. albicans* con las 5 moléculas evaluadas. A. 4-terpeneol. B. Citral. C. Timol. D. B-eudesmol. E. trans-2-dodecenal. ....**Error! Bookmark not defined.**
- Anexo 4. Placa de *S. aureus* incubada 24 horas, posteriormente añadido colorante TTC.  
.....**Error! Bookmark not defined.**
- Anexo 5. Placa de *E.coli* incubada 24 horas, posteriormente añadido colorante TTC.....**Error! Bookmark not defined.**
- Anexo 6. Placa de *C.albicans* incubada 24 horas, posteriormente añadido colorante TTC.  
.....**Error! Bookmark not defined.**

## 1. Introducción

Como se conoce en la actualidad, la resistencia a los medicamentos antimicrobianos representa una carrera contra el tiempo en el ámbito de la salud, ya que cada vez existen microorganismos sumamente patógenos resistentes a diferentes tipos de antibióticos de primera, segunda, tercera y cuarta generación, provocando dificultad al momento de plantear posibles tratamientos eficaces para los mismos, según el Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos y de su Uso (GLASS) se ha reportado actualmente una alta tasa de resistencia al ciprofloxacino, antibiótico utilizado para tratar infecciones urinarias, oscilando desde el 8,4 % al 92,9 % para *E. coli*, además para *S. aureus* se reportó una tasa media resistente a meticilina del 12,11 % y *E. coli* resistente a cefalosporinas de tercera generación con un 36 %, (OMS, 2020). Sin embargo, ancestralmente, los aceites esenciales han demostrado poseer propiedades naturales antimicrobianas efectivas para diversas aplicaciones como control del crecimiento, tanto para bacterias Gram positivas y Gram negativas así como para diversos hongos, varias moléculas presentes en aceites esenciales se destacan por su actividad antimicrobiana, tales como: 4-terpineol, timol, citral, Trans-2-dodecenoal y  $\beta$ -Eudesmol, en las cuales varios estudios han demostrado que los componentes activos provenientes de estos aceites podrían lograr interrumpir la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas y otras sustancias macromoleculares, afectando así el crecimiento bacteriano (Falcone et al., 2005) (Ghavam et al., 2020) (Huang et al., 2021) (Jambun et al., 2017) (Lu et al., 2017) (Memar et al., 2017) ¿Será posible aplicaciones futuras en el ámbito de la salud? Por tal motivo se ha decidido realizar un estudio acerca de la inhibición de estas moléculas en la Universidad Politécnica Salesiana, sede Girón, en los Laboratorios Ciencias de la Vida, con el fin de evaluar el potencial antimicrobiano y antifúngico de las moléculas puras estándar, 4-terpineol,  $\beta$ -Eudesmol, timol, citral o Trans-2-dodecenoal que son altamente activas, empleando dos metodologías, la concentración mínima

inhibitoria (CMI) y el método de Kirby Bauer como prueba confirmatoria, y evaluándolas en una bacteria Gram Negativa (*Escherichia coli*), una bacteria Gram Positiva (*Staphylococcus aureus*) y una levadura (*Candida Albicans*), comparando su actividad con el uso de herramientas estadísticas corroborando así la interesante actividad antimicrobiana poco estudiada que poseen las moléculas evaluadas en este estudio a bajas concentraciones.

## **2. Fundamentación teórica**

### **2.1 Actividad Antimicrobiana**

La actividad antimicrobiana se conoce como la capacidad que presenta cualquier sustancia que logre provocar una inhibición en el crecimiento de microorganismos y significativo a nivel de su población microbiana, ya sea solo inhibiendo su crecimiento, como eliminándolo por completo. Este tipo de actividad puede ser determinada mediante metodologías tanto cuantitativas como cualitativas *in vitro*. Para el caso de pruebas cuantitativas se puede considerar la Concentración Mínima Inhibitoria, también conocida como (CMI) así como la Concentración Bactericida Mínima (CBM), las cuales permitan hacer una comparación a diferentes compuestos a los que pueda ser expuesta una población bacteriana (Fica C., 2005)

Por otro lado, en el caso de pruebas cualitativas se puede tomar en cuenta el Método de Kirby Bauer o discos de difusión en la cual, mediante discos de papel empapados de sustancias que se hayan descubierto de ser inhibitorias para los microorganismos que se desee evaluar se podrá determinar de forma cualitativa el efecto de dichas sustancias mediante un halo de inhibición de crecimiento en la superficie del medio de cultivo previamente inoculado e incubado (Sánchez et al., 2016).

### **2.2 Resistencia bacteriana**

La resistencia bacteriana a antibióticos se produce cuando una bacteria o más son capaces de crecer y sobrevivir en presencia de uno o más antibióticos, cuando todo esto sucede, la o las bacterias resistentes continúan causando la infección, esta resistencia bacteriana a antibióticos pertenece a una resistencia de tipo específico a fármacos antimicrobianos, pero otros microorganismos como tales como hongos y virus también pueden ser resistentes a fármacos antimicrobianos (López et al., 2019). Las bacterias se vuelven resistentes a los antibióticos de distintas formas, pero la principal es por presión selectiva, esto se da cuando las bacterias no



son sensibles al antibiótico que se usará para tratar la infección, esto significa que las bacterias que sobrevivan pueden seguir multiplicándose, creando una población bacteriana, esta presión selectiva es un proceso lento pero que no se puede parar, por ende la sobreutilización de antibióticos ayuda a acelerar el proceso de selección de bacterias resistentes (López et al., 2019).

### **2.2.1 Mecanismos de resistencia**

Entre los mecanismos generales de resistencia bacteriana se tienen los siguientes: Modificación enzimática del antibiótico (beta-lactamasas, cloranfenicol acetil-transferasa), cambios en la permeabilidad a antibióticos por mutaciones en porinas (Mutación en porina D2 en *P. aeruginosa* “resistencia a carbapenems”), modificaciones en el sitio de ataque del antibiótico (Cambios de afinidad a la penicilina en las proteínas ligantes a penicilina “PBP”, modificaciones ribosomales “resistencia a aminoglucósidos”, resistencia a quinolonas por mutaciones en subunidades de girasa o proteínas protectoras del ADN girasa), mecanismos de eflujo (Bombas de eflujo para tetraciclina, cloranfenicol, quinolonas, beta-lactámicos, eritromicina y otros compuestos), transporte inefectivo (Deficiente captación de aminoglucósidos en anaerobios) (Fica, 2014).

### **2.2.2 Problemas en la salud pública**

Hoy en día el problema de resistencia bacteriana especialmente de las bacterias Gram Positivas y Gram Negativas como *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. faesium* que son los microorganismos más estudiados últimamente debido a importancia clínica y capacidad de resistencia, constituyen una gran amenaza para la salud en general, debido a que estos microorganismos presentan distintos tipos de mecanismos de acción, la mayoría de estos son comunes por su capacidad de diseminación (Lozano & Torres, 2017). Todos estos corresponden a diferentes sistemas enzimáticos de degradación o a diferentes modificaciones estructurales en su pared celular o en los distintos sitios blanco en el ADN o citoplasma (Fica, 2014).

Por lo tanto, la resistencia bacteriana es un fenómeno de tipo progresivo que está presente en innumerables bacterias y debido a su mecanismo de acción cada vez se imposibilita dar alternativas terapéuticas o tratamientos y estos tienen un costo muy elevado. Hasta el día de hoy las bacterias comunes presentan nuevos mecanismos de defensa ante distintos antimicrobianos, por lo cual se deben realizar más estudios para tratar de parar esta problemática (Pérez et al., 2007).

## **2.3 Microorganismos en evaluación**

### *2.3.1 Staphylococcus aureus*

*S. aureus* o también llamado Estafilococo dorado es una bacteria Gram Positiva perteneciente a la familia *Staphylococcaceae*, es inmóvil, tiene forma de coco y pueden aparecer en racimos, cadenas o en parejas (Camarena & Sánchez, 2009). Tiene un tamaño aproximado de 0,8 a 1,5 micras de diámetro y algunas de sus cepas pueden producir capas externas “mucoides” capaces de aumentar la capacidad para producir ciertos tipos de infecciones (Piñeros, 2015).

En cuanto a su metabolismo, esta es una bacteria anaerobia facultativa, oxidasa negativa, catalasa positiva y coagulasa positiva, muy capaz de metabolizar ADN (Piñeros, 2015). Su mecanismo de propagación y transmisión se da principalmente por el consumo de alimentos contaminados por este microorganismo, en el área laboral se da mediante transmisión por contacto directo con personas infectadas mediante mucosas o heridas o por inoculaciones accidentales con objetos cortopunzantes. También se puede transmitir de animales a humanos llamadas también enfermedades zoonóticas (Bush, 2019).

Hay que tomar en cuenta que *S. aureus* fue la primera bacteria en desarrollar resistencia a antibióticos (Lacueva, 2017). Posee un genoma aproximado de 2800Kb que pueden codificar tanto para resistencia a antibióticos y como para toxinas (Lacueva, 2017). Algunas cepas de esta bacteria han desarrollado cierto tipo de resistencia a antibióticos, en este caso *S. aureus* es

resistente a todos los antibióticos beta-lactámicos, dentro de ellos se encuentra la meticilina que es un tipo de penicilina por lo cual son conocidas como cepas SARM (*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina), causando problemas de resistencia que van en aumento día con día (Bush, 2019).

La bacteria *S. aureus* por lo general se encuentra de forma temporal en los adultos sanos un 30 % en la nariz y un 20 % en la piel, siendo este último porcentaje perteneciente a personas que trabajan en el área hospitalaria. En general las enfermedades asociadas a este estafilococo son: endocarditis, osteomielitis, neumonía, infecciones mamarias, infección del flujo sanguíneo, infecciones cutáneas, de las cuales todas estas deben tratarse con antibióticos y como se mencionó anteriormente el gran problema es la resistencia a los mismos (Huang et al., 2019).

### 2.3.2 *Escherichia coli*

*E. coli* es una bacteria Gram Negativa anaerobia facultativa no esporulante perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, es móvil debido a que posee flagelos peritricos (Rodríguez, 2002). Tiene un diámetro aproximado de 2 a 4 mm, por lo que la convierte en una de las bacterias Gram Negativas más grandes y de interés en su estudio (Kaur & Embi, 2009).

Esta bacteria es uno de los microorganismos con mayor información tanto a nivel fisiológico, bioquímico y genético (Ramírez et al., 2005). *E. coli* tiene la capacidad de fermentar lactosa y glucosa con producción de gas, a la vez que produce indol mediante triptófano y no usa el citrato como su fuente de carbono. Algo muy importante en esta bacteria es que está cubierta por tres elementos que son: membrana externa, membrana citoplasmática y un espacio periplásmico que está constituido por péptido-glicano, el cual le confiere la forma y rigidez a este microorganismo, lo que le permite de igual manera resistir presiones osmóticas ambientales demasiado altas, sin embargo esta bacteria es muy sensible a temperaturas de más de 70 °C (Garro et al., 2018). Como se mencionó anteriormente *E. coli* posee diversas facetas y

características, por lo que todos los estudios realizados antes mencionan que la capacidad de adaptación de la bacteria es poco común debido a que por la adquisición de nuevos genotipos y otros elementos que transmitan su material genético cambian con regularidad (Garro et al., 2018).

Como se sabe que estas bacterias pertenecen a las enterobacterias, poseen una alta resistencia hacia la ampicilina (beta-lactámico), tetraciclina, cloranfenicol, entre otras, lo que hace específicamente es interferir en las últimas fases de la síntesis de peptidoglicano haciendo que la formación de la pared bacteriana sea inexistente (Mosquito et al., 2011). La bacteria *E. coli* se sabe que normalmente se encuentra en el tracto gastrointestinal, por lo cual pueden causar enfermedades como: infecciones urinarias, infecciones entéricas, infecciones de próstata, meningitis en recién nacidos, infecciones del flujo sanguíneo, sin embargo con el pasar el tiempo ciertas cepas de esta enterobacteria han adquirido genes que causan infecciones intestinales, ya sean de tipo enterohemorrágicas, enterotoxigénicas, enteroagresivas, enteropatogénicas y enteroagregativas, la mayoría produciendo citotoxinas y neurotoxinas causando diarreas ya sea en niños y adultos de tipo grave y peligroso si no se tiene un tratamiento adecuado, pero como se sabe que tiene una gran resistencia a antibióticos, es difícil dar un tratamiento adecuado (Caldas, 2010).

### 2.3.3 *Candida albicans*

*C. albicans* es un hongo dimórfico tipo levadura con aspecto filamentosos de tipo aerobio, esto quiere decir que se va a desarrollar de manera distinta en función a la temperatura de crecimiento, pertenece al filo Ascomycota, por lo cual su reproducción es de manera asexual por germinación (Gudat et al., 1998). La forma de sus células es alargada y se diversifican de tal manera que toman el aspecto de filamentos y pseudo hifas, macroscópicamente estas crecen formando colonias ovaladas o redondas blandas, cremosas, lisas y blancas, con aproximadamente 3-8 por 2,7 micras de tamaño (Magariños, 2006).

Este microorganismo es de tipo patógeno y es muy estudiado debido a que es un hongo oportunista en el entorno de cualquier tipo de organismo vivo, puede modular el pH en el biofilm y tampoco es considerado como cariogénico, su genoma es altamente dinámico y por esta razón se estudia su variabilidad en distintos estudios moleculares y epidemiológicos (Quintana et al., 2017). En cuanto al metabolismo de esta levadura, posee una alta habilidad fermentativa y oxidativa, asimila el azúcar como su única fuente de carbono y asimila el nitrato de potasio como su única fuente de nitrógeno (Andrade, 2014).

*C. albicans* es resistente a una gran cantidad de fármacos, todo esto debido a la variedad de cambios genéticos que ha sufrido y de alteraciones enzimáticas que son esenciales para la síntesis de la pared celular (Quintana et al., 2017).

Se sabe que las infecciones producidas por *C. albicans* tienen una gran tasa de morbilidad y mortalidad, normalmente este hongo reside en las membranas mucosas de la cavidad vaginal y oral, así como también en el tracto gastrointestinal actuando como un hospedero sano, pero posee ciertas características intrínsecas que de cierta manera promueve su habilidad para producir enfermedades tales como: candidosis mucocutánea en personas con deficiencias fisiológicas de inmunidad celular, candidosis oral en niños, vulvovaginitis y otras infecciones micóticas que generalmente afectan a pacientes inmunosuprimidos debido a que *C. albicans* tiene la capacidad de competir con otros microorganismos por nutrientes ya que aprovecha que el cuerpo humano está bajo estrés y con defensas bajas para actuar (Panizo & Reviákina, 2005).

#### **2.4 Propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales**

Como se sabe los aceites esenciales poseen altas propiedades antimicrobianas debido a la acción combinada de varios compuestos y no solo a uno de ellos, en este caso se puede hablar de un 85 % del total de cada aceite esencial. Ahora, el otro 15 % representa una actividad antimicrobiana de tipo sinérgica, es decir, que la mezcla de sus principios activos mayoritarios

van a tener una mejor actividad por separado (Usano et al., 2014). Se ha podido determinar incluso que los aceites esenciales provenientes de canela, clavo de olor, tomillo, romero, entre otros donde su principal componente son los de naturaleza fenólica poseen una mayor actividad antimicrobiana como por ejemplo el timol (Zekaria, 2015). Aunque el mecanismo de acción de cada compuesto es incierto, se sabe que son mucho más activos contra bacterias Gram Positivas, debido a que son más permeables y sus membranas celulares actúan de mejor manera, es decir pueden ayudar a combatir diversos agentes infecciosos de plantas y ayudar en la resistencia de diversas enfermedades causadas con hongos y bacterias (Usano et al., 2014).

## 2.5 Moléculas de aceites esenciales evaluadas

### 2.5.1 Citral

Molécula pura “citral”

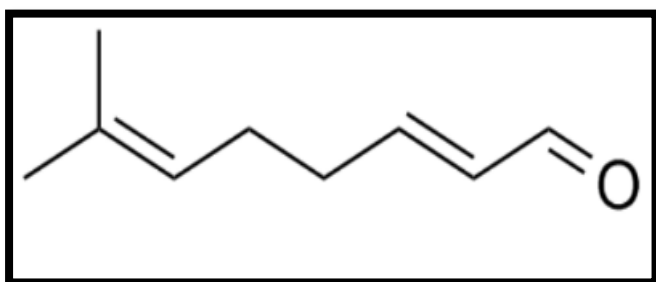


Figura 1. Estructura molecular del citral.

Fuente: (Restrepo et al., 2009).

El citral (3, 7-dimetil-2, 6-octadienal) es un aldehído monoterpenoide a menudo presente en forma de estereoisómeros genarinal y neral que se obtiene naturalmente de hierbas, plantas y frutas cítricas como limón, limón mirto, limoneros y naranjos (NCBI, 2021). El citral posee actividad antifúngica y propiedades bactericidas, insecticidas, desodorantes, expectorantes, estimulantes del apetito y espasmolíticas; tiene efectos diuréticos y antiinflamatorios débiles (Lu et al., 2017). En un estudio realizado en la Universidad Obafemi Awolowo ubicado en Nigeria, se evaluó la actividad antimicrobiana del citral con el uso de diferentes bacterias y

hongos, en el cual con una concentración mínima inhibitoria del mismo dio como resultado una actividad mucho más específica para bacterias Gram positivas (G. O. Onawunmi, 1989).

Sin embargo, el citral demuestra tener un mecanismo de acción predominante sobre la membrana de la célula fúngica ya que la alta lipofilia y volatilidad de esta molécula ayuda a que se adhiera fácilmente a la misma, por lo tanto, penetra con mayor facilidad y ejerce su efecto biológico, bloqueando la síntesis de la membrana celular, inhibiendo la germinación de esporas, evitando su proliferación y por lo tanto causando la muerte celular (C. Da Silva et al., 2008). En general el citral actúa como agente fungicida debido a que tiene la capacidad de formar un complejo de transferencia de carga con un donante de electrones del hongo a levadura, lo que va a resultar en la muerte fúngica (C. Da Silva et al., 2008).

En cuanto al mecanismo de acción del citral contra bacterias Gram Negativas se sabe que actúa directamente en la membrana citoplasmática y membranas externas de las bacterias, con la inhibición del crecimiento de las mismas y causando una inactivación, en el cual el ARN polimerasa es el principal responsable de la transcripción y el factor sigma el principal promotor, estos factores particulares están codificados por el gen *rpoS* (Gen codificante para proteínas regulatorias de transcripción bacteriana) en bacterias Gram Negativas particularmente por lo cual esto va a inducir a las células que están en crecimiento en la fase estacionaria causando la muerte de las mismas (Somolinos et al., 2010).

En un estudio realizado por la Universidad de Northwest A&F, Yangling, Shaanxi, China, en el centro conjunto de investigaciones de EE.UU, mencionan que el citral tiene una fuerte actividad antimicrobiana contra bacterias Gram Negativas, específicamente en cepas de *C. sakazakii*, ya que se ha visto que el citral es capaz de reducir considerablemente el ATP intracelular y como se sabe esta molécula de ATP es indispensable en distintas funciones de los organismos vivos, tanto en el crecimiento, replicación y supervivencia de los mismos, a la vez

que ayuda a almacenar y suministrar la energía metabólica, esto quiere decir que una reducción significativa del mismo va a aumentar la permeabilidad de la membrana o una mayor tasa de hidrólisis del ATP dentro de las células y esto puede conllevar a una fuga del ATP intracelular a través de las distintas células con alteraciones morfológicas de la membrana celular que se dieron a causa de la acción del citral, como se puede observar esta molécula pura posee un gran efecto antimicrobiano contra este tipo de microorganismos, no solo afectando directamente al ATP intracelular sino también en la reducción del pH citoplasmático y una hiperpolarización de la membrana celular (Shi et al., 2016).

El mecanismo de acción contra bacterias Gram Positivas es relativamente claro, ya que si se tiene una concentración baja del citral este va a afectar directamente a la actividad enzimática y a la producción de energía, pero si se tiene una alta concentración de citral este va a afectar directamente a la desnaturalización de proteínas, a la permeabilidad de la membrana citoplasmática y alterar la función de la misma causando deformaciones en su estructura permitiendo pérdidas de macromoléculas desde el interior de la célula (Somolinos et al., 2010). En un estudio realizado por la Universidad Politécnica de Cartagena menciona que en cepas de *L. monocytogenes* que es un bacilo Gram Positivo, hubo daños directos en la membrana externa de todas las células de este microorganismo debido a que el citral forma poros en las mismas dando un resultado en la pérdida de material celular, lo que resulta en la muerte celular de la bacteria, y para mejores resultados en bacterias Gram Positivas, si el citral es combinado con nisina que es una molécula que posee una actividad altamente antibacteriana y que es sintetizada de forma natural por la bacteria *L. lactis* (Cano et al., 2020) los resultados en cuanto al mecanismo de acción serían prometedores y con mejores resultados si se los usa a bajas concentraciones (Payan, 2014).



## 2.5.2 4-terpineol

Molécula pura de “4-terpineol”

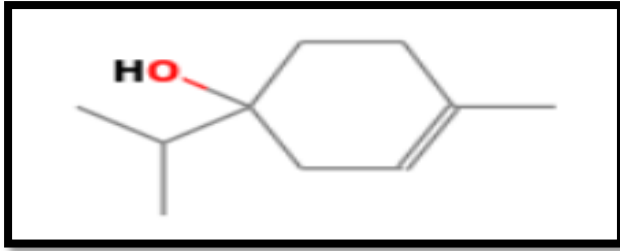


Figura 2. Estructura molecular de 4-terpineol

Fuente: (J. Huang et al., 2021).

El 4-terpineol es un terpineol y alcohol terciario monoterpénico monocíclico presente de forma natural en las especies vegetales, este lleva un sustituyente hidroxilo en la posición 4. Tiene un papel importante como metabolito vegetal, agente antibacteriano, siendo esta molécula la primera respuesta que se da cuando existen microorganismos, antioxidante, antiinflamatorio, antiparasitario, antineoplásico, e inductor de apoptosis y un componente oleoso volátil (NCBI, 2021). Diversos estudios han reportado que el 4-terpineol posee un gran efecto entre diversos organismos, tales como bacterias Gram positivas, Gram negativas, así como Levaduras, convirtiéndolo en un agente antimicrobiano de alto espectro (Huang et al., 2021).

Su mecanismo de acción en bacterias Gram positivas se lo puede caracterizar como bactericida, capaz de matar células bacterianas influyendo directamente en el acoplamiento molecular con la proteína modificada 2a (PBP2a) de unión a la Penicilina, una de las principales moléculas implicadas en atribuirle la resistencia a antibióticos, como target, esto debido a que 4-terpineol posee actividad transpeptidasa la cual permite la biosíntesis de la pared celular, para esto, el hidroxilo de 4-terpineol establece dos enlaces de hidrógeno con residuos de aminoácidos, por otro lado una vez en contacto con bacterias Gram positivas, establece también interacciones Van Der Waals y una interacción alquilo con residuos de aminoácidos; todas estas interacciones hacen posible que la molécula llegue a acoplarse efectivamente al sitio activo de la enzima PBP2a. Al acoplarse satisfactoriamente 4-terpineol con la enzima PBP2a esta provocará la inhibición de actividad de resistencia al fármaco y, al inhibirla, en combinación con los mismos,

la bacteria podrá ser atacada por sustancias antimicrobianas, tales como antibióticos, volviéndolas sensibles a estos y permeabilizando la membrana para el paso de los mismos (Cordeiro et al., 2020).

Por otro lado, en segundo plano en algunos casos puede actuar como una sustancia bacteriostática la cual inhibe o ralentiza el crecimiento celular, pero no causa la muerte, esto se evidencia en la formación de biofilm, ya que diversas investigaciones señalan que también evita el crecimiento de biofilm, a los cuales se les atribuye la resistencia antibiótica en casos con mayor virulencia (Cordeiro et al., 2020) reportan que el 4-terpineol posee un potencial agente antibiofilm, debido a su capacidad de prevenir la formación de los mismos que, incluso a concentraciones subóptimas puede llegar a actuar también sobre biofilms maduros ya establecidos por otras bacterias, sin embargo, todavía se necesitan más investigaciones que corroboren esta hipótesis.

Con respecto al mecanismo de acción de 4-terpineol en bacterias Gram negativas, no se conoce a ciencia cierta un mecanismo concreto, sin embargo, se lo ha relacionado directamente con el de la molécula  $\alpha$ -terpineol, familia de los terpineoles, atribuyéndoles actividades antimicrobianas isoméricas.

Al evaluar sus posibles características antibióticas en *E. Coli*, (Li et al., 2014) mencionan que, dependiendo a la concentración a la que sea expuesta la bacteria se afecte directamente su curva de crecimiento, haciéndola pasar por alto fases importantes y llevándolas directamente a la fase de muerte celular más rápidamente. De igual manera el tiempo juega un papel importante en la acción antimicrobiana, ya que, mientras más horas transcurran desde la inoculación de la molécula con el agente microbiano, la célula bacteriana será forzada a deformarse, tanto a nivel de pared celular, así como citoplasma, disminuyendo el tamaño de las células, condensando y periódicamente perdiendo el citoplasma, así como plasmólisis y vacuolización de la célula,

desplazando de igual manera el núcleo de la misma. Esto debido a que al igual que en bacterias Gram Positivas, al poseer propiedades lipofílicas, se le atribuye la capacidad de penetrar en la membrana plasmática, ocasionando alteraciones directamente en la estructura de la bacteria, así como en su metabolismo y provocando los daños celulares antes mencionados (Li et al., 2014). De igual manera, se necesitan más estudios para determinar a profundidad el mecanismo de 4-terpineol.

En cuanto a el mecanismo de acción de 4-terpineol en hongos, posee un amplio espectro para diversos patógenos causantes de candidiasis, faringitis, vaginitis y enfermedades del tracto respiratorio (Francisconi et al., 2020), para este caso, se utilizarán como referencia a las levaduras, a las cuales se les asocia de igual manera con la resistencia a los antimicrobianos, así como en la formación de biofilm en algunas especies pertenecientes a esta familia, causando infecciones muchas veces fatales para los seres vivos debido a su característica como oportunista (Francisconi et al., 2020).

El accionar de 4-terpineol en contra de este tipo de microorganismos se enfoca en provocar cambios a nivel de membrana, es decir, un cambio físico en la materia ocasionando un cambio en la dureza y haciendo que la membrana sea más líquida y así pueda ser abierta con facilidad, esto debido a que actúa sobre las enzimas incorporadas e inhibiéndolas, aumentando su fluidez y como consecuencia, la fuga de sus organelos intracelulares, causando de igual manera daños estructurales y funcionales y causándoles la muerte (Francisconi et al., 2020).

Por otro lado, diversas investigaciones mencionan que a nivel de inhibición de biofilm, el 4-terpineol podría controlar la proliferación de este en etapa *in vitro* irrumpiendo en la capa formada y volviéndola más líquida, característica vista en su accionar en hongos individuales, resultado de diversas interacciones moleculares y penetrando en las diferentes paredes celulares y en la matriz polimérica de la biopelícula (Francisconi et al., 2020).

### 2.5.3 $\beta$ -Eudesmol

Molécula pura de “ $\beta$ -eudesmol”

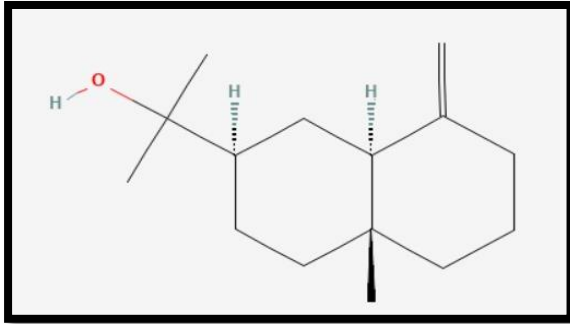


Figura 3. Estructura molecular de  $\beta$ -eudesmol.

Fuente: (Javidnia et al., 2010).

El  $\beta$ -Eudesmol es un compuesto carbocíclico, un alcohol terciario y un sesquiterpeno tipo eudesmano sustituido en las posiciones 2, 4a y 8 por grupos 2-hidroxipropan-2-ilo, metilo y metilideno, respectivamente (el diastereoisómero 2R, 4aR, 8aS) (NCBI, 2021). Se ha utilizado en la medicina tradicional principalmente por sus propiedades diuréticas, antihipertensivas, antipiréticas, antisépticas y antimicrobianas. En diversos estudios se ha demostrado que la mayoría de los aceites esenciales obtenidos de plantas vasculares son eficaces en el tratamiento de infecciones fúngicas y bacterianas, en este caso pertenecientes a la familia *Lamiaceae*, en el cual se detalla un porcentaje medianamente alto en el uso del  $\beta$ -Eudesmol extraído de las flores y hojas con un efecto inhibitorio y letal significativo específicamente en bacterias Gram positivas. A esto se le atribuye a los resultados reportados por (Alarjani & Skalicky, 2021) en donde, aceites esenciales compuestos por esta molécula lograron inhibir el crecimiento de diversas bacterias multirresistentes como *S. aureus* con un halo de inhibición de más de 15 mm.

Para el caso de bacterias Gram negativas, diversas investigaciones reportaron un efecto inhibitorio letal para las mismas (Ghavam et al., 2020), proveniente del aceite esencial de *T. macrophyllum*, utilizada en medicina ancestral, en la cual el  $\beta$ -Eudesmol es considerado el componente principal, ya que posee el 90 % del total del aceite esencial (Javidnia et al., 2010) esto debido a la actividad lipofílica proveniente del grupo hidroxilo de  $\beta$ -Eudesmol ya que

facilitan el relacionarse con la membrana celular bacteriana y así su entrada a la célula (Ghavam et al., 2020). De igual manera, al presentar un efecto antibiofilm en contra de consorcios bacterianos ya sea heterogéneo u homogéneo, se la considera una molécula de amplio espectro.

Para levaduras la actividad de  $\beta$ -Eudesmol es aún más impresionante ya que, visto en (Noriega et al., 2020) sus investigadores reportan en su ensayo de autobiografía una alta actividad antifúngica como antimicrobiana de esta molécula en bajas concentraciones de 500  $\mu\text{g/mL}$  posicionándolo como una posible molécula de amplio espectro. Sin embargo, aún se necesitan más estudios para poder determinar si esta molécula posee un alto grado de toxicidad (Ghavam et al., 2020).

#### 2.5.4 Trans-2-dodecenal

Molécula pura de “trans-2-dodecenal”

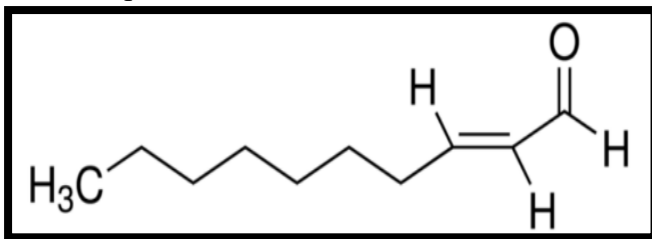


Figura 4. Estructura molecular de trans-2-dodecenal.

Fuente: (Matasyoh et al., 2009).

El trans-2-dodecenal, es un aldehído graso trans-2,3-insaturado que es (E) -dodec-2-eno en el que el grupo metilo alílico se ha oxidado al aldehído correspondiente (NCBI, 2021), se puede encontrar en diversas fuentes tales como culantro, diferentes tipos de jengibre provenientes de la familia *Zingiberaceae*, así como plantas provenientes de la familia *Apiaceae* (Erdem et al., 2015) y *Lamiaceae* (Ashraf et al., 2014) al igual que en varias especies de bacterias e incluso en insectos (Jambun et al., 2017). Diversos estudios han planteado una hipótesis en donde este compuesto ejerce su efecto letal de la rotura de la membrana, además de alteraciones en la permeabilidad de esta y consiguiente pérdida de control quimiosmótico (Yildiz, 2016) penetrando la célula e interactuando con diversos compuestos celulares tales como proteínas y

ácidos nucleicos, ya que al poseer una estructura de aldehído  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado puede actuar potencialmente como un agente alquilante, afectando así al crecimiento bacteriano especialmente en bacterias Gram positivas ya que al evaluar la molécula con diversas cepas bacterianas de este tipo se evidenció un resultado alentador en cuanto a su inhibición en las mismas con concentraciones mínimas inhibitorias menores a 10  $\mu\text{g/mL}$  (Kubo et al., 2004) sin embargo, diversos estudios reportan alta actividad antimicrobiana tanto para Gram negativas como diversos tipos de hongos (Erdem et al., 2015).

En el caso de bacterias Gram negativas y hongos, el mecanismo de acción sigue siendo el mismo, mostrando una gran actividad antibacteriana con radios de inhibición mayores a 15 mm y un CMI menor a 90  $\mu\text{g/mL}$  como lo reporta (Ashraf et al., 2014) en donde, al evaluarlo en *A. flavus*, *C. albicans*, *Nitrospira spp*, *E. coli*, entre otros, su actividad inhibitoria fue considerable, atribuyéndole el efecto a Trans-2-dodecenal.

La única variación posible que puede existir entre microorganismos es la susceptibilidad de los mismos vinculándola con la velocidad en el que la molécula llegue a penetrar la pared celular, así como las estructuras membranales de la célula (J. Matasyoh et al., 2009). Sin embargo, todavía se necesitan más estudios acerca del uso de trans-2-dodecenal purificado en Gram negativas, así como hongos.

### 2.5.5 Timol

Molécula pura de “timol”

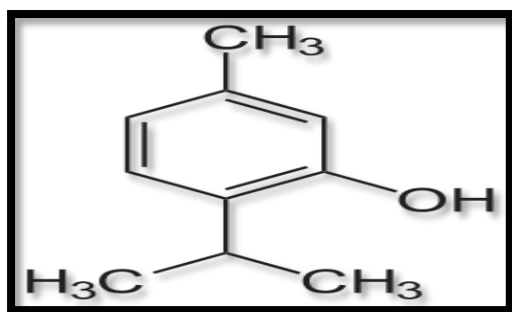


Figura 5. Estructura molecular del timol.  
Fuente: (Usano et al., 2014).

El timol, cuyo nombre químico es 2-isopropil-5-metilfenol, es uno de los compuestos fenólicos presentes en los aceites esenciales, es un monoterpeno natural e isómero del carvacrol que se extrae del tomillo y otros tipos de plantas (NCBI,2021). Es un ingrediente activo proveniente de la familia *Lamiaceae*, este componente posee efectos antibacterianos y antifúngicos, ya que puede inhibir el crecimiento de bacterias patógenas Gram positivas y Gram negativas; una característica de las moléculas con acción antibiótica es provocar daños en la pared celular de las bacterias (García & Palou, 2008).

El mecanismo de acción del timol ante las bacterias Gram Negativas y Gram Positivas actúa desintegrando la membrana externa de las mismas permitiendo la salida de lipopolisacáridos y de esta manera se incrementará la permeabilidad de la membrana citoplasmática (García & Palou, 2008). En algunos estudios realizados a bacterias como *S. thiphymurium* (Bacteria Gram Negativa) y *S. aureus* (Bacteria Gram Positiva), nos mencionan que este agente antimicrobiano tiene la capacidad de unir las proteínas hidrofóbicas de la membrana mediante puentes de hidrógeno, cambiando de esta manera la permeabilidad de las mismas. Todos los efectos inhibitorios del timol van en un valor de pH superior a 5,5 y si estos valores disminuyen este agente antimicrobiano no se disociaría, lo que significa que se logra unir de mejor manera las partes hidrofóbicas de las proteínas y se facilitará la disolución de la fase lipídica de la membrana (García & Palou, 2008).

Es muy importante señalar que el timol cambia la permeabilidad de las células microbianas, ya que permite que se filtren todos estos componentes químicos esenciales para el metabolismo, entre ellos están los iones, ácidos nucleicos, ATP y aminoácidos lo que provocará una disminución de la carga total de la célula, incrementando su efecto en la fase lag (Falcone et al., 2005).

Por otro lado, se han realizado estudios del mecanismo de acción del timol en hongos como *B. cereus* y *C.botulinum* y esta molécula es capaz de inhibir varios procesos en la transición de espora a célula y estos procesos son: germinación, crecimiento y multiplicación celular y comparando la concentración de timol que se requiere para hongos, esta debe ser baja, y en bacterias es mucho más alta, de esta manera se logra suprimir la multiplicación celular para inhibir todos estos procesos antes mencionados, todo esto a causa de la naturaleza hidrofóbica de las esporas (García & Palou, 2008).

Para entender de mejor manera a que concentraciones se debe trabajar con esta molécula, se hizo un estudio específico con *B. cereus*, donde nos indican que una concentración entre 20 y 250 ppm. El número de microorganismos en la fase estacionaria va a disminuir significativamente de manera lineal por lo que la lisis celular va a afectar los niveles de toxina, se liberarán las proteasas y se dará la degradación de las proteínas, pero si la concentración de timol es igual o mayor a 500 ppm no se va a observar ningún crecimiento, esto quiere decir que esta molécula a altas concentraciones no va a tener ningún efecto inhibitorio, por lo cual se debe emplear el mismo en concentraciones bajas (Falcone et al., 2005).

Es de gran importancia señalar que para que se den estos mecanismos de acción tanto de hongos y bacterias van a depender de diferentes factores como pH del medio, temperatura, sensibilidad de la molécula, tipo de microorganismos, entre otros. De esta manera se producirá el cambio en la permeabilidad de la membrana citoplasmática, se dará la salida del material intracelular y por lo tanto se provocará la muerte de los microorganismos (García & Palou, 2008).

## **2.6 Evaluación de la Actividad Antimicrobiana y Antifúngica**

### **2.6.1 Método de Kirby Bauer**

El método de Kirby Bauer o también conocido como Discos de difusión consiste en la determinación del nivel de resistencia o sensibilidad microbiana frente a un agente



preferiblemente polar que no polar (Choma & Grzelak, 2011) en este caso las cinco moléculas a evaluar, midiendo así el grado de actividad del mismo sobre microorganismos patógenos aeróbicos, así como anaeróbicos facultativos a testear con el fin de seleccionar el tratamiento más viable en el área médica (Hudzicki, 2012).

Para poder determinar el grado de difusión de dichas moléculas en el agar se debe considerar la solubilidad de este, el pH, la temperatura, así como la concentración y su profundidad dentro de la caja petri (Biemer, 1973).

Esta metodología determina un gradiente de difusión posterior a la progresión hacia la estabilidad que da sitio a una caída gradual de la concentración cerca del borde del disco creando una región de inhibición del aumento bacteriano (Biemer, 1973).

En donde los resultados que se arrojarán se expresarán como el halo medio de inhibición +/- desviación estándar, es necesario que todos los ensayos de las moléculas a evaluar se hagan el mismo día y a similares o mismas condiciones (Solarte, 2015).

### **2.6.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)**

La concentración mínima inhibitoria o CMI tiene la capacidad de poder determinar de una manera mucho más precisa la concentración de antibiótico que será necesaria para la inhibición del crecimiento del patógeno, con toda esta información se puede elegir de mejor manera que antibiótico es más eficaz contra dicho microorganismo (Argote, 2017). Es muy importante poder interpretar la sensibilidad de cada antibiótico, por lo cual los resultados se darán en  $\mu\text{g/mL}$  y cada uno puede indicar si es Muy Fuerte (MF), Fuerte (F), Moderada (M), Débil (D) o Ausente (A) (Argote, 2017).

En el caso de que la interpretación salga (MF o F), esto quiere decir que el crecimiento del microorganismo está siendo inhibido a una concentración del antibiótico de dosis habitual o normal, estos valores dependerán del fármaco que se vaya a usar. Si la interpretación es (A),

estamos hablando de que existe una resistencia del microorganismo y la concentración del antibiótico no es suficiente y por último si en la interpretación nos arroja una (M o D) quiere decir que existe una inhibición del microorganismo pero solo a dosis máximas recomendadas (Torrenega et al., 2017).

Algo muy importante a tomar en cuenta es que la concentración mínima inhibitoria no se puede determinar mientras los antibióticos a usar no estén disponibles comercialmente, cuando el fármaco previamente sometido a pruebas *in vitro* es ineficaz contra el microorganismo, en general si no existe una buena eficacia del antibiótico no se puede realizar la CMI (Melo et al., 2015).

Para escoger de mejor manera el antibiótico más efectivo es de suma importancia mencionar que para cada antibiótico existirá una menor dilución ensayada previamente y se expresará con el símbolo " $\leq$ ", y si en los resultados arroja una CMI " $\leq$ " con antibiótico (MF) con una CMI significa que efectivamente este fármaco es eficaz en su menor concentración y se elegirá para los futuros ensayos (IDEXX, 2018).

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1 Moléculas

Las moléculas puras a trabajar fueron adquiridas por la Universidad Politécnica Salesiana, de las cuales: Citral, 4-terpineol, trans-2-dodecenal,  $\beta$ -Eudesmol y Timol pertenecientes a la marca Sigma-Aldrich con una pureza de  $\geq 95$  % para los primeros tres compuestos, del  $\geq 90$  % para  $\beta$ -Eudesmol y del  $\geq 99$  % para Timol, todas estas con fechas de expiración de hasta el 07/01/2024, se preparó cada molécula a una concentración del 5 % diluido en DMSO (dimetilsulfóxido) con fecha de expiración de hasta 01/12/23, para emplearlas en los diferentes ensayos.

#### 3.2 Actividad Antimicrobiana

Se utilizaron dos métodos, el primer método consistió en el ensayo de micro dilución para la determinación de la concentración mínima inhibitoria de cada molécula, por otro lado, se necesitó un método confirmatorio para evaluar la veracidad de dicha actividad, por lo cual se determinó también mediante Antibiogramas, por medio de discos de difusión. Para estos ensayos se emplearon: Una bacteria Gram Positiva: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, una bacteria Gram Negativa: *Escherichia coli* ATCC 25922, y una levadura: *Candida albicans* ATCC 10231.

##### 3.2.1 Reactivación de cepas microbianas

A fin de obtener cepas viables tanto bacterianas como fúngicas, se realizó una activación de las mismas, las cuales se encontraban en criobank a una temperatura de  $-20$  °C. Para esto se utilizó la técnica de estriado simple en una caja Petri con previa hidratación para cada microorganismo, con las condiciones que se indican a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1.

Condiciones de cultivo

<b>CEPA</b>	<b>ATCC</b>	<b>Medio</b>	<b>Temperatura</b>
<i>S. aureus</i>	29213	Agar Müller-Hinton	36 °C
<i>E. coli</i>	25922	Agar Müller-Hinton	36 °C
<i>C. albicans</i>	10231	Agar Müller-Hinton	26 °C

Elaborado por: Las autoras, 2022.

### 3.2.2 Preparación de controles

Los controles positivos empleados para las diversas metodologías se rigieron de acuerdo al tipo de microorganismo a emplear. En el caso de las bacterias Gram Positivas como Gram Negativas se utilizó el antibiótico beta-lactámico de amplio espectro; ampicilina diluida en DMSO (dimetilsulfóxido) a una concentración de 40 % para una mejor actividad. Para la levadura se empleó el antimicótico (itraconazol) diluido en DMSO (dimetilsulfóxido) a una concentración del 1 %.

Como control negativo para el ensayo de microdilución se utilizó el medio de cultivo más el inóculo del microorganismo, y en el caso del método de Kirby Bauer se empleó DMSO (dimetilsulfóxido).

### 3.3 Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se realizó el inóculo de cada microorganismo a evaluar en tubos de ensayo de 10 mL con caldo Muller-Hinton posteriormente se incubaron los tubos de ensayo de 24-48 horas a 36 °C para bacterias y 26 °C para la levadura.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se procedió a diluir el inóculo en caldo Muller-Hinton para su posterior lectura en el espectrofotómetro UV mini-1240 marca Shimadzu para su estandarización se debe llegar a una absorbancia entre 0,08 a 0,12 equivalente a 108 UFC/mL

para bacterias y de 0,15 equivalente a 106 UFC/mL para la levadura, las longitudes de onda a medir fueron de 625 nm y 530 nm respectivamente.

### ***3.3.1 Inoculación en placas***

Se emplearon tres microplacas de 96 pocillos estériles, en donde fueron distribuidas las moléculas de la siguiente manera: Para las celdas 1-10 de la fila A se colocó 85 µL de caldo de cultivo Muller-Hinton más 15 µL de cada molécula por duplicado, es decir, A1-A2 4-terpineol, A3-A4 Trans-2-Dodecenal, A5-A6 Citral, A7-A8 β -Eudesmol y A9-A10 Timol; y en las celdas 1-10 a partir de la fila B hasta la H se colocó 50 µL de caldo de cultivo para empezar con el método de microdilución.

A continuación, mediante el uso de una micropipeta se procedió a diluir de manera descendente cada molécula con el fin de que cada celda quede con un volumen de 50 µL.

La columna 11 se destinó para el control positivo, con 35 µL de caldo de cultivo, 15µL del antibiótico (ampicilina) y la columna 12 para el control negativo con 50 µL de caldo de cultivo. Para terminar, se inoculó en toda la placa 15 µL del microorganismo a evaluar obteniendo un volumen final de 65 µL en cada celda.

Una vez terminado el ensayo se procederá a envolver en aluminio cada placa y se llevará a incubación dependiendo del microorganismo, para bacterias se utilizó la incubadora rotatoria TECNAL TE-420 a 40 rpm y 36 °C y una incubadora MEMMERT sin rotación para levaduras a 26 °C por 24 horas en ambos casos.

Transcurrido el tiempo de incubación se procederá a colocar 20 µL del colorante de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) preparado con 24 horas de antelación a una concentración del 8 %, se deberá incubar según los requerimientos de cada microorganismo previamente descritos durante 60 minutos.

Las microplacas fueron visualizadas en el equipo de lectura Microplate Reader Epoch Biotek, conjunto con el software Gen5 a una longitud de onda de 405 nm para la evaluación de las diferentes absorbancias.

### 3.3.2 Análisis de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Los resultados obtenidos fueron interpretados en  $\mu\text{g/mL}$  una vez que se haya agregado el colorante (TTC) en cada uno de los pocillos y se procedió a identificar los diferentes valores de concentración y efectividad de las moléculas mediante los parámetros de las Tablas 2, 3, y 4, empezando con una concentración del 5 %.

Tabla 2.

Parámetros para la concentración mínima inhibitoria de Citral, Trans-2-dodecenal y 4-terpineol en  $\mu\text{g/mL}$

<b>CMI</b>	<b>Código</b>	<b><math>\mu\text{g/mL}</math></b>
<b>Muy Fuerte</b>	MF	$\text{CMI} < 192$
<b>Fuerte</b>	F	$\text{CMI} \geq 192$
<b>Moderada</b>	M	$192 > \text{CMI} < 1920$
<b>Débil</b>	D	$1920 > \text{CMI} < 7680$
<b>Ausente</b>	A	$\text{CMI} > 7680$

Elaborado por: Las autoras, 2022.

Tabla 3.

Parámetros para la concentración mínima inhibitoria del Timol en  $\mu\text{g/mL}$

<b>CMI</b>	<b>Código</b>	<b><math>\mu\text{g/mL}</math></b>
<b>Muy Fuerte</b>	MF	$\text{CMI} < 178$
<b>Fuerte</b>	F	$\text{CMI} \geq 178$
<b>Moderada</b>	M	$178 > \text{CMI} < 1780$

<b>Débil</b>	D	1780 > CMI < 7120
<b>Ausente</b>	A	CMI > 7120

Elaborado por: Las autoras, 2022.

Tabla 4.

Parámetros para la concentración mínima inhibitoria del  $\beta$ -Eudesmol en  $\mu\text{g/mL}$

<b>CMI</b>	<b>Código</b>	<b><math>\mu\text{g/mL}</math></b>
<b>Muy Fuerte</b>	MF	CMI < 174
<b>Fuerte</b>	F	CMI $\geq$ 174
<b>Moderada</b>	M	174 > CMI < 1740
<b>Débil</b>	D	1740 > CMI < 6960
<b>Ausente</b>	A	CMI > 6960

Elaborado por: Las autoras, 2022.

Una vez obtenidos estos valores se deberá aplicar la fórmula del porcentaje de inhibición con las absorbancias obtenidas de las moléculas evaluadas en los distintos microorganismos para posteriormente determinar su  $\text{IC}_{50}$  despejando la ecuación de la recta.

La fórmula empleada para obtener el porcentaje de inhibición es la siguiente:

$$\% \text{Inhibición} = \frac{\text{absorbancia del medio y bacteria} - \text{absorbancia de la muestra}}{\text{absorbancia del medio y bacteria}} \times 100$$

Una vez determinados los porcentajes de inhibición se procederá a realizar una regresión lineal conjunto con los valores obtenidos de las concentraciones previamente calculadas, reemplazando en la ecuación de la recta el valor de  $y=50$  para la obtención del  $\text{IC}_{50}$  respectivo para cada molécula.

### **3.4 Método de Kirby Bauer**

Inicialmente se preparó el inóculo de cada microorganismo a evaluar en tubos de ensayo de 10 mL con caldo Müller-Hinton, posteriormente se incubaron los tubos de ensayo de 24-48 horas a 36 °C para bacterias y 26 °C para la levadura.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se procedió a centrifugar los tubos de ensayo durante 20 minutos a 3500 rpm. Una vez obtenido el pelet, se desechó el líquido restante para luego diluir el inóculo en suero fisiológico estéril para su posterior lectura en el espectrofotómetro UV mini-1240 marca Shimadzu, su estandarización debe llegar a una absorbancia entre 0,08 a 0,12 equivalente a  $10^8$  UFC/mL para bacterias y de 0,15 equivalente a  $10^6$  UFC/mL para la levadura, las longitudes de onda a medir fueron de 625 nm y 530 nm respectivamente.

Previamente se debe preparar 15 cajas Petri de 15 cm de diámetro con medio de cultivo Müller-Hinton estéril dispensado y listo para siembra (para cada microorganismo).

Una vez estandarizado el inóculo se procedió a sembrar el microorganismo en las cajas Petri por triplicado para cada molécula, cada caja debe constar con 6 discos colocando un volumen total de 20  $\mu$ L en cada disco, de los cuales dos serán destinados a los controles tanto positivo (ampicilina para bacterias e itraconazol para levaduras) como negativo (DMSO), y los 4 restantes a cada molécula con una variación en la concentración de 5 %; 2,5 %; 1,25 % y 0,625 % respectivamente, se procederá a diluir con DMSO a partir de la concentración 2,5 % hasta llegar a la concentración de 0,625 %.

Para finalizar, se deberán incubar las cajas Petri, previamente selladas con parafilm, por 24 horas a 36 °C para bacterias y por 72 horas a 26 °C para la levadura.

Visualizar resultados, posterior al tiempo de incubación establecido, midiendo cada halo de inhibición con el calibrador o pie de rey.



### **3.5 Análisis estadístico**

Con los diferentes resultados obtenidos de las moléculas evaluadas en la técnica de determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) se analizaron en el programa estadístico Infostat 2020, y posteriormente la obtención de un gráfico de perfil multivariado.

## 4. Resultados y Discusión

### 4.1 Evaluación de (CMI)

Tabla 5.

Porcentaje de inhibición y CMI de las moléculas evaluadas

Microorganismo	Trans-2-dodecenal			$\beta$ -Eudesmol			4-Terpineol			Timol			Citral		
	CMI (ug/mL)	% Inh	Cod	CMI (ug/mL)	% Inh	Cod	CMI (ug/mL)	% Inh	Cod	CMI (ug/mL)	% Inh	Cod	CMI (ug/mL)	% Inh	Cod
<i>S. aureus</i>	12,01	79,51	M F	43,62	80,21	M F	24,06	80,56	M F	22,27	79,93	M F	6,01	80,91	M F
<i>E. coli</i>	96,13	80,97	M F	174,47	80,58	M	96,24	91,75	M F	89,07	90,39	M F	24,05	91,17	M F
<i>C. albicans</i>	6,00	19,66	M F	21,81	13,43	M F	24,06	14,23	M F	22,27	34,96	M F	24,05	86,30	M F

Elaborado por: Las autoras, 2022.

CMI de *S. aureus* vs cada molécula evaluada

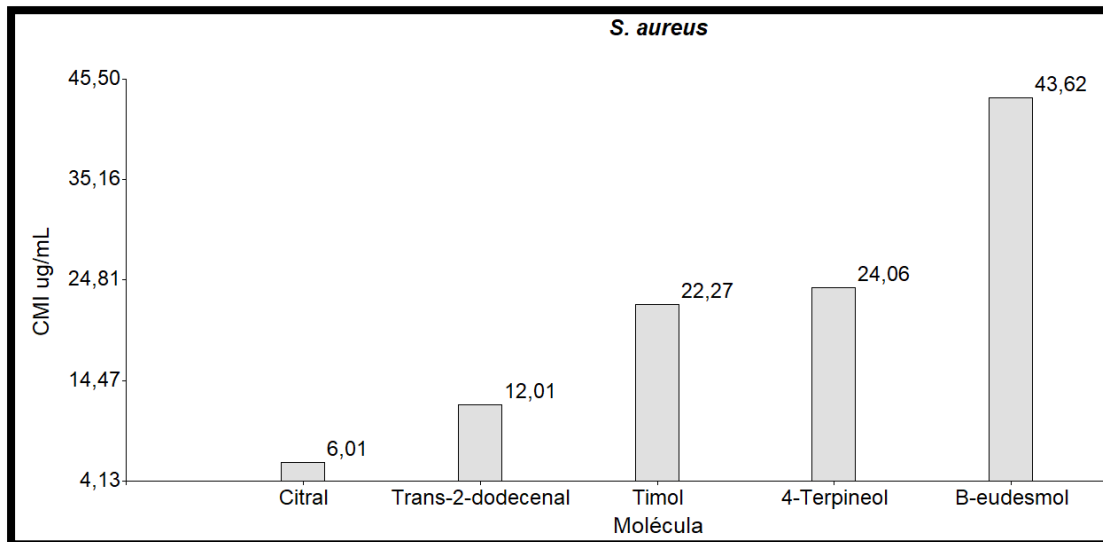


Figura 6. Análisis estadístico de la concentración mínima inhibitoria de *S. aureus* vs las moléculas evaluadas.

Elaborado por: Las autoras, 2022.

CMI de *E. coli* vs cada molécula evaluada

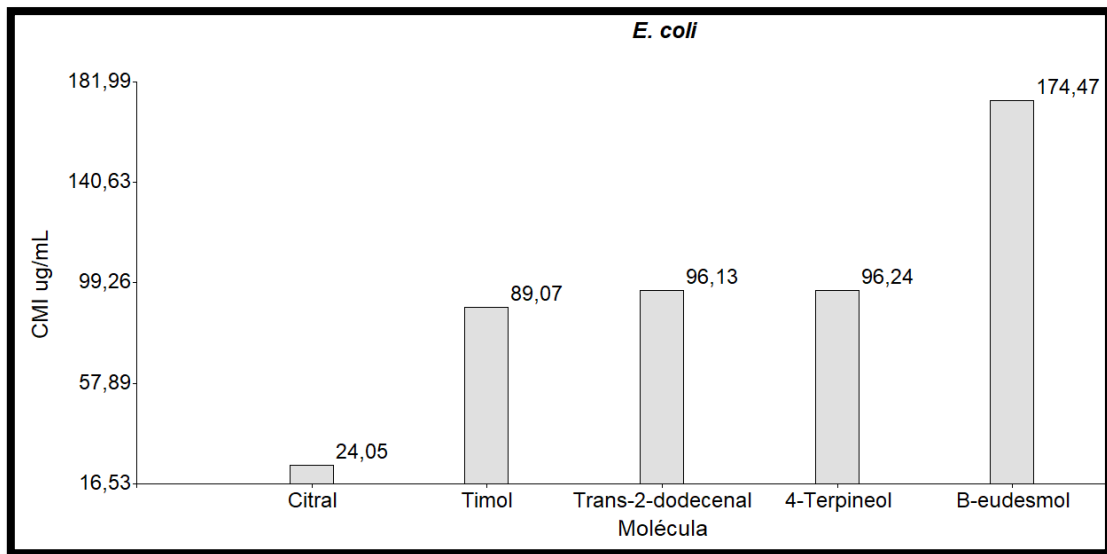


Figura 7. Análisis estadístico de la concentración mínima inhibitoria de *E. coli* vs las moléculas evaluadas. Elaborado por: Las autoras, 2022.

CMI de *C. albicans* vs cada molécula evaluada

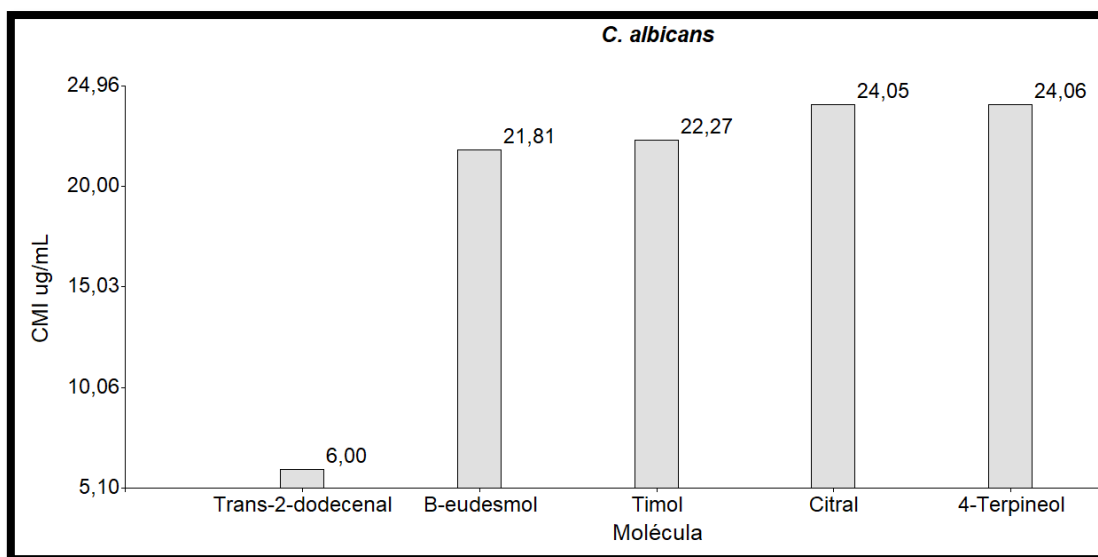


Figura 8. Análisis estadístico de la concentración mínima inhibitoria de *C. albicans* vs las moléculas evaluadas. Elaborado por: Las autoras, 2022.

### *Trans-2-dodecenal*

Como se puede observar en los resultados, los valores arrojados por el CMI se muestran favorables para los tres microorganismos, en primera instancia con la molécula *Trans-2-dodecenal* partiendo de una concentración de 192,26  $\mu\text{g/mL}$  se pudo evidenciar una CMI significativa de 12,01  $\mu\text{g/mL}$  para *S. aureus*, comparando con estudios realizados por (Jambun et al., 2017) en donde la concentración inicial utilizada fue de 4000  $\mu\text{g/mL}$  obteniendo un CMI de 8  $\mu\text{g/mL}$ , se puede deducir que la concentración usada en este estudio es mucho más baja que la empleada por estos autores, variando tan solo en 4  $\mu\text{g/mL}$  por lo cual se puede corroborar que existe una alta efectividad antimicrobiana de esta molécula a concentraciones bajo el 5% y ubicándola así en el mismo nivel de actividad que la molécula citral como lo evidenciado en la Figura 9.

Al contrario de los resultados encontrados por (Foudah et al., 2021) (Jambun et al., 2017) en donde no existió una actividad inhibitoria por parte de esta molécula, en este estudio si se pudo observar una gran actividad antimicrobiana para *E.coli* como la evidenciada en la Tabla 5 y Figura 7. Que, si bien su CMI es mayor que el encontrado para *S. aureus* sigue siendo significativo con un valor de 96,13  $\mu\text{g/mL}$  comprobando su efectividad a concentraciones menores de 200  $\mu\text{g/mL}$ .

Por otro lado para *C. albicans* se pudo determinar un valor menor del reportado por (Foudah et al., 2021) en donde se observa un CMI de 12,5  $\mu\text{g/mL}$  a concentraciones por debajo del 4 %, lo que quiere decir que haciendo una comparación directamente proporcional con la encontrada en este estudio, se corrobora la actividad inhibitoria de *Trans-2-dodecenal*, pese a que la mayor concentración fue de 5 %, la CMI obtenida fue de 6,00  $\mu\text{g/mL}$  lo cual se debe a que en este caso se utilizó una molécula pura y en el realizado por los otros autores se evaluó partes de hojas de *Coriandrum sativum L.* que al no ser una sustancia tan pura como la evaluada en esta

investigación, la concentración de CMI no es tan apreciable, sin embargo al realizar un análisis estadístico multivariado, se destaca el hecho de que posee una fuerte actividad siendo esta molécula la que mejor actúa frente a levaduras como lo evidenciado en la Figura 11.

### $\beta$ -Eudesmol

Al contrario con los resultados reportados por (Noriega et al., 2020) los valores mínimos de inhibición encontrados oscilaban entre 200-100  $\mu\text{g/mL}$  siendo considerados a estas concentraciones como compuestos sumamente fuertes, ya que según los autores se dice que todos los valores por debajo de 500  $\mu\text{g/mL}$  poseían una gran actividad inhibitoria, sin embargo el valor arrojado para *C. albicans* con 21,81  $\mu\text{g/mL}$  demuestra que al ser una molécula pura a concentraciones menores a los 50  $\mu\text{g/mL}$  se posee una actividad inhibitoria sumamente alta para levaduras.

Los resultados reportados en la Tabla 5. Junto con el análisis multivariado encontrado en la Figura 9. Demuestran que la CMI obtenida para *S. aureus* representa valores significativos en contraste a los descritos en la investigación de (Alarjani & Skalicky, 2021) los cuales forman una escala de acuerdo al nivel de concentración, siendo 500  $\mu\text{g/mL}$  moderada y mayor de 50  $\mu\text{g/mL}$  fuerte, por lo tanto haciendo una comparación con los descritos en este estudio se puede corroborar que el valor encontrado de CMI para  $\beta$ -Eudesmol 43,62  $\mu\text{g/mL}$  representa una alta actividad antibacteriana para bacterias Gram Positivas estando por debajo de la concentración promedio en la escala previamente mencionada.

Por otro lado, para *E. coli* el valor reportado en este estudio de igual manera presenta una alta capacidad de inhibición como se puede observar en la Figura 10. ya que, comparando con los estudios realizados por (Ghavam et al., 2020) en donde la concentración mínima inhibitoria obtenida fue sumamente alta para  $\beta$ -Eudesmol con 1000  $\mu\text{g/mL}$  partiendo con una concentración de 2000  $\mu\text{g/mL}$ , es más del triple que lo reportado en este estudio por lo cual se

confirma su alta actividad, que si bien está por encima de las concentraciones vistas para *S. aureus* y *C. albicans* sigue siendo significativa.

#### *4-Terpineol*

Haciendo una comparación entre el CMI encontrado en *E. coli* para 4-terpineol 96,24 µg/mL en este estudio (Ver Figura 7.), con el reportado por (de Souza et al., 2020) de aproximadamente 1810 µg/mL se constata el éxito en esta investigación, ya que, al contrario por el encontrado por estos autores, el valor obtenido en esta investigación está por debajo de los 1000 µg/mL que si bien no difiere mucho para llegar al mismo, sigue siendo significativo para corroborar una fuerte actividad antimicrobiana para bacterias Gram Negativas a concentraciones sumamente bajas.

Con respecto a las especies *S. aureus* y *C. albicans* el CMI obtenido para ambos casos fue de 24,06 µg/mL lo cual determina una fuerte actividad antimicrobiana de 4-terpineol a concentraciones por debajo de los 100 µg/mL como se evidencia en las Figuras 7. Y 9. que, al contrario con los reportados por (Kotan et al., 2007) (Abdallah et al., 2020) (Tonon et al., 2018) (Francisconi et al., 2020) en donde sus concentraciones inhibitorias mínimas oscilaban entre 390-1560 ug/mL para *S. aureus* y de 2000 a 4000 ug/mL para *C. albicans*, esto puede relacionarse con el hecho de que si bien en los diversos estudios el porcentaje de 4-terpineol se presentaba como componente mayoritario, la molécula evaluada no se encontraba purificada, lo que puede inferir en el valor del CMI significativamente.

#### *Timol*

Para los autores (Kot et al., 2019) el CMI encontrado para *S.aureus* osciló entre los 190 a 390 µg/mL al evaluarlo en el aceite esencial de *Thymus vulgaris*, el cual posee un porcentaje mayor del 60% de la molécula timol, que al compararlo con el valor de 22,27 µg/mL obtenido en esta investigación (Ver Figura 7.) se confirma que a concentraciones por debajo de 50 µg/mL

todavía existe una alta actividad antimicrobiana, corroborando la alta capacidad inhibitoria de esta molécula evaluada. De igual manera los datos obtenidos para *C.albicans* fueron de 22,27 µg/mL lo que al comparar con (Braga et al., 2007) (Braga et al., 2007) demuestran que en concentraciones mínimas de 125 µg/mL aún actúa sobre las células de esta levadura, esta gran actividad puede deberse al mecanismo de acción del timol ya que como lo reportado por los autores, al exponerlo con esta molécula se produjeron cambios drásticos en la morfología de la misma.

Por otro lado *E. coli* obtuvo un CMI de 89,07 µg/mL como se puede observar en la Figura 8. que si bien es casi el triple de los encontrados en *S. aureus* y *C. albicans* todavía sigue siendo significativo ya que al relacionarlo con lo reportado por (Santurio et al., 2014) con un CMI de 2786 µg/mL se puede deducir que para bacterias Gram Negativas la molécula de timol sigue siendo efectiva a concentraciones por debajo de los 100 µg/mL, confirmando una vez más el amplio espectro que posee para varios agentes microbianos.

### *Citral*

Como se conoce, la molécula Citral posee una alta actividad antimicrobiana, tanto para bacterias como hongos (Onawunmi, 1989), según (Oliveira et al., 2021) las concentraciones que poseen alta actividad antibacteriana para *S. aureus* fluctuaron entre 500 µg/mL a 4000 µg/mL, siendo 2500 µg/mL la más óptima, sin embargo, al compararlas con las reportadas en esta investigación con 6,01 µg/mL y trabajada a una concentración del 5 %, se deduce que a concentraciones menores de 10µg/mL la molécula evaluada posee alta actividad inhibitoria para bacterias Gram Positivas como lo evidenciado en las Figuras 7. y 10. de igual manera, en el caso de *E.coli* y *C. albicans* el CMI obtenido está por debajo de los 50 µg/mL siendo seis veces menor al reportado por los autores (Shi et al., 2016)(Da Silva et al., 2008) con valores entre 270 y 540 µg/mL al 1 % para ambos casos, haciendo una relación directa entre las concentraciones

empleadas en este estudio y las reportadas por los diversos autores se puede corroborar la actividad inhibitoria de Citral, ya que en este caso las concentraciones obtenidas en ambos casos concuerdan con el porcentaje evaluado del 5 % y 1 % respectivamente, sin embargo, si bien, siguen siendo significativos y relativamente equivalentes, la concentración inhibitoria de dichas investigaciones sigue sobrepasando los 50 µg/mL.

#### Perfil multivariado de las moléculas evaluadas en *S. aureus*

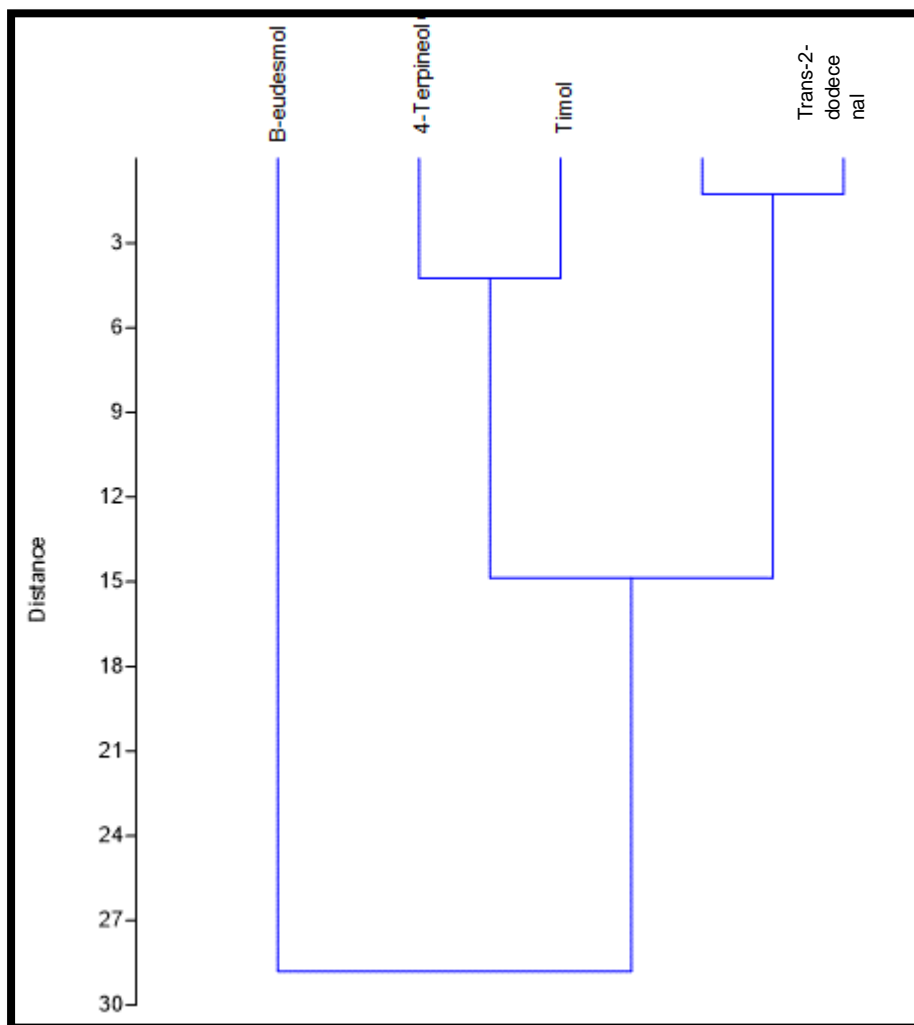


Figura 10. Análisis multivariado de la concentración mínima inhibitoria de *S. aureus* vs las moléculas evaluadas.

Elaborado por: Las autoras, 2022.



Perfil multivariado de las moléculas evaluadas en *E.coli*

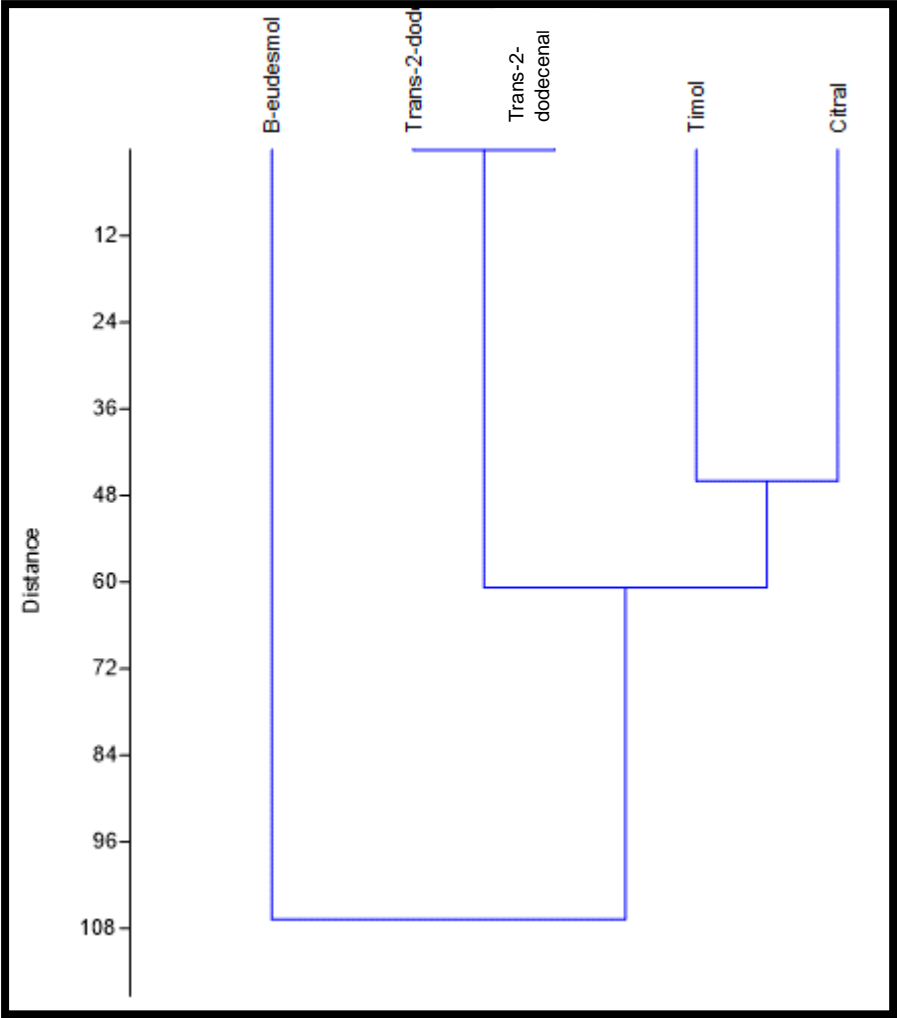


Figura 11. Análisis multivariado de la concentración mínima inhibitoria de *E. coli* vs las moléculas evaluadas.

Elaborado por: Las autoras, 2022.

Perfil multivariado de las moléculas evaluadas en *C.albicans*

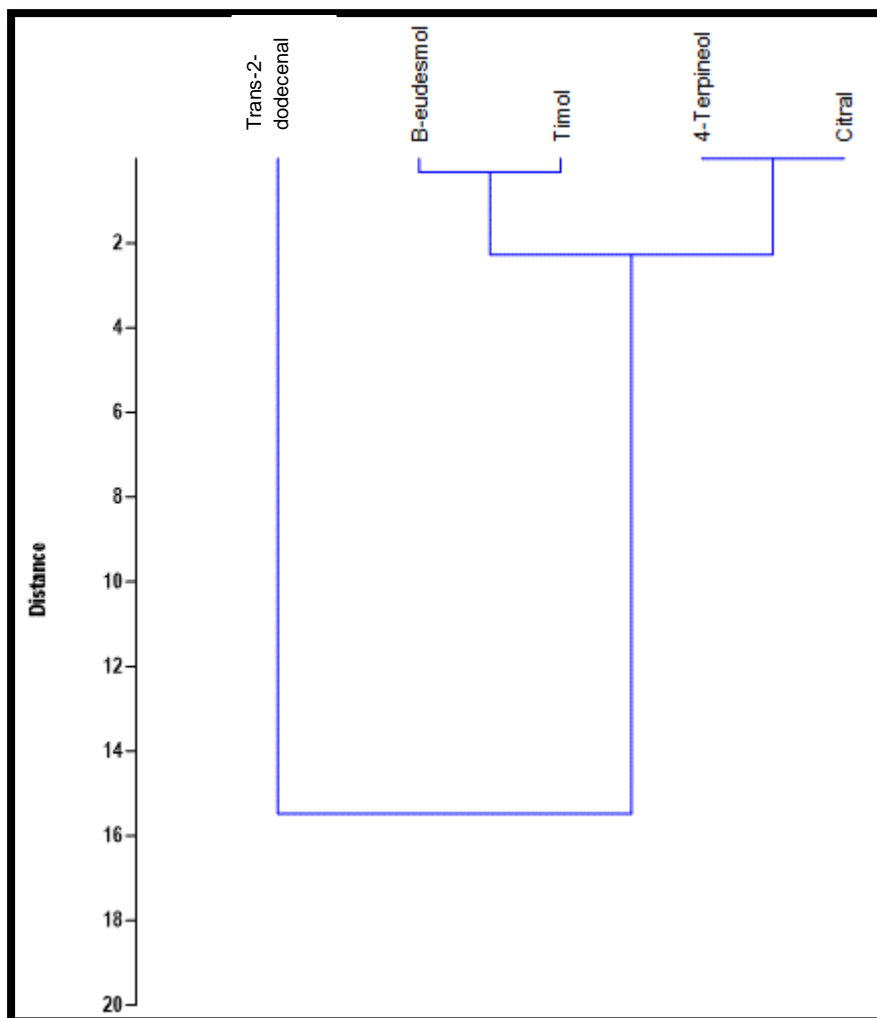


Figura 12. Análisis multivariado de la concentración mínima inhibitoria de *C. albicans* vs las moléculas evaluadas.

Elaborado por: Las autoras, 2022.

**IC<sub>50</sub>**

Tabla 6.

Valores de IC<sub>50</sub> de las 5 moléculas evaluadas en mg/mL

Microorganismo	Trans-2-dodecenal	β - Eudesmol	4-terpineol	Timol	Citral
<i>S. aureus</i>	0,18	0,193	0,009	0,11	0,014
<i>E. coli</i>	0,071	0,06	0,08	0,08	0,04
<i>C. albicans</i>	0,09	0,14	0,10	0,10	0,11

Elaborado por: Las autoras, 2022.

IC<sub>50</sub> vs cada molécula evaluada

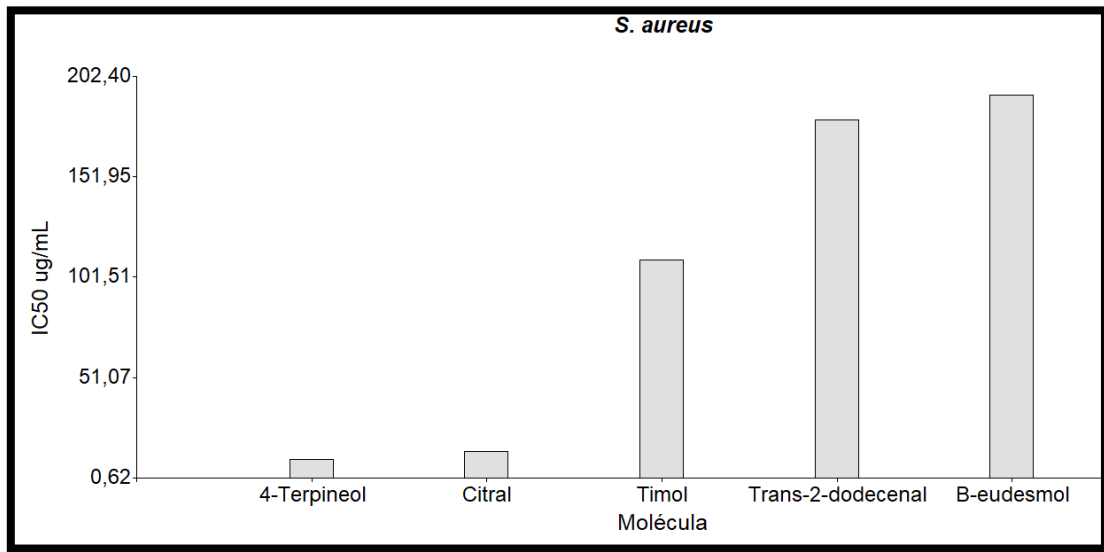


Figura 12. Análisis estadístico IC<sub>50</sub> de *S. aureus* vs cada molécula evaluada.  
Elaborado por: Las autoras, 2022.

IC<sub>50</sub> vs cada molécula evaluada

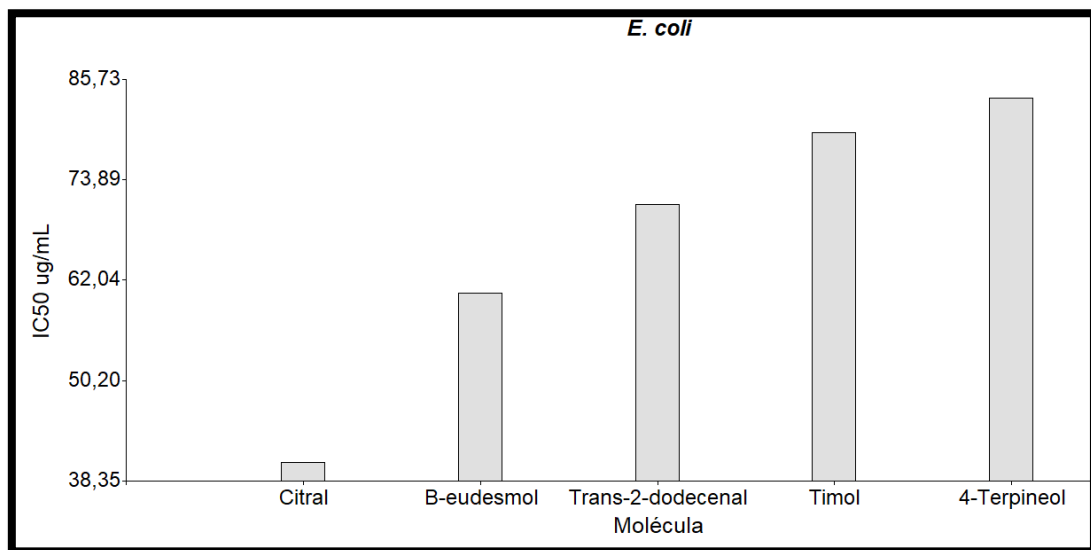


Figura 13. Análisis estadístico IC<sub>50</sub> de *E. coli* vs cada molécula evaluada.  
Elaborado por: Las autoras, 2022.

IC<sub>50</sub> vs cada molécula evaluada

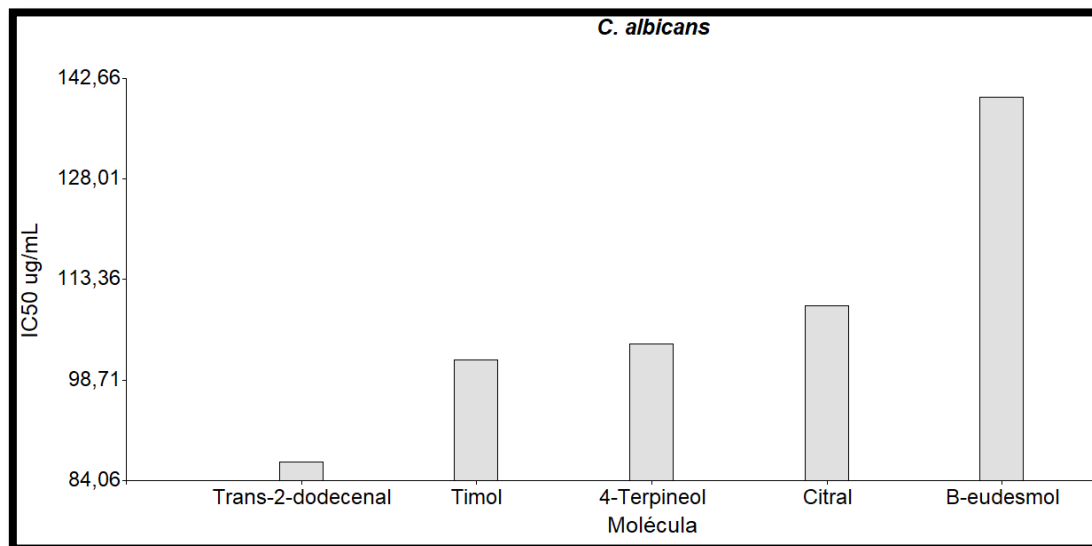


Figura 14. Análisis estadístico IC<sub>50</sub> de *C. albicans* vs cada molécula evaluada.  
Elaborado por: Las autoras, 2022.

La interacción entre la concentración previamente evaluada en el método de microdilución y el porcentaje de inhibición de las moléculas a evaluar se presenta de manera directamente proporcional lo que quiere decir que mientras más grande sea la concentración de la molécula el porcentaje de inhibición aumentará, sin embargo para la determinación del IC<sub>50</sub> sus valores tendrán una relación inversamente proporcional, dicho de la otra manera, a menor valor de IC<sub>50</sub> la actividad antimicrobiana será mayor, como lo evidenciado en la Tabla 6 y Figuras 9, 10 y 11. Para la molécula 4-terpineol con el microorganismo *S. aureus* lo cual nos indica una alta susceptibilidad, por otro lado el mayor valor encontrado fue el de B-eudesmol para la misma bacteria, lo que quiere decir que en comparación con *E. coli* y *S. aureus*, esta molécula no es tan sensible para levaduras, sin embargo se necesitan más estudio que corroboren este hecho.

## 4.2 Discos de difusión

Los resultados arrojados en el método de Kirby Bauer o también conocido como discos de difusión reveló una significativa actividad antimicrobiana tanto para *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans* pertenecientes a los grupos Gram Positiva, Gram Negativa como levaduras respectivamente. Dicha actividad se determinó de acuerdo a los halos de inhibición observados en las diferentes cajas Petri teniendo en cuenta que se realizaron tres repeticiones por cada cepa evaluada, de los cuales se deriva un control positivo, producto comercial ampibex 250mg/5mL (ampicilina) para bacterias y de itraconazol para levaduras al 40 % y al 1 % respectivamente. Para el caso de bacterias, se utilizó una concentración elevada debido a la resistencia creada por las bacterias a concentraciones menores según experimentación, siendo 40 % la más significativa. Para el control negativo se utilizó DMSO (dimetilsulfóxido) al 99 % y para terminar las respectivas moléculas a concentraciones del 5 %; 2,5 %; 1,25 % y 0,625 %.

### Halos de inhibición para *S. aureus* ATCC 29213

Tabla 7.

Halos de inhibición de *S. aureus* ATCC 29213 para la molécula Trans-2-dodecenal al 5 %; 2,5 %; 1,25 % y 0,625 % y control positivo (ampicilina) (Anexo 1)

Repeticiones	5 %	2,5 %	1,25 %	0,625 %	CONTROL POSITIVO
Caja 1	3,2 mm	2,6 mm	2,5 mm	2,3 mm	5,5 mm
Caja 2	3,4 mm	2,8 mm	2,5 mm	2,3 mm	6,3 mm
Caja 3	3,3 mm	2,6 mm	2,5 mm	2,3 mm	6 mm

Elaborado por: Las autoras, 2022.

Tabla 8.

Halos de inhibición de *S. aureus* ATCC 29213 para la molécula  $\beta$ -Eudesmol al 5 %; 2,5 %; 1,25 % y 0,625 % y control positivo (ampicilina) (Anexo 1)

Repeticiones	5 %	2,5 %	1,25 %	0,625 %	CONTROL POSITIVO
Caja 1	2,2 mm	2,1 mm	2 mm	0	4,7 mm
Caja 2	2,1 mm	2,1 mm	2,1 mm	0	4,6 mm
Caja 3	2,1 mm	2 mm	2 mm	0	4,5 mm

Elaborado por: Las autoras, 2022.

Tabla 9.

Halos de inhibición de *S. aureus* ATCC 29213 para la molécula 4-Terpineol al 5 %; 2,5 %; 1,25 % y 0,625 % y control positivo (ampicilina) (Anexo 1)

Repeticiones	5 %	2,5 %	1,25 %	0,625 %	CONTROL POSITIVO
Caja 1	2,5 mm	2 mm	2 mm	0	4,2 mm
Caja 2	2,6 mm	2 mm	2 mm	0	4,6 mm
Caja 3	2,6 mm	2 mm	2 mm	0	4,6 mm

Elaborado por: Las autoras, 2022.

Tabla 10.

Halos de inhibición de *S. aureus* ATCC 29213 para la molécula Timol al 5 %; 2,5 %; 1,25 % y 0,625 % y control positivo (ampicilina) (Anexo 1)

Repeticiones	5 %	2,5 %	1,25 %	0,625 %	CONTROL POSITIVO
Caja 1	2,2 mm	2,1 mm	0	0	4,6 mm
Caja 2	2,1 mm	2 mm	0	0	4,6 mm
Caja 3	2,2 mm	2,1 mm	0	0	4,5 mm

Elaborado por: Las autoras, 2022.

Tabla 11.

Halos de inhibición de *S. aureus* ATCC 29213 para la molécula Citral al 5 %; 2,5 %; 1,25 % y 0,625 % y control positivo (ampicilina) (Anexo 1)

Repeticiones	5 %	2,5 %	1,25 %	0,625 %	CONTROL POSITIVO
Caja 1	2,4 mm	2,2 mm	2 mm	2 mm	4,7 mm
Caja 2	3 mm	2,4 mm	2,3 mm	2,3 mm	4,5 mm
Caja 3	2,6 mm	2,4 mm	2,1 mm	2,1 mm	4,5 mm

Elaborado por: Las autoras, 2022.

Como se puede observar en la Tabla 7. y Tabla 11. El halo de inhibición generado por las moléculas evaluadas es constante para las cuatro concentraciones propuestas para el experimento, siendo la concentración del 5% la que mayor halo posee, lo que quiere decir que estas moléculas a concentraciones de 5% hasta 0,625% si poseen alta actividad microbiana a bajas concentraciones.

Por otro lado, como lo evidenciado en la Tabla 8. y Tabla 9. En las moléculas testeadas existe una alta actividad antibacteriana hasta la concentración de 1,25 %, sin embargo, para la

concentración de 0,625 % no se logró evidenciar un halo de inhibición en ninguna de las tres repeticiones, por lo cual se puede deducir que, para estas moléculas a concentraciones por debajo del 1,25 % no se cumple una función de actividad antibacteriana.

De igual manera para la molécula Timol si se logró evidenciar halos de inhibición bacteriana, sin embargo, como se puede evidenciar en la Tabla 10. Solo existió actividad a concentraciones mayores de 1,25 %, siendo esta la molécula menos activa para bacterias Gram Positivas a concentraciones por debajo del 2,5 %.

### Halos de inhibición para *E. coli* ATCC 25922

Tabla 12.

*Halos de inhibición de E.coli ATCC 25922 para la molécula Trans-2-dodecenal al 5 %; 2,5 %; 1,25 % y 0,625 % y control positivo (ampicilina) (Anexo 2)*

Repeticiones	5 %	2,5 %	1,25 %	0,625 %	CONTROL POSITIVO
<b>Caja 1</b>	2,5 mm	2,5 mm	0	0	4,7 mm
<b>Caja 2</b>	2,6 mm	2,3 mm	0	0	4,6 mm
<b>Caja 3</b>	3 mm	2,5 mm	0	0	4,9 mm

Elaborado por: Las autoras, 2022.

Tabla 13.

*Halos de inhibición de E.coli ATCC 25922 para la molécula  $\beta$ -Eudesmol al 5 %; 2,5 %; 1,25 % y 0,625 % y control positivo (ampicilina) (Anexo 2)*

Repeticiones	5 %	2,5 %	1,25 %	0,625 %	CONTROL POSITIVO
<b>Caja 1</b>	4 mm	3 mm	2,3 mm	0	5 mm
<b>Caja 2</b>	3 mm	3 mm	2,4 mm	0	4,5 mm
<b>Caja 3</b>	2,7 mm	2,5 mm	2,5 mm	0	5,1 mm

Elaborado por: Las autoras, 2022.

Tabla 14.

*Halos de inhibición de E.coli ATCC 25922 para la molécula 4-Terpineol al 5 %; 2,5 %; 1,25 % y 0,625 % y control positivo (ampicilina) (Anexo 2)*

Repeticiones	5 %	2,5 %	1,25 %	0,625 %	CONTROL POSITIVO
<b>Caja 1</b>	2,7 mm	2,6 mm	2,4 mm	0	4,3mm

<b>Caja 2</b>	2,6 mm	2,6 mm	2,3 mm	0	5 mm
<b>Caja 3</b>	3 mm	2,6 mm	2,3 mm	0	4,6 mm

Elaborado por: Las autoras, 2022.

Tabla 15.

*Halos de inhibición de E.coli ATCC 25922 para la molécula Timol al 5 %; 2,5 %; 1,25 % y 0,625 % y control positivo (ampicilina) (Anexo 2)*

<b>Repeticiones</b>	<b>5 %</b>	<b>2,5 %</b>	<b>1,25 %</b>	<b>0,625 %</b>	<b>CONTROL POSITIVO</b>
<b>Caja 1</b>	3,1 mm	0	0	0	4,5 mm
<b>Caja 2</b>	3,3 mm	0	0	0	5 mm
<b>Caja 3</b>	2,8 mm	0	0	0	5 mm

Elaborado por: Las autoras, 2022.

Tabla 16.

*Halos de inhibición de E.coli ATCC 25922 para la molécula Citral al 5 %; 2,5 %; 1,25 % y 0,625 % y control positivo (ampicilina) (Anexo 2)*

<b>Repeticiones</b>	<b>5 %</b>	<b>2,5 %</b>	<b>1,25 %</b>	<b>0,625 %</b>	<b>CONTROL POSITIVO</b>
<b>Caja 1</b>	2,5 mm	0	0	0	4,3 mm
<b>Caja 2</b>	2,5 mm	0	0	0	4,6 mm
<b>Caja 3</b>	2,5 mm	0	0	0	4,5 mm

Elaborado por: Las autoras, 2022.

Como se puede evidenciar en la Tabla 13. y Tabla 14. El halo de inhibición formado por las moléculas evaluadas es constante para tres de las cuatro concentraciones propuestas en esta investigación, siendo la concentración del 5 % la que mayor halo posee, lo que quiere decir que estas moléculas a concentraciones de 5 % hasta 1,25 % si poseen alta actividad microbiana.

Por otro lado, para la molécula Trans-2-dodecenal si se logró evidenciar halos de inhibición bacteriana, sin embargo, como se puede observar en la Tabla 12. Solo existió actividad a concentraciones mayores de 2,5 %, siendo esta molécula medianamente activa a bajas concentraciones.

Por último, como se puede observar en la Tabla 15. y Tabla 16. las moléculas evaluadas no poseen un halo de inhibición significativo para concentraciones por debajo del 5 % lo que quiere



decir que, tanto el Timol y Citral no cumplen con una función de actividad antibacteriana característica a concentraciones bajas para bacterias Gram Negativas.

### Halos de inhibición para *C. albicans* ATCC

Tabla 17.

Halos de inhibición de *C. albicans* ATCC 10231 para la molécula *Trans*-2-dodecenal al 5 %; 2,5 %; 1,25 % y 0,625 % y control positivo (itraconazol) (Anexo 3)

Repeticiones	5 %	2,5 %	1,25 %	0,625 %	CONTROL POSITIVO
<b>Caja 1</b>	3,6 mm	3 mm	2,7 mm	2,2 mm	0
<b>Caja 2</b>	3,4 mm	2,5 mm	2,6 mm	2,2 mm	0
<b>Caja 3</b>	3 mm	2,5 mm	2,3 mm	2,2 mm	0

Elaborado por: Las autoras, 2022.

Tabla 18.

Halos de inhibición de *C. albicans* ATCC 10231 para la molécula  $\beta$ -Eudesmol al 5 %; 2,5 %; 1,25 % y 0,625 % y control positivo (itraconazol) (Anexo 3)

Repeticiones	5 %	2,5 %	1,25 %	0,625 %	CONTROL POSITIVO
<b>Caja 1</b>	2,6 mm	2,5 mm	2,3 mm	2,2 mm	0
<b>Caja 2</b>	2,6 mm	2,2 mm	2,3 mm	2,2 mm	0
<b>Caja 3</b>	2,6 mm	2,3 mm	2,3 mm	2,2 mm	0

Elaborado por: Las autoras, 2022.

Tabla 19.

Halos de inhibición de *C. albicans* ATCC 10231 para la molécula 4-Terpineol al 5 %; 2,5 %; 1,25 % y 0,625 % y control positivo (itraconazol) (Anexo 3)

Repeticiones	5 %	2,5 %	1,25 %	0,625 %	CONTROL POSITIVO
<b>Caja 1</b>	2,7 mm	2,4mm	2,3mm	2,2 mm	0
<b>Caja 2</b>	3 mm	2,5 mm	2,3 mm	2,2 mm	0
<b>Caja 3</b>	3,3 mm	2,7 mm	2,3 mm	2,2 mm	0

Elaborado por: Las autoras, 2022.

Tabla 20.

Halos de inhibición de *C. albicans* ATCC 10231 para la molécula Timol al 5 %; 2,5 %; 1,25 % y 0,625 % y control positivo (itraconazol) (Anexo 3)

Repeticiones	5 %	2,5 %	1,25 %	0,625 %	CONTROL POSITIVO
<b>Caja 1</b>	2,7 mm	2,8 mm	2,3 mm	2,2 mm	0
<b>Caja 2</b>	2,8 mm	2,8 mm	2,2 mm	2,2 mm	0
<b>Caja 3</b>	3,3 mm	3 mm	2,3 mm	2,2 mm	0

Elaborado por: Las autoras, 2022.

Tabla 21.

Halos de inhibición de *C. albicans* ATCC 10231 para la molécula Citral al 5 %; 2,5 %; 1,25 % y 0,625 % y control positivo (itraconazol) (Anexo 3)

Repeticiones	5 %	2,5 %	1,25 %	0,625 %	CONTROL POSITIVO
<b>Caja 1</b>	3,2 mm	2,4mm	2,3 mm	2,2 mm	0
<b>Caja 2</b>	3,2 mm	2,3 mm	2,3 mm	2,2 mm	0
<b>Caja 3</b>	3,1 mm	2,3 mm	2,3 mm	2,2 mm	0

Elaborado por: Las autoras, 2022.

Como se puede evidenciar en la Tablas de la 17 a la 21. Los halos formados por todas las moléculas evaluadas presentan una actividad antifúngica constante, siendo la concentración del 5 % la que posee mayor actividad debido a que comparando con las concentraciones de 2,5 %; 1,25 % y 0,625 % presenta un diámetro mayor, sin embargo esto no quiere decir que las concentraciones menores al 5% no poseen actividad ya que si bien el diámetro de su halo es menor si existe una actividad representativa para todas las concentraciones. Para este caso se utilizó una concentración del 2 % debido a la toxicidad que posee este antimicótico de ser diagnosticado a un ser humano según lo descrito en (Janssen Pharmaceutica NV, 2019) donde itraconazol fue relacionado con patológicas como la insuficiencia cardíaca congestiva presentándose en pacientes con dosis suministradas del 4 %. De igual manera en los estudios realizados por (López & Lerma, 2000) la concentración de itraconazol empleada coincide con el 2 % que al revisar sus estadísticas presenta una efectividad de más del 85 % para la inhibición de este microorganismo.

## 5. Conclusiones y recomendaciones

Se debe considerar que la concentración al que está testeado el antibiótico comercial es alta, esto debido a la resistencia microbiana que todas las bacterias poseen en la actualidad como lo evidenciado en (Alarjani & Skalicky, 2021) en donde la mayoría de cepas aisladas para Gram Positivas presentaba una alta resistencia para este tipo de antibiótico, de igual manera los estudios realizados por (J. Silva & Delgado, 2017) (Fica, 2014) demuestran una alta resistencia a ampicilina para todo tipo de bacilos, llegando a porcentajes del casi 100 %. Según (Rodríguez, 2015) se propone tratamientos de un máximo de 200 mg una vez al día siendo estos equivalentes al 2 % para antimicóticos como itraconazol.

El microorganismo que presentó mayor sensibilidad fue *S. aureus* (Gram Positiva) debido a su pared celular, ya que al estar constituida por peptidoglicano en más del 90 % posibilitará la entrada de las moléculas a la célula actuando directamente en el citoplasma (de Souza et al., 2020).

Se concluye que la molécula  $\beta$ -Eudesmol posee una alta actividad antimicrobiana por encima de las evaluadas siendo altamente activa para Gram Positivas y Gram Negativas, secundada por Trans-2-dodecenal y Citral las cuales demostraron poseer una capacidad inhibitoria similar, sin embargo, se necesitan más estudios que corroboren el hecho. Por otro lado, para Trans-2-dodecenal se puede destacar también su actividad antimicótica actuando contra *C. albicans*.

En todos los casos evaluados se concluye que, a concentraciones por debajo del 5 % todavía existe una alta capacidad antimicrobiana de las diferentes moléculas evaluadas que, si bien se destacan unas concentraciones más bajas que otras, todas son altamente activas. De igual manera al trabajar con moléculas previamente purificadas, tanto a altas como bajas concentraciones estas poseerán una alta capacidad inhibitoria.

## 6. Referencias

- Abdallah, F., Lagha, R., & Gaber, A. (2020). Biofilm Inhibition and Eradication Properties of Medicinal Plant Essential Oils against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Clinical Isolates. *Pharmaceuticals*, 13(11), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ph13110369>
- Alarjani, K., & Skalicky, M. (2021). Antimicrobial resistance profile of Staphylococcus aureus and its in-vitro potential inhibition efficiency. *Journal of Infection and Public Health*, xxxx. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.018>
- Andrade, M. (2014). Identificación de las especies del género Candida en gestantes con candidiasis vulvovaginal que acuden al Hospital Gineco-obstétrico Dr. Jaime Sánchez Porcel Sucre – 2011. *Ecorfan*, 210–257. [https://www.ecorfan.org/bolivia/series/Topicos Selectos de Quimica\\_I/Articulo 5.pdf](https://www.ecorfan.org/bolivia/series/Topicos Selectos de Quimica_I/Articulo 5.pdf)
- Argote V. (2017). EVALUATION OF THE INABILITY CAPACITY OF ESSENTIAL OILS IN Staphylococcus aureus AND Escherichia coli. *Bioteconología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 15(SPE2), 52–60. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1692-35612017000400052](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612017000400052)
- Ashraf, S., Zubair, M., Rizwan, K., Tareen, R., Rasool, N., Zia-Ul-Haq, M., & Ercisli, S. (2014). Compositional studies and biological activities of Perovskia abrotanoides kar. oils. *Biological Research*, 47(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/0717-6287-47-12>
- Biemer, J. (1973). Antimicrobial susceptibility testing by the Kirby-Bauer disc diffusion method. *Annals of Clinical Laboratory Science*, 3(2), 135–140.
- Braga, P. C., Alfieri, M., Culici, M., & Dal Sasso, M. (2007). Inhibitory activity of thymol against the formation and viability of Candida albicans hyphae. *Mycoses*, 50(6), 502–506. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2007.01412.x>
- Braga, P., Sasso, M., Culici, M., & Alfieri, M. (2007). Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of Candida albicans. *Fitoterapia*, 78(6), 396–400. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.02.022>
- Caldas, L. (2010). Enfermedad diarreica aguda. *Revista de Salud*, 7. [http://uv.unicauca.edu.co/Documentos2010/DptoMedInt/Infecciones\\_intestinales.pdf](http://uv.unicauca.edu.co/Documentos2010/DptoMedInt/Infecciones_intestinales.pdf)
- Camarena, J., & Sánchez, R. (2009). INFECCIÓN POR Staphylococcus aureus RESISTENTE A METICILINA. *Control Calidad SEIMC*, 1–4. <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/sarm.pdf>
- Cano, D., Gómez, M., Oviedo, V., & Ríos, L. (2020). Nisina como conservante de alimentos : revisión sistemática de la literatura. 6, 52–64.
- Choma, I. M., & Grzelak, E. M. (2011). Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218(19), 2684–2691. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.069>
- Cordeiro, L., Figueiredo, P., Souza, H., Sousa, A., Andrade, F., Medeiros, D., Nóbrega, J., Silva, D., Martins, E., Barbosa, J., & Lima, E. (2020). Terpinen-4-ol as an antibacterial and antibiofilm agent against staphylococcus aureus. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms21124531>
- Da Silva, C., Guterres, S., Weisheimer, V., & Schapoval, E. (2008). Antifungal activity of the

- lemongrass oil and citral against *Candida* spp. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 12(1), 63–66. <https://doi.org/10.1590/s1413-86702008000100014>
- de Souza, V., Crippa, B., de Almeida, J., Iacuzio, R., Setzer, W., Sharifi-Rad, J., & Silva, N. (2020). Synergistic antimicrobial action and effect of active chitosan-gelatin biopolymeric films containing *Thymus vulgaris*, *Ocimum basilicum* and *Origanum majorana* essential oils against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Cellular and Molecular Biology*, 66(4), 214–223. <https://doi.org/10.14715/cmb/2020.66.4.26>
- Erdem, S., Nabavi, S., Orhan, I., Daglia, M., Izadi, M., & Nabavi, S. (2015). Blessings in disguise: A review of phytochemical composition and antimicrobial activity of plants belonging to the genus *Eryngium*. *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s40199-015-0136-3>
- Falcone, B., Speranza, B., Del Nobile, M. A., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2005). A Study on the Antimicrobial Activity of Thymol Intended as a Natural Preservative. *Journal of Food Protection*, 68(8), 1664–1670. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.8.1664>
- Fica, A. (2014). Resistencia Antibiótica En Bacilos. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25(3), 432–444. [http://dx.doi.org/10.1016/S0716-8640\(14\)70060-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0716-8640(14)70060-4)
- Fica C., A. (2005). Aspectos básicos sobre antimicrobianos I. *Medwave*, 5(02), 1–10. <https://doi.org/10.5867/MEDWAVE.2005.02.2522>
- Foudah, A., Alqarni, M., Alam, A., Ayman S, M., Ibnouf, E., & Yusufoglu, H. (2021). Evaluation of the composition and in vitro antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of Cilantro (*Coriandrum sativum* L. leaves) cultivated in Saudi Arabia (Al-Kharj). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(6), 3461–3468. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.03.011>
- Francisconi, R., Huacho, P., Tonon, C., Bordini, E., Correia, M., Sardi, J., & Spolidorio, D. (2020). Antibiofilm efficacy of tea tree oil and of its main component terpinen-4-ol against *Candida albicans*. *Brazilian Oral Research*, 34(e050), 1–9. <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2020.VOL34.0050>
- García, R., & Palou, E. (2008). Productivity in Small Scale Assembly Plants. In *Proceedings - Society of Automotive Engineers* (pp. 805–813).
- Garro, G., García, D., Valerín, K., & Jiménez, K. (2018). Optimización de una ruta metabólica en *Escherichia coli* para la producción de farneseno mediante el uso de biología sintética. *Revista Tecnología En Marcha*. <https://doi.org/10.18845/tm.v31i4.3957>
- Ghavam, M., Manca, M., Manconi, M., & Bacchetta, G. (2020). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils obtained from leaves and flowers of *Salvia hydrangea* DC. ex Benth. *Scientific Reports*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73193-y>
- Ghavam, Mansureh, Manca, M. L., Manconi, M., & Bacchetta, G. (2020). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils obtained from leaves and flowers of *Salvia hydrangea* DC. ex Benth. *Scientific Reports 2020 10:1*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73193-y>
- Gudat, W., Heizmann, W., Hockertz, S., & Nolting, S. (1998). *Candida Albicans*. *Zeitschrift*

- Fur Allgemeinmedizin*, 74(17–18), 782–785. <https://doi.org/10.3109/9781439801994-60>
- Huang, J., Yang, L., Zou, Y., Luo, S., Wang, X., Liang, Y., Du, Y., Feng, R., & Wei, Q. (2021). Antibacterial activity and mechanism of three isomeric terpineols of *Cinnamomum longepaniculatum* leaf oil. *Folia Microbiologica*, 66(1), 59–67. <https://doi.org/10.1007/s12223-020-00818-0>
- Huang, S., Singh, R., McKinnell, J., & Park, S. (2019). Decolonization to Reduce Postdischarge Infection Risk among MRSA Carriers. *New England Journal of Medicine*, 380(7), 638–650. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1716771>
- Hudzicki, J. (2012). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol Author Information. *American Society For Microbiology*, December 2009, 1–13.
- IDEXX. (2018). *Guía microbiológica para interpretar la CMI. Cmi.*
- Jambun, D., Dwiyanto, J., Lim, Y. Y., Tan, J. B. L., Muhamad, A., Yap, S. W., & Lee, S. M. (2017). Investigation on the antimicrobial activities of gingers (*Etlingera coccinea* (Blume) S.Sakai & Nagam and *Etlingera sessilantha* R.M.Sm.) endemic to Borneo. *Journal of Applied Microbiology*, 123(4), 810–818. <https://doi.org/10.1111/JAM.13536>
- Janssen Pharmaceutica NV. (2019). Itraconazol capsulas. In *Patriot Pharmaceuticals, LLC*. [https://doi.org/10.1016/S1033-3355\(11\)80053-6](https://doi.org/10.1016/S1033-3355(11)80053-6)
- Javidnia, K., Gholami, M., Firuzi, O., Özer, H., & Kandemir, A. (2010). Antimicrobial and antioxidant activity and chemical composition of the essential oil of *tanacetum macrophyllum* (Waldst. et Kit.) Schultz. Bip. *Journal of Essential Oil Research*, 22(2), 186–188. <https://doi.org/10.1080/10412905.2010.9700299>
- Kaur, R., & Embi, M. A. (2009). Morfología y estructura bacteriana. *European Journal of Social Sciences*, 9(1), 48–60.
- Kot, B., Wierzchowska, K., Piechota, M., Czerniewicz, P., & Chrzanowski, G. (2019). Antimicrobial activity of five essential oils from lamiaceae against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Natural Product Research*, 33(24), 3587–3591. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1486314>
- Kotan, R., Kordali, S., & Cakir, A. (2007). Screening of antibacterial activities of twenty-one oxygenated monoterpenes. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 62(7–8), 1–6. <https://doi.org/10.1515/znc-2007-7-808>
- Kubo, I., Fujita, K., Nihei, K., & Kubo, A. (2004). Anti-Salmonella activity of (2E)-alkenals. *Journal of Applied Microbiology*, 96(1), 693–699. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2003.02175.x>
- Lacueva, M. (2017). *Resistencia a antibióticos en Staphylococcus aureus. Evolución y perspectiva actual*. 20. <https://eprints.ucm.es/54765/>
- Li, L., Shi, C., Yin, Z., Jia, R., Peng, L., Kang, S., & Li, Z. (2014). Antibacterial activity of  $\alpha$ -terpineol may induce morphostructural alterations in *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(4), 1–5. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000400035>
- López-Olmos, J., & Lerma, E. (2000). Tratamiento de la candidiasis vulvovaginal recidivante: Estudio prospectivo comparativo de tres preparados antimicóticos con dosis única

- durante 6 meses. *Clinica e Investigacion En Ginecologia y Obstetricia*, 27(10), 366–375.
- López, A., Muñoz, C., Aguilera, C., Alonso, M., Bueno, R., Sacristán, S., & Toboso, S. (2019). Plan Nacional Frente a la Resistencia a los Antibióticos 2019-2021. *Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios*, 37. [http://resistenciaantibioticos.es/es/system/files/field/files/pran\\_2019-2021\\_0.pdf?file=1&type=node&id=497&force=0](http://resistenciaantibioticos.es/es/system/files/field/files/pran_2019-2021_0.pdf?file=1&type=node&id=497&force=0)
- Lozano, C., & Torres, C. (2017). Actualización en la resistencia antibiótica en Gram positivos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(Supl 1), 2–8. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(17\)30028-9](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(17)30028-9)
- Lu, W.-C., Huang, D.-W., Wang, C.-C. R., Yeh, C.-H., Tsai, J.-C., Huang, Y.-T., & Li, P.-H. (2017). *Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil*. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.12.018>
- Magariños, M. (2006). Candiadisis. *Tratado de Geratría Para Residentes*, 4, 443–448.
- Matasyoh, J. C., Maiyo, Z. C., Ngure, R. M., & Chepkorir, R. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Coriandrum sativum*. *Food Chemistry*, 113(2), 526–529. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.097>
- Matasyoh, J., Maiyo, Z., Ngure, R., & Chepkorir, R. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Coriandrum sativum*. *Food Chemistry*, 113(2), 526–529. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.097>
- Melo, G., Méndez, G., & Fortich, M. (2015). Actividad antibacteriana in vitro de diecinueve aceites esenciales frente a bacterias asociadas al acné. *Revista Cubana de Farmacia*, 49(1), 103–116.
- Memar, M. Y., Raei, P., Alizadeh, N., Aghdam, M. A., & Kafil, H. S. (2017). Carvacrol and thymol: Strong antimicrobial agents against resistant isolates. *Reviews in Medical Microbiology*, 28(2), 63–68. <https://doi.org/10.1097/MRM.0000000000000100>
- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J., & Ochoa, T. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(4), 648–656. <https://doi.org/10.17843/rpmpesp.2011.284.430>
- Noriega, P., Ballesteros, J., De la Cruz, A., & Veloz, T. (2020). Chemical composition and preliminary antimicrobial activity of the hydroxylated sesquiterpenes in the essential oil from piper barbatum kunth leaves. *Plants*, 9(2), 1–9. <https://doi.org/10.3390/plants9020211>
- Noriega, Paco, Ballesteros, J., De la Cruz, A., & Veloz, T. (2020). Chemical composition and preliminary antimicrobial activity of the hydroxylated sesquiterpenes in the essential oil from piper barbatum kunth leaves. *Plants*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/plants9020211>
- Oliveira, H., Selis, N., Sampaio, B., Júnior, M., de Carvalho, S., de Almeida, J., Almeida, P., da Silva, I., Oliveira, C., Brito, T., da Silva, L., Teixeira, M., Coelho, H., Barbosa, C., Andrade, Y., Bittencourt, R., Viana, J., Campos, G., Timenetsky, J., ... Marques, L. (2021). Citral modulates virulence factors in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95971-y>

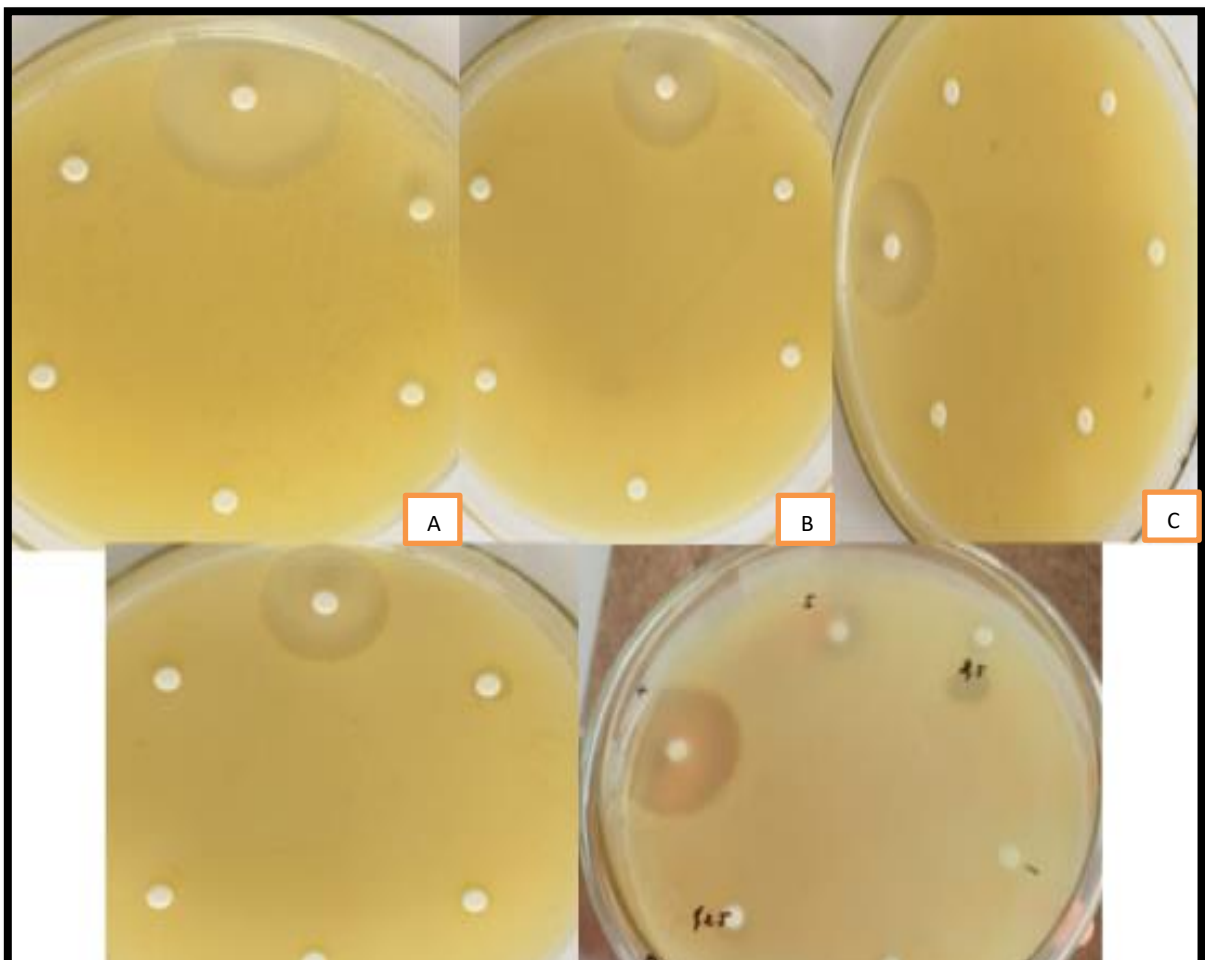
- Onawunmi, G. (1989). Evaluation of the antimicrobial activity of citral. *Letters in Applied Microbiology*, 9(3), 1–4. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1989.tb00301.x>
- Onawunmi, G. O. (1989). Evaluation of the antimicrobial activity of citral. *Letters in Applied Microbiology*, 9(3), 105–108. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1989.tb00301.x>
- Panizo, M. ., & Reviákina, V. (2005). Candida albicans y su efecto patógeno sobre las mucosas. In *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* (Vol. 21, Issue 2, pp. 38–45). [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562001000200011&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562001000200011&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Payan, L. (2014). *Evaluación del efecto combinado de los antimicrobianos naturales nisina, D -limoneno, glucósido de steviol y citral sobre Listeria monocytogenes en alimentos [Tesis, Universidad Politécnica de Cartagena]*. 1–48. <https://pdfs.semanticscholar.org/86dc/0a3cb47391d8231f5800b7af0bf4118b4004.pdf>
- Pérez Cárdenas, J. E., Isaza M., G., & Acosta, S. (2007). Actividad antibacteriana de extractos de Phenax rugosus y Tabebuia chrysantha. *Biosalud*, May 2016, 59–68.
- Piñeros, J. (2015). DATABiO Staphylococcus aureus. *Databio*, 1–3. [http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas de agentes biologicos/Fichas/Bacterias/Staphylococcus aureus.pdf](http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Bacterias/Staphylococcus%20aureus.pdf)
- Quintana, S., Sjostrom, P., Mazón, G., Socarrás, D., Calderón, M., Herrera, A., Margarita, S., Quintana, C., & Lizarzaburu, A. (2017). Genoma de Candida albicans y resistencia a las drogas Genome of Candida albicans and drug resistance. *Barranquilla (Col.)*, 33(3), 438–450. <http://www.candidagenome.org/>
- Ramírez, J., Contreras, G., & Gómez, M. (2005). La fase estacionaria en la bacteria Escherichia coli. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47(3–4), 92–101.
- Restrepo, J., Vinasco, L., Jaramillo, L., & Colmenares, A. (2009). Encapsulamiento de los aceites esenciales de citral ( cymbopogon citratus ) en  $\beta$  -ciclodextrinas usando CO 2 supercrítico Encapsulation of essential oil from citral ( cymbopogon citratus ) in  $\beta$  -ciclodextrines by using supercritical CO 2. *Red de Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España y Portugal*, 11(2), 9–19. <http://www.redalyc.org/pdf/2913/291323541001.pdf>
- Rodríguez, A. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. *Salud Publica de Mexico*, 44(5), 464–475. <https://doi.org/10.1590/s0036-36342002000500011>
- Sánchez, E., Castillo, S., & García, P. (2016). Actividad antimicrobiana. *Investigación En Plantas de Importancia Médica*, 77–100. <https://doi.org/10.3926/oms.334>
- Santurio, D. F., De Jesus, F. P. K., Zanette, R. A., Schlemmer, K. B., Fraton, A., & Fries, L. L. M. (2014). Antimicrobial activity of the essential oil of thyme and of thymol against Escherichia coli strains. *Acta Scientiae Veterinariae*, 42(1).
- Shi, C., Song, K., Zhang, X., Sun, Y., Sui, Y., Chen, Y., Jia, Z., Sun, H., Sun, Z., & Xia, X. (2016). Antimicrobial activity and possible mechanism of action of citral against Cronobacter sakazakii. *PLoS ONE*, 11(7), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159006>



- Silva, J., & Delgado-Ron, A. (2017). *Epidemiología y Geomática View project Systematic Review and Meta-Analysis View project*. <https://doi.org/10.29019/tsafiqui.v0i3.217>
- Solarte, A. (2015). *Salmonella Typhimurium AISLADA DE CASOS CLÍNICOS EN*.
- Somolinos, M., García, D., Condón, S., MacKey, B., & Pagán, R. (2010). Inactivation of *Escherichia coli* by citral. *Journal of Applied Microbiology*, *108*(6), 1928–1939. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04597.x>
- Tonon, C., Serignoli, R., Ferreira, E., Maquera, P., Orlandi, J., & Spolidorio, D. (2018). Interactions between terpinen-4-ol and nystatin on biofilm of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Brazilian Dental Journal*, *29*(4), 1–9. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201802073>
- Torrenega, M., Pájaro, N., & León, G. (2017). *esenciales de diferentes especies del género Citrus Resumen Antibacterial activity in vitro of essential oils Introducción*. *46*(2), 160–175.
- Usano, J., Palá, J., & Díaz, S. (2014). *Aceites esenciales: conceptos básicos y actividad antibacteriana.Reduca (Biología) [revista en Internet] 2014 [acceso 01 de diciembre de 2021]; 7(2): 60-70. 7(2), 60–70*. <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/1553/1747>
- Yildiz, H. (2016). Chemical Composition, Antimicrobial, and Antioxidant Activities of Essential Oil and Ethanol Extract of *Coriandrum sativum* L. Leaves from Turkey. *International Journal of Food Properties*, *19*(7), 1593–1603. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1092161>
- Zekaria, D. (2015). *Los aceites esenciales una alternativa a los antimicrobianos*. 1–6.

## 7. Anexos

Anexo 1. Antibiogramas de *S. aureus* con las 5 moléculas evaluadas. A. 4-terpeneol. B. Citral. C. Timol. D. B-eudesmol. E. trans-2-dodecenal

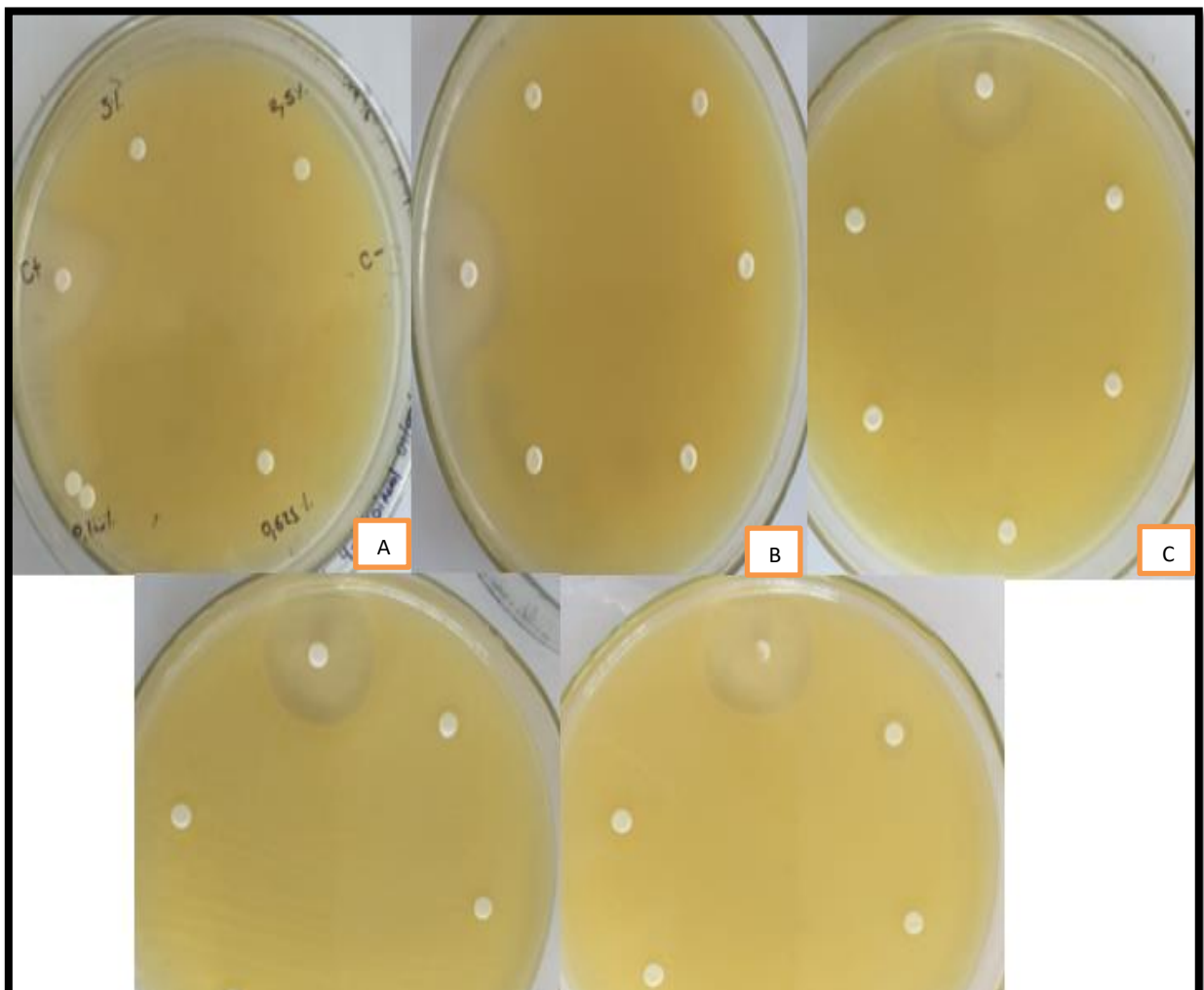


D

E

Elaborado por: Las autoras, 2022

Anexo 2. Antibiogramas de *E.coli* con las 5 moléculas evaluadas. A. 4-terponeol. B. Citral. C. Timol. D. B-eudesmol. E. *trans*-2-dodecenal

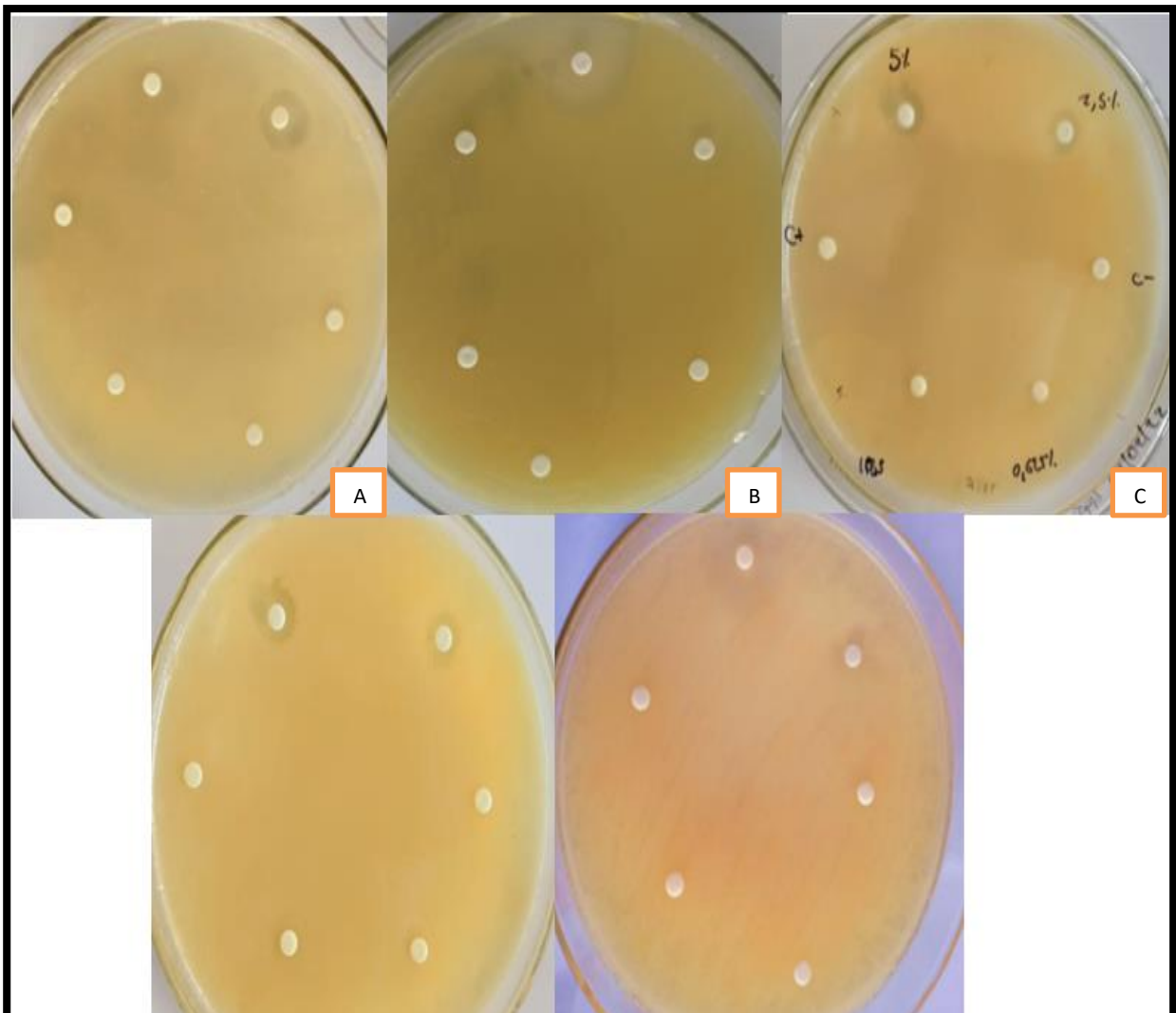


D

E

Elaborado por: Las autoras, 2022.

Anexo 3. Antibiogramas de *C. albicans* con las 5 moléculas evaluadas. A. 4-terpeneol. B. Citral. C. Timol. D. B-eudesmol. E. trans-2-dodecenal.



D

E

Elaborado por: Las autoras, 2022.

Anexo 4. Placa de *S. aureus* incubada 24 horas, posteriormente añadido colorante TTC.

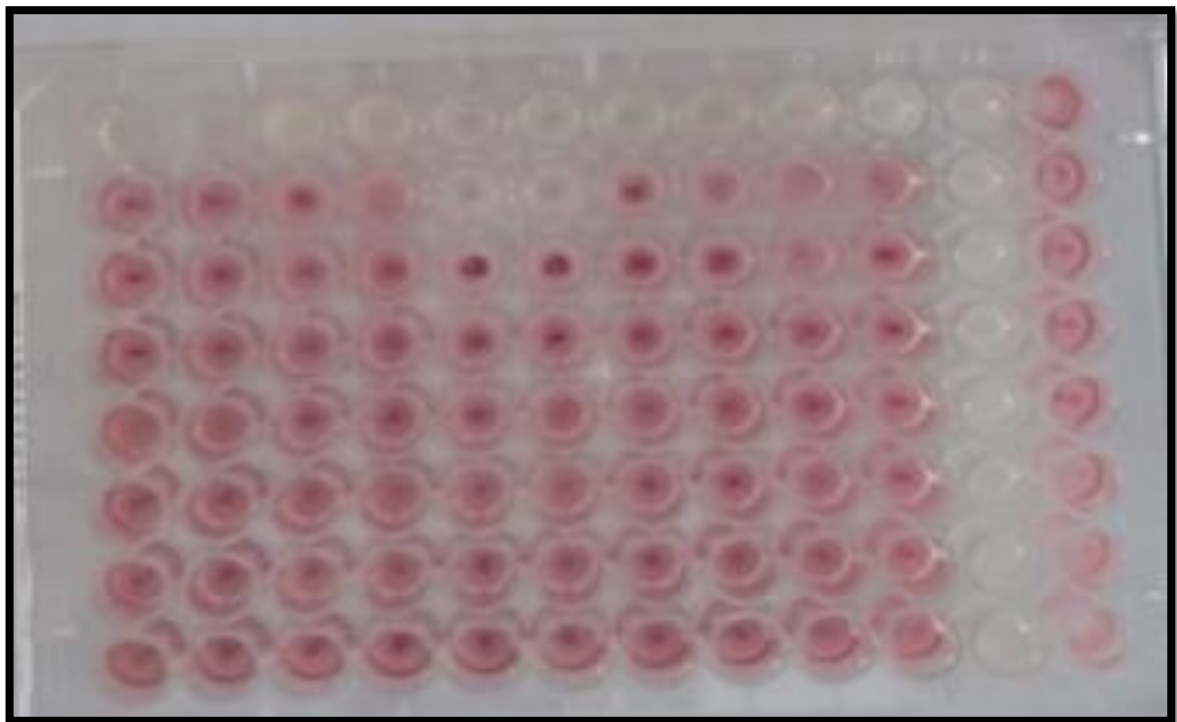


Elaborado por: Las autoras, 2022.

Anexo 5. Placa de *E. coli* incubada 24 horas, posteriormente añadido colorante TTC.



*Anexo 6. Placa de C.albicans incubada 24 horas, posteriormente añadido colorante TTC.*



Elaborado por: Las autoras, 2022.