



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE CUENCA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

“EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE

ESENCIAL DE *Bursera graveolens* (PALO SANTO) FRENTE A *Escherichia coli* Y

Candida albicans”

Trabajo de titulación previo a la obtención del
título de Ingeniera Biotecnóloga

AUTORA: MERLY CECIBEL RENTERIA VILLALTA

TUTORA: DRA. MÓNICA JUDITH ESPADERO BERMEO

Cuenca - Ecuador

2026

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

Yo, Merly Cecibel Renteria Villalta con documento de identificación N° 0707268397
manifiesto que:

Soy la autora y responsable del presente trabajo; y, autorizo 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.

Cuenca, 10 de febrero del 2026

Atentamente,



Merly Cecibel Renteria Villalta

0707268397

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

Yo, Merly Cecibel Renteria Villalta con documento de identificación N° 0707268397, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del Trabajo experimental: “Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo) frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans*”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera Biotecnóloga, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

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

Cuenca, 10 de febrero del 2026

Atentamente,



Merly Cecibel Renteria Villalta

0707268397

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Mónica Judith Espadero Bermeo con documento de identificación N° 0103645412, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: “EVALUACIÓN *IN VITRIO* DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Bursera graveolens* (PALO SANTO) FRENTE A *Escherichia coli* Y *Candida albicans*”, realizado por Merly Cecibel Renteria Villalta con documento de identificación N° 0707268397, 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.

Cuenca, 10 de febrero del 2026

Atentamente,



Dra. Mónica Judith Espadero Bermeo

0103645412

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a Dios, por darme la fuerza, valentía y sabiduría de llegar hasta aquí, definitivamente GRACIAS.

En segundo lugar, a los seres que más amo, a mis padres. Gracias, mamá por no permitirte rendirte nunca y que llegemos juntitas hasta la meta, gracias por siempre confiar en mí, desde que era muy pequeña. A mi papá por cada esfuerzo y sacrificio para yo poder estar aquí. Quiero que sepan que son lo más importante en mi vida y sin ustedes esto no sería posible.

A mi mayor accionista, gracias, hermano por nunca dejarme sola a pesar de la distancia, por nunca permitir que tu hermana se rinda.

Gracias a mis hermanos, definitivamente han sido mi mejor equipo, los amo. Y quien no lleva mi sangre, pero se ha convertido como una hermana, Gracias Juli.

A mi tutora Mónica Espadero, por la guía, paciencia y darnos todo el ánimo.

A mis amigas, Angy (Andrea), Sofy, Jeramel y May, gracias amigas, hicieron de este lugar desconocido un hogar para mí.

Y a mi comadre de Laboratorio Thalía, gracias.

Y por último y no menos importante a mí, porque a pesar de todas las turbulencias te permitiste llegar hasta aquí.

Dedicatoria

Esto va dedicado principalmente a alguien que llegó a motivarme la vida, que ha sido mi mayor fuente de inspiración en este último año a Enith Isabella, mi sobrina. Aún estas muy pequeña para entenderlo, pero ya después te lo explicaré.

A toda a mi familia, porque aportaron de diferentes maneras, han sido definitivamente mis mejores aliados, los amo. Y repito esta frase que señale hace 5 años: por y para ustedes, familia.

ÍNDICE

Agradecimientos.....	1
Dedicatoria	2
Índice de tablas.....	6
Abreviaturas	7
Resumen.....	8
Abstract	9
CAPÍTULO I	10
1.1 Introducción.....	10
1.2 Planteamiento del problema	12
1.3 Pregunta de investigación.....	13
1.4 Justificación.....	13
1.5 Objetivos	15
1.5.1 Objetivo general.....	15
1.5.2 Objetivos específicos.....	15
1.6 Hipótesis.....	16
CAPÍTULO II	17
2. Marco de referencia.....	17
2.1 Antecedentes de la investigación.....	17
2.2 Marco conceptual	18
2.3 Bases teóricas	20
2.3.1 Plantas medicinales	20
2.3.2 Aceites esenciales.....	20
2.3.4 <i>Bursera graveolens</i> (Palo Santo)	25
2.3.5 El aceite esencial como agente antimicrobiano.....	30
2.3.6 Métodos utilizados para la determinación de la actividad antimicrobiana.....	31
2.3.5 Métodos utilizados para la determinación de la actividad antimicrobiana	35
2.3.5.1 Método de dilución y micro-dilución en caldo	36
2.3.6 Microorganismos de estudio: <i>Escherichia coli</i> y <i>Candida albicans</i>	36
2.3.6.1 <i>Escherichia coli</i>	36
2.3.6.2 <i>Candida albicans</i>	39
CAPÍTULO III.....	43
3.1 Nivel de investigación	43
3.2 Diseño de investigación	43

3.3	Diseño de experimento	43
3.4	Población y muestra	45
3.5	Unidad experimental	47
3.6	Técnicas e instrumentos de recolección de datos	47
3.7	Técnicas de procesamiento y análisis de datos.....	48
3.8	Procedimientos experimentales.....	48
3.8.1	Fase 1.	49
3.8.2	Fase 2.	49
3.8.3	Fase 3	51
3.9.	Fase 4.....	57
CAPÍTULO IV.....		62
4.	Resultados y discusión	62
4.1	Detección de compuestos con propiedades antimicrobianas del aceite esencial de <i>Bursera graveolens</i> (palo santo) frente a <i>Escherichia Coli</i> ATCC 25922 y <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	62
4.2	Determinación de la CMI del aceite esencial de <i>Bursera graveolens</i> frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	65
4.2.1	Determinación de la CMI del aceite esencial de <i>Bursera graveolens</i> (palo santo) frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	67
4.2.2	Comparación de determinación de concentración mínima inhibitoria del aceite esencial <i>Bursera graveolens</i> (palo santo) frente a <i>Escherichia Coli</i> ATCC 25922 y <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	69
CAPÍTULO V		72
5.	Conclusiones y recomendaciones.....	72
5.1	Conclusiones	72
5.2	Recomendaciones.....	73
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		74
ANEXOS		84

Índice de figuras

Figura 1.	Diferentes métodos de extracción de aceites esenciales	23
Figura 2.	<i>Bursera graveolens</i> (palo santo).....	26
Figura 3.	Clasificación taxonómica de la especie <i>Bursera graveolens</i> (palo santo).....	26
Figura 4.	Composición química del aceite esencial de <i>Bursera graveolens</i> (palo Santo).....	28

Figura 5. Esquema de la bioautografía por contacto.....	33
Figura 6. Diagrama del procedimiento de bioautografía directa.....	34
Figura 7. Diagrama del procedimiento del método de bioautografía por inmersión o superposición en agar.....	35
Figura 8. La cepa ATCC 25922 después de 24 horas de incubación.....	49
Figura 9. La cepa ATCC 10231 después de 24 horas de incubación.....	51
Figura 10. Distribución de concentraciones y controles en la microplaca	54
Figura 11. Distribución de la solución madre en microplacas	54
Figura 12. Concentración mínima inhibitoria con un indicador metabólico de DTT de Escherichia coli ATCC 25922.....	55
Figura 13. Concentración mínima inhibitoria con indicador metabólico de DTT de Candida albicans ATCC 10231.....	56
Figura 14. TLC Cromatografía del aceite esencial de Bursera graveolens (palo santo) en fase móvil aplicado revelador de vanilina.....	58
Figura 15. TLC Cromatográfica del aceite esencial Bursera graveolens (palo santo) visualizadas en 254 y 366 nm sin revelador.....	59
Figura 16. Bioautografía directa de E. coli con el MTT recién colocado.....	60
Figura 17. Cromatografía en capa fina visualizada a 366 nm.....	63
Figura 18. Los halos de inhibición de los posibles compuestos frente a Escherichia coli ATCC 25922 y Candida albicans ATCC 10231.....	64
Figura 19. Porcentaje de inhibición a longitud de 630 nm frente a Escherichia coli ATCC 25922.....	66
Figura 20. Porcentaje de inhibición a longitud de 630 nm frente a Candida albicans ATCC 10231.....	68

Figura 21. Comparación de porcentajes de inhibición entre *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Candida albicans* ATCC 10231..... 70

Índice de tablas

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del aceite esencial *Bursera graveolens* (palo santo) 29

Tabla 2. Propiedades organolépticas del aceite esencial de las diferentes partes de la planta 30

Tabla 3. Tratamientos realizados con sus respectivos controles de *Escherichia coli* ATCC 25922 . 44

Tabla 4. Tratamientos realizados con sus respectivos controles de *Candida albicans* ATCC 10231 44

Tabla 5. Tabla de variable independiente..... 46

Tabla 6. Tabla de variable dependiente..... 46

Tabla 7. Resultados obtenidos de la técnica de bioautografía..... 62

Tabla 8. Resultados obtenidos de la concentración mínima inhibitoria del *Bursera graveolens* (palo santo) frente a *Escherichia coli* ATCC 25922..... 65

Tabla 9. Resultados obtenidos de la concentración mínima inhibitoria del *Bursera graveolens* (palo santo) frente a *Candida albicans* ATCC 10231..... 68

Abreviaturas

CMI: Concentración mínima inhibitoria

MTT: Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

ATCC: American Type Culture

TLC: Thin Layer Chromatography (Cromatografía capa fina)

TTC: Cloruro de 2,3,5- trifeniltetrazolio

TWEEN 80: Polisorbato 80

DMSO: dimetilsulfóxido

Rf: Retention factor

Resumen

Las plantas medicinales en la actualidad tienen un papel fundamental a causa de las variadas propiedades que contienen por los compuestos bioactivos que dan lugar a la actividad antibacteriana, antifúngica, antiinflamatoria y otros más. Dentro de este ámbito el aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo) ha generado un interés por contener metabolitos secundarios que tienen actividad antimicrobiana. El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Candida albicans* ATCC 10231, por medio de la técnica de bioautografía identificando los posibles compuestos responsables de la actividad antimicrobiana, mediante la determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) y la comparación de valores obtenidos del CMI identificando el microorganismo más sensible.

Por medio de la técnica de bioautografía asociada a la cromatografía de capa fina (TLC) y análisis de frentes de referencia (Rf), apoyados en el atlas cromatográfico y bibliografía. Se asociaron como posibles compuestos responsables de la actividad antimicrobiana el terpineol (Rf: 0,25), mentofurano (Rf: 0,33), germacreno (Rf: 0.50) y limoneno (Rf: 0.55).

Por consiguiente, se determinó la concentración mínima inhibitoria mediante el método de microdilución en caldo. Los resultados evidenciaron un mayor efecto inhibitoria en *Escherichia coli* ATCC 25922 con una concentración de 1500 µg/ ml bajo el criterio de mayor al 90%, mientras que en *Candida albicans* ATCC 10231 presentó una concentración mínima inhibitoria de 6000 µg/mL. Estos hallazgos indican que el aceite esencial posee actividad antimicrobiana dependiente de la concentración y mayor eficacia frente a la cepa bacteriana evaluada.

Palabras clave: CMI, comparación, bioautografía

Abstract

Medicinal plants currently play a fundamental role due to their diverse properties, stemming from bioactive compounds that produce antibacterial, antifungal, anti-inflammatory, and other types of activity. Within this context, the essential oil of *Bursera graveolens* (palo santo) has generated interest because it contains secondary metabolites with antimicrobial activity. This research aimed to evaluate the antimicrobial activity against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Candida albicans* ATCC 10231 using bioautography. The study identified the compounds responsible for the inhibitory activity by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and comparing MIC values to identify the most sensitive microorganism.

The bioautography technique was combined with thin-layer chromatography (TLC) and reference front (Rf) analysis, supported by a chromatographic atlas and relevant literature. Terpineol (Rf: 0.25), Menth furan (Rf: 0.33), germacrene (Rf: 0.50), and limonene (Rf: 0.55) were identified as potential compounds responsible for the antimicrobial activity.

Therefore, the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using the broth microdilution method. The results showed a greater inhibitory effect against *Escherichia coli* ATCC 25922 at a concentration of 1500 µg/mL (greater than 90%), while against *Candida albicans* ATCC 10231, the MIC was 6000 µg/mL. These findings indicate that the essential oil exhibits concentration-dependent antimicrobial activity and greater efficacy against the evaluated bacterial strain.

Keywords: CMI, comparison, bioautography

CAPÍTULO I

1.1 Introducción

En la actualidad, el uso de plantas medicinales tiene un papel fundamental en los sistemas de salud tradicional y complementaria. Esto se atribuye a su amplia trayectoria en el tratamiento de múltiples enfermedades y a la creencia generalizada de que sus componentes poseen actividad biológica y podrían ser favorables para el bienestar humano. Se ha utilizado desde tiempos muy antiguos en diversas culturas globales, siendo particularmente significativo en poblaciones indígenas y rurales (Mosquera, 2022).

En Ecuador, el uso terapéutico de las plantas es una práctica profundamente enraizada, transmitida entre generaciones, se emplean para combatir infecciones y trastornos comunes, reflejando un conocimiento tradicional vivo y una valiosa fuente de metabolitos bioactivos.

Muchas de estas especies pertenecientes a familias botánicas reconocidas por su capacidad de producir aceites esenciales, los cuales se originan como metabolitos secundarios sintetizados por las plantas aromáticas de familias como (*Lamiaceae*, *Apiaceae*, *Myrtaceae*, *Burseraceae*, entre otras). Aunque no participan directamente con principales funciones en su desarrollo y crecimiento, sí cumplen con funciones ecológicas relevantes como la defensa frente a patógenos y la interacción con el entorno biótico y abiótico. Los aceites esenciales están constituidos por una mezcla compleja de compuestos orgánicos y oxigenados como (sesquiterpenos, terpenos, terpenoides, fenoles, timol, etc.) (Cañarte Vélez & Ponce Párraga, 2021).

Desde una perspectiva microbiológica, los bioactivos presentes en las plantas poseen propiedades con actividad antibacteriana, actividad antifúngica y actividad antioxidante, atribuidas a la acción combinada de sus metabolitos secundarios, que pueden dañar estructuras celulares y metabolitos esenciales siendo procesos claves para la supervivencia de los microorganismos,

según estudios realizados por Chouhan et al. (2017) los aceites esenciales poseen compuestos como (Limoneno, linalool y alfa- terpineol) que afectan la permeabilidad de la membrana en microorganismos patógenos. Afectando las estructuras celulares según estudios realizados por Keller & Dörr (2023) el aceite esencial palo santo contiene compuestos bioactivos como (limoneno, terpenoides, terpenos, etc) que pueden modificar la permeabilidad de la membrana. Estos efectos han sido observados frente a patógenos como *Escherichia coli* y patógenos fúngicos como *Candida albicans*, que actúan desestabilizando las membranas celulares mediante la alteración de los lipopolisacáridos en bacterias y del ergosterol en hongos, comprometiendo así su viabilidad.

Desde el punto de vista de la salud pública, ambos microorganismos son considerados agentes etiológicos frecuentes de infecciones oportunistas, cuya relevancia se ha incrementado debido a la disminución de la eficacia de los antimicrobianos, situación reconocida por la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, 2017).

Debido al creciente uso de plantas medicinales por la presencia de sus metabolitos secundarios y a su elevada demanda en el mercado, diversos estudios han demostrado el potencial antimicrobiano del aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo). Sin embargo, es necesario continuar desarrollando investigaciones que permitan profundizar en la caracterización de su actividad antimicrobiana, así como en sus posibles aplicaciones como agente antimicrobiano de origen natural.

El presente estudio evaluó *in vitro* la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo) frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans*, mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Asimismo, se identificó a través de la técnica de la bioautografía, los posibles componentes responsables de la actividad antimicrobiana,

y por último se realizó la comparación de los valores del CMI obtenidos por ambos microorganismos.

1.2 Planteamiento del problema

Las plantas medicinales han sido objeto de interés creciente debido a sus múltiples propiedades biológicas, entre ellas la actividad antimicrobiana, atribuida a su composición compleja de metabolitos secundarios como (monoterpenos, sesquiterpenos, fenoles y compuestos volátiles) que pueden afectar la viabilidad de microorganismos patógenos.

A pesar de este interés general por los aceites esenciales, en Ecuador persiste una limitada investigación científica sistemática sobre el potencial antimicrobiano de muchos aceites esenciales de origen vegetal, especialmente frente a microorganismos clínicamente relevantes. Según estudios realizados por Ruiz (2025) han evaluado la actividad de aceites esenciales de especies como *Cinnamomum zeylanicum*, *Syzygium aromaticum* y *Illicium verum* frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans*, donde se presenció que la sinergia de *Cinnamomum zeylanicum* y *Syzygium aromaticum* hizo mayor efecto en la *Candida albicans* con un halo de 61mm y la sinergia de *Cinnamomum zeylanicum* y *Illicium verum* en la *Escherichia coli* tuvo mayor efecto inhibitorio, lo que muestra el interés por este tipo de estudios en la región.

Sin embargo, aún existen un número considerable de especies nativas incluido *Bursera graveolens* (palo santo) que carece de estudios concluyentes sobre su capacidad inhibitoria frente a bacterias y hongo bajo condiciones experimentales controladas.

Esta carencia de evidencia de información resulta particularmente relevante considerando el impacto clínico y patógeno que tienen los microorganismos *Escherichia coli* y *Candida albicans*, que son responsables de varias infecciones oportunistas que pueden ir desde formas leves y localizadas hasta enfermedades graves (Ruiz, 2025).

La información científica disponible sobre la acción inhibitoria del aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo) frente a microorganismos como *Escherichia coli* y *Candida albicans* es limitada, inconsistente o insuficiente para establecer conclusiones firmes sobre su eficacia o aplicación como agente antimicrobiano natural.

Esta limitación se relaciona, principalmente, con la falta de estudios sistemáticos que determinan parámetros cuantitativos como la concentración mínima inhibitoria (CMI) o identifiquen los posibles compuestos responsables de la actividad antimicrobiana mediante técnicas como bioautografía.

En este contexto, surge la necesidad de generar evidencia experimental que permita esclarecer si el aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo) presenta actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans*, lo que contribuiría a ampliar el conocimiento científico sobre los posibles usos biológicos de esta especie, aún poco investigada desde una perspectiva microbiológica.

1.3 Pregunta de investigación

¿El aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo) posee actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans*?

1.4 Justificación

Ecuador posee una rica biodiversidad vegetal, entre la cual la especie aromática *Bursera graveolens* (palo santo) ha sido tradicionalmente valorada por sus usos medicinales y rituales. El aceite esencial de esta planta contiene metabolitos secundarios como limoneno, α -terpineol y carvona, entre otros terpenos, que han mostrado actividad biológica prometedora en estudios preliminares. Sin embargo, hasta la fecha, la evidencia científica sobre su efecto antimicrobiano

frente a microorganismos como *Escherichia coli* y *Candida albicans* es aún limitada, lo que representa un vacío importante en el conocimiento sobre su capacidad inhibitoria y su uso potencial como agente antimicrobiano.

En ese sentido, en el estudio realizado por Jaramillo (2019) reportó que el perfil químico lo domina los monoterpenos por lo tanto el rendimiento del aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo) fue del 42,2%), pulegone (20,9%), carvona (7,5%), cariofileno (4,1%) y trans-carveol (3,8%)”, para completar la información en el siguiente estudio (Saltos et al., 2022) analizaron el aceite esencial proveniente del norte de Perú y encontraron 26 compuestos que representan el 67,1 % del aceite total, destacándose el α -terpineno (31,57%), isocariofileno (6,61 %), piperitona (5,61 %), β - trans-ocimeno (4,93 %) y 6-alil-o- cresol (4,63 %), lo que confirma que los monoterpenos son los constituyentes predominantes.

En un estudio realizado por Martínez y Oviedo (2019), el aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo) presentó actividad antimicrobiana frente a *Enterobacter sp.* y levaduras (CMI 1,62 – 6,48 mg/mL), mientras que *Pseudomonas sp.* mostró resistencia a las concentraciones probadas. Estos resultados respaldan la potencial bioactividad de los aceites esenciales de palo santo frente a microorganismos de importante relevancia por sus afecciones clínicas.

En función a lo anterior, a pesar de que las investigaciones realizadas hasta el momento proporcionan indicios iniciales de la acción antimicrobiana del aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo), existen aún vacíos importantes que limitan la comprensión integral de su potencial biológico. Específicamente, una porción considerable de los trabajos publicados se ha enfocado en análisis cualitativos o semicuantitativos basados en métodos como difusión de agar, microdilución en caldo, constituyen una alternativa adecuada para la determinación cuantitativa de la concentración mínima inhibitoria (CMI) (Chouhan et al., 2017). Adicionalmente, la

bioautografía acoplada a cromatografía en capa fina facilitando la correlación entre la actividad antimicrobiana y los compuestos presentes en el aceite esencial (Horváth et al., 2010).

De igual forma, la composición química del aceite esencial muestra fluctuaciones, condicionada por elementos como la procedencia geográfica, los factores ambientales y el proceso de obtención, lo cual complica la generalización de los hallazgos previos y acentúa la exigencia de producir evidencia experimental en condiciones reguladas.

Por otro lado, son limitadas las investigaciones que combinan mediciones cuantitativas, por ejemplo, la concentración mínima inhibitoria (CMI), con metodologías auxiliares que faciliten la correlación de la actividad antimicrobiana con constituyentes específicos, como la bioautografía. Por lo tanto, la carencia de datos sistemáticos y cuantificables acerca del efecto inhibitor del aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo) contra *Escherichia coli* y *Candida albicans* fundamenta la ejecución de este trabajo, el cual pretende no solamente verificar dicha actividad antimicrobiana, sino también aportar a una caracterización más exacta y replicable de su impacto frente a microorganismos de importancia clínica, consolidando de esta manera la base científica para su eventual uso como agente antimicrobiano de origen natural.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Evaluar *in vitro* la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo) frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans* para su uso como potencial antimicrobiano.

1.5.2 Objetivos específicos

- Identificar mediante cromatografía (TLC) y bioautografía los metabolitos secundarios que contiene el aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo) responsable de la actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans*.
- Determinar *in vitro* la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo) frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans* mediante el método de microdilución en microplaca para su posterior uso.
- Comparar la efectividad *in vitro* del aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo) frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans* mediante los valores obtenidos del CMI, identificando el microorganismo más sensible.

1.6 Hipótesis

El aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo) posee metabolitos secundarios que tienen la capacidad antimicrobiana para inhibir el crecimiento de *Escherichia Coli* y *Candida Albicans*.

CAPÍTULO II

2. Marco de referencia

2.1 Antecedentes de la investigación

En un estudio realizado por Martínez & Oviedo (2019) se evaluó el aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo) extraído por destilación de arrastre de vapor (rendimiento 1,25 %) y determinado su composición por GC-MS, encontrando que el compuesto mayoritario fue D-limoneno (77,6 %). La actividad antimicrobiana *in vitro* frente a microorganismos aislados del pescado *Kajikia audax* mostró una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 1,62 mg/mL para *Aeromonas salmonicida* y 6,48 mg/mL para *Pichia kudriavzevii*, mientras que *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobiano del aceite de palo santo, pero también evidencia la necesidad de seguir investigando frente a otros microorganismos clínicos relevantes.

Según en el estudio de Fon-Fay et al., (2017) “Actividad antimicrobiana de aceites esenciales de *Ocotea quixos*, *Bursera graveolens*, *Cymbopogon citratus* y *Curcuma longa* sobre microorganismos contaminantes de alimentos”, se observó que el aceite esencial de *Bursera graveolens* presentó actividad antimicrobiana al compararlo con otros aceites vegetales frente a cepas contaminantes. Aunque no se detalló la CMI para todos los microorganismos, se concluyó que dicho aceite mostró “strong antimicrobial activities” frente a ciertas bacterias y hongos, lo cual respalda su potencial bioactivo y la necesidad de profundizar su evaluación cuantitativa frente a cepas patógenas como *Escherichia coli* o *Candida albicans*.

Un estudio clave para tu investigación es el desarrollado por Sotelo et al., (2017), quienes

evaluaron la composición química y la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Bursera graveolens* obtenido del norte de Perú. Los autores identificaron 26 compuestos que representan el 67,1 % del aceite, destacándose como componente mayoritario el α -terpineno (31,57 %), junto con isocariofileno, piperitona y β -trans- ocimeno. En cuanto a la actividad biológica, demostraron que el aceite esencial presenta una acción antimicrobiana notable frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas y levaduras, incluyendo microorganismos de relevancia clínica como *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

2.2 Marco conceptual

Los metabolitos secundarios son compuestos orgánicos producidos por plantas y microorganismos que no participan directamente en las funciones esenciales de crecimiento, pero cumplen roles ecológicos como defensa, comunicación o competencia (Dewick, 2009; Pérez Urria Carril & Ávalos García, 2009).

La cromatografía de capa delgada (TLC) junto con bioautografía permite correlacionar la separación de componentes del aceite esencial con su efecto inhibitorio, facilitando la identificación de los metabolitos responsables de la actividad antimicrobiana (Horváth et al., 2013).

De acuerdo con Supino (1995) el ensayo colorimétrico MTT se fundamenta en la habilidad de las células vivas para transformar una sal de tetrazolio soluble, el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), en un compuesto de formazán insoluble. Las sales de tetrazolio actúan como aceptoras de electrones procedentes de sustratos oxidados o de enzimas específicas, como NADH y NADPH. En concreto, la reducción del MTT ocurre en los sitios de ubiquinona y de los citocromos b y c pertenecientes a la cadena de transporte de electrones de la

mitocondria, y es consecuencia de la actividad de la enzima deshidrogenasa.

La microdilución es una técnica estandarizada utilizada para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante diluciones seriadas del agente antimicrobiano en microplacas de 96 pozos. Según Wigand, Hilpert y Hancock (2008).

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante la microdilución en caldo es un método ampliamente estandarizado para evaluar la actividad antimicrobiana de aceites esenciales, permitiendo identificar la menor concentración que inhibe el crecimiento microbiano (Tóth et al., 2022), aplicando el método colorimétrico de TTC (cloruro 2,3,5-trifeniltetrazolio) el cual permite visualizar la viabilidad celular.

CAPITULO II

2.3 Bases teóricas

2.3.1 Plantas medicinales

A través de los años, las especies vegetales con propiedades curativas han constituido el pilar fundamental de la medicina tradicional. La interacción perdurable entre los seres humanos y las plantas medicinales ha permitido acumular un conocimiento profundo sobre su empleo, especialmente en las comunidades rurales, donde se han erigido como una opción valiosa para el mantenimiento y la recuperación de la salud (Carranza et al., 2021). Utilizados en formas de extractos naturales y aceites esenciales para aprovechar sus propiedades terapéuticas.

Los aceites esenciales son productos que han sido muy requeridos desde tiempos de antigüedad por sus varias propiedades medicinales. Sin embargo, en los últimos años se ha generado un significativo interés por sus potenciales usos en el ámbito terapéutico (Cañigueral, 2007).

2.3.2 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son considerados mezclas de diferentes sustancias químicas producidas de manera natural por las plantas y que les otorga ese olor característico a flores, hojas, frutos, árboles, semillas y especias. Son metabolitos secundarios cuya característica química principal es que son volátiles por ende se vaporan de manera muy rápida y tienen una baja densidad. De acuerdo con sus características tienen propiedades diferentes dependiendo el solvente en el caso del agua son insolubles, en el vinagre son levemente solubles y en aceites vegetales, ceras, alcohol, grasas son completamente solubles (Peredo Luna et al., 2009; Martínez, 2001).

2.3.2.1 Propiedades físicas y químicas de los aceites esenciales

La composición de los aceites esenciales consiste en una mezcla compleja de sustancias de variada estructura química, cuya síntesis principalmente mediante dos rutas biosintéticas: la de metil-eritritol y la del ácido shikímico (Barotto, 2021).

En su composición química presentan una fracción de hidrocarburos como compuestos oxigenados tales como: cetonas, alcoholes, 1,3-benzodioxoles y furanocumarinas, etc. Generalmente suelen encontrarse en la parte aérea de las plantas, por otra parte, los hidrocarburos se encuentran mayormente en las raíces (Vargas y Bottia como se citó en Noel & Oviedo Casariego, 2019).

Los fenilpropenos tienen en su estructura un anillo aromático que constituye de seis carbonos. Se ha establecido que existen más 1000 monoterpenos y 3000 sesquiterpenos, y solo se han estudiado fenilpropenos. Y asimismo componentes importantes como los genoles esterés fenólicos, ácidos esterificados, lactonas, óxidos, acetales, aminas y compuestos con nitrógeno (Noel Martínez & Oviedo Casariego, 2019).

Los aceites esenciales generalmente son volátiles y son líquidos a temperatura ambiente. Cuando recién son destilados no presentan algún color o son levemente amarillos. La viscosidad es menor a la del agua, tienen un índice de refracción elevado. Son solubles en alcohol y disolventes orgánicos habituales, por ejemplo: éter o cloroformo, y alcohol. Son arrastrables por el vapor de agua (Noel Martínez & Oviedo Casariego, 2019; Martínez, 2001).

2.3.2.2 Origen de los aceites esenciales

Puede ser naturales, artificiales y sintéticos.:

Los naturales se obtienen directamente de la planta sin sufrir modificaciones químicas ni

físicas. En cambio, los que son artificiales 13 se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia (Noel Martínez & Oviedo Casariego, 2019).

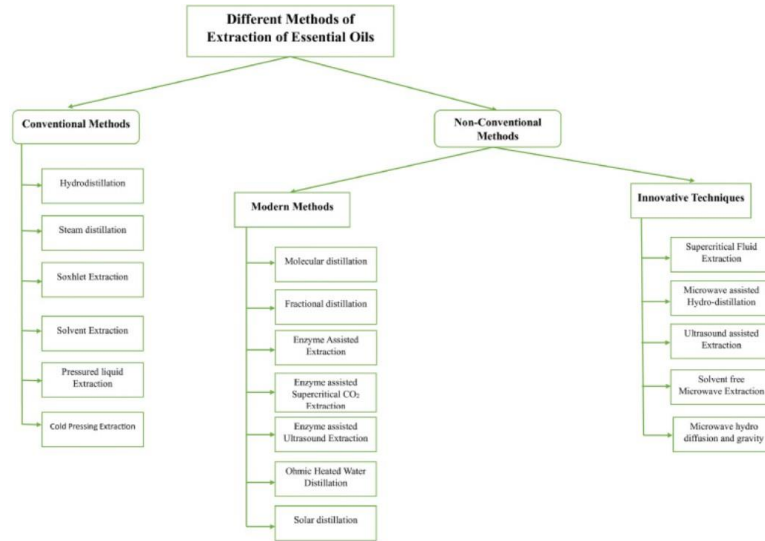
Los aceites esenciales sintéticos son los producidos que por la combinación de sus componentes son la mayoría de las veces producidos por procesos de síntesis química. Estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes (esencias de vainilla, limón, fresa, etc.) (Vargas y Bottia, 2008, Noel Martínez & Oviedo Casariego, 2019).

2.3.2.3. Métodos de extracción de aceites esenciales

La elección del método de extracción para obtener aceites esenciales de distintas partes de la planta varía según la fuente vegetal y las condiciones específicas. Se presentan las diferentes técnicas de extracción disponibles a partir de materiales vegetales. Cabe señalar que un proceso de extracción inadecuado puede alterar negativamente la bioactividad y las cualidades naturales de los aceites esenciales (Nabi et al., 2025).

Figura 1.

Diferentes métodos de extracción de aceites esenciales



Nota. La figura muestra los diferentes métodos por los cuales se puede extraer aceites esenciales.

Fuente: Nabi et al., (2025).

Existen diferentes técnicas por las cuales se puede extraer el aceite esencial, tales como la destilación con vapor, hidro difusión, maceración, la extrusión mecánica (frio) y extracción con fluido supercrítico (EFS). Los diferentes aceites esenciales extraídos por los distintos métodos pueden ser inevitables para ser refinados o procesados. Debido a una combinación apropiada de los anteriores procesos o por redestilación, fraccionamiento, cromatografía, cristalización, tratamiento químico, etc. Dependiendo de donde venga la materia prima y la calidad de los productos y sus especificaciones (Noel Martinez & Oviedo Casariego, 2019).

2.3.2.3.1 Destilación por arrastre de vapor

Este método de extracción, ampliamente implementado a gran escala, se basa en la exposición del material vegetal (previamente humedecido o dispuesto sobre agua) al vapor de agua caliente. El vapor altera las paredes celulares, liberando los aceites volátiles. La mezcla gaseosa se conduce a un condensador, donde se obtienen un destilado que combina agua y aceite esencial. El

proceso, que puede realizarse con equipos como el aparato Clevenger, alcanza su máximo rendimiento en torno a las dos horas, observándose que una mayor temperatura del vapor incrementa proporcionalmente la cantidad de aceite obtenido (Peredo -Luna et al., 2009).

2.3.2.3.2 Extracción Soxhlet

La extracción Soxhlet constituye un procedimiento continuo de tipo sólido/líquido empleado para aislar compuestos de baja solubilidad, como aceites esenciales de plantas aromáticas (clavo, canela, menta, etc)(Nabi et al., 2025). El proceso, que puede durar varias horas, consiste en la circulación y condensación constante de un disolvente a través de la materia prima (Nabi et al., 2025).

Su eficacia de extracción y rendimiento dependen críticamente del disolvente utilizado y del tiempo de extracción, pudiendo obtenerse mayores cantidades de aceite con procesos más prolongados (Nuñez, 2008).

2.3.2.3.3 Extracción de Fluidos Super crítico (SFE)

La extracción de fluidos super críticos es un método de extracción en el cual su principio se basa en usar fluidos en estado crítico como lo es el CO₂, que se encuentra en estado líquido y gaseoso. Sirve para extraer compuestos de matrices ya sea en estado líquido o sólido como los aceites esenciales (Nabi et al., 2025).

Este método permite obtener compuestos con mayor pureza, con mayor rendimiento y de esta manera mejor actividad antioxidante y biológica. Asimismo, puede extraer compuestos que por otros métodos no es posible. Sin embargo, aún es muy limitante ya que los equipos tienen un elevado costo, el CO₂ presenta una baja capacidad para extraer compuestos muy polares y su

operatividad es muy compleja (Nabi et al., 2025; Cuellar Aquino & Cesar Tafur Sotelo, 2017).

2.3.4 *Bursera graveolens* (Palo Santo)

Bursera graveolens o también conocido como palo santo, es una especie forestal representativa y de gran importancia, se encuentra específicamente en la región sur occidental de la provincia de Loja, en los cantones de Zapotillo, Macará y Paltas (Saltos et al., 2022) . El aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo) tiene propiedades antisépticas, analgésicas y sedantes, las cuales son empleadas principalmente en aplicación tópica diluida en aceite vegetal, aliviando o contrarrestando dolores reumáticos. “Así como en difusión atmosférica o en inhalación directa (envase, pañuelo, muñecas) para estados de estrés, ansiedad o insomnio” (Cañarte Vélez & Ponce Párraga, 2021).

Por ello, resulta muy conveniente su aplicación como antiséptico atmosférico, purificando el aire de nuestro hogar o lugar de trabajo, también es muy interesante ya que permite favorecer la meditación y la conexión espiritual, a tal razón se ha vuelto de uso muy práctico en la disciplina del yoga (AromaTraining, 2020, Cañarte Vélez & Ponce Párraga, 2021).

Figura 2.

Bursera graveolens (palo santo)



Nota. La figura muestra al árbol de *Bursera graveolens* (palo santo) creciendo en zonas áridas. Fuente: (Manzano, 2008).

Figura 3.

Clasificación taxonómica de la especie Bursera graveolens (palo santo)

Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Sapindales
Familia	<i>Burseraceae</i>
Género	<i>Bursera</i>
Especie	<i>Bursera graveolens</i> (Kunth) Triana y Planch
Nombre Vulgar	Palo santo

Nota. Descripción taxonómica Fuente: (Puecas, 2010)

2.3.4.1 Hábitat

Bursera graveolens (palo santo) se puede encontrar en México, Cuba, Islas Galápagos y al norte del Perú. Es un árbol caducifolio y crece en la parte baja de las vertientes occidentales del norte peruano, de 800 a 1200 m.s.n.m. Se encuentra a escasos metros del océano Pacífico en el departamento de tumbes; también en los distritos de Papayal, Matapalo, Pampas de Hospital (Noel Martínez & Oviedo Casariego, 2019).

2.3.4.2 Descripción botánica

El árbol de *Bursera graveolens* (palo santo) se desarrolla en función de la calidad del sitio y los factores ambientales, con condiciones favorables puede llegar a tener alturas de hasta 15 metros, con copa aproximada de 12 metros de diámetro, al frotar con las manos el árbol de palo santo se puede sentir una sensación muy agradable y refrescante, esto debido a su aroma y perfume característico que empieza a extenderse. Cuando está foliado es de color verde y exuberante (Manzano, 2008).

Las hojas se presentan compuestas, imparipinadas y alternas, pueden llegar a tener entre 3 a 4 pares de foliolos, en algunos casos hasta 9 foliolos y su borde es aserrado-dentado. Son pequeñas bifoliadas, tienen un aroma característico a las demás partes del árbol. Esta especie inicia su proceso de floración a fines de abril (Noel Martínez & Oviedo Casariego, 2019).

2.3.4.3 Composición química del aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo)

La composición química y la actividad farmacológica de *Bursera graveolens* (palo santo) han sido investigadas por diversos autores, cuyos hallazgos sobre los extractos y el aceite esencial, reflejan su variabilidad significativa del contenido de metabolitos secundarios dependiendo de la parte vegetal utilizada. Los estudios reportan en el aceite esencial los compuestos responsables de su aroma balsámico, dulce y picante característico. En especímenes de origen ecuatoriano se ha

identificado limoneno y α -terpinol en los tallos (Manzano Santana et al., 2009) .

Por otro parte, de la madera en virutas se han aislado compuestos como el (-)-dihidro- α -agarofurano y el (-)-10-epi-g-eudesmol. En material vegetal colectado en el Cañon del Chicamocha (Colombia), se encontraron limoneno, óxido de cariofileno y trans-cariofileno en las hojas, mientras que en los tallos se detectaron limoneno, mirceno y mentofurano (Manzano Santana et al., 2009). La investigación también ha incorporado, mediante técnicas como la cromatografía de gases-olfatometría (GC-O), la evaluación de compuestos aromáticos activos como el cicloteno y la vainillina (Manzano Santana et al., 2009).

Figura 4.

*Composición química del aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo Santo).*

El aceite extraído del <i>Bursera graveolens</i> (palo santo) tiene la siguiente composición química de la esencia de palo santo.		
Análisis	GC	MS
Alfa-Pinene	0.70	0.66
Limonene	62.88	34.16
Mentofurano	0.70	6.07
Terpien-4-Olo	0.60	0.54
Alfa-Terpineolo	23.53	19.67
Carvone	3.68	4.05
Sesquiterpeni	3.95	23.53
Ácido acetico	V.O	0.1360
Ácido Guayeretico	C.R	0.007

Nota. Se detalla la composición química del aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo)

Fuente:(Manzano, 2008).

2.3.4.4 Los compuestos terpenoides y sus propiedades

Los terpenoides, como el carvacol, limoneno, linalool, α -terpineno y timol, son compuestos que puede obtenerse de diversas plantas y poseen una amplia gama de efectos biológicos, incluyendo propiedades antimicrobianas contra bacterias, hongos y parásitos. Aunque estos compuestos presentan baja toxicidad y son fácilmente accesibles en la naturaleza, su aplicación clínica se encuentra aún restringida debido a que requieren concentraciones inhibitorias relativamente altas (IC50) (Gallegos et al., 2019). Esta limitación ha motivado a la comunidad científica a investigar, analizar y aprovechar el potencial antimicrobiano de los terpenoides, particularmente en estudios que demuestran su capacidad para inhibir el crecimiento de un amplio espectro de bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas (Gallegos et al., 2019).

2.3.4.5 Propiedades fisicoquímicas y organolépticas del aceite esencial del *Bursera graveolens* (palo santo)

A continuación, se indican las diferentes propiedades que se han descrito hasta la actualidad.

Tabla 1.

Propiedades fisicoquímicas del aceite esencial Bursera graveolens (palo santo)

Parámetros	Valor
Densidad	0.5444 g/cm ³ \pm 0.0099
Índice de refracción (a 20 °C)	1.47564 nD \pm 0.0001
Solubilidad	Etanol (30 %, 50%, 80%), glicerina
pH	4.5 \pm 0.1

Nota. Fuente: Manzano Santana et al. (2009, p. 47), Bravo (2014, p. 26), Carrión – Paladines et al.

(2016, p. 2), Sagnay et al., 2021).

Tabla 2.

Propiedades organolépticas del aceite esencial de las diferentes partes de la planta

Parámetros	Características		
	Fruto fresco	Fruto seco	Madera
Color	Incoloro	Incoloro Traslúcido	Amarillo dorado
Olor	Fragante	Cítrico- amaderado	Amaderado
Aspecto	Líquido	Líquido viscoso	Dulce

Nota. Fuente: (Chiado (2017, p. 55 – 56); Bravo (2014, p. 26); Sagnay et al., 2021).

2.3.5 El aceite esencial como agente antimicrobiano

Teniendo en cuenta la gran variedad de compuestos químicos que contiene un aceite esencial, es muy probable que su actividad antimicrobiana no se deba a un metabolito secundario específico, sino a la combinación de varios de ellos sobre distintas partes de la célula microbiana (Reyes y Jurado, 2014).

El efecto que pueden tener los aceites esenciales frente a los microorganismos siempre es diferente, la actividad antimicrobiana se puede evaluar como la concentración mínima inhibitoria, esto significa determinar la concentración mínima requerida del aceite esencial de alguna planta que tenga la capacidad de detener el crecimiento de los microorganismos como pueden ser las propiedades bactericidas. O también la concentración mínima letal que asegure la eliminación de un 99.9% de toda la población de los microorganismos (Reyes y Jurado, 2014). Por lo tanto, se podría decir que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales depende específicamente de:

su carácter hidrofílico e hidrofóbico, sus componentes químicos y el tipo de microorganismo sobre el cual actúan (Noel Martínez & Oviedo Casariego, 2019).

Actualmente, diversos estudios sobre aceites esenciales han demostrado que su fase de vapor presenta eficacia frente a varias bacterias patógenas, incluidas bacterias Gram negativas (López et al., 2005). Investigaciones posteriores señalan que esta actividad está relacionada principalmente con su composición química, destacando a los monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos como los compuestos que probablemente generan el efecto antimicrobiano (Kalemba & Kunicka, 2003).

2.3.6 Métodos utilizados para la determinación de la actividad antimicrobiana

Existen diversos métodos para determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* mediante el uso de extractos, aceites esenciales o compuestos puros, los más conocidos incluyen la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), el contacto directo, difusión en agar, dilución en caldo o agar, fase vapor y otros menos utilizados como el citofluorométricos y bioluminiscentes los cuales proporcionan información sobre la naturaleza del efecto inhibitor ya sea bactericida o bacteriostático (Balouiri et al., 2016).

2.3.5.1 Técnica de Bioautografía para la identificación de los posibles metabolitos que tienen actividad antimicrobiana.

La bioautografía directa es una técnica ágil y de ejecución sencilla, cuya principal ventaja radica en permitir la visualización directa de la actividad antimicrobiana sobre la placa cromatográfica. Este enfoque facilita la identificación inmediata de las fracciones o bandas que poseen la capacidad inhibitoria frente al microorganismo ensayado (Horváth et al., 2010); (Choma & Jesionek, 2015).

La bioautografía constituye un enfoque analítico que combina la detección de actividad antimicrobiana con las técnicas de cromatografía en capa fina. Su fundamento es la capacidad inhibitoria (antibacteriana o antifúngica) de los compuestos separados en la placa TLC. Esta revisión examina tres modalidades principales: bioautografía por contacto, por inmersión y directa, dedicando especial atención a esta última. Se describen sus aplicaciones, que van desde el análisis de distintos tipos de sustancias hasta el estudio de procesos bioquímicos y factores que modulan el crecimiento microbiano. De igual forma, se discuten métodos complementarios que pueden integrarse a la bioautografía directa, destacando entre ellos, por su potencial, el cribado por bioluminiscencia acoplado a cromatografía en capa fina (TLC) (Choma & Grzelak, 2011).

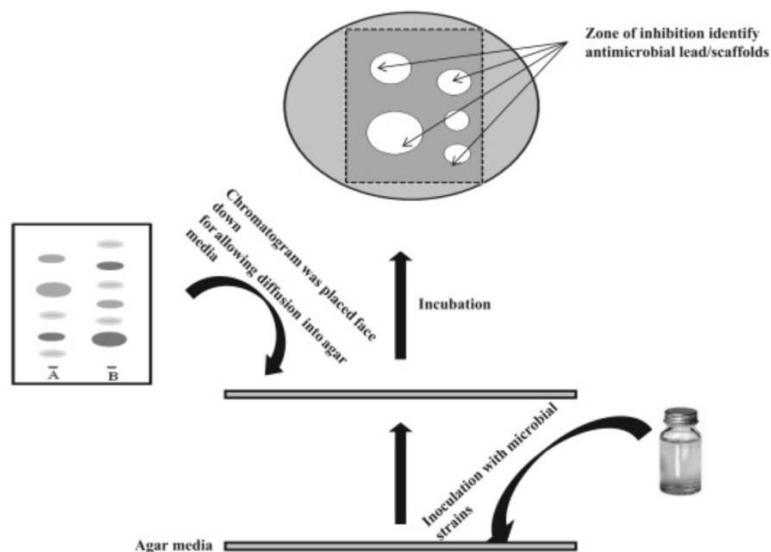
2.3.5.1.1 Técnica de bioautografía por contacto

El método de bioautografía por contacto se realiza colocando una placa de cromatografía en capa fina (TLC), ya desarrollada, directamente sobre la superficie de un agar que ha sido inoculado con el microorganismo estudiado. Después de un tiempo de contacto definido, se retira la placa y el medio de cultivo se somete a incubación. Durante el contacto, los compuestos activos migran desde la placa cromatográfica hacia el agar, generando zonas claras de inhibición del crecimiento que indican la ubicación de los metabolitos con propiedades antimicrobianas (Choma & Jesionek, 2015).

Esta técnica minimiza la exposición directa de los microorganismos al material adsorbente de la placa, por lo que resulta especialmente adecuada para trabajar con cepas sensibles o con compuestos que poseen una buena capacidad de difusión en el medio sólido. No obstante, su eficacia está condicionada por la difusibilidad de las moléculas en el agar, lo que puede dificultar la detección de aquellas sustancias que son marcadamente hidrofóbicas (Dewanjee et al., 2015).

Figura 5.

Esquema de la bioautografía por contacto.



Nota. Figura tomada de Fuente: (Dewanjee et al., 2015)

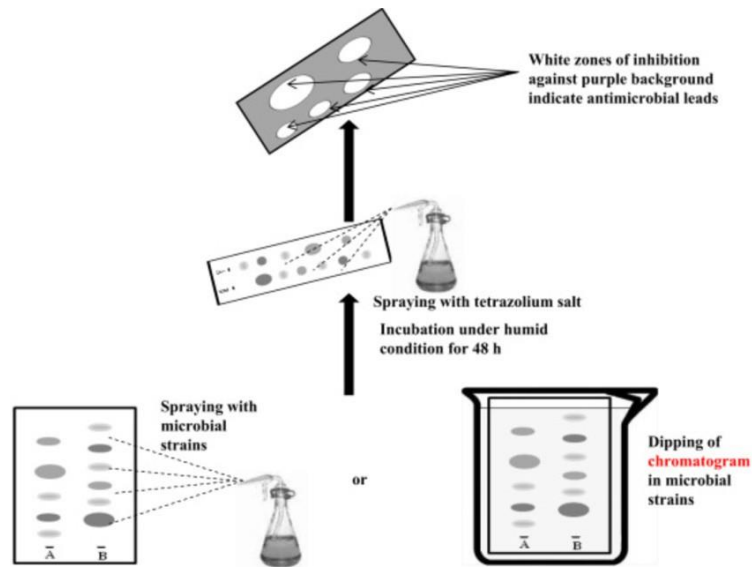
2.3.5.1.2 Técnica de bioautografía directa

La bioautografía directa es la técnica de mayor uso por su simplicidad operativa y rapidez de ejecución. El procedimiento consiste en aplicar, usualmente por aspersion, una suspensión del microorganismo directamente sobre la placa de cromatografía en capa fina (TLC), una vez que se ha completado la separación de los compuestos y se ha evaporado totalmente el disolvente. Luego, la placa se incuba en condiciones óptimas para el desarrollo microbiano. La presencia de sustancias activas se revela como zonas claras o halos de inhibición, en contraste con el crecimiento visible del microorganismo en el resto de la placa (Choma & Jesionek, 2015).

Este formato facilita una interacción inmediata entre los metabolitos separados y las células microbianas, lo que resulta muy efectivo para evaluar muestras como aceites esenciales. Sin embargo, la fiabilidad del ensayo puede verse comprometida por factores como la persistencia de trazas del disolvente de separación o por posibles efectos tóxicos del material adsorbente utilizado en la placa sobre el cultivo microbiano (Dewanjee et al., 2015).

Figura 6.

Diagrama del procedimiento de bioautografía directa.



Nota. La figura presenta el procedimiento del método de bioautografía directa. Fuente: (Dewanjee et al., 2015)

2.3.5.1.3 Técnica de bioautografía por inmersión o superposición en agar

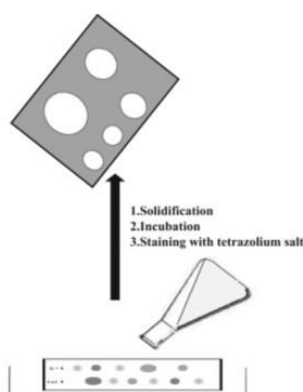
El método de superposición de agar integra principios de la bioautografía por contacto y la directa. En este procedimiento, sobre el cromatofolio ya desarrollado se vierte una capa de agar fundido que ha sido inoculado previamente con el microorganismo de interés. Una vez solidificado el medio, se procede a la incubación y posterior tinción, generalmente con una sal de tetrazolio (como MTT) la cual es reducida por las células viables al derivado correspondiente de formazán produciendo un color violeta intenso lo que permite visualizar las bandas donde se inhibe o se permite el crecimiento microbiano (Dewanjee et al., 2015).

Una variante específica para bacterias Gramnegativas utiliza un agar inoculado

con *Serratia marcescens*, un microorganismo que produce un pigmento rojo natural. Tras la incubación, las zonas donde hay compuestos activos aparecen como áreas blancas o de un tono amarillo pálido, destacando sobre el fondo rojo del gel (Choma & Grzelak, 2011) ;(Dewanjee et al., 2015).

Figura 7

Diagrama del procedimiento del método de bioautografía por inmersión o superposición en agar.



Nota. La figura presenta el procedimiento del método de bioautografía por inmersión o s. Fuente:

(Dewanjee et al., 2015)

2.3.5 Métodos utilizados para la determinación de la actividad antimicrobiana

Existen diversos métodos para determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* mediante el uso de extractos, aceites esenciales o compuestos puros, los más conocidos incluyen la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), el contacto directo, difusión en agar, dilución en caldo o agar, fase vapor y otro menos utilizados como el citofluorométricos y bioluminiscentes los cuales proporcionan información sobre la naturaleza del efecto inhibitor ya sea bactericida o bacteriostático (Balouiri et al., 2016).

2.3.5.1 Método de dilución y micro-dilución en caldo

El método de dilución y microdilución seriada se lleva a cabo en tubos o pocillos con medios líquidos (caldos), los cuales contienen concentraciones decrecientes (serie de dilución doble) 1:2 de AE diluido en el caldo, en el cual se inocula un número definido de células bacterianas. El volumen final de la prueba define si el método se denomina de dilución (cuando se utilizan tubos con un volumen total de 1-10 mL) o de microdilución (si se realiza en placas de pocillos usando un máximo de 500 µL por pocillo). Posterior a la incubación (16-24 h dependiendo del microorganismo), la presencia de turbidez o sedimentación indica crecimiento del microorganismo. Finalmente, para rectificar la inhibición, se toman alícuotas de los tubos o pocillos sin turbidez y se hace un sembrado en agar o por la adición de un indicador colorimétrico como el TCC. La CMI en esta técnica se determina de acuerdo con la concentración más baja que impide el crecimiento visible del microorganismo. Estos métodos son mayormente utilizados en estudios con bacterias (Noel Martínez & Oviedo Casariego, 2019).

2.3.6 Microorganismos de estudio: *Escherichia coli* y *Candida albicans*

2.3.6.1 *Escherichia coli*

La bacteria *Escherichia coli* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y habita, generalmente de forma inocua, en altas concentraciones dentro de la microflora intestinal de humanos y animales. No obstante, cuando se localiza en otros sitios del organismo, este microorganismo puede ocasionar enfermedades graves, tales como infecciones del tracto urinario, bacteriemia o meningitis. Además, ciertas cepas con capacidad enteropatógena, aunque menos numerosas, son responsables de causar cuadros de diarrea aguda (Alejandro, 2016).

Se han clasificado diferentes tipos de *Escherichia coli* según sus factores de virulencia y los cuadros clínicos que producen. Los más relevantes incluyen las variantes enteropatógena (EPEC),

enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC) y uro patógeno (UPEC). Estas cepas patogénicas expresan estructuras de adhesión, producen toxinas y emplean sistemas especializados de secreción, mecanismos que les permiten adherirse a tejidos, alterar funciones celulares y eludir la respuesta inmunitaria del hospedador, potenciando así su capacidad para causar infección (Croxen et al., 2013).

2.3.7.1.2 Características morfológicas de la *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo de la familia *Enterobacteriaceae*, de dimensiones variables entre 0,3 y 1-6 micrómetros. Esta bacteria presenta movilidad activa mediada por múltiples flagelos de disposición peritrica que cubren su superficie celular. No tiene capacidad de esporulación y su metabolismo es anaerobio facultativo, lo que le permite desarrollarse tanto en medios de cultivo enriquecidos como selectivos (Fernández & Peláez, 2021).

Desde el punto de vista bioquímico, sus requerimientos nutricionales son relativamente simples: fermenta glucosa, reduce nitratos, da una reacción positiva para la catalasa y negativa para la oxidasa. En el cultivo, sus colonias presentan características distintivas según el medio utilizado: exhiben un brillo verde-metálico en Agar Eosina Azul de Metileno (EMB), una coloración rosada en Agar MacConkey, y en Agar sangre se observan como colonias blanquecinas que pueden mostrar diversos grados de hemólisis (Fernández & Peláez, 2021).

2.3.7.1.2.2 Mecanismos de defensas de la *Escherichia coli*

De esta manera, la bacteria *Escherichia coli* combate diferentes compuestos naturales como los aceites esenciales y de qué manera desarrolla su capacidad de defensa.

- **Primera capa de defensa, una barrera natural:** *Escherichia coli*, al ser una bacteria Gram negativa, tienen una pared celular singular. Su capa más externa es

rica en lipopolisacáridos (LPS), que funciona como un muro inteligente y selectivo. Esta membrana está diseñada para bloquear el paso de moléculas hidrofóbicas, es decir, aquellas que tienden a repelar el agua, como muchos componentes de los aceites esenciales. Es como una primera barrera de seguridad que limita la entrada de estos compuestos antes de que puedan actuar (Nikaido, 2003).

- **Las bombas de flujo, un sistema de expulsión:** Si un compuesto logra traspasar la membrana externa, *Escherichia coli* tiene un sistema de respuesta activa. Posee mecanismos moleculares especializados, conocidos como bombas de flujo (como sistema AcrAB-TolC), que actúan como aspiradoras celulares. Estas bombas detectan y expulsan activamente una amplia gama de sustancias extrañas incluyendo los compuestos hidrofóbicos y muchos antibióticos. Cuando estas bombas se vuelven demasiado activas, reducen drásticamente la concentración del agente antimicrobiano dentro de la bacteria, haciéndola más resistente (X. Z. Li et al., 2015).
- **Modificación de su estructura para adaptarse:** Frente a una amenaza persistente, *Escherichia coli* no se queda pasiva. Puede reconfigurar su propia estructura de defensa. De manera puntual, altera la composición de las grasas (lípidos) que forman sus membranas. Cambiando la proporción entre ácidos grasos saturados e insaturados, consigue que su membrana sea más rígida y compacta (Denich et al., 2003).
- **Una adaptación progresiva tras exposiciones repetidas (resistencia) :** Existe un fenómeno crucial, si la bacteria se expone de forma repetida a pequeñas dosis (subletales) de estos compuestos, puede activar sistemas internos de respuesta al

estrés. Esto pone en marcha genes relacionados con la tolerancia química y la reparación celular. Con el tiempo, estas exposiciones continuas pueden entrenar a la bacteria, permitiéndole desarrollar una resistencia cada vez mayor y más estable. Este es uno de los principales desafíos para usar compuestos naturales como alternativa antimicrobiana, ya que resalta la necesidad de emplearlos de manera controlada y efectiva para evitar que las bacterias aprendan a defenderse (Poole, 2012).

2.3.7.1.3 *Escherichia coli* ATCC 25922

Escherichia coli ATCC 25922 es una cepa bacteriana caracterizada por la American Type Culture, es una bacteria ampliamente utilizada como microorganismo de referencia en pruebas microbiológicas, particularmente en ensayos de susceptibilidad a antibióticos y de seguridad alimentaria. A diferencia de las variantes patógenas como *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* ATCC 25922 se considera como una cepa sustituta segura debido a su naturaleza no virulenta, por lo que su manejo es adecuado en entornos de laboratorio estándar sin plantear riesgos significativos para la salud (American Type Culture, 2024).

2.3.6.2 *Candida albicans*

Candida albicans es un hongo levaduriforme de carácter oportunista, clasificado taxonómicamente dentro del Reino Fungi, Filo *Ascomycota*, clase *Saccharomycetes* y familia *Debaryomycetaceae*. Habita de forma comensal en el organismo humano, formando parte del microbiota habitual de superficies mucosas como la boca, el tracto digestivo, la vagina y la piel. En estado de equilibrio, su proliferación es regulada por las defensas inmunitarias del huésped y por la competencia con otros microorganismos de la flora normal. No obstante, ante la disfunción de estos mecanismos de control, *Candida albicans* puede adquirir un comportamiento patogénico,

desencadenado infecciones que van desde afecciones locales hasta formas diseminadas (Calderone & Fonzi, 2001).

Clínicamente, *Candida albicans* se reconoce como la especie más relevante dentro del género *Candida* en infecciones humanas, representando entre el 50% y el 70% de todos los diagnósticos de candidiasis. El espectro de enfermedades que produce es amplio, abarcando desde infecciones superficiales y localizadas, como la candidiasis oral o vaginal, hasta cuadros invasivos severos, como la candidemia y la candidiasis diseminada. Estas últimas conllevan una morbilidad y mortalidad, particularmente en pacientes con el sistema inmunológico debilitado (Regan et al., 2017).

2.3.7.2.1 Características morfológicas y fisiológicas de *Candida albicans*

Desde el punto de vista morfológico, *Candida albicans* se presenta como células ovaladas o elipsoidales, con un tamaño aproximado de 4–6 μm . Una de sus características más distintivas es su capacidad de dimorfismo, es decir, la habilidad de alternar entre diferentes formas morfológicas: levadura, pseudohifa e hifa verdadera. Esta transición morfológica está estrechamente relacionada con su virulencia, ya que las formas filamentosas facilitan la invasión tisular y la evasión de la respuesta inmune del hospedador (Łubiech & Twarużek, 2021).

En medios de cultivo como Agar Sabouraud dextrosa, *Candida albicans* forma colonias de color blanco cremoso, textura lisa y bordes regulares. Bioquímicamente, es una levadura fermentadora de glucosa y otros carbohidratos, catalasa positiva y capaz de crecer en condiciones aerobias y anaerobias facultativas. Además, presenta la capacidad de formar biofilms sobre superficies bióticas y abióticas, lo que incrementa significativamente su resistencia a antifúngicos y a agentes antimicrobiano (Saigal et al., 2011).

2.3.7.2.2 Mecanismos de resistencia de *Candida albicans*

En la actualidad, se ha observado un incremento en la resistencia de *Candida albicans* a los antifúngicos del grupo de los azoles, siendo el fluconazol uno de los más afectados. Esta resistencia está mediada por varios mecanismos que son importantes descrita por Calderone & Fonzi (2001):

- Cambios en la ruta metabólica de síntesis de ergosterol, componente fundamental de la membrana celular del hongo
- Aumento en la actividad de bombas de eflujo, como Cdr1p y Mdr1p, que expulsan de forma activa los fármacos desde el interior de la célula.
- Mutaciones en el gen *ERG11*, las cuales disminuyen la capacidad del antifúngico para unirse a su blanco enzimático
- Formación de biopelículas, su habilidad para adherirse a superficies y formar biopelículas es particularmente importante en infecciones relacionadas con dispositivos médicos (catéteres, prótesis). Estas biopelículas poseen una arquitectura compleja que actúa como barrera, dificultando la acción de los fármacos antifúngicos y potenciando los mecanismos de resistencia.

Debido a la acción combinada de estos mecanismos, *Candida albicans* se ha convertido en un patógeno prioritario para la investigación de nuevas estrategias terapéuticas. Esto ha impulsado el estudio de alternativas como los aceites esenciales, cuyos componentes pueden actuar sobre la integridad de la membrana fúngica e interferir con el metabolismo del ergosterol (Cordonez, 2025).

2.3.7.2.3 *Candida albicans* ATCC 10231

Candida albicans ATCC 10231 es un hongo levaduriforme patógeno oportunista se cómo cepa estándar en pruebas antimicrobianas y en ensayos de CMI y control de calidad microbiológico debido a su estabilidad genética y comportamiento conocido frente a agentes antimicrobianos. Esta cepa es considerada una cepa de referencia universal para evaluar actividad antifúngica en laboratorio (American Type Cultura Collection, 2024)(Blanco et al., 1992).

CAPÍTULO III

3. Marco metodológico

3.1 Nivel de investigación

El presente trabajo de investigación se desarrolló bajo un enfoque metodológico descriptivo-comparativo. De manera descriptivo porque permitió evaluar la actividad inhibitoria del aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo) frente a *Escherichia Coli* ATCC 25922 y *Candida albicans* ATCC 10231 y es comparativo debido a que busca comparar diferencias significativas sobre la susceptibilidad de ambos microorganismos frente al aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo).

3.2 Diseño de investigación

El diseño de esta investigación es de tipo experimental con corte transversal con un enfoque cuantitativo *in vitro*, por lo que la variable independiente que corresponde a la concentración del aceite esencial *Bursera graveolens* (palo santo) que se opera para evaluar su efecto sobre la variable dependiente que corresponde a la inhibición del crecimiento antimicrobiano de *Escherichia Coli* ATCC 25922 y *Candida Albicans* ATCC 10231 por medio de microdilución. Este estudio se realizó bajo un tiempo determinado y en condiciones controladas. Este enfoque experimental permitió establecer una relación directa entre las concentraciones aplicadas del aceite esencial y los efectos biológicos observados en los ensayos microbiológicos.

3.3 Diseño de experimento

Para la evaluación del efecto antimicrobiano, se implementó un diseño experimental con corte transversal para determinar la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial *Bursera graveolens* (palo santo) frente a *Escherichia Coli* ATCC 15922 y *Candida Albicans* ATCC 10231. El estudio incluyó la evaluación de cada microorganismo y con la utilización de control positivo,

negativo, solvente y antibiótico que evitó resultados falsos. Los bioensayos se repitieron tres veces con tres replicas obteniendo un total de 30 unidades experimentales representadas en la Tabla (3 y 4).

Variable de entrada: Tratamientos Aceite esencial *Bursera graveolens* (palo santo)

Unidad experimental: 6 microplacas (aceite esencial + hongo) (aceite esencial+ bacteria).

Variable de salida: inhibición del crecimiento microbiana evaluada mediante la determinación del CMI.

Tabla 3

Tratamientos realizados con sus respectivos controles de Escherichia coli ATTC 25922

Tratamiento	Factor de entrada	Variable de Salida
1	Ae 1+ E + S	CMI
2 CP	E+ MD+ S	Presencia de crecimiento
3 CN	MD + S	Ausencia de crecimiento
4 CS	E + S	Presencia de crecimiento
5 CA	A1 + E	Ausencia de crecimiento

Nota. Ae 1: Aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo), E: Bacteria, CS: Control Solvente, CN: Control negativo, S: Solvente, A1: Antibiótico (ampicilina), MD: Medio de cultivo, CMI: Concentración mínima inhibitoria.

Fuente: Autora (2026)

Tabla 4.

.Tratamientos realizados con sus respectivos controles de Candida albicans ATTC 10231

Tratamiento	Factor de entrada	Variable de salida
1	Ae 1 + H + S	CMI
2 CP	H + MD + S	Presencia de crecimiento
3 CN	MD + S	Ausencia de crecimiento
4 CS	H + S	Presencia de crecimiento
5 CA	A1 + H	Ausencia de crecimiento

Nota. Ae 1: Aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo), H: Hongo, CS: Control Solvente, CN: Control negativo, S: Solvente, A1: Antibiótico (ampicilina), MD: Medio de cultivo, CMI: Concentración mínima inhibitoria. Fuente: Autora (2026).

3.4 Población y muestra

La población en esta investigación corresponde a los siguientes microorganismos, *Escherichia coli* ATTC 25922 la cual se obtuvo de los laboratorios de Microbiolab de Quito y *Candida Albicans* ATTC 10231 del banco de microorganismos del Laboratorio de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca. El aceite esencial caracterizado por GC/MS se adquirió en la empresa AROMAVIDA®.

3.5 Variables

3.5.1 Variable independiente: Las concentraciones de aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo).

Tabla 5

Tabla de variable independiente

Variable	Dimensiones	Indicadores
Concentración del aceite esencial de <i>Bursera graveolens</i> (palo santo)	Niveles de concentración	6000 µg/mL, 3000 µg/mL, 1500 µg/mL, 750 µg/mL, 375 µg/mL, 187.5 µg/mL, 93.75µg/mL, 46.87 µg/mL

Nota. Variable independiente que corresponde a la investigación Fuente: Autora (2026)

Tabla 6

Tabla de variable dependiente

Variable	Dimensiones	Indicadores
- Crecimiento microbiano evaluado con presencia y ausencia de crecimiento, utilizado como criterio para establecer la concentración mínima inhibitoria	Efecto inhibitorio del aceite esencial <i>Bursera graveolens</i>	Presencia de turbidez en el pocillo

Nota. Variable dependiente que corresponde a la investigación Fuente: Autora (2026)

3.5 Unidad experimental

La unidad experimental estuvo constituida por cada ensayo individual realizado para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la evaluación de la actividad antimicrobiana mediante bioautografía del aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo) frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Candida albicans* ATCC 10231.

En la CMI, la unidad experimental correspondió a cada pozo con una concentración específica del aceite esencial inoculado con el microorganismo de prueba, evaluándose la inhibición del crecimiento.

3.6 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

La recolección de datos se realizó mediante tres técnicas experimentales complementarias, orientadas a evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo) frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Candida albicans* ATCC 10231.

En primer lugar, se utilizó la bioautografía, con el fin de identificar los metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial que poseen actividad inhibitoria. Esta técnica permitió observar directamente las zonas de la placa cromatográfica donde se presentó halos de inhibición microbiana.

Para la determinación cuantitativa de la actividad antimicrobiana, se empleó la técnica de microdilución en caldo en placas de 96 pocillos, utilizada para obtener la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). La técnica permitió evaluar el crecimiento o inhibición de los microorganismos frente a concentraciones seriadas del aceite. La lectura de los resultados se realizó mediante el método colorimétrico con MTT permitiendo visualizar la viabilidad de los microorganismos y midiendo la absorbancia con el lector de microplacas, detectando cambios en la densidad óptica.

3.7 Técnicas de procesamiento y análisis de datos

Los datos obtenidos se clasificaron de acuerdo con cada microorganismo evaluado (*Escherichia coli* ATCC 25922 y *Candida albicans* ATCC 10231) y con el tipo de análisis realizado (bioautografía y CMI). Los valores de absorbancia de la microdilución fueron registrados y organizados en tablas de Excel, donde se realizó estadística descriptiva (promedios y desviaciones) de cada ensayo.

El análisis cualitativo para la técnica de bioautografía se realizó mediante la observación de zonas claras de inhibición asociadas a los metabolitos presentes en la placa de cromatografía, registrando el número de bandas activas frente a cada microorganismo.

Con el fin de comparar la sensibilidad de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Candida albicans* ATCC 10231 frente al aceite esencial *Bursera graveolens* (palo santo), se empleó un análisis gráfico logarítmico. Estos permitieron visualizar la dispersión, mediana y valores atípicos de las concentraciones inhibitorias obtenidas para cada microorganismo, facilitando la identificación del microorganismo más sensible. La interpretación se complementó mediante el análisis estadístico correspondiente según la distribución de los datos.

3.8 Procedimientos experimentales

Este procedimiento experimental constó de 4 fases, basados en el siguiente orden: Adquisición del aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo), activación de las cepas microbiológicas *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Candida albicans* ATCC 10231, determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y procedimiento de bioautografía del aceite esencial con

las dos cepas.

3.8.1 Fase 1.

3.8.1.1 Adquisición del aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo)

En esta fase se adquirió 10 mL de aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo) del laboratorio AROMAVIDA de la ciudad de Quito, con su respectiva ficha técnica (Anexo A) en el cual se detallan sus principales características fisicoquímicas tales como la pureza y densidad.

Asimismo, se adjuntaron los resultados de los análisis cromatográficos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) (Anexo B y C).

3.8.2 Fase 2.

3.8.2.1 Activación de las cepas de estudio: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Candida albicans* ATCC 10231

La cepa ATCC 25922 de *Escherichia coli* se obtuvo de Laboratorio Microbiolab ubicado en la ciudad de Quito, luego se reactivó en caldo “Brain heart”, se realizó el aislamiento mediante siembra por estriado en agar MacConkey, y se dejó incubar por 24 horas a 37 °C

Figura 8

La cepa ATCC 25922 después de 24 horas de incubación.



Nota: Crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922 en incubación después de 24 h.
Fuente: Autora

La cepa ATTC 10231 de levadura *Candida albicans* se obtuvo de los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca, se reactivó en caldo Sabouraud, posteriormente se lo identificó en agar sangre incubándolo por 24 a 48 horas a 34 °C

Figura 9

La cepa ATTC 10231 después de 24 horas de incubación



Nota: Crecimiento de *Candida albicans* ATCC 10231 en medio Sabouraud.
Fuente: Autora

3.8.3 Fase 3

3.8.3.1 Fase 3. Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI)

El método realizado por Noel Martínez & Oviedo Casariego (2019) constituye como una de las técnicas más empleadas para determinar la concentración mínima inhibitoria tanto en bacterias como en hongos. La principal diferencia radica en el tipo de medio líquido utilizado, en el cual se selecciona de acuerdo con el microorganismo de estudio, el bioensayo puede llevarse a cabo mediante

el método de microdilución en caldo, empleando microplacas de 96 pozos.

3.8.3.2 Preparación de la solución madre

Para el ensayo frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, las diluciones del aceite esencial de *Bursera graveleons* (palo santo), se realizaron en caldo Muller Hinton con Tween 80 y DMSO; para *Candida albicans* se utilizó caldo Sabouraud suplementado con Tween 80 y DMSO. En ambos ensayos, la solución del aceite esencial se preparó a concentración inicial de 6000 µg/ mL. La preparación de esta solución se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por (Noel Martínez & Oviedo Casariego, 2019).

La preparación de la solución madre se realizó a partir de la densidad (0.85%) del aceite esencial *Bursera graveolens* (palo santo) a un volumen final de 2 mL:

$$C_{\text{pozo}} = \frac{C_{\text{stock}}}{4}$$

$$m = C \times V$$

$$V = \frac{m}{\text{densidad}}$$

Fuente: Autora (2026)

3.8.3.3 Controles del ensayo de microdilución

Se estableció los controles necesarios para el ensayo de microdilución en caldo, de acuerdo con el protocolo estándar M07-A11 (CLSI, 2024). Se preparó un control positivo de crecimiento con 100 µL de caldo Mueller-Hinton suplementado con Tween 80 al 0,5% (v/v), inoculado con la suspensión microbiana.

Como controles negativos de esterilidad se utilizaron 100 µL del mismo medio con Tween 80 y 100 µL de caldo puro sin inocular. El control de antimicrobiano de referencia consistió en

100 μ L de una solución de ampicilina (para bacterias) o fluconazol (para levaduras) en caldo puro a una concentración conocida. Finalmente, se incluyó un control del solvente con 100 μ L de una mezcla de DMSO a la concentración máxima empleada ($\leq 1\%$ v/v) en caldo con Tween 80 al 0,5%, para evaluar la posible interferencia del vehículo de disolución en el crecimiento microbiano.

3.8.3.4 Preparación del inóculo de *Escherichia coli* ATTC 25922

Para la preparación del inóculo bacteriano se seleccionaron de dos a tres colonias aisladas de *Escherichia coli* ATTC 25922, se suspendieron en solución salina utilizando el espectrofotómetro a 630 nm de 0.1 a 0.08 de absorbancia, y se diluye en caldo llegando a una concentración 5×10^5 UFC/ mL tal como indica el (CLSI, 2025). Se colocó en los pocillos 100 μ l de inóculo ajustado por Mc Farland.

3.8.3.5 Preparación del inóculo de *Candida albicans* ATTC 10231

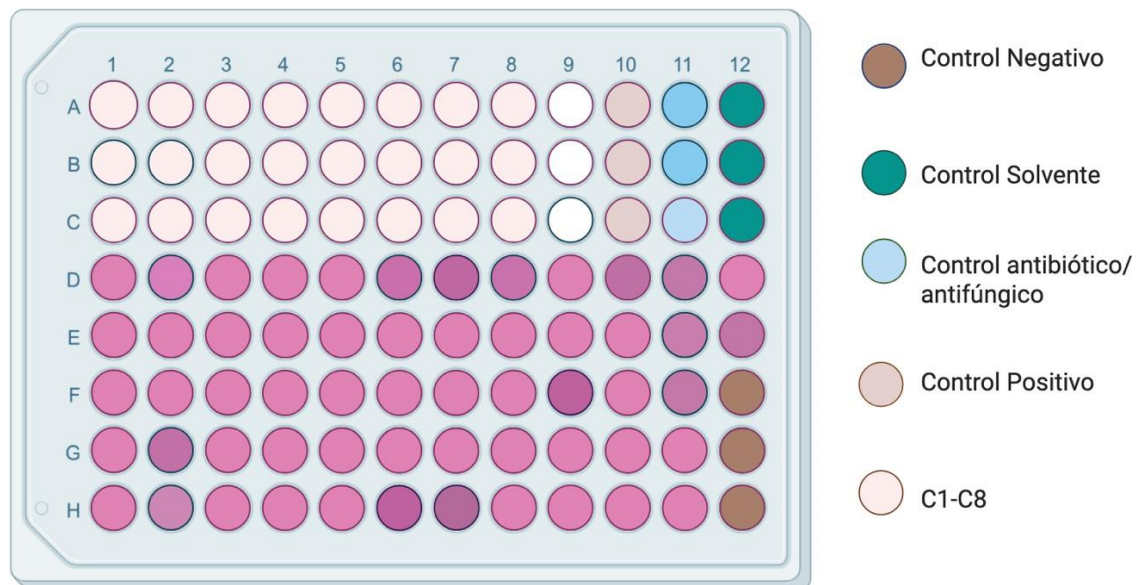
A partir de una colonia de *Candida albicans* ATTC se preparó una suspensión celular a una turbidez equivalente a la escala de Mac farland, correspondiente a una concentración aproximada de $1-5 \times 10^6$ UCF/ mL mediante espectrofotometría a 530 nm y de absorbancia 0.12 a 0.15 OD y se obtuvo una concentración de $0.25 - 2.5 \times 10^3$ UFC/ mL en medio Sabouraud como indica el (CLSI, 2017). Igualmente, en los pocillos se agregó 100 μ l de inóculo.

3.8.3.6 Preparación y distribución de microplacas para la determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI)

En las microplacas se preparó una serie de diluciones dobles del aceite esencial en cada pocillo como se muestra en la Figura (10,11 ,12 y 13). Se obtuvo como concentraciones finales lo siguiente: 6000 μ g/ mL, 3000 μ g/mL, 1500 μ g/mL, 750 μ g/ mL, 375 μ g/ mL, 187. 5 μ g/mL, 93. 75 μ g/mL, 46. 875 μ g/ mL. Cada concentración fue preparada de manera secuencial para asegurar la homogeneidad del ensayo.

Figura 10

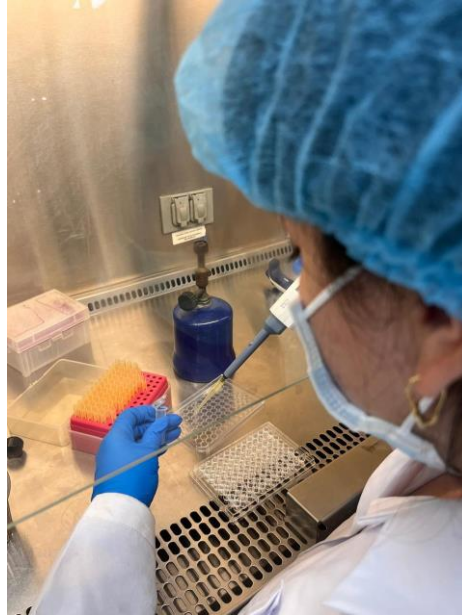
Distribución de concentraciones y controles en la microplaca



Nota. C1-8: 8 Concentraciones, CP: control positivo, CS: Control solvente, CA: Control antibiótico/ antifúngico. Fuente: Autora (2026).

Figura 11

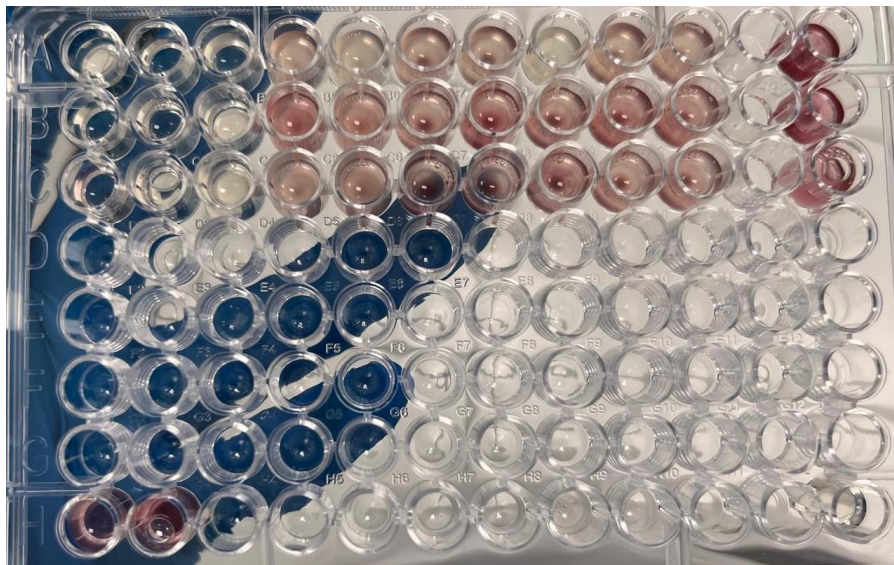
Distribución de la solución madre en microplacas.



Nota. Distribución de solución madre en microplacas Fuente: Autora (2026)

Figura 12

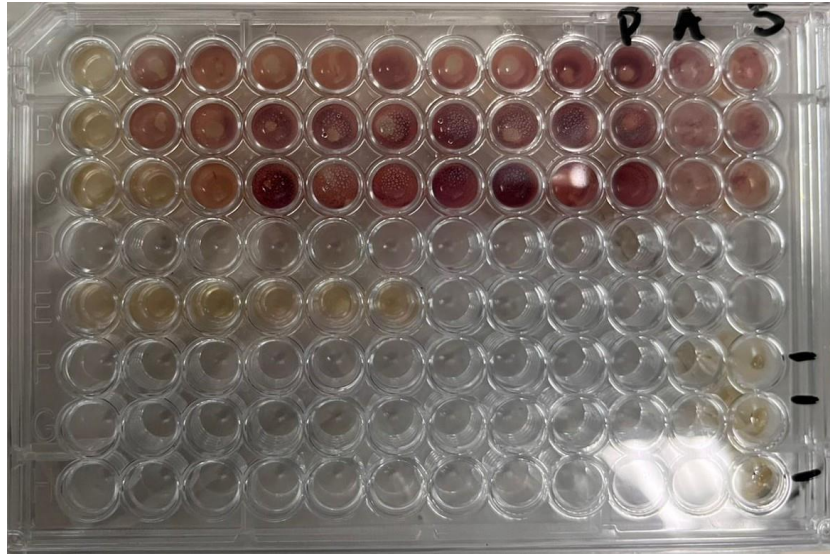
Concentración mínima inhibitoria con un indicador metabólico de DTT de Escherichia coli ATTC 25922.



Fuente: Autora (2026)

Figura 13

Concentración mínima inhibitoria con indicador metabólico de DTT de Candida albicans ATTC 10231.



Nota. Fuente: Autora (2026)

3.8.3.7 Incubación y cuantificación de viabilidad de células

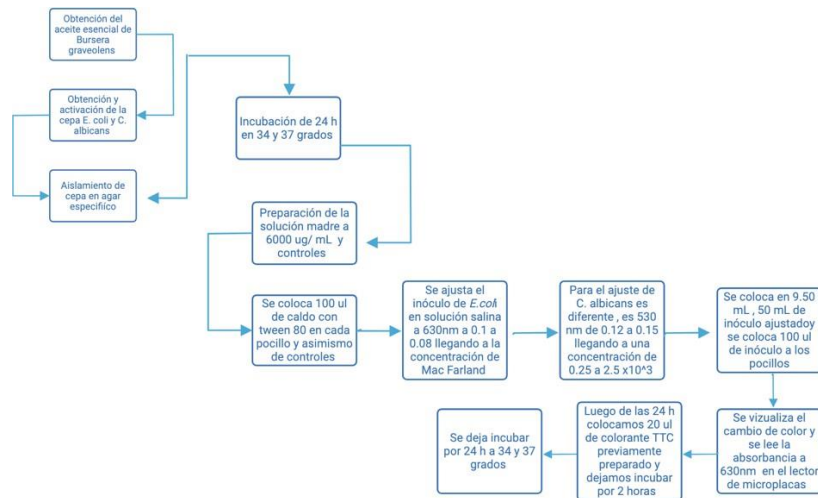
Tras la siembra, las microplacas se incubaron a 37 °C durante 24 horas para permitir el crecimiento microbiano.

Para evaluar cuantitativamente la viabilidad celular, se añadieron 20 µL de una solución de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) al 0.5% (p/v) a cada pocillo. Las placas se incubaron nuevamente a 37 °C durante 2 horas para permitir la reducción metabólica del colorante. Posteriormente, se procedió a la lectura visual. En este ensayo, los pozos con células metabólicamente activas redujeron el TTC incoloro a su producto de reducción, desarrollando un color rojo intenso. Por el contrario, los pozos con inhibición completa del crecimiento microbiano no mostraron cambio de color, manteniendo la tonalidad original del medio.

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se determinó como la menor concentración del aceite esencial que previno completamente la formación del color rojo característico, indicando una inhibición superior al 99% del metabolismo microbiano en comparación con el control positivo Figura (12 y 13), y como se puede observar en el esquema 1.

Esquema 1

Diagrama de flujo del procedimiento experimental de la concentración mínima inhibitoria.



Fuente: Autora (2026)

3.9. Fase 4

3.9.1 Bioautografía de manera directa de aceite esencial *Bursera graveolens* (palo santo)

frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Candida albicans* ATCC 10231.

3.9.1.1 Preparación de la muestra

Siguiendo la metodología de (Noriega et al., 2023) el aceite esencial se disolvió en metanol 30ul de aceite + 1ml de metanol. Las placas de TLC se cortan en dimensiones de 3 cm x 8 cm y

asimismo con un lápiz se señala 1 cm de cada lado. El solvente para la fase móvil es el tolueno, acetato de etilo y éter de petróleo. Las placas fueron colocadas a la cámara sin que toque el punto señalado con el solvente. La corrida tuvo una duración aproximadamente 15 minutos. La concentración solvente se basó en la distribución (93:7:20). De tolueno, acetato de etilo y éter de petróleo.

Posteriormente se dejó secar en cámara húmeda por 90 minutos y luego se colocó con el inóculo ya ajustado a Mac Farland que es $1-5 \times 10^6$ UCF/ mL. Se incubó en cámara húmeda por 24 horas a 37 °C.

Figura 14

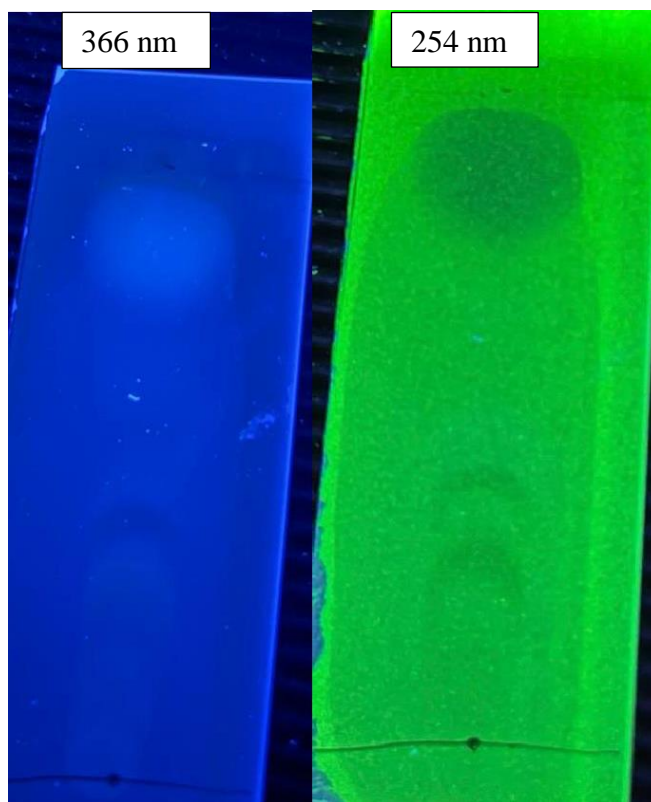
*TLC Cromatografía del aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo) en fase móvil aplicado revelador de vanilina.*



Nota. Fuente: autora

Figura 15

TLC Cromatográfica del aceite esencial Bursera graveolens (palo santo) visualizadas en 254 y 366 nm sin revelador.



Fuente: Autora (2026)

3.9.1.2 Evaluación antimicrobiana por bioautografía directa

Tras la aplicación del inóculo de manera directa, las placas cromatográficas se incubaron en cámara húmeda a 37 °C durante 24 horas en la estufa para permitir el crecimiento microbiano.

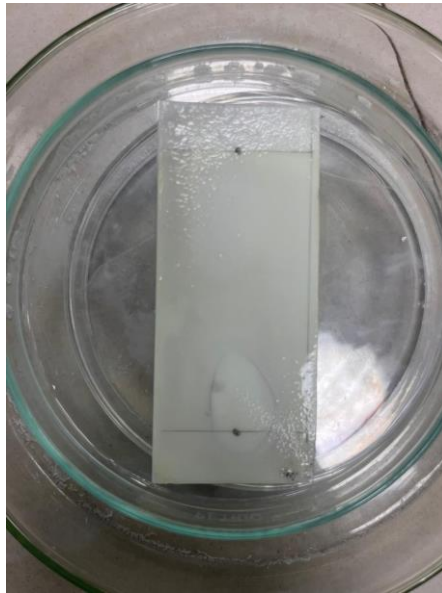
3.9.1.3 Solución reveladora previamente preparada

La solución se realizó con 6 mg de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) y 10 µL de Triton X-100 en 10 mL de PBS estéril (pH 7,4). Las placas se incubaron nuevamente a 37 °C durante 1 hora en la estufa (Ormaza Pinos & Parra Román, 2024). Durante este período, las células metabólicamente activas redujeron la sal de tetrazolio (MTT) a su

correspondiente producto de reducción, generando una coloración violeta intensa en las áreas con crecimiento microbiano. Finalmente, para mejorar la visualización de los halos de inhibición, las placas se lavaron suavemente con etanol, lo que permitió distinguir con mayor claridad las zonas incoloras o de menor coloración, correspondientes a los compuestos con actividad antimicrobiana, en contraste con el fondo violeta del crecimiento microbiano (Dewanjee et al., 2015) como se puede observar en la Figura 16.

Figura 16

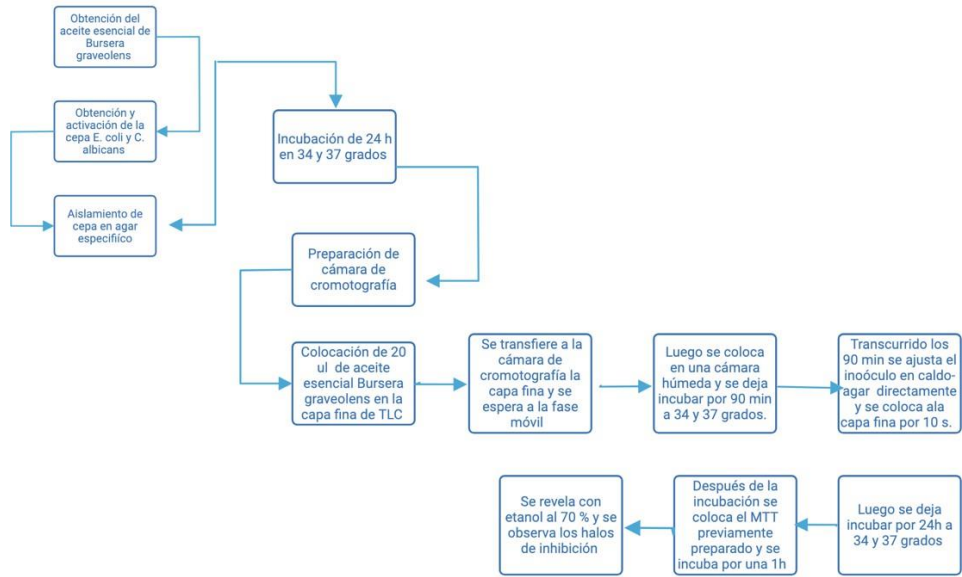
. Bioautografía directa de E. coli con el MTT recién colocado.



Fuente: Autora (2026)

Esquema 2

Diagrama de flujo del procedimiento experimental de bioautografía



Fuente: Autora (2026)

CAPÍTULO IV

4. Resultados y discusión

4.1 Detección de compuestos con propiedades antimicrobianas del aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo) frente a *Escherichia Coli* ATCC 25922 y *Candida albicans* ATCC 10231.

Por medio de la técnica de bioautografía se identificó el posible compuesto responsable de efectuar la actividad antimicrobiana al visualizar la inhibición de color blanco o amarillento. Se puede detectar con mayor facilidad los compuestos que no están activos porque se va a generar un color violeta- azulado.

En la tabla 7 se describe el recorrido por los posibles compuestos, los valores obtenidos del Rf, el frente de referencia, el frente de disolvente, el supuesto compuesto y el color generado a 366 nm.

Tabla 7

Resultados obtenidos de la técnica de bioautografía

Distancia recorrida (cm)	Frente disolvente	al Frente referencia (Rf)	de Compuesto	Color detectado a 366 nm
1,5	6	0.25	Terpineol	Rosado bajo
2	6	0.33	Mento Furan	Rosado
3	6	0.50	Germacreno	Verde - azulado
3,4	6	0.55	Limoneno	Verde- azulado

Nota. Supuestos compuestos responsables de la actividad biológica. Fuente: Autora (2026).

Los resultados obtenidos mediante la bioautografía se evidenció zonas activas que corresponden a valores de Rf de 0.25, 0.55, 0.50 y 0.55 como se observa en la Figura (17), los cuales se relacionó con los posibles compuestos que son el terpineol, mentofurano, germacreno y

limoneno. La identificación se realizó mediante comparación con referencias descritas en el Atlas de análisis de drogas vegetales de Wagner & Bladt (2001), empleando la concentración de solvente, el cual se emplea para la separación de aceites esenciales y terpenos.

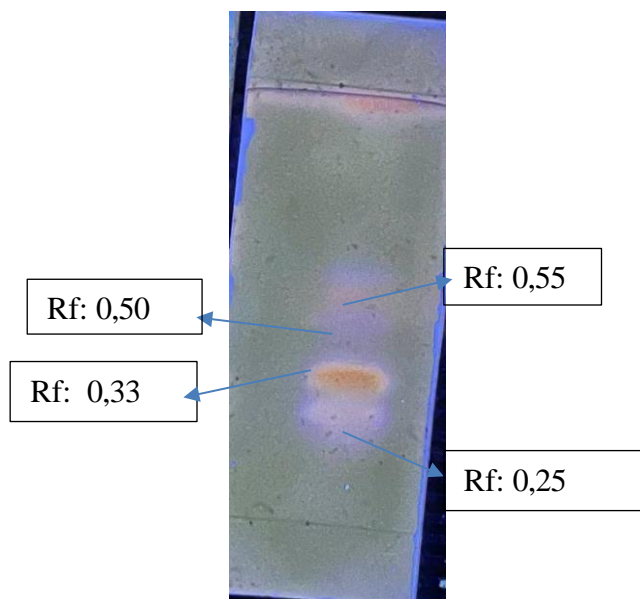
De acuerdo con Wagner & Bladt (2001) los alcoholes terpénicos como el terpineol presentan valores de Rf en el rango de 0.15-0.25 mediante la técnica de cromatografía, lo que coincide con el valor observado en el presente estudio (Rf: 0.25). Según el estudio de L. Li et al. (2015) el compuesto terpineol tiene capacidad de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* de forma directa considerando que tiene mejor potencial antimicrobiana que un aceite esencial.

Asimismo, el mentofurano es descrito como detectable en procedimientos similares, mostrando desplazamiento cercano a compuestos terpénicos de polaridad intermedia. En el caso de los hidrocarburos terpénicos, el atlas indica que estos tienden a localizarse hacia valores de Rf más altos, próximos al frente del solvente, lo que respalda el estudio preliminar de germacreno (Rf: 0.50) y limoneno (Rf: 0.55) en las zonas observados. En una investigación realizada por Freitas et al. (2020) se comprobó la capacidad antibacteriana y antiinflamatoria del germacreno.

De la misma manera en el ensayo de Jocabed et al. (2009) se observó resultados similares al presente trabajo de investigación de Rf para el limoneno de un rango de (0,49 -0,59) y cuando se utiliza revelador como la vanilina y ácido sulfúrico se produce un color azul o violeta. El limoneno presentó actividad antimicrobiana en el estudio de Schroder et al. (2022) frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Candida albicans* ATCC 10231 en ensayos cuantitativos de microdilución, evidenciando mayor susceptibilidad en *Candida albicans* ATCC 10231.

Figura 17

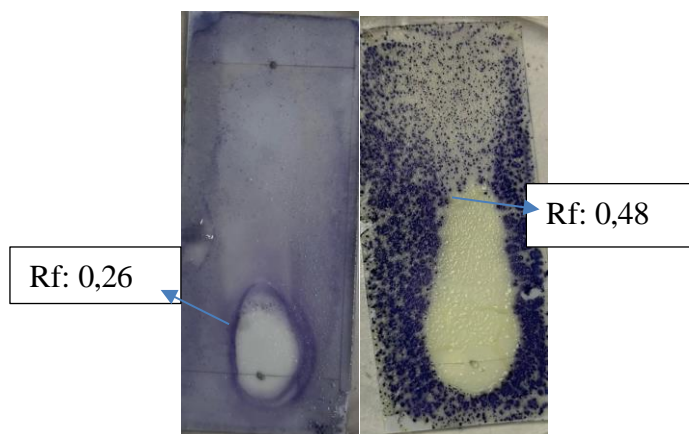
Cromatografía en capa fina visualizada a 366 nm.



Fuente: Autora (2026)

Figura 18

. Los halos de inhibición de los posibles compuestos frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Candida albicans* ATCC 10231.



Nota. Los halos de inhibición de los posibles compuestos con actividad antimicrobiana. Fuente:

Autora (2026)

Los componentes identificados a partir del valor del frente de referencia (Rf) permiten interferir la posible presencia de compuestos con actividad antimicrobiana, lo cual respalda mediante el enfoque propuesto (Ortiz, 2023).

4.2 Determinación de la CMI del aceite esencial de *Bursera graveolens* frente a *Escherichia coli* ATCC 25922

La actividad antimicrobiana del aceite esencial *Bursera graveolens* frente *Escherichia coli* se evaluó mediante 8 concentraciones seriadas de 6000 µg/mL, 3000 µg/mL, 1500 µg/mL, 750 µg/mL, 375 µg/ mL, 187,5 µg/mL, 93,75 µg/mL, 46,875 µg/mL La concentración mínima inhibitoria se determinó observando la inhibición del crecimiento bacteriano, evaluada por la absorbancia a 630 nm. Los resultados mostraron una reducción progresiva de la absorbancia conforme disminuiría la concentración del aceite esencial.

Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar de los 3 experimentos que se detalla en la tabla 8:

Tabla 8

Resultados obtenidos de la concentración mínima inhibitoria del Bursera graveolens (palo santo) frente a Escherichia coli ATCC 25922.

Concentración (µg/mL)	Absorbancia (media \pm DS)	% inhibición
6000	0.130 \pm 0.060	96,64
3000	0.160 \pm 0.065	95
1500	0.205 \pm 0.080	92
750	0.525 \pm 0.070	66
375	1.052 \pm 0.090	22
187.5	1.180 \pm 0.085	0
93.75	1.128 \pm 0.120	0
46.87	1.277 \pm 0.150	0

Nota. Datos de porcentaje del CMI del aceite esencial *Bursera graveolens* (palo santo) frente *Escherichia coli* ATCC 25922. Fuente: Autora

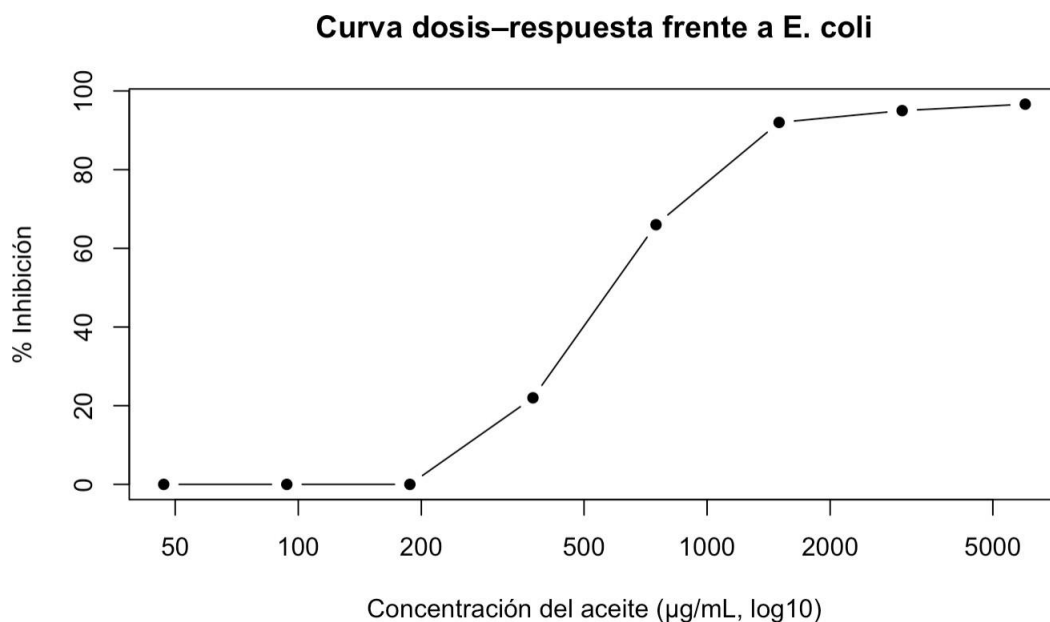
Por lo tanto, la concentración mínima inhibitoria es 1500 µg/ml del aceite esencial *Bursera graveolens* (palo) frente a *Escherichia Coli* ATCC 25922 porque alcanza ± 90% cumpliendo el criterio de eficacia antimicrobiana mínima. A partir de 750 µl la actividad disminuyó a 66 %, y por debajo de 375 µl la inhibición fue inferior al 25 % evidenciando una respuesta claramente dependiente de la concentración.

Este efecto indica que el aceite actúa como un agente bacteriostático solo al superar una concentración mínima efectiva. Por debajo de este nivel, su potencia disminuye notablemente. Al comparar estos resultados con la información reportada Noel Martínez & Oviedo Casariego (2019) indica que *Enterobacter sp* presentó una concentración mínima inhibitoria de 1,62 mg/ ml, se observa una concordancia en el rango de sensibilidad de bacterias Gram negativas. Dado que *enterobacter* y *Escherichia coli* comparten características estructurales similares, especialmente la presencia de una membrana externa rica en lipopolisacáridos, los valores obtenidos refuerzan la coherencia biológica del efecto observado.

Sin embargo, en la investigación de Fon-Fay et al. (2017) obtuvo un resultado contrario en comparación con otros aceites esenciales de estudios, el aceite de *Bursera graveolens* (palo santo) alcanzó valores inferiores a los demás, lo que confirma una actividad moderada.

Figura 19

Porcentaje de inhibición a longitud de 630 nm frente a Escherichia coli ATCC 25922.



Nota. Gráfica realizada en R studio. Fuente: Autora

4.2.1 Determinación de la CMI del aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo) frente a *Candida albicans* ATCC 10231.

La actividad antimicrobiana del aceite esencial *Bursera graveolens* (palo santo) frente *Candida albicans* ATCC 10231 se evaluó mediante 8 concentraciones seriadas de 6000 µg/mL, 3000 µg/mL, 1500 µg/mL, 750 µg/mL, 375 µg/ mL, 187,5 µg/mL, 93,75 µg/mL, 46,875 µg/mL. La concentración mínima inhibitoria se determinó observando la inhibición del crecimiento bacteriano, evaluada por la absorbancia a 630 nm. Los resultados mostraron una reducción progresiva de la absorbancia conforme disminuiría la concentración del aceite esencial. Los resultados se expresaron como media ± desviación estándar de los 3 experimentos que se detalla en la tabla 9:

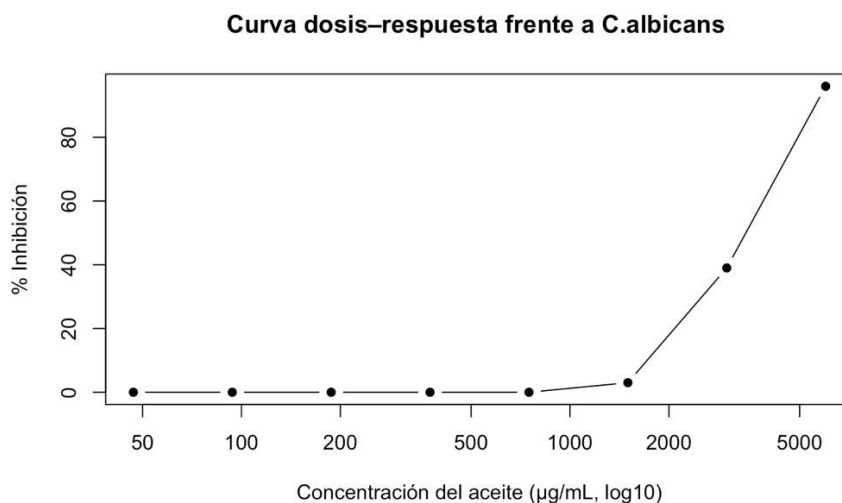
Tabla 9

Resultados obtenidos de la concentración mínima inhibitoria del *Bursera graveolens* (palo santo) frente a *Candida albicans* ATCC 10231.

Concentración (μ g/mL)	Absorbancia (media \pm DS)	% inhibición
6000	0.125 \pm 0.0142	96
3000	0.530 \pm 0.0721	39
1500	0.786 \pm 0.0463	3
750	0.760 \pm 0.0287	0
375	0.735 \pm 0.0313	0
187.5	0.752 \pm 0.0536	0
93.75	0.763 \pm 0.065	0
46.87	0.788 \pm 0.080	0

Figura 20

Porcentaje de inhibición a longitud de 630 nm frente a *Candida albicans* ATCC 10231.



Nota. Gráfica realizada en R studio. Fuente: Autora

Por lo tanto, la concentración mínima inhibitoria es a 6000 $\mu\text{g} / \text{ml}$ del aceite esencial *Bursera graveolens* (palo santo) frente a *Candida albicans* ATCC 10231 porque alcanza $\pm 90\%$ cumpliendo el criterio de eficacia antimicrobiana mínima. Sin embargo, la actividad disminuyó considerablemente a 3000 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (39%) y prácticamente desapareció a 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ indicando que la CMI es superior a la observada para *Escherichia coli* ATCC 25922 en términos de estabilidad del efecto inhibitorio en concentraciones intermedias. Con relación al estudio realizado por Sotelo et al. (2017) produjo halos de inhibición de 14,6 a 17 mm frente a *Candida albicans*, valores mayores a los registrados frente a *Escherichia coli*, lo que sugiere una mayor susceptibilidad del hongo en ensayos de difusión en disco. Sin embargo, en el presente estudio, la inhibición fue más marcada únicamente a concentraciones elevadas, evidenciado que la respuesta antifúngica también depende de la concentración utilizada. Se vio similitud de resultados en el trabajo de investigación realizado por Noel Martínez & Oviedo Casariego (2019) que reporta que las levaduras presentan valores de CMI mayores que algunas, lo que coincide parcialmente con la tendencia observada en el presente estudio.

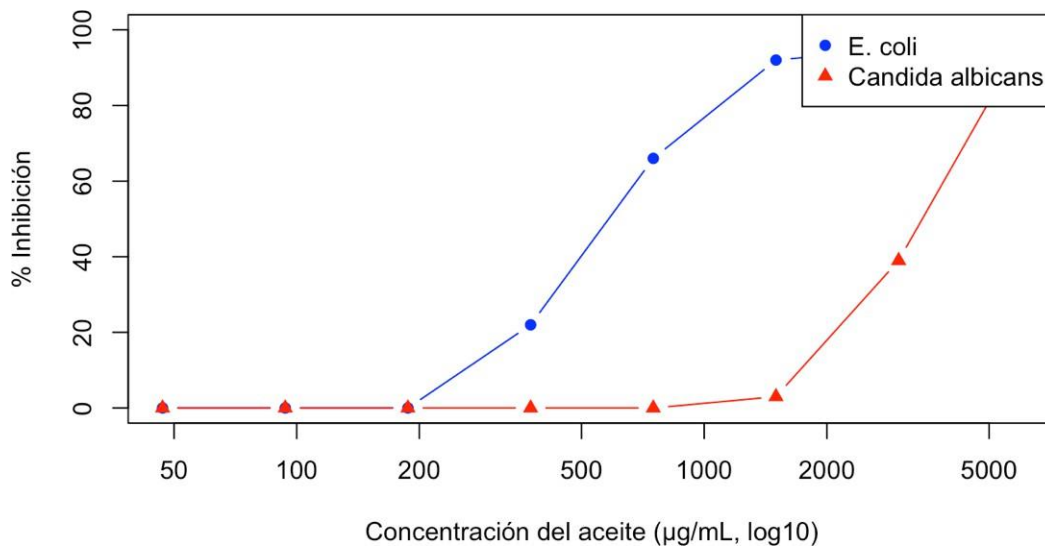
4.2.2 Comparación de determinación de concentración mínima inhibitoria del aceite esencial *Bursera graveolens* (palo santo) frente a *Escherichia Coli* ATCC 25922 y *Candida albicans* ATCC 10231.

La determinación de la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo) mostro diferencias de la sensibilidad de los microorganismos evaluados la concentración mínima inhibitoria frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 fue 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mientras que para *candida albicans* se determinó una concentración de 6000 μg como se puede observar en

la figura 8, lo que demuestra una mayor susceptibilidad de la bacteria al tratamiento *in vitro* en la figura 20.

Figura 21

Comparación de porcentajes de inhibición entre *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Candida albicans* ATCC 10231.



Nota. La figura es una gráfica representativa de la comparación de la sensibilidad de ambos microorganismos realizada en R studio. Fuente: Autora (2026)

El aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo) mostró diferencias claras en la sensibilidad entre *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Candida albicans* ATCC 10231. Bajo el criterio de 90 % de inhibición, la concentración mínima inhibitoria para *Escherichia coli* ATCC 25922 fue de 1500 $\mu\text{g/mL}$, mientras para la candida fue 6000 $\mu\text{g/mL}$. Esto indica que, en las condiciones experimentales empleadas, la bacteria presentó mayor susceptibilidad que el hongo. Lo que indica que la *Candida albicans* ATCC 10231 requiere aproximadamente 4 veces más

concentración que la *Escherichia coli* ATCC 25022 para que el efecto antimicrobiano sea equivalente. En el estudio de “Actividad antimicrobiana “in vitro” del palo santo (*Bursera graveolens* sobre los microorganismos encontrados en el paz aguja” realizado por Noel & Oviedo (2019) reportó que el CMI de 1,62 para *Enterobacter sp* y 6,48 para levadura, muestra una relación proporcional similar al estudio presente, lo que sugiere que los aceites esenciales tienden a requerir mayores concentraciones para inhibir eucariotas como levadura que para bacterias Gram negativas relacionadas. Esta concordancia respalda los datos obtenidos.

Se ha indicado que las diferencias en la composición de la pared y membrana celular entre bacterias y hongos influyen en la susceptibilidad a compuestos lipofílicos. Por ejemplo, la membrana externa de bacterias Gram negativas actúa como barrera selectiva, pero cuando los terpenos alcanzan cantidades suficientes, pueden insertarse en la bicapa lipídica y causar cambios en la permeabilidad (Schroder et al., 2022). En cambio, los autores Luján et al. (2012) tuvieron de resultado que el aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo) generó mejor actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas, pero no en las bacterias Gram negativas. De la misma manera para levaduras ha obtenido un mejor efecto, esto se debe a la parte usada del material vegetal, se ha comprobado que el tallo de *Bursera graveolens* (palo santo) tiene mejor efecto inhibitorio.

CAPÍTULO V

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

De la evaluación *in vitro* de aceite esencial de *Bursera graveolens* frente a las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Candida albicans* ATCC 10231 permite definir las siguientes conclusiones:

Se identificó los posibles metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica del aceite esencial *Bursera graveolens* (palo santo) frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Candida albicans* ATCC 10231 en base al análisis de los frentes de referencia (Rf) y bibliografía. Se permitió asociar determinados metabolitos con la actividad antimicrobiana. De tal manera en el aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo) se detectaron compuestos terpénicos como el terpineol, mentofurano, germacreno y en mayor proporción el limoneno. Que posee la capacidad de alterar la integridad de la membrana celular y en las levaduras actúa degradando la membrana de ergosterol.

El aceite esencial de *Bursera graveolens* presentó inhibición a los microorganismos estudiados siendo un valor de CMI 1500 µg/mL para *Escherichia Coli* ATCC 25922 y para *Candida albicans* ATCC 10231 de 6000 µg/mL. Los resultados obtenidos reflejan la presencia de los bioactivos presentes en el aceite esencial, como los sesquiterpenos y terpenos que actúan inhibiendo microorganismos.

Finalmente, mediante el análisis estadístico descriptivo y las gráficas de curvas dosis-respuesta en escala logarítmica permitieron visualizar claramente la diferencia en el comportamiento de ambos microorganismos, evidenciando que *Escherichia coli* ATCC 25922

fue más sensible al aceite esencial que *Candida albicans* ATCC 10231.

5.2 Recomendaciones

Se recomienda aislar los principales metabolitos identificados y evaluar su actividad antimicrobiana de manera individual, con el fin de determinar cuál de ellos contribuye mayormente el efecto inhibitorio y si existe sinergia entre los compuestos presentes en el aceite esencial *Bursera graveolens* (palo santo).

Se recomienda complementar la CMI con la determinación de concentración mínima inhibitoria bactericida (CMB) y concentración mínima fungicida (CMF), para establecer si el efecto observado es Bacteriostático/ fungistático o bactericida/ fungicida.

Sería conveniente evaluar la actividad antimicrobiana frente a otras cepas clínicas, tanto Gram positivas como Gram negativas, así como otras especies de hongos, para determinar el espectro real de acción del aceite esencial.

Finalmente se recomienda desarrollar estudios que permiten comprender el mecanismo de acción de aceite esencial, tales como pruebas de permeabilidad de membrana, análisis de daño celular o estudios microscópicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alejandro, D. J. (2016). *Infecciones por Escherichia coli y su Perfil de Resistencia en niños atendidos en el Hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera “La Mascota” Enero 2011 – 31 Diciembre 2015*. [UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, MANAGUA UNAN – MANAGUA FACULTAD DE MEDICINA]. <https://files01.core.ac.uk/download/pdf/80118486.pdf>
- American Type Culture Collection. (2024). *Candida albicans (petirrojo) Berkhout - 10231 / ATCC*. <https://www.atcc.org/products/10231>
- American Type Culture. (2024). *Escherichia coli (Migula) Castellani y Chalmers - 25922 / ATCC*. <https://www.atcc.org/products/25922>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Barotto, A. J. (2021). Extracción verde de aceites esenciales. *REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNLP*, 8, no. 2. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/140964>
- Blanco, M. T., Perez-Giraldo, C., Blanco, J., Moran, F. J., Hurtado, C., & Gomez-Garcia, A. C. (1992). In vitro studies of activities of some antifungal agents against *Candida albicans* ATCC 10231 by the turbidimetric method. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36(4), 898–901. <https://doi.org/10.1128/AAC.36.4.898>
- Calderone, R. A., & Fonzi, W. A. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, 9(7), 327–335. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02094-7](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02094-7)

- Cañarte Vélez, C. R., & Ponce Párraga, K. Y. (2021). Viabilidad técnica en la extracción de aceites esenciales en la hoja de palo santo (*Bursera Graveolens*). *Dominio de Las Ciencias, ISSN-e 2477-8818, Vol. 7, N°. 1, 2021 (Ejemplar Dedicado a: ENERO-ABRIL)*, 7(1), 26. <https://doi.org/10.23857/dc.v7i1.1632>
- Cañigueral, S. V. (2007). LOS ACEITES ESENCIALES EN FITOTERAPIA. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*.
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85617508002>
- Carranza, L. S., Bacusoy, M. Z., Zurita, M. G., Posligua, A. A. C., & Mora, M. M. (2021). Plantas medicinales, su uso en afecciones respiratorias en comunidades rurales, provincia Los Ríos –Ecuador. *Journal of Science and Research: Revista Ciencia e Investigación, ISSN 2528-8083, Vol. 6, N°. 2, 2021*, 6(2), 5.
<https://doi.org/10.5281/zenodo.5507565>
- Choma, I., & Jesionek, W. (2015). Effects-Directed Biological Detection: Bioautography. *Instrumental Thin-Layer Chromatography*, 279–312.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417223-4.00011-X>
- 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>
- Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines*, 4(3), 58.
<https://doi.org/10.3390/MEDICINES4030058>

- CLSI. (2017). M27: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. *Wayne (PA): Clinical Laboratory Standard Institute, 4th ed*, 19087–1898. <https://clsi.org/shop/standards/m27/>
- CLSI. (2025). *M100 | Estándares de desempeño para pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos*. <https://clsi.org/shop/standards/m100/>
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), 822–880. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>
- Cuellar Aquino, R., & Cesar Tafur Sotelo, J. (2017). *Diseño de la automatización para una planta piloto de extracción por fluido supercrítico utilizando CO2 como solvente* [Pontificia Universidad Católica del Perú]. <http://hdl.handle.net/20.500.12404/8438>
- Denich, T. J., Beaudette, L. A., Lee, H., & Trevors, J. T. (2003). Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *Journal of Microbiological Methods*, 52(2), 149–182. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00155-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00155-0)
- Dewanjee, S., Gangopadhyay, M., Bhattacharya, N., Khanra, R., & Dua, T. K. (2015). Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5(2), 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2014.06.002>
- Ruiz, E. (2025). *Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Cinnamomum zeylanicum*, *Illicium verum* y *Syzygium aromaticum* frente a cepas *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans** [Universidad Central

del Ecuador]. https://www.dspace.uce.edu.ec/server/api/core/bitstreams/58d2a4e9-651e-4bbb-a01d-1528dbac77b4/content?utm_source=

F Reyes- Jurado, E. P. y A. L.-M. (2014). *Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales* . <https://www.udlap.mx/TSIA/assets/files/volumen8-1/TSIA-vol-8-1-UDLAP.pdf#page=70>

FERNÁNDEZ, M., & PELÁEZ, A. (2012). *SENSIBILIDAD DE Escherichia coli ATCC 25922 FRENTE A ANTISÉPTICOS Y DESINFECTANTES UTILIZADOS A NIVEL HOSPITALARIO*. UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA .

Fon-Fay, F., Casariego, A., Falco, A., & Pino, J. (2017). *Actividad antimicrobiana de aceites esenciales de Ocotea Quixos (Lam.) Kosterm, Bursera graveolens (Kunth) Triana y Planch, Cymbopogon citratus (DC) Stapf. Y Curcuma Longa (L.) sobre microorganismos contaminantes de alimentos* [Universidad Técnica Estatal de Quevedo].

<https://revcitecal.iiia.edu.cu/revista/index.php/RCTA/es/article/view/114/97>

Freitas, P. R., de Araújo, A. C. J., dos Santos Barbosa, C. R., Muniz, D. F., Rocha, J. E., de Araújo Neto, J. B., da Silva, M. M. C., Silva Pereira, R. L., da Silva, L. E., do Amaral, W., Deschamps, C., Relison Tintino, S., Ribeiro-Filho, J., & Coutinho, H. D. M. (2020). Characterization and antibacterial activity of the essential oil obtained from the leaves of *Baccharis coridifolia* DC against multiresistant strains. *Microbial Pathogenesis*, *145*, 104223.

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104223>

Gallegos, P., Bañuelos, R., Delgadillo, L., Meza, C., & Echavarría, F. (2019).

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE CINCO COMPUESTOS TERPENOIDES: CARVACROL, LIMONENO, LINALOOL, α -TERPINENO Y TIMOL. *Tropical and Subtropical Agroecosystemas*. https://www.researchgate.net/profile/Francisco-Echavarria-Chairez/publication/334263317_ACTIVIDAD_ANTIBACTERIANA_DE_CINCO_COMPUESTOS_TERPENOIDES_CARVACROL_LIMONENO_LINALOOL_a-TERPINENO_Y_TIMOL_ANTIBACTERIAL_ACTIVITY_OF_FIVE_TERPENOID_COMPOUNDS_CARVACROL_LIMONENE_LINALOOL_a-TERPINENE_AND_/links/5d1fa0c592851cf44068e4e5/ACTIVIDAD-ANTIBACTERIANA-DE-CINCO-COMPUESTOS-TERPENOIDES-CARVACROL-LIMONENO-LINALOOL-a-TERPINENO-Y-TIMOL-ANTIBACTERIAL-ACTIVITY-OF-FIVE-TERPENOID-COMPOUNDS-CARVACROL-LIMONENE-LINAL

Horváth, G., Jámor, N., Végh, A., Böszörményi, A., Lemberkovics, É., Héthelyi, É., Kovács, K., & Kocsis, B. (2010). Antimicrobial activity of essential oils: The possibilities of TLC-bioautography. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(3), 178–182. <https://doi.org/10.1002/ffj.1993>

Jaramillo, B. (2019). *Volatile chemical composition of essential oil from *Bursera graveolens* (Kunth) Triana & Planch and their fumigant and repellent activities. Vol.41.* https://doi.org/https://www.redalyc.org/journal/1871/187160125043/html/?utm_source

- Jocabed, D., Lemus, C., Dardón, R. M., José, J., González De León, E., Cristina, M., & Leiva, M. (2009). “*Determinación y cuantificación de la actividad antioxidante de especies nativas y su posible fuente para el desarrollo de nutricoséuticos*” [Universidad de San Carlos de Guatemala]. <https://biblioteca-farmacia.usac.edu.gt/Tesis/QF1102.pdf>
- Keller, M., & Dörr, T. (2023). ‘*E. coli*’ is one of the most widely studied organisms – and that may be a problem for both science and medicine. <https://doi.org/10.64628/AAI.5g6fj5wa3>
- Li, L., Shi, C., Yin, Z., Jia, R., Peng, L., Kang, S., & Li, Z. (2015). Antibacterial activity of α -terpineol may induce morphostructural alterations in *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(4), 1409. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000400035>
- Li, X. Z., Plésiat, P., & Nikaido, H. (2015). The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2), 337–418. <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-14>
- Łubiech, K., & Twarużek, M. (2021). Fungal Infections of Human Mammary Gland During Lactation. *Encyclopedia of Mycology: Volume 1,2, 1*, V1-730-V1-735. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21033-9>
- Luján, M., Gutiérrez, F., Ventura, L., Mendoza, M., Cruz, S., & García, O. (2012). Composición química y actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Bursera graveolens* y *Taxodium mucronatum* de Chiapas, México. *Gayana Botánica* . <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20133089507>

- Manzano Santana, P., Miranda, M., Gutiérrez, Y., García, G., Orellana, T., & Orellana, A. (2009). Efecto antiinflamatorio y composición química del aceite de ramas de *Bursera graveolens* Triana & Planch. (palo santo) de Ecuador. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 14(3), 45–53.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962009000300007&lng=es&nrm=iso&tlng=pt
- Manzano, P. (2008). “*POTENCIAL FITOFÁRMACO DE BURSERA GRAVEOLENS SP (PALO SANTO), DEL BOSQUE SECO TROPICAL, PENÍNSULA DE SANTA ELENA, PROVINCIA DEL GUAYAS.*”
- Martínez, A. (2001). *UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA ACEITES ESENCIALES*. 1.
- Nabi, M. H. Bin, Ahmed, M. M., Mia, M. S., Islam, S., & Zzaman, W. (2025). Essential oils: Advances in extraction techniques, chemical composition, bioactivities, and emerging applications. *Food Chemistry Advances*, 8(1), 101048.
<https://doi.org/10.1016/j.focha.2025.101048>
- Nikaido, H. (2003). Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 593–656.
<https://doi.org/10.1128/mmbr.67.4.593-656.2003>
- Noel, K. C., & Oviedo, J. E. (2019). *Actividad antimicrobiana “in vitro” del aceite esencial de palo santo (Bursera graveolens) sobre los microorganismos presentes en el pez aguja (Kajikia audax)*. Universidad Nacional de Tumbes.
<https://hdl.handle.net/20.500.12874/769>
- Noel Martinez, K. C., & Oviedo Casariego, J. E. (2019). *Actividad antimicrobiana “in vitro” del aceite esencial de palo santo (Bursera graveolens) sobre los*

microorganismos presentes en el pez aguja (Kajikia audax). Universidad Nacional de Tumbes. <https://hdl.handle.net/20.500.12874/769>

Noriega, P., Calderón, L., Ojeda, A., & Paredes, E. (2023). Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Bioautography Activity of Essential Oil from Leaves of Amazon Plant *Clinopodium brownei* (Sw.). *Molecules* 2023, Vol. 28, 28(4). <https://doi.org/10.3390/molecules28041741>

Nuñez, C. E. (2008). Extracciones con equipo Soxhlet. *Cenunez.Com.Ar*.
www.cenunez.com.ar

Ormaza Pinos, A. P., & Parra Román, E. E. (2024). *Determinación de la actividad antimicrobiana de Curcuma longa, Cymbopogon citratus, Zingiber officinale y Ocotea quixos, frente a Streptococcus mutans*.
<http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/28884>

Ortiz, N. (2023). *Determinación in vitro de la actividad antimicrobiana de los extractos elaborados con Hierba Luisa (Cymbopogon citratus) frente a las bacterias Escherichia coli y Staphylococcus aureus*. Universidad Politécnica Salesiana .

Peredo -Luna, H. A., Palou -García, E., & López -Malo, A. (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3(1), 24–32.

Pérez Urria Carril, E., & Ávalos García, A. (2009). Metabolismo secundario de plantas. In *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal (Vol. 2, Number 3).
<https://hdl.handle.net/20.500.14352/50406>

Poole, K. (2012). Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(9), 2069–2089.
<https://doi.org/10.1093/jac/dks196>

Regan, A. K., Moore, H. C., De Klerk, N., Omer, S. B., Mak, D. B., & Effler, P. V. (2017). Reply to Levi et al. *Clinical Infectious Diseases*, 64(8), 1143–1144.

<https://doi.org/10.1093/cid/cix108>

Sagnay, O., Valeria, J., Lema, Y., & Hernán, L. (2021). *ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas*.

Saigal, S., Bhargava, A., Mehra, S. K., & Dakwala, F. (2011). Identification of *Candida albicans* by using different culture medias and its association in potentially malignant and malignant lesions. *Contemporary Clinical Dentistry*, 2(3), 188.

<https://doi.org/10.4103/0976-237x.86454>

Saltos, R., Bec, N., Salinas, M., Ramírez, J., Larroque, C., & Armijos. Chabaco. (2022).

Composición química y actividad AChE-BuChE del aceite esencial de palo santo *Bursera graveolens* (Kunth) Triana & Planch de Jipijapa, Ecuador . *MS EDITIONS*.

[https://www.researchgate.net/profile/Chabaco-](https://www.researchgate.net/profile/Chabaco-Armijos/publication/362363457_Chemical_composition_and_AChE-BuChE_activities_of_the_essential_oil_of_palo_santo_Bursera_graveolensKunth_Triana_Planch_from_Jipijapa_Ecuador/links/62ecf72f0b37cc344770ed97/Chemical-composition-and-AChE-BuChE-activities-of-the-essential-oil-of-palo-santo-Bursera-graveolensKunth-Triana-Planch-from-Jipijapa-Ecuador.pdf?utm_source=chatgpt.com)

[Armijos/publication/362363457_Chemical_composition_and_AChE-](https://www.researchgate.net/profile/Chabaco-Armijos/publication/362363457_Chemical_composition_and_AChE-BuChE_activities_of_the_essential_oil_of_palo_santo_Bursera_graveolensKunth_Triana_Planch_from_Jipijapa_Ecuador/links/62ecf72f0b37cc344770ed97/Chemical-composition-and-AChE-BuChE-activities-of-the-essential-oil-of-palo-santo-Bursera-graveolensKunth-Triana-Planch-from-Jipijapa-Ecuador.pdf?utm_source=chatgpt.com)

[BuChE_activities_of_the_essential_oil_of_palo_santo_Bursera_graveolensKunth_](https://www.researchgate.net/profile/Chabaco-Armijos/publication/362363457_Chemical_composition_and_AChE-BuChE_activities_of_the_essential_oil_of_palo_santo_Bursera_graveolensKunth_Triana_Planch_from_Jipijapa_Ecuador/links/62ecf72f0b37cc344770ed97/Chemical-composition-and-AChE-BuChE-activities-of-the-essential-oil-of-palo-santo-Bursera-graveolensKunth-Triana-Planch-from-Jipijapa-Ecuador.pdf?utm_source=chatgpt.com)

[Triana_Planch_from_Jipijapa_Ecuador/links/62ecf72f0b37cc344770ed97/Chemica](https://www.researchgate.net/profile/Chabaco-Armijos/publication/362363457_Chemical_composition_and_AChE-BuChE_activities_of_the_essential_oil_of_palo_santo_Bursera_graveolensKunth_Triana_Planch_from_Jipijapa_Ecuador/links/62ecf72f0b37cc344770ed97/Chemical-composition-and-AChE-BuChE-activities-of-the-essential-oil-of-palo-santo-Bursera-graveolensKunth-Triana-Planch-from-Jipijapa-Ecuador.pdf?utm_source=chatgpt.com)

[l-composition-and-AChE-BuChE-activities-of-the-essential-oil-of-palo-santo-](https://www.researchgate.net/profile/Chabaco-Armijos/publication/362363457_Chemical_composition_and_AChE-BuChE_activities_of_the_essential_oil_of_palo_santo_Bursera_graveolensKunth_Triana_Planch_from_Jipijapa_Ecuador/links/62ecf72f0b37cc344770ed97/Chemical-composition-and-AChE-BuChE-activities-of-the-essential-oil-of-palo-santo-Bursera-graveolensKunth-Triana-Planch-from-Jipijapa-Ecuador.pdf?utm_source=chatgpt.com)

[Bursera-graveolensKunth-Triana-Planch-from-Jipijapa-](https://www.researchgate.net/profile/Chabaco-Armijos/publication/362363457_Chemical_composition_and_AChE-BuChE_activities_of_the_essential_oil_of_palo_santo_Bursera_graveolensKunth_Triana_Planch_from_Jipijapa_Ecuador/links/62ecf72f0b37cc344770ed97/Chemical-composition-and-AChE-BuChE-activities-of-the-essential-oil-of-palo-santo-Bursera-graveolensKunth-Triana-Planch-from-Jipijapa-Ecuador.pdf?utm_source=chatgpt.com)

[Ecuador.pdf?utm_source=chatgpt.com](https://www.researchgate.net/profile/Chabaco-Armijos/publication/362363457_Chemical_composition_and_AChE-BuChE_activities_of_the_essential_oil_of_palo_santo_Bursera_graveolensKunth_Triana_Planch_from_Jipijapa_Ecuador/links/62ecf72f0b37cc344770ed97/Chemical-composition-and-AChE-BuChE-activities-of-the-essential-oil-of-palo-santo-Bursera-graveolensKunth-Triana-Planch-from-Jipijapa-Ecuador.pdf?utm_source=chatgpt.com)

Schroder, V., Radu, N., Cornea, P. C., Coman, O. A., Pirvu, L. C., Mohammed, M. S.

O., Stefaniu, A., Pintilie, L., Bostan, M., Caramihai, M. D., & Roman, V. (2022).

Studies Regarding the Antimicrobial Behavior of Clotrimazole and Limonene.

Antibiotics 2022, Vol. 11, 11(12). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121816>

- Sotelo, A., Figueroa, C., Césare, M., & Alegría, M. (2017). *Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Essential Oil of Bursera graveolens (Burseraceae) From Perú* [Universidad Nacional Agraria La Molina].
https://www.researchgate.net/profile/Mary-Cesare-Coral/publication/320247305_Chemical_Composition_Antimicrobial_and_Antioxidant_Activities_of_the_Essential_Oil_of_Bursera_graveolens_Burseraceae_From_Peru/links/59e6df3ea6fdcc0e88249956/Chemical-Composition-Antimicrobial-and-Antioxidant-Activities-of-the-Essential-Oil-of-Bursera-graveolens-Burseraceae-From-Peru.pdf
- Supino, R. (1995). MTT Assays. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 43, 137–149. <https://doi.org/10.1385/0-89603-282-5:137>
- Tatiana Mosquera. (2022). *Productos naturales: investigación y perspectivas en Ecuador*. Scielo Books . https://books.scielo.org/id/4kqtv/pdf/tatiana-9789978108260.pdf?utm_source=chatgpt.com
- Wagner, H., & Bladt, S. (2001). *Plant Drug Analysis*.
- World Health Organization. (2017, September 7). *Priorización de patógenos para orientar el descubrimiento, la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos para infecciones bacterianas resistentes a los medicamentos, incluida la tuberculosis*. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-EMP-IAU-2017.12>

ANEXOS

Anexo A.

Ficha técnica del aceite esencial *Bursera graveolens* (palo santo)

FICHA TÉCNICA

AROMAVIDA®
TU UNIVERSO ORGÁNICO

GENERALIDADES :

NOMBRE : Ac.Esencial Palo santo 10ml

CÓDIGO : PAEB80-010

NOMBRE CIENTÍFICO : *Bursera graveolens*
NOMBRE COMÚN : Ac.Esencial Palo santo 10ml
COMMON NAME : Palo Santo / Holly wood



CAS : -
EC : -
PRESENTACIÓN : 10 mL
USO : Ingrediente para productos múltiples. Siempre diluir antes de utilizar.

INGREDIENTES INCI : 100% *Bursera graveolens* oil

PRECAUCIONES : No usar sin diluir. Evitar contacto con ojos y mucosas. Conservar en un lugar fresco, seco y oscuro. Mantener fuera del alcance de los niños.

DESCRIPCIÓN GENERAL :

Aceite esencial 100% puro obtenido de la destilación de las plantas por arrastre de vapor. Se trata de un aceite esencial totalmente natural sin aditivos químicos y de plantas libres de organismos genéticamente modificados (OGM).

ORGANOLÉPTICOS :

ASPECTO : Fluido y límpido
COLOR : Amarillo claro a oscuro, Transparente
OLOR : A resina, Cálido, A madera
SABOR : N/A

FISICOQUÍMICOS :

DENSIDAD RELATIVA : 0.80 - 0.90
ÍNDICE DE REFRACCIÓN : 1.470 - 1.478
BRIX : 71.8 - 75.0 %
pH: N/A
COMPONENTES PRINCIPALES : LIMONENE, MENTHOFURANE , alpha-TERPINEOL, GERMACRENE D, CARVONE

OTRA INFORMACIÓN :

FAMILIA BOTÁNICA : Burseraceae
PARTE PROCESADA : Hojas & Ramas
TIPO DE PRODUCTO : Aceite esencial
TIPO DE CULTIVO : Convencional
MÉTODO DE FABRICACIÓN : Destilación por arrastre de vapor

COSING :

NOMBRE INCI : *Bursera Graveolens* Wood Oil
FUNCIONES : FLAVOURING, FRAGRANCE, PERFUMING
DESCRIPCIÓN : *Bursera Graveolens* Wood Oil is the volatile oil obtained from the wood of *Bursera graveolens*, Burseraceae

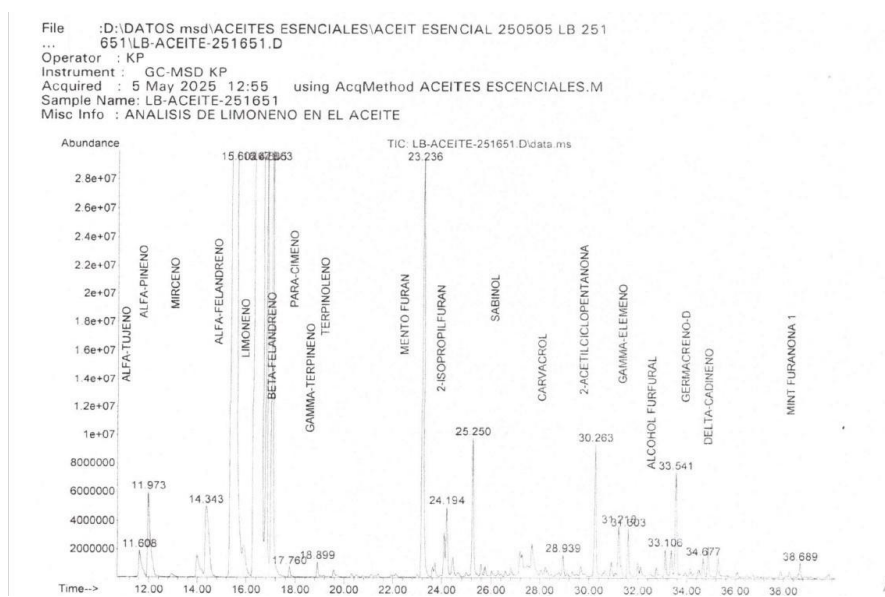
RESTRICCIONES : N/A

GRUPO DE RIESGO PRINCIPAL : Personas con historia de alergia a los aceites esenciales o a la planta de este aceite.

Nota. Ficha técnica del aceite esencial *Bursera Graveolens* otorgado por (AROMAVIDA,2024)
Fuente: AROMAVIDA

Anexo B.

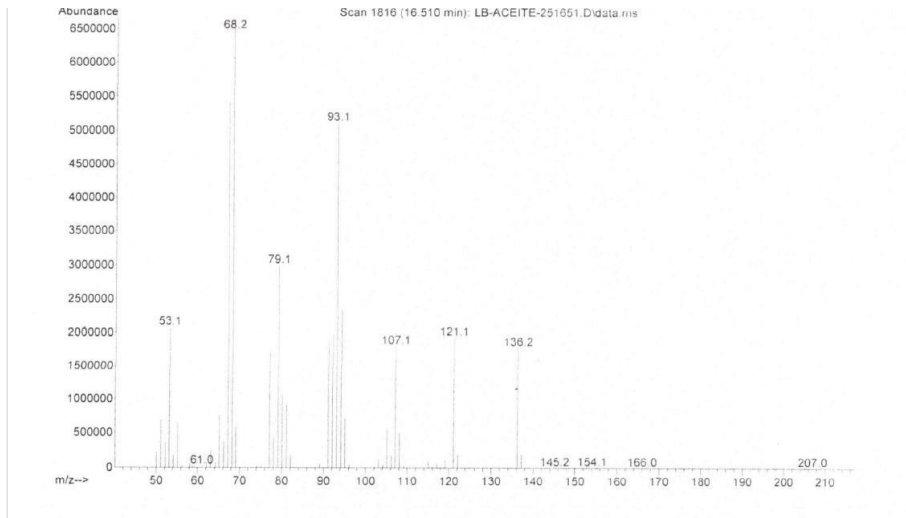
Análisis de GC/MS del aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo).



Nota. Los componentes del aceite esencial *Bursera graveolens* (Palo Santo) Fuente: (Laboratorio de AROMAVIDA,2025).

Anexo C.

Análisis de GC /MS del aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo)



Nota. Los componentes del aceite esencial *Bursera graveolens* (Palo Santo) Fuente: (Laboratorio de AROMAVIDA,2025)

Anexo D.

Documento de compra de la cepa Escherichia coli ATTC 25922 emitido por el Laboratorio

Microbiolab

NO TIENE LOGO

CORTEZ PAZMIÑO MARIA ESTHER

MCP MICROBIOLAB LABORATORIO MICROBIOLOGIA AGRICOLA ECUADOR

Dirección: Calle: REINO DE QUITO 1 Numero: S/N Interseccion: VIA EL QUINCHE GUAYLLABAMBA
Matriz:

Dirección: Calle: REINO DE QUITO 1 Numero: S/N Interseccion: VIA EL QUINCHE GUAYLLABAMBA
Sucursal:

OBLIGADO A LLEVAR CONTABILIDAD NO

R.U.C.: 1713152047001

FACTURA

No. 001-001-000001292

NÚMERO DE AUTORIZACIÓN

0501202601171315204700120010010000012924034905716

FECHA Y HORA DE AUTORIZACIÓN: 05/01/2026 13:08:19

AMBIENTE: PRODUCCIÓN

EMISIÓN: NORMAL

CLAVE DE ACCESO



0501202601171315204700120010010000012924034905716

Razón Social / Nombres y Apellidos: RAMIREZ SALAZAR JOHMAYRA THALIA

Identificación 0150687325

Fecha 05/01/2026 Placa / Matrícula: Guía

Dirección:

Cod. Principal	Cod. Auxiliar	Cantidad	Descripción	Detalle Adicional	Precio Unitario	Subsidio	Precio sin Subsidio	Descuento	Precio Total	
P28		1.00	CEPA PURA EN CAJA PETRI		9.00	0.00	0.00	0.00	9.00	
P34		1.00	LOGISTICA DE TRANSPORTE	Proceso de embalaje y envío por servientrega o transporte terrestre	6.00	0.00	0.00	0.00	6.00	
Información Adicional									SUBTOTAL 0%	15.00
Email: michu_ale123@hotmail.com									SUBTOTAL NO OBJETO DE IVA	0.00
Forma de pago									SUBTOTAL EXENTO DE IVA	0.00
01 - SIN UTILIZACION DEL SISTEMA FINANCIERO									SUBTOTAL SIN IMPUESTOS	15.00
Valor									TOTAL DESCUENTO	0.00
									ICE	0.00
									IRBPNR	0.00
									PROPINA	0.00
									VALOR TOTAL	15.00
									VALOR TOTAL SIN SUBSIDIO	0.00
									AHORRO POR SUBSIDIO: (Incluye IVA cuando corresponda)	0.00

Nota.

Nota. Obtención de la cepa ATCC 25922. Fuente: MCP MICROBIOLAB

ANEXO E

Datos obtenidos de la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Bursera graveolens*

(palo santo) frente *Escherichia coli* ATCC 25922

Réplica	Repetición	Absorbancia	Tratamiento	Absorbancia Control positivo	Concentración $\mu\text{g/mL}$
1	1	0.075	T1	1.210	6000 $\mu\text{g/mL}$
1	2	0.188	T1	1.022	
1	3	0.090	T1	1.151	
2	1	0.087	T1	1.221	
2	2	0.103	T1	1.340	
2	3	0.115	T1	1.034	
3	1	0.173	T1	1.007	
3	2	0.108	T1	0.999	
3	3	0.233	T1	1.067	
1	1	0.050	T2	1.210	3000 $\mu\text{g/mL}$
1	2	0.195	T2	1.022	
1	3	0.125	T2	1.051	
2	1	0.313	T2	1.221	
2	2	0.208	T2	1.340	
2	3	0.233	T2	1.034	
3	1	0.114	T2	1.007	
3	2	0.203	T2	0.999	
3	3	0.186	T2	1.067	
1	1	0.215	T3	1.210	1500 $\mu\text{g/mL}$
1	2	0.173	T3	1.022	
1	3	0.165	T3	1.051	
2	1	0.074	T3	1.221	
2	2	0.203	T3	1.340	
2	3	0.199	T3	1.034	
3	1	0.368	T3	1.007	
3	2	0.191	T3	0.999	
3	3	0.256	T3	1.067	
1	1	0.637	T4	1.210	750 $\mu\text{g/mL}$
1	2	0.458	T4	1.022	
1	3	0.601	T4	1.051	
2	1	0.455	T4	1.221	
2	2	0.594	T4	1.340	
2	3	0.503	T4	1.034	
3	1	0.566	T4	1.007	
3	2	0.447	T4	0.999	

3	3	0.456	T4	1.067	
1	1	1.023	T5	1.210	375 µg/mL
1	2	1.115	T5	1.022	
1	3	1.078	T5	1.051	
2	1	1.138	T5	1.221	
<hr/>					
2	2	1.004	T5	1.340	
2	3	1.009	T5	1.034	
3	1	1.170	T5	1.007	
3	2	1.042	T5	0.999	
3	3	0.903	T5	1.067	
1	1	1.270	T6	1.210	187.5 µg/mL
1	2	1.136	T6	1.022	
1	3	1.120	T6	1.051	
2	1	1.341	T6	1.221	
2	2	1.135	T6	1.340	
2	3	1.101	T6	1.034	
3	1	1.460	T6	1.007	
3	2	1.019	T6	0.999	
3	3	1.041	T6	1.067	
1	1	1.271	T7	1.210	93.75 µg/mL
1	2	1.200	T7	1.022	
1	3	1.110	T7	1.051	
2	1	1.501	T7	1.221	
2	2	1.026	T7	1.340	
2	3	0.999	T7	1.034	
3	1	1.331	T7	1.007	
3	2	0.901	T7	0.999	
3	3	0.111	T7	1.067	
1	1	1.017	T8	1.210	46.87 µg/mL
1	2	1.052	T8	1.022	
1	3	1.345	T8	1.051	
2	1	1.411	T8	1.221	
2	2	1.008	T8	1.340	
2	3	1.455	T8	1.034	
3	1	1.762	T8	1.007	
3	2	1.392	T8	0.999	
3	3	1.053	T8	1.067	

Fuente: Autora (2026)

ANEXO F

Datos obtenidos de la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Bursera graveolens* (palo santo) frente *Candida albicans* ATCC 10231

Réplica	Repetición	Absorbancia	Tratamiento	Absorbancia Control positivo	Concentración $\mu\text{g/mL}$
1	1	0.119	T1	1.051	6000 $\mu\text{g/mL}$
1	2	0.130	T1	1.110	
1	3	0.101	T1	1.045	
2	1	0.141	T1	1.055	
2	2	0.128	T1	1.301	
2	3	0.150	T1	1.245	
3	1	0.125	T1	1.071	
3	2	0.128	T1	1.008	
3	3	0.123	T1	1.111	
1	1	0.619	T2	1.051	3000 $\mu\text{g/mL}$
1	2	0.601	T2	1.110	
1	3	0.433	T2	1.045	
2	1	0.525	T2	1.055	
2	2	0.606	T2	1.301	
2	3	0.522	T2	1.245	
3	1	0.420	T2	1.071	
3	2	0.548	T2	1.008	
3	3	0.499	T2	1.111	
1	1	0.766	T3	1.051	1500 $\mu\text{g/mL}$
1	2	0.780	T3	1.110	
1	3	0.734	T3	1.045	
2	1	0.828	T3	1.055	
2	2	0.830	T3	1.301	
2	3	0.803	T3	1.245	
3	1	0.827	T3	1.071	
3	2	0.815	T3	1.008	
3	3	0.699	T3	1.111	
1	1	0.702	T4	1.051	750 $\mu\text{g/mL}$

1	2	0.801	T4	1.110	
1	3	0.789	T4	1.045	
2	1	0.757	T4	1.055	
2	2	0.755	T4	1.301	
2	3	0.743	T4	1.245	
3	1	0.779	T4	1.071	
3	2	0.765	T4	1.008	
3	3	0.754	T4	1.111	
1	1	0.676	T5	1.051	375 µg/mL
1	2	0.748	T5	1.110	
1	3	0.761	T5	1.045	
2	1	0.708	T5	1.055	
2	2	0.715	T5	1.301	
2	3	0.726	T5	1.245	
3	1	0.756	T5	1.071	
3	2	0.761	T5	1.008	
3	3	0.770	T5	1.111	
1	1	0.678	T6	1.210	187.5 µg/mL
1	2	0.810	T6	1.051	
1	3	0.789	T6	1.110	
2	1	0.742	T6	1.045	
2	2	0.713	T6	1.055	
2	3	0.685	T6	1.245	
3	1	0.817	T6	1.071	
3	2	0.799	T6	1.008	
3	3	0.735	T6	1.111	
1	1	0.680	T7	1.051	93.75µg/mL
1	2	0.875	T7	1.110	
1	3	0.833	T7	1.045	
2	1	0.793	T7	1.055	
2	2	0.694	T7	1.301	
2	3	0.783	T7	1.245	
3	1	0.719	T7	1.071	
3	2	0.726	T7	1.008	
3	3	0.775	T7	1.111	
1	1	0.662	T8	1.051	46.87 µg/mL
1	2	0.880	T8	1.110	
1	3	0.895	T8	1.045	
2	1	0.805	T8	1.055	

2	2	0.822	T8	1.301
2	3	0.846	T8	1.245
3	1	0.713	T8	1.071
3	2	0.729	T8	1.008
3	3	0.745	T8	1.111

Fuente: Autora (2026)