



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“Evaluación de la actividad antimicrobiana del Limoneno
y Cineol y su posible efecto sinérgico o antagónico”**

TESIS

Que para obtener el grado de:
Licenciado en Bioquímica Diagnóstica

PRESENTA:

Montserrat Felipe Martínez

ASESORES:

Dra. Claudia Tzasna Hernández Delgado

Dra. Rocío Serrano Parrales

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Evaluación de la actividad antimicrobiana del Limoneno y Cineol y su posible efecto sinérgico o antagónico

Que presenta la pasante: **Montserrat Felipe Martínez**
Con número de cuenta: **311286762** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de mayo de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q. Mario Arturo Morales Delgado	
VOCAL	Dra. Claudia Tzasna Hernández Delgado	
SECRETARIO	Dr. Enrique Salas Téllez	
1er. SUPLENTE	M. en C. María Guadalupe Avilés Robles	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Guadalupe Hernández Torres	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/javg

A mis abuelitos José Martínez y Cirilo Felipe,
con todo el amor y admiración del mundo.
Q.E.P.D.

Agradecimientos

A mis padres José Guadalupe Felipe Camacho y Alicia Martínez Covarrubias, por siempre apoyarme, enseñarme valores, estar siempre conmigo y nunca dejar que me rindiera. Por siempre dar lo mejor de ustedes día a día, desde que soy pequeña recuerdo como se esforzaban mí. A ustedes les debo mucho de lo que soy y aún más de lo que tengo, en esté trabajo ustedes fueron piezas clave, espero que sea el primero de los muchos éxitos alcance gracias a sus enseñanzas. Los amo con toda mi alma y no importan las circunstancias buenas o malas para mí siempre serán los mejores padres del mundo.

A mi hermana Mayra Felipe Martínez por todos los momentos geniales a tu lado, porque, aunque no entendía porque llegaste al mundo, al final todo fue para bien, así ya no estuve sola. Sé que no atravesamos por el mejor momento, pero espero sepas que te amo demasiado y que siempre voy a estar para ti.

A mis abuelitos José (Q.E.P.D.), Lupe, Cirilo (Q.E.P.D.) y Malena por todo lo que hicieron por mí, por cuidarme, jugar conmigo, por todas y cada una de las anécdotas que ahora están en mi memoria. De ustedes aprendí muchísimo y también por gracias a su apoyo, económico y moral pude concluir con esta etapa, los amo.

A mis tíos por todo su apoyo y por tantos momentos divertidos en familia, no dejemos que las diferencias de pensamiento nos separen. A mis primos por una infancia maravillosa a su lado, gracias a ustedes tengo increíbles memorias, los quiero mucho.

A mi novio Sergio, gracias por ser el mejor amigo del mundo y estar a mi lado siempre, tú eres ese impulso que me hacía falta. Sin ti no habría logrado hacer demasiadas cosas, estuviste cuando fui feliz, cuando estuve triste, cuando quise abandonar todo y nunca me dejaste sola, siempre viste lo mejor de mí y me impulsaste a ser mejor. Te amo demasiado.

A mis amigos: Adrián, Mary, Lexy, Irving, Liz, Monse 25, Fernanda, Maya, gracias por tantos momentos divertidos y tristes, por todas esas anécdotas, viajes y momentos tan felices que he tenido con ustedes, yo sé que en muchos años vamos a seguir juntos. Los amo. A mis amigos

del laboratorio de Farmacognosia-Fitoquímica: Gelos, Christian y Erick, gracias por ayudarme con mi trabajo experimental y por todas esas platicas y risas que tuvimos, hicieron que nunca estuviera estresada, los quiero mucho y espero que sigamos juntos.

A la Dra. Claudia Tzasna por haberme abierto las puertas de su laboratorio, por confiar y creer en mi aún sin conocerme. En usted encontré una gran tutora y un ejemplo a seguir. Gracias por toda la ayuda y oportunidades de aprendizaje que me brindó. La quiero mucho Doc. Nani, es usted una grandiosa persona.

A la Dra. Rocío, gracias por estar conmigo en cada uno de los experimentos, por su paciencia y por todas las palabras de aliento que me brindó, por todas las conversaciones que tuvimos de camino a la facultad. La quiero mucho Doctora Chio.

Índice general

I-	Justificación	1
II-	Introducción	5
III-	Antecedentes	5
IV-	Hipótesis	5
V-	Objetivo general	6
VI-	Objetivos particulares	6
VII-	Metodología	7
	1. Obtención de los compuestos	7
	2. Bioensayos	7
	3. Actividad antibacteriana	7
	3.1 Microorganismos utilizados	7
	3.2 Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana	7
	3.3 Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana	8
	4. Actividad antifúngica	8
	4.1 Microorganismos utilizados	8
	4.2 Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica	8
	4.3 Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica	8
	4.4 Efecto de los compuestos Limoneno y Cineol y sus mezclas sobre la curva de crecimiento de levaduras	8
	5. Evaluación de la interacción entre los compuestos Limoneno y Cineol	9
VIII-	Resultados y análisis	9
IX-	Discusión	23
X-	Conclusiones	28
XI-	Apéndices	
	Apéndice 1: Estructura química de los compuestos Limoneno y Cineol	29
	Apéndice 2: Método de difusión en agar de Kirby-Baüer	29
	Apéndice 3: Técnica de macrodilución en caldo de Koneman	30
	Apéndice 4: Curva de supervivencia y efecto sobre el crecimiento	31
XII-	Bibliografía	33

Índice de figuras

FIGURA	TÍTULO	PAGINA
Figura 1	Actividad antifúngica cualitativa del Limoneno, Cineol y sus mezclas sobre hongos levaduriformes.	17
Figura 2	Efecto del Limoneno sobre la curva de crecimiento de <i>C. albicans</i> 17MR.	19
Figura 3	Efecto del Cineol sobre la curva de crecimiento de <i>C. albicans</i> 17MR.	19
Figura 4	Efecto de la mezcla Limoneno/Cineol 1:1 sobre la curva de crecimiento de <i>C. albicans</i> 17MR.	19
Figura 5	Efecto de la mezcla Limoneno/Cineol 25:75 sobre la curva de crecimiento de <i>C. albicans</i> 17MR.	19
Figura 6	Efecto de la mezcla Limoneno/Cineol 75:25 sobre la curva de crecimiento de <i>C. albicans</i> 17MR.	19
Figura 7	Efecto del Limoneno sobre la curva de crecimiento de <i>C. glabrata</i> .	20
Figura 8	Efecto del Cineol sobre la curva de crecimiento de <i>C. glabrata</i> .	20
Figura 9	Efecto de la mezcla Limoneno/Cineol 1:1 sobre la curva de crecimiento de <i>C. glabrata</i> .	20
Figura 10	Efecto de la mezcla Limoneno/Cineol 25:75 sobre la curva de crecimiento de <i>C. glabrata</i> .	20
Figura 11	Efecto de la mezcla Limoneno/Cineol 75:25 sobre la curva de crecimiento de <i>C. glabrata</i> .	20
Figura 12	Efecto del Limoneno sobre la curva de crecimiento de <i>C. tropicalis</i> .	21
Figura 13	Efecto del Cineol sobre la curva de crecimiento de <i>C. tropicalis</i> .	21
Figura 14	Efecto de la mezcla Limoneno/Cineol 1:1 sobre la curva de crecimiento de <i>C. tropicalis</i> .	21
Figura 15	Efecto de la mezcla Limoneno/Cineol 25/75 sobre la curva de crecimiento de <i>C. tropicalis</i> .	21
Figura 16	Efecto de la mezcla Limoneno/Cineol 75:25 sobre la curva de crecimiento de <i>C. tropicalis</i> .	21

Índice de cuadros

Cuadro	TÍTULO	PÁGINA
Cuadro 1	Contribución de estudios antimicrobianos y de interacción de Limoneno y Cineol.	5
Cuadro 2	Actividad antibacteriana de Limoneno, Cineol y sus mezclas sobre cepas Gram positivas.	10
Cuadro 3	Actividad antibacteriana de Limoneno, Cineol y sus mezclas sobre cepas Gram negativas.	11
Cuadro 4	Tipos de interacciones de las mezclas de los compuestos puros en cepas Gram positivas.	14
Cuadro 5	Tipos de interacciones de las mezclas de los compuestos puros en cepas Gram negativas.	15
Cuadro 6	Actividad antifúngica de Limoneno, Cineol y sus mezclas sobre cepas levaduriformes.	16
Cuadro 7	Tipos de interacciones de las mezclas de los compuestos puros en cepas levaduriformes.	18

Resumen

Los terpenos presentes en los aceites esenciales como el Limoneno y Cineol, se encuentran distribuidos en la naturaleza y a ellos se les atribuyen diversas propiedades como desinflamantes, insecticidas y antimicrobianos. El objetivo de él presente trabajo es evaluar la capacidad antimicrobiana del Limoneno y Cineol, así como también la determinación del tipo de interacción que ejercen al combinarse en diferentes proporciones (1:1, 25:75 y 75:25). La actividad antimicrobiana se determinó utilizando el método de difusión en agar de Kirby-Baüer, sobre 18 cepas bacterianas (9 cepas Gram positivas y 9 Gram negativas), 3 de hongos levaduriformes y 4 cepas de hongos miceliados. La determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC), la Concentración Bactericida Mínima (CBM) y Concentración Fungicida Mínima (CFM) se llevó a cabo por el método de dilución en caldo. Los resultados fueron que el Limoneno y Cineol inhibieron a las 9 cepas Gram positivas, mientras que en las Gram negativas el Cineol inhibió 8 y el Limoneno las 9 cepas desafiadas. Las combinaciones 1:1 y 75:25 inhibieron a las 9 cepas Gram positivas y a las 9 negativas, mientras que la combinación 25:75 tuvieron efecto en 8 cepas de bacterias Gram positivas y 8 en Gram negativas. Para el Cineol las cepas más sensibles fueron *E. coli* CUSI y *Enterococcus faecalis* ATCC 14506 (MIC= 3.00 mg/mL 1.50 mg/mL respectivamente), para el Limoneno y las combinaciones no se obtuvieron valores de MIC ni CBM. Ambos compuestos y sus combinaciones presentaron actividad en las 3 cepas de hongos levaduriformes, mientras que en hongos miceliados no hubo efecto. *C. albicans* 17MR fue la más sensible a los 5 tratamientos (MIC= 0.10 mg/mL de limoneno y cineol, MIC= >1 mg/mL para las combinaciones 1:1 y 25:75 y 1mg/mL de la combinación 75:25). Los resultados mostraron que los compuestos por separado actúan de la misma manera que en combinación para las bacterias, ya que presentaron una interacción de tipo indiferente. En el caso de las levaduras, se recomienda utilizar los compuestos por separado, ya que las interacciones que resultaron de las combinaciones fueron de tipo antagónico. Para los hongos miceliados no se recomiendan estos compuestos, ya que o tuvieron actividad.

INTRODUCCIÓN

Los agentes antimicrobianos son sustancias químicas sintéticas o de Origen natural que impiden la multiplicación o desarrollo de la colonización microbiológica (Igal *et al.*, 2018; Matute, 2008). Los antibióticos son un tipo de antimicrobianos diseñados para atacar infecciones bacterianas, así como infecciones causadas por hongos como las candidiasis dentro (o sobre) el cuerpo (Fuhrmann, 2015). En los últimos años se ha incrementado la resistencia de los microorganismos hacia estos medicamentos (antibióticos) (Igal *et al.*, 2018). La resistencia bacteriana se define como el mecanismo de una bacteria para sobrevivir en concentraciones de antibiótico que inhiben/matan a otras de la misma especie (Fernández *et al.*, 2003). Sin dudas, el uso excesivo y con frecuencia empírico de los antimicrobianos para el tratamiento de diferentes situaciones clínicas ha conducido a modificaciones de la ecología, morfología y fisiología bacteriana, lo que puede determinar consecuencias fatales para la salud pública (Hernández, 2001).

Como alternativas al uso de los antimicrobianos sintéticos se encuentra el uso de plantas medicinales. Por lo tanto, el consumo de plantas medicinales (medicina tradicional) o fitoterapia constituye uno de los aspectos más importantes dentro de la medicina alternativa y complementaria (Winslow y Kroll, 1998; Ernest, 2000). La medicina tradicional es todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales (OMS, 1997).

No hay dudas de que las ventajas de consumir productos naturales como uso antimicrobiano son innumerables. El hecho de que las bacterias y los hongos aun no hayan generado resistencia ya es suficiente para plantear su empleo regular, pero no hay que olvidar que además favorecen el proceso de regeneración epitelial, estimulan los mecanismos naturales de eliminación, favorecen el funcionamiento de los órganos en general, inhiben y/o erradican el crecimiento de los microorganismos y aumentan las defensas del organismo, mientras que los antibióticos sintéticos suelen bajarlas (Cabrera *et al.*, 2015).

El 80 % de la población mundial, más de cuatro mil millones de personas, utiliza las plantas como principal remedio medicinal, según señala la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1997). Esto se debe a que algunas plantas poseen compuestos producto del metabolismo primario y sobre todo secundario a los que deben dichas actividades, como antioxidantes, antimicrobianos, entre otras (Escalona, 2015).

Las plantas elaboran dos tipos de componentes químicos: los metabolitos primarios y los secundarios. Los metabolitos primarios son fundamentales para la nutrición, interacción con el medio ambiente que las rodea (Martinez-Esteso *et al.*, 2009). Tales compuestos son los carbohidratos, proteínas, grasas, ácidos nucleicos, aminoácidos, algunos ácidos carboxílicos, vitaminas, otros (Sena, 2004).

Mientras que, los metabolitos secundarios de las plantas a menudo se denominan productos naturales, estos productos no tienen un papel fundamental en el mantenimiento de los procesos de la vida, pero son importantes para que la planta interactúe. Estos son sintetizados a partir de metabolitos primarios y son necesarios en defensa de las plantas contra herbívoros y patógenos, para la polinización, floración o dispersión, entre otras (Ramakrishna y Gokare, 2011). Dichos metabolitos secundarios no son comunes a todas las plantas, pero son característicos de cada familia, género y especie, por ejemplo, la solanina, que es característico del género *Solanum*. Como ejemplo de los grupos de metabolitos secundarios se incluyen: alcaloides, flavonoides, esteroides, cumarinas, taninos, monoterpenos y otros (Sena, 2004).

Los aceites esenciales (AE) son mezclas complejas de metabolitos secundarios, obtenidos a partir de fracciones volátiles de las plantas por procesos de destilación, son de aspecto semi oleoso, altamente volátiles, solubles en aceites, alcohol, éter de petróleo, tetracloruro de carbono y demás solventes orgánicos; insolubles en agua, aunque le transmiten su perfume; son inflamables, responsables del aroma de las plantas (Sena, 2004; Vélez-Terranova *et al.*, 2014; Yáñez *et al.*, 2007).

Los principales componentes de los aceites esenciales son los terpenoides, los cuales se encuentran en muchas hierbas y especias. Estos

compuestos se derivan de una estructura básica de 5 carbonos (C_5H_8), comúnmente llamada unidad de isopreno y se clasifican en función del número de estas unidades en su esqueleto. Los compuestos activos más importantes están incluidos en 2 grupos químicos: terpenoides (monoterpenoides y sesquiterpenoides) y fenilpropanoides (Vélez-Terranova *et al.*, 2014).

Los AE presentan una fuerte actividad antimicrobiana que inhibe el crecimiento y la supervivencia de la mayoría de microorganismos (Vélez-Terranova *et al.*, 2014). Los terpenos, terpenoides, aldehídos y alcoholes presentes en los AE son los responsables de dicha actividad antimicrobiana (Cruz, 2013).

Es por ello que el interés en los monoterpenos aislados ha ido creciendo en los últimos años, debido a su eventual uso en la industria farmacéutica o su utilidad farmacológica que estos presentan. Hernández *et al.*, (2003 y 2008) han realizado diversos estudios sobre los aceites esenciales de algunas especies de la familia Verbenaceae tales como: *Lantana achyranthifolia* Desf. y *Lippia graveolens* H.B.K., encontrando que presentan compuestos comunes entre ellos como: α -pineno, β -pineno, Carvacrol, Eugenol, Mirceno, Ocimeno, Salicilato de metilo, Farneseno, Timol, Limoneno y Cineol.

El Limoneno (Apéndice 1), es uno de los terpenos más comunes en la naturaleza y un componente importante de numerosos aceites esenciales de cítricos (Zulaikha *et al.*, 2015). Este compuesto ha sido ampliamente estudiado, y ha demostrado ser antiinflamatorio, antioxidante, anticonceptivo, antimicrobiano, anticancerígeno, antidiabético, antiviral y gastroprotector (Vieira *et al.*, 2018).

Mientras que el 1,8-cineol (Apéndice 1) es un monoterpeno natural, también conocido como eucaliptol. Es un compuesto importante de muchos aceites esenciales de plantas, es conocido por su efecto mucolítico y acción espasmolítica sobre el tracto respiratorio. También ha demostrado beneficios terapéuticos en la inflamación de enfermedades respiratorias, como el asma y enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) (Juergens, 2014).

Existen plantas que en sus aceites esenciales hay terpenos y poseen actividad antimicrobiana, aunque hay ocasiones en las que un terpeno aislado de una planta resulta con menos actividad que el aceite esencial, el

cual es una mezcla de compuestos (Bandoni *et al.*, 2009). En dicha mezcla los diferentes componentes pueden interactuar para aumentar o reducir la eficacia antimicrobiana (Bassolé y Juliani, 2012). Dichas interacciones se conocen como interacciones farmacológicas.

Una interacción farmacológica ocurre cuando 2 o más compuestos reaccionan entre sí, alterando los efectos clínicos del otro. Esta interacción puede dar como resultado un aumento (Sinergismo) o disminución (Antagonismo) en la actividad farmacológica de los agentes (Council on Family Health, 2004; IUPHAR, 2018). El término “sinergismo” se refiere a la interacción farmacológica o toxicológica de sustancias e incluso moléculas diferentes interaccionan, lo que provoca un efecto biológico combinado mayor a la suma de los efectos individuales (OMS, 1997).

En cuanto al antagonismo surge cuando el efecto combinado de dos o más factores es menor que el efecto individual de cualquiera de ellos. En los ensayos biológicos, este término se puede usar cuando se produce una respuesta específica por exposición a cualquiera de los dos factores, pero no a ambos (OMS, 1997).

Por lo anterior se pretende evaluar la actividad antimicrobiana de dos compuestos puros como lo es el Limoneno y el Cineol sobre cepas bacterianas y de hongos de interés clínico.

Antecedentes

Sobre el Limoneno y Cineol se han realizado diversos estudios de sus efectos, algunos de ellos se encuentran resumidos en el cuadro 1.

Cuadro 1. Contribución de estudios antimicrobianos y de interacción de Limoneno y Cineol.

Referencia	Aceite o interacción	País de referencia	Aportación
Candelaria Dueñas S., 2016.	Cineol y Limoneno	México	Afirma que el Cineol y el Limoneno poseen actividad antimicrobiana en cepas Gram positivas y negativas y levaduras.
Hendry <i>et al.</i> , 2009.	Cineol	Inglaterra	Actividad antimicrobiana del aceite de eucalipto crudo, de su componente principal, sólo y en combinación con Gluconato de clorixidina.
Vieira <i>et al.</i> , 2018.	Limoneno	Brasil	El limoneno ha sido ampliamente estudiado, y ha demostrado ser antiinflamatorio, antioxidante, anticonceptivo, anticancerígeno, antidiabético, antimicrobiano, antiviral y gastroprotector.
Obidi <i>et al.</i> , 2013.	Limoneno	Nigeria	Menciona que el aceite esencial de naranja tiene como componente al limoneno y este AE posee actividad antimicrobiana.

Justificación

En la actualidad son varios los estudios que se han realizado sobre el Limoneno y el Cineol, y se sabe que están presentes en el aceite esencial de muchas especies de plantas que han presentado actividad antimicrobiana, por lo tanto, es importante conocer su efecto antimicrobiano por separado y en combinaciones contra diferentes cepas microbianas.

Hipótesis

Si el Cineol y el Limoneno se encuentran presentes en el aceite esencial de diferentes especies de plantas con actividad antimicrobiana, entonces los compuestos puros presentaran actividad antimicrobiana.

Objetivo General:

- Evaluar el efecto antimicrobiano conjunto de los compuestos (Limoneno y Cineol) mediante técnicas cuantitativas y cualitativas para demostrar la existencia de un posible efecto sinérgico o antagónico en la actividad antimicrobiana.

Objetivos particulares:

- Evaluar cualitativa y cuantitativamente el efecto antimicrobiano del Limoneno y Cineol por separado.
- Evaluar el efecto del Limoneno y Cineol sobre las curvas de crecimiento de poblaciones de las cepas Gram positivas, Gram negativas, levaduras y hongos miceliados más sensibles.
- Determinar de manera cualitativa y cuantitativamente la actividad antimicrobiana de mezclas de Limoneno y Cineol en diferentes proporciones.
- Evaluar el efecto de la combinación de Limoneno y Cineol sobre las curvas de crecimiento de las dos cepas bacterianas Gram positivas y negativas más sensibles.

Metodología

Obtención de los compuestos

Los compuestos se obtuvieron de Sigma-Aldrich, Limoneno (# cat. 183164) y Cineol (# cat. C80601).

Bioensayos

Actividad antibacteriana

Microorganismos utilizados. Los microorganismos empleados para evaluar la actividad antimicrobiana fueron los siguientes:

Bacterias Gram positivas: Cepas de catálogo: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Micrococcus luteus* ATCC 10240, *S. epidermidis* ATCC 12228 y *Enterococcus faecalis* ATCC 14506. Cepas donadas por el laboratorio de microbiología de la FES Cuautitlán: *S. aureus* FES-C y *S. epidermidis* FES-C y cepas multirresistentes y donadas de casos clínicos por el laboratorio de análisis de la CUSI de la FES Iztacala (UNAM): *S. aureus* 23MR, *S. aureus* CUSI, *S. aureus* cc.

Bacterias Gram negativas: *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 fueron donadas por el laboratorio de microbiología de la FES Cuautitlán, *Escherichia coli* 82MR y *E. coli* ATCC 25922 fueron donadas por el laboratorio de análisis clínicos de la CUSI de la FES Iztacala (UNAM), *Salmonella typhi* ATCC 19430, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Serratia marcescens* ATCC 14756, *Salmonella entérica* subsp. *enterica* serovar *typhi* ATCC 7251, *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724 y *K. pneumoniae* ATCC 27853 y *Bacillus subtilis*.

Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana

Esta actividad cualitativa se evaluó con base en la técnica de difusión en agar o de Kirby Baüer (Koneman, 1996). Se utilizaron sensidiscos impregnados con 3.36 mg de limoneno y con 3.69 mg de cineol contenidos en 4 µL de los compuestos puros. Para las mezclas se utilizaron sensidiscos impregnados con 4 µL en las siguientes proporciones limoneno/cineol: 1:1 (3.60 mg), 25:75 (3.5 mg) y 75:25 (3.46 mg). Los bioensayos se realizaron por triplicado. Como control positivo se utilizaron sensidiscos impregnados con 25 µg de

cloranfenicol. Cada ensayo se realizó por triplicado en placas de agar Müller Hinton (Apéndice 2).

Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana

La concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración bactericida mínima, se evaluó por medio de la técnica de dilución en caldo (Picazo, 2000). Se utilizaron concentraciones de 4.0, 3.0, 2.0, 1.5, 1.0, 0.75, 0.5, 0.0 mg/mL de limoneno y cineol por separado. Para los bioensayos de las mezclas se emplearon las mismas concentraciones en proporción limoneno/cineol: 1:1, 25:75 y 75:25. Como control positivo se utilizó cloranfenicol a diferentes concentraciones. Los bioensayos se realizaron por triplicado (Apéndice 3).

Actividad antifúngica

Microorganismos utilizados:

Cepas levaduriformes y miceliares: *Candida albicans* 17MR aislada de un caso clínico, donada por el laboratorio de Análisis Clínicos FES Iztacala, *C. glabrata* y *C. tropicalis* aisladas de casos clínicos, donadas por el Hospital Ángeles (Metropolitano). Los hongos filamentosos utilizados fueron *Aspergillus niger*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Fusarium moniliforme* y *F. sporotrichum*.

Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica

En esta prueba, para hongos filamentosos se realizó el método de inhibición del crecimiento radial (Wang y Bun, 2000); se utilizaron sensidiscos impregnados con 4 µL de Limoneno y Cineol (3.36 mg y 3.69 mg respectivamente) por separado; en el caso de las mezclas se utilizaron sensidiscos con 4 µL de limoneno/cineol en proporción 1:1, 25:75 y 75:25; como control positivo se utilizaron 50 mcg de Ketoconazol. En cuanto a la actividad antifúngica de los hongos levaduriformes, se llevó a cabo el mismo procedimiento de las bacterias y como control positivo se utilizó Nistatina (30 mcg). Para ambos tipos de hongos se realizaron ensayos por triplicado y se llevaron a cabo en agar PDA.

Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica

En la evaluación cuantitativa sobre los hongos levaduriformes se llevó a cabo el mismo método que el de las bacterias (dilución en caldo), pero utilizando como medio de cultivo el agar PDA y como control positivo se utilizó Nistatina.

Efecto de los compuestos Limoneno, Cineol y sus mezclas sobre la curva de crecimiento de levaduras

Para la evaluación de las curvas de crecimiento se llevó a cabo por el método propuesto por Kubo y colaboradores en 1996 (Modificado por Ávila en 1996). En el cual se evaluaron las 3 cepas levaduriformes, que fueron las que resultaron más sensibles, contra la ½ MIC, MIC y CFM, además de un testigo; contabilizando el número de UFC (Unidades Formadoras de Colonias) en 24 horas divididas en 7 tiempos para los compuestos separados y las mezclas (Apéndice 4).

Evaluación de la interacción entre los compuestos Limoneno y Cineol

Para determinar el tipo de interacción entre el Limoneno y el Cineol en las diferentes proporciones (1:1, 25:75 y 75:25) se utilizó el Índice de Correlación Fraccionada (ICF) (Sierra *et al.*, 2011) El ICF se obtiene a partir de la siguiente fórmula:

$$\sum ICF = \frac{MIC \text{ de la Proporción}}{MIC \text{ de limoneno}} + \frac{MIC \text{ de la Proporción}}{MIC \text{ de cineol}}$$

Con base en el resultado obtenido de la ecuación, se consideró:

Sinergismo si $ICF \leq 0.5$, adición si $ICF > 0.5$ pero ≤ 1.0 , indiferencia si $ICF > 1$ pero < 4 y antagonismo si $ICF \geq 4$.

Resultados y análisis

Evaluación de la actividad antimicrobiana

Cuadro 2. Actividad antibacteriana de Limoneno, Cineol y sus mezclas sobre cepas Gram positivas

Cepa bacteriana		Limonoeno	Cineol	L/C 1:1	L/C 25:75	L/C 75:25	Cloranfenicol
<i>E. faecalis</i> ATCC 14506	Halo	8.00 ± 0.81	14.33 ± 0.47	6.00 ± 0.00	8.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	11.00 ± 0.00
	MIC	>4.00	3.00	>4.00	>4.00	>4.00	3.00
	CBM	>4.00	4.00	>4.00	>4.00	>4.00	7.00
<i>M. luteus</i> ATCC 10240	Halo	9.33 ± 0.47	9.66 ± 0.47	6.66 ± 0.47	n.a.	11.00 ± 0.81	33.33 ± 0.47
	MIC	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	2.00
	CBM	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	5.00
<i>S. aureus</i> 23MR	Halo	10.66 ± 1.25	7.66 ± 0.47	6.00 ± 0.00	7.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	23.33 ± 0.47
	MIC	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	7.00
	CBM	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	10.00
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Halo	8.66 ± 0.94	6.50 ± 0.50	8.66 ± 0.47	7.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	20.66 ± 0.94
	MIC	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	8.00
	CBM	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	12.00
<i>S. aureus</i> CC	Halo	7.66 ± 0.47	6.00 ± 0.00	7.66 ± 0.47	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	20.00 ± 0.00
	MIC	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	2.00
	CBM	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	10.00
<i>S. aureus</i> CUSI	Halo	9.66 ± 0.47	7.00 ± 0.00	8.66 ± 0.47	9.66 ± 0.47	11.00 ± 0.81	25.00 ± 0.00
	MIC	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	4.00
	CBM	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	8.00
<i>S. aureus</i> FES-C	Halo	9.50 ± 0.50	7.33 ± 0.47	6.00 ± 0.00	7.00 ± 0.00	11.33 ± 0.94	21.33 ± 0.94
	MIC	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	4.00
	CBM	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	10.00
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	Halo	8.66 ± 0.47	7.33 ± 0.47	10.33 ± 1.24	12.00 ± 0.00	12.33 ± 0.47	12.66 ± 0.47
	MIC	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	2.00
	CBM	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	5.00
<i>S. epidermidis</i> FES-C	Halo	8.33 ± 0.47	10.66 ± 1.24	6.33 ± 0.47	6.00 ± 0.00	9.33 ± 0.47	26.00 ± 0.81
	MIC	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	2.00
	CBM	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	5.00

Halos de inhibición en mm. Concentración de MIC y CBM en (mg/mL). Valores promedio de 3 repeticiones ± D.E. (n.a. = No activo). Cloranfenicol [mcg/mL]

Cuadro 3. Actividad antibacteriana de Limoneno, Cineol y sus mezclas sobre cepas Gram negativas.

Cepa bacteriana		Limóneno	Cineol	L/C 1:1	L/C 25:75	L/C 75:25	Cloranfenicol
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Halo	7.00 ± 0.00	13.33 ± 0.81	6.00 ± 0.00	7.66 ± 0.57	6.00 ± 0.00	20.66 ± 0.94
	MIC	>4.00	4.00	>4.00	>4.00	>4.00	2.00
	CBM	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	4.00
<i>E. coli 82MR</i>	Halo	10.66 ± 0.47	7.66 ± 0.47	9.66 ± 0.47	n.a.	11.66 ± 0.57	30.66 ± 0.94
	MIC	>4.00	3.00	>4.00	>4.00	>4.00	4.00
	CBM	>4.00	4.00	>4.00	>4.00	>4.00	10.00
<i>E. coli CUSI</i>	Halo	10.00 ± 0.00	17.00 ± 0.81	8.33 ± 0.94	12.00 ± 0.00	9.33 ± 0.47	22.33 ± 0.47
	MIC	>4.00	1.50	>4.00	>4.00	>4.00	4.00
	CBM	>4.00	4.00	>4.00	>4.00	>4.00	8.00
<i>K. oxytoca</i> ATCC 8724	Halo	8.66 ± 1.24	12.66 ± 0.47	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	21.33 ± 0.47
	MIC	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	1.00
	CBM	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	2.00
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	Halo	13.00 ± 0.81	n.a.	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	12.33 ± 0.94
	MIC	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	1.00
	CBM	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	5.00
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Halo	8.00 ± 0.81	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	21.33 ± 0.94
	MIC	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	n.a.
	CBM	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	n.a.
<i>S. typhi</i> ATCC 19430	Halo	9.66 ± 0.47	14.33 ± 0.94	6.66 ± 0.47	8.00 ± 0.00	9.66 ± 0.47	21.33 ± 0.94
	MIC	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	n.a.
	CBM	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	n.a.
<i>S. enterica</i> ATCC 7251	Halo	8.33 ± 0.94	7.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.66 ± 0.47	24.00 ± 0.81
	MIC	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	1.00
	CBM	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	2.00
<i>S. marcescens</i> ATCC 14576	Halo	7.00 ± 0.81	17.66 ± 0.94	7.00 ± 0.81	8.33 ± 0.47	6.00 ± 0.00	20.00 ± 0.00
	MIC	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	2.00
	CBM	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	12.00

Halos de inhibición en mm. Concentración de MIC y CBM en (mg/mL). Valores promedio de 3 repeticiones ± D.E. (n.a. = No activo)
Cloranfenicol [mcg/mL]

Evaluación cualitativa.

Los resultados de la actividad antimicrobiana cualitativa se encuentran en los cuadros 2 y 3. Se observan las bacterias Gram positivas y negativas que presentaron susceptibilidad a los compuestos separados (Limoneno y Cineol), así como a las 3 combinaciones (1:1, 25:75 y 75:25, Limoneno/Cineol) y el control positivo utilizado.

De las 18 cepas bacterianas analizadas, el Limoneno por si solo presentó actividad en todas las cepas, mientras que el Cineol solo tuvo efecto en 17 cepas, difiriendo solo en *K. pneumoniae* ATCC 13883 (Cuadros 2 y 3).

La actividad antibacteriana en las mezclas fue; la mezcla 1:1 y 75:25 presentaron actividad en las 18 cepas, la mezcla 25:75 presento actividad en 16 cepas, 8 Gram positivas y 8 en Gram negativas, siendo las cepas *M. luteus* ATCC 10240 y *E. coli* 82MR respectivamente (Cuadros 2 y 3).

En cuanto a las mezclas en las cepas Gram positivas, la mezcla Limoneno/Cineol 1:1 y 75:25 presentaron halos de inhibición en todas las cepas, mientras que la mezcla 25:75 tuvo efecto en solo 8 cepas, no pudiendo inhibir a *M. luteus* ATCC 10240 (Cuadro 2). Al contrastar la actividad de cada una de las mezclas frente a los compuestos por separado se encontró lo siguiente.

En las bacterias Gram positivas la mezcla 1:1 en la mayoría de las cepas su actividad fue menor a la del compuesto Limoneno solo; de las 9 cepas en 6 la actividad disminuyo, en 2 (*S. aureus* ATCC 29213 y *S. aureus* CC) se mantuvieron igual y en *Staphylococcus epidermidis* 12228 aumento. En Gram negativas la mezcla presento una disminución en la activad en 8 de las 9 cepas, mientras que en *S. marcescens* ATCC 14576 se mantuvo el mismo resultado (Cuadro 3). En cuanto a la misma mezcla (1:1) pero en contraste con el Cineol solo; de las 9 cepas Gram positivas 6 de ellas presentaron menor efecto y las otras 3 (*S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* CC y *S. epidermidis* ATCC 12228) tuvieron una mayor actividad (Cuadro 2); en las bacterias Gram negativas en 6 cepas el tamaño del halo fue menor al del compuesto solo, sin embargo, en la cepa de *M. luteus* ATCC 10240, el Cineol no había podido inhibir su crecimiento y la mezcla sí, por último en la cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853 la actividad se mantuvo (Cuadro 3).

Para la actividad de mezcla Limoneno/Cineol 25:75 sobre cepas Gram positivas frente al Limoneno; 6 cepas tuvieron una disminución en la actividad, 2 se mantuvieron (*E. feacalis* ATCC 14506 y *S. aureus* CUSI) y en una cepa *E. feacalis* ATCC 14506 se mantuvo el efecto (Cuadro 2). En Gram

negativas en 5 de las 9 cepas el efecto disminuyo, una de ellas fue *E. coli* 82MR que en esta mezcla no presento efecto alguno; y en las cepas restantes *Enterobacter aerogenes*, *E. coli* CUSI y *S. marcescens* ATCC 14576 aumentaron su efecto (Cuadro 3).

Los resultados de la mezcla anterior en comparación con los de Cineol solo cambio, ya que, de las 9 cepas Gram positivas, 5 presentaron disminución del tamaño del halo, por lo tanto, de la actividad, mientras que 3 cepas (*S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* CUSI y *S. epidermidis* ATCC 12228) presentaron un aumento en la actividad y *S. aureus* CC mantuvo el efecto (Cuadro 2). En cuanto a las cepas Gram negativas 7 cepas presentaron una disminución del efecto con la mezcla, en *K. pneumoniae* ATCC 13883 que no había sido inhibida por el Cineol solo con la mezcla sí y con respecto a *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Cuadro 3).

En la tercera mezcla Limoneno/Cineol 75:25, los resultados sobre cepas Gram positivas, frente a los resultados del Limoneno solo; arrojaron que en 4 cepas se presentó una disminución de la actividad (*E. feacalis* ATCC 14506, *S. aureus* 23MR, *S. aureus* ATCC 29213 y *S. aureus* CC) y en las 5 cepas restantes se presentó aumento de actividad (Cuadro 2). Con respecto a las cepas Gram negativas, *E. coli* 82MR presento un aumento en el efecto y *S. typhi* ATCC 19430 mantuvo el mismo efecto, mientras que en las otras 7 cepas el efecto disminuyo (Cuadro 3).

La mezcla Limoneno/Cineol 75:25 contrastada con los resultados de los halos de inhibición del Cineol solo muestran que, en bacterias Gram positivas, en la cepa de *S. aureus* CC la actividad se mantuvo igual, mientras que en 3 cepas (*E. feacalis* ATCC 14506, *S. aureus* 23MR y *S. aureus* ATCC 29213) disminuyeron el efecto y las 6 cepas restantes hubo aumento del efecto (Cuadro 2).

En cuanto a la actividad de las cepas Gram negativas; aumento en las cepas *E. coli* 82M y *K. pneumoniae* ATCC 13883, en la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 se mantuvo igual, mientras que en las otras 6 cepas el efecto disminuyo (Cuadro 3).

Evaluación cuantitativa

Los resultados obtenidos en la evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) se muestran en los Cuadros 2 y 3.

En el cuadro 2 se muestran los resultados de bacterias Gram positivas y se aprecia que la bacteria más sensible es *E. faecalis* ATCC 14506, ya que presenta una MIC y una CBM de 3.00 y 4.00 mg/mL respectivamente para el compuesto Cineol.

Al comparar los resultados entre los compuestos solos, se puede ver que en las todas las cepas la concentración requerida para inhibir el crecimiento de las bacterias es mayor a 4 mg/mL a excepción de *E. faecalis* inhibida por él Cineol, lo que nos dice que esa cepa es más sensible a ese compuesto que al limoneno.

En cuanto a las mezclas todas las concentraciones requeridas para inhibir (MIC) y/o eliminar a las cepas, al igual que sucede con el compuesto Limoneno no se lograron determinar ya que las concentraciones que se requerían para lograr esa respuesta (inhibitoria o exterminio) sobre pasaban los 4 mg/mL (cuadro 2).

En el Cuadro 4 se muestran los tipos de interacciones resultantes de las mezclas en cada una de las cepas de bacterias Gram positivas con base en el Índice de Correlación Fraccionada (ICF).

Cuadro 4. Tipos de interacciones de las mezclas de los compuestos puros en cepas Gram positivas

Cepa bacteriana	Mezclas		
	L/C 1:1	L/C 25:75	L/C 75/25
<i>E. faecalis</i> ATCC 14506	I (2.33)	I (2.33)	I (2.33)
<i>M. luteus</i> ATCC 10240	I (2.00)	I (2.00)	I (2.00)
<i>S. aureus</i> 23MR	I (2.00)	I (2.00)	I (2.00)
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	I (2.00)	I (2.00)	I (2.00)
<i>S. aureus</i> CC	I (2.00)	I (2.00)	I (2.00)
<i>S. aureus</i> CUSI	I (2.00)	I (2.00)	I (2.00)
<i>S. aureus</i> FES-C	I (2.00)	I (2.00)	I (2.00)
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	I (2.00)	I (2.00)	I (2.00)
<i>S. epidermidis</i> FES-C	I (2.00)	I (2.00)	I (2.00)

Sinergismo (S) si $ICF \leq 0.5$, adición (A) si $ICF > 0.5$ pero ≤ 1.0 , indiferencia (I) si $ICF > 1$ pero < 4 y antagonismo (An) si $ICF \geq 4$. Entre paréntesis, el valor calculado con la MIC.

La interacción que se da entre los compuestos solos con cada mezcla es de indiferencia, lo que nos dice que los efectos de cualquiera de las mezclas son igual al efecto que se tendría al usar los compuestos solos.

Los resultados de las concentraciones de MIC y CBM de las bacterias Gram negativas se encuentra en el cuadro 3, donde podemos observar que

del compuesto Limoneno se necesitan concentraciones mayores a 4 mg/mL para inhibir el crecimiento de todas las cepas Gram negativas que se utilizaron, mientras que del Cineol en 6 de las 9 cepas se necesitan más de 4 mg/mL del compuesto para poder inhibirlas, para *Enterobacter aerogenes* se necesitaron 4 mg/mL para inhibir su crecimiento, *E. coli* 82MR se requirieron 3 mg/mL para inhibir el crecimiento y para CBM se requirieron 4 mg/mL y en cuanto a la MIC obtenida de *E. coli* donada por el CUSI de FES Iztacala, se necesitaron 1.50 mg/mL y para CBM 4 mg/mL.

Para las 3 mezclas la concentración más grande que se utilizó fue de 4 mg/mL, sin embargo, esa concentración no logro inhibir a ninguna cepa, por lo que se requeriría una concentración más grande para obtener tal respuesta.

Los resultados de los tipos de interacción entre las mezclas y los compuestos por separado que se dieron en las cepas Gram negativas se encuentran en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Tipos de interacciones de las mezclas de los compuestos puros en cepas Gram negativas.

Cepa bacteriana	Mezclas		
	L/C 1:1	L/C 25:75	L/C 75/25
<i>Enterobacter aerogenes</i>	I (2.00)	I (2.00)	I (2.00)
<i>E. coli</i> 82MR	I (2.33)	I (2.33)	I (2.33)
<i>E. coli</i> CUSI	I (3.66)	I (3.66)	I (3.66)
<i>K. oxytoca</i> ATCC 8724	I (2.00)	I (2.00)	I (2.00)
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	I (2.00)	I (2.00)	I (2.00)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	I (2.00)	I (2.00)	I (2.00)
<i>S. typhi</i> ATCC 19430	I (2.00)	I (2.00)	I (2.00)
<i>S. enterica</i> ATCC 7251	I (2.00)	I (2.00)	I (2.00)
<i>S. marcescens</i> ATCC 14576	I (2.00)	I (2.00)	I (2.00)

Sinergismo (S) si $ICF \leq 0.5$, adición (A) si $ICF > 0.5$ pero ≤ 1.0 , indiferencia (I) si $ICF > 1$ pero < 4 y antagonismo (An) si $ICF \geq 4$. Entre paréntesis, el valor calculado con la MIC.

De igual manera como en las bacterias Gram positivas todas las interacciones de las Gram negativas fueron de indiferencia, lo que indica que no hay diferencia entre usar un compuesto solo o en mezcla.

Evaluación de la actividad antifúngica.

Evaluación cualitativa

Los compuestos por separado (Limoneno y Cineol), así como las mezclas (1:1, 25:75 y 75:25) no tuvieron actividad antifúngica en ninguna de las 4 cepas de hongos miceliados evaluados.

Para el ensayo cualitativo del efecto de los compuestos limoneno, cineol y sus mezclas, los hongos levaduriformes presentaron susceptibilidad en las 3 muestras evaluadas, los resultados obtenidos se presentan en el cuadro 6.

Cuadro 6: Actividad antifúngica de limoneno, cineol y sus mezclas sobre cepas Levaduriformes

Cepa levaduriforme		Limoneno	Cineol	L/C 1:1	L/C 25:75	L/C 75:25	Nistatina
<i>Candida albicans</i> 17MR	Halo	21.66 ± 0.81	15.00 ± 0.70	13.66 ± 0.94	16.33 ± 0.00	14.33 ± 0.47	30.00 ± 0.81
	MIC	0.10	0.10	>1.00	>1.00	1.00	11.00
	CFM	0.25	0.25	>1.00	>1.00	1.50	n.d.
<i>C. glabrata</i>	Halo	19.33 ± 0.47	13.33 ± 0.47	11.00 ± 0.81	13.00 ± 0.00	14.00 ± 0.00	22.00 ± 0.00
	MIC	0.25	0.25	0.75	3.00	>4.00	8.00
	CFM	0.40	0.40	1.00	4.00	>4.00	n.d.
<i>C. tropicalis</i>	Halo	16.66 ± 0.94	14.00 ± 0.81	10.66 ± 0.47	13.00 ± 0.81	13.33 ± 0.47	20.33 ± 0.47
	MIC	>4.00	>1.00	2.00	>4.00	>4.00	9.00
	CFM	>4.00	>1.00	3.00	>4.00	>4.00	n.d.

Halos de inhibición en mm. Concentración de MIC y CFM en (mg/mL). Valores promedio de 3 repeticiones ± D.E. (n.d. = No determinada). Concentración de MIC y CFM para Nistatina en (mcg/mL).

El Limoneno presenta una mayor actividad antifúngica en comparación al compuesto Cineol, ya que en las tres cepas el Limoneno presentó valores más grandes de halos que a los del Cineol, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas.

Al contrastar los resultados del Limoneno por separado en comparación con las 3 mezclas, este como anteriormente se mencionó, presenta un mayor efecto en las 3 cepas de hongos levaduriformes, mientras que el tratamiento con el menor efecto es la mezcla 1:1, en las 3 cepas levaduriformes. (Figura 3).

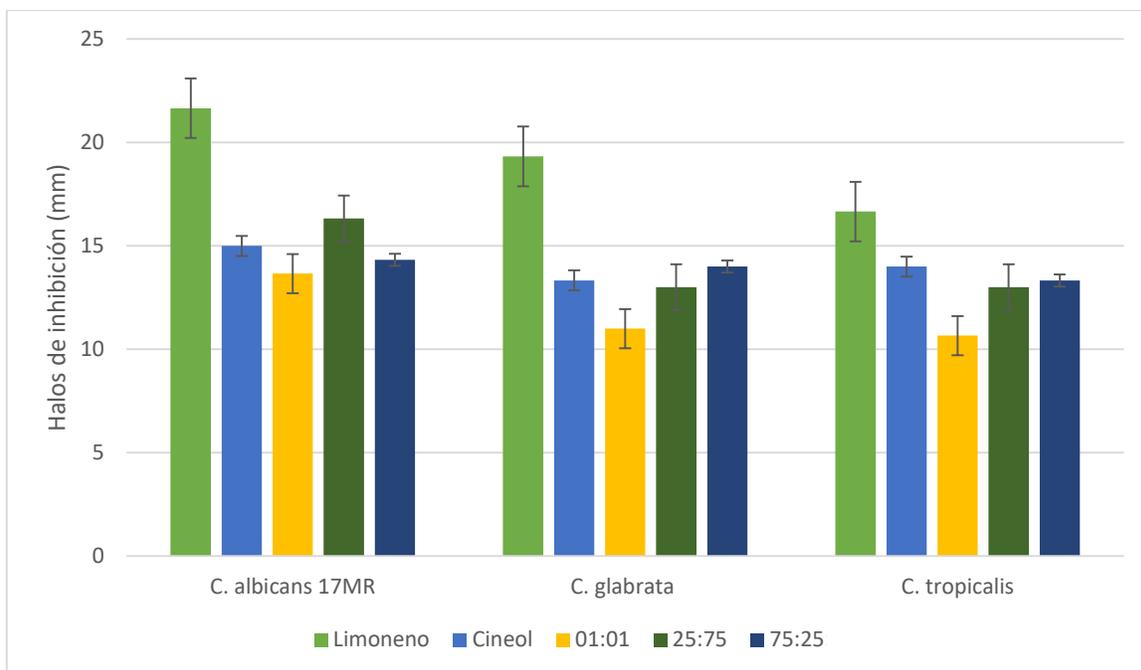


Figura 1. Actividad antifúngica cualitativa del limoneno, cineol y sus mezclas sobre hongos levaduriformes. Valores promedio de halos de 3 repeticiones \pm DE. Nota: No se presenta el control con Nistatina.

Evaluación cuantitativa

Los resultados cualitativos de las levaduras se encuentran en el cuadro 6, donde se aprecian las concentraciones de MIC y CBM de cada compuesto por separado y las mezclas.

Los tratamientos de Limoneno y Cineol tuvieron el mejor efecto en las cepas de *C. albicans* 17MR y *C. glabrata* ya que las concentraciones de MIC y CFM fueron las más bajas con respecto a los tratamientos de las mezclas.

Para *C. tropicalis* el tratamiento en el cual se obtuvo unos valores menores de MIC y CBM fue el de Cineol, ya que de los otros 4 tratamientos no se obtuvieron valores fijos, solo aproximados.

En cuanto a los tipos de interacciones (Cuadro 7) que se dieron entre las cepas de hongos levaduriformes y los tratamientos, con base en el Índice de correlación fraccionada, notamos que no existieron sinergismos, lo que significa los compuestos no potencializan su efecto fungicida al estar en combinación.

Para la primera mezcla 1:1 presenta antagonismo en *C. albicans* 17MR y *C. glabrata*, esto indica que los componentes disminuyeron su efecto al estar en

dicha proporción. Mientras que en *C. tropicalis* la interacción que se obtuvo fue de indiferencia, es decir, que los componentes no disminuyeron ni aumentaron su efecto.

Para las mezclas L/C 25:75 y 75:25 el resultado para todas cepas de levaduras fue el mismo, la interacción que se dio entre los compuestos fue de antagonismo.

Lo que nos indica que los compuestos Limoneno y Cineol son más eficaces cuando están separados que en mezcla.

Cuadro 7. Tipos de interacciones de las mezclas de los compuestos puros en cepas Levaduriformes

Cepa levaduriforme	Mezclas		
	L/C 1:1	L/C 25:75	L/C 75/25
<i>Candida albicans</i> 17MR	An (20.00)	An (20.00)	An (20.00)
<i>C. glabrata</i>	An (6.00)	An (24.00)	An (32.00)
<i>C. tropicalis</i>	I (2.50)	An (5.00)	An (5.00)

Sinergismo (S) si $ICF \leq 0.5$, adición (A) si $ICF > 0.5$ pero ≤ 1.0 , indiferencia (I) si $ICF > 1$ pero < 4 y antagonismo (An) si $ICF \geq 4$. Entre paréntesis, el valor calculado con la MIC.

Los ensayos de la curva letal de crecimiento se realizaron en las 3 cepas de hongos levaduriformes ya que fueron sensibles para todas las mezclas, los resultados se muestran en 15 figuras divididas por cada cepa.

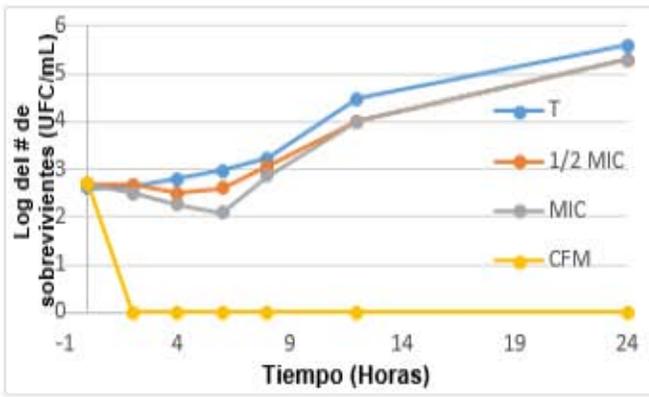


Figura 2. Efecto del limoneno sobre la curva de crecimiento de *C. albicans* 17MR a concentraciones de mg/mL: 1/2MIC= 0.03, MIC= 0.05 y CFM= 0.10

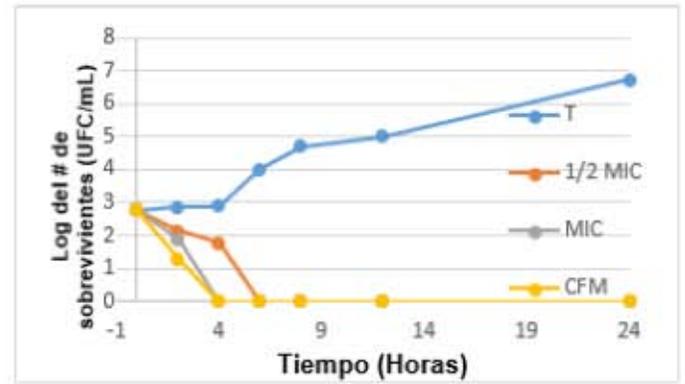


Figura 5. Efecto de la mezcla Limoneno/Cineol 25:75 sobre la curva de crecimiento de *C. albicans* 17MR a concentraciones de mg/mL: 1/2MIC= 1.00, MIC= 2.00 y CFM= 3.00

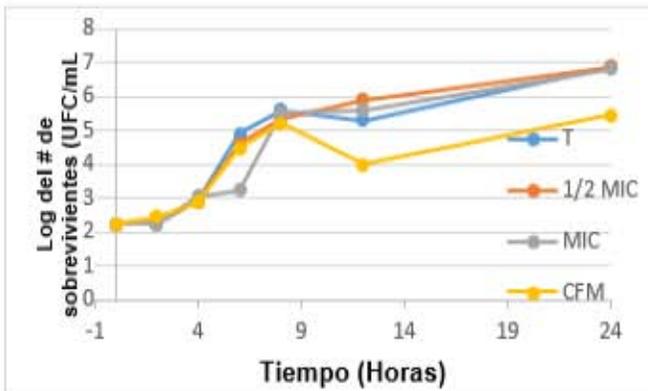


Figura 3. Efecto del cineol sobre la curva de crecimiento de *C. albicans* 17MR a concentraciones de mg/mL: 1/2MIC= 0.10, MIC= 0.25 y CFM= 0.50

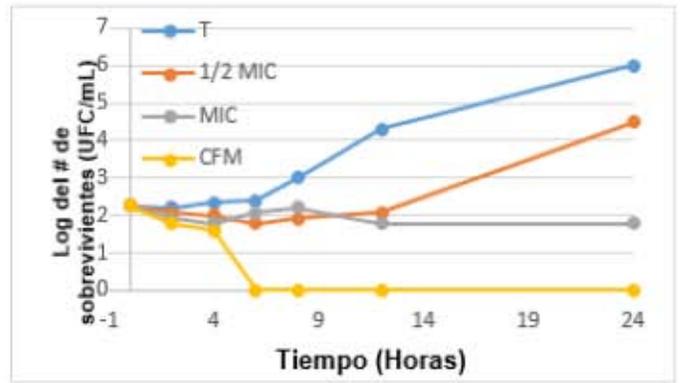


Figura 6. Efecto de la mezcla Limoneno/Cineol 75:25 sobre la curva de crecimiento de *C. albicans* 17MR a concentraciones de mg/mL: 1/2MIC= 0.50, MIC= 1.00 y CFM= 1.50

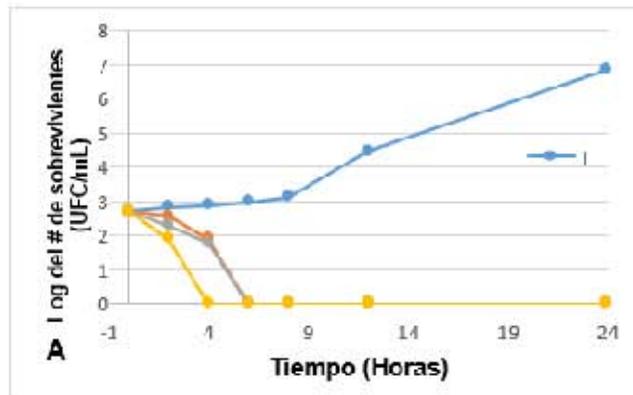


Figura 4. Efecto de la mezcla Limoneno/Cineol 1:1 sobre la curva de crecimiento de *C. albicans* 17MR a concentraciones de mg/mL: 1/2MIC= 1.00, MIC= 2.00 y CFM= 3.00

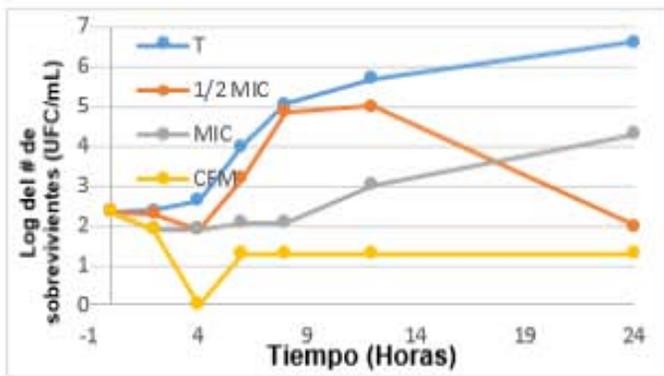


Figura 7. Efecto del limoneno sobre la curva de crecimiento de *C. glabrata* a concentraciones de mg/mL: 1/2MIC= 0.07, MIC= 0.13 y CFM= 0.25

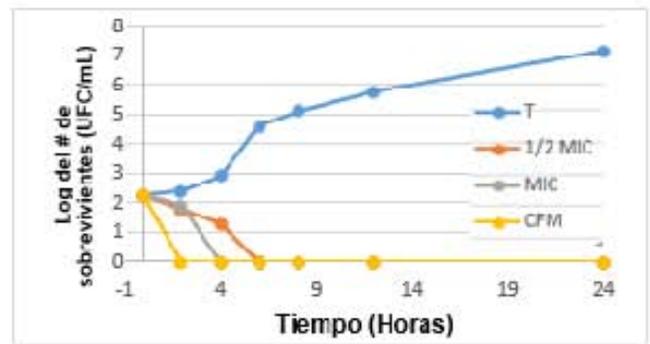


Figura 10. Efecto de la mezcla Limoneno/Cineol 25.75 sobre la curva de crecimiento de *C. glabrata* a concentraciones de mg/mL: 1/2MIC= 1.50, MIC= 3.00 y CFM= 4.00

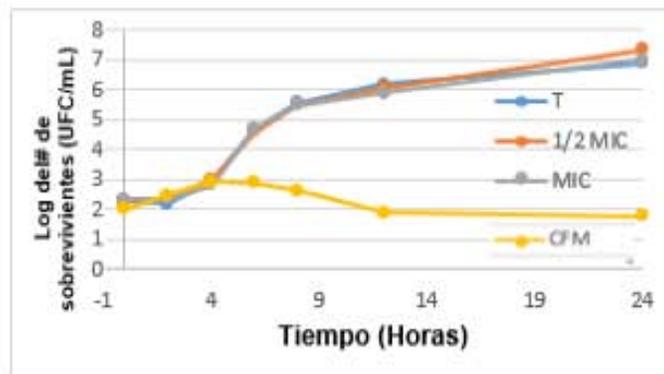


Figura 8. Efecto del cineol sobre la curva de crecimiento de *C. glabrata* a concentraciones de mg/mL: 0.25, MIC= 0.50 y CFM= 1.00

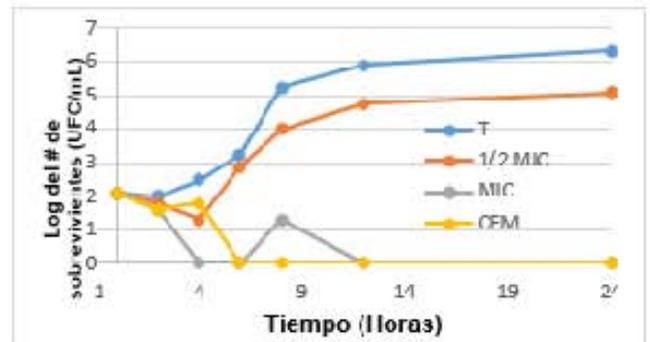


Figura 11. Efecto de la mezcla Limoneno/Cineol 75:25 sobre la curva de crecimiento de *C. glabrata* a concentraciones de mg/mL: 1/2MIC= 1.00, MIC= 2.00 y CFM= 4.00



Figura 9. Efecto de la mezcla Limoneno/Cineol 1:1 sobre la curva de crecimiento de *C. glabrata* a concentraciones de mg/mL: 1/2MIC= 0.38, MIC= 0.75 y CFM= 1.00

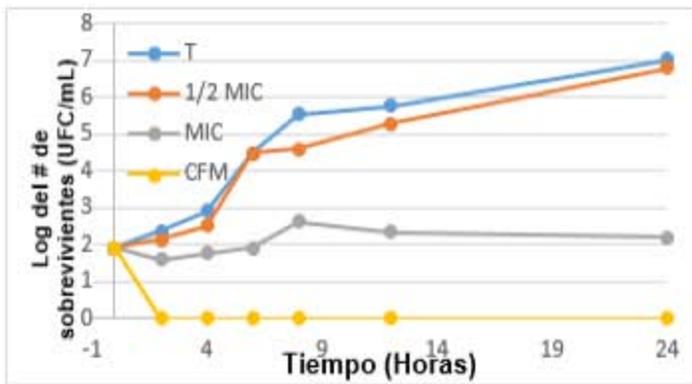


Figura 12. Efecto del limoneno sobre la curva de crecimiento de *C. tropicalis* a concentraciones de mg/mL: 1/2MIC= 0.07, MIC= 0.13 y CFM= 0.25

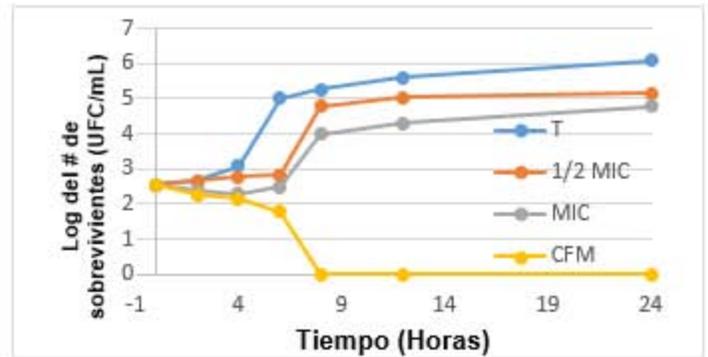


Figura 15. Efecto de la mezcla Limoneno/Cineol 25:75 sobre la curva de crecimiento de *C. tropicalis* a concentraciones de mg/mL: 1/2MIC= 1.50, MIC= 3.00 y CFM= 4.00

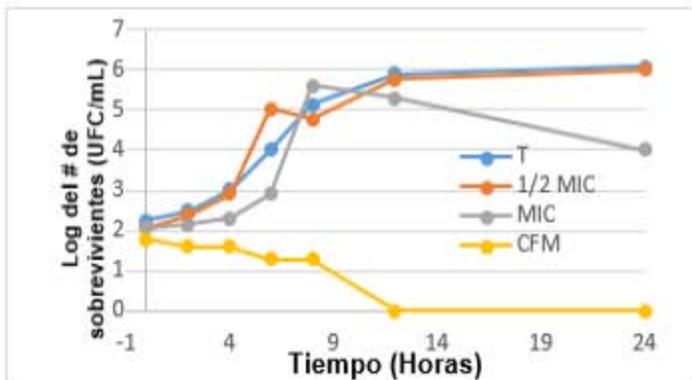


Figura 13. Efecto del cineol sobre la curva de crecimiento de *C. tropicalis* a concentraciones de mg/mL: 1/2MIC= 0.10, MIC= 0.25 y CFM= 0.50

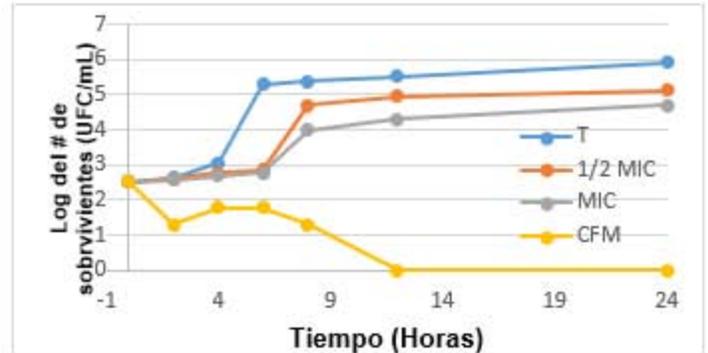


Figura 16. Efecto de la mezcla Limoneno/Cineol 75:25 sobre la curva de crecimiento de *C. tropicalis* a concentraciones de mg/mL: 1/2MIC= 1.00, MIC= 2.00 y CFM= 4.00

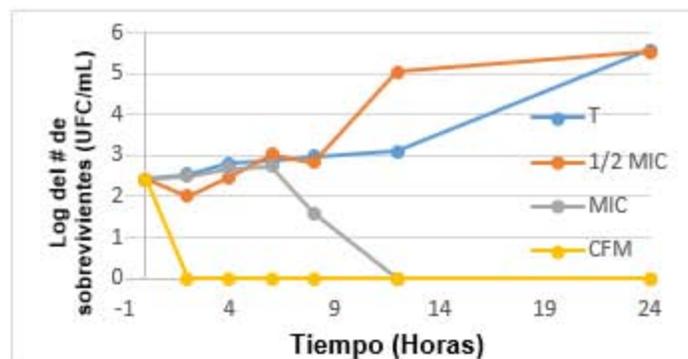


Figura 14. Efecto de la mezcla Limoneno/Cineol 1:1 sobre la curva de crecimiento de *C. tropicalis* a concentraciones de mg/mL: 1/2MIC= 1.00, MIC= 2.00 y CFM= 3.00

El efecto observado sobre una población de *C. albicans* expuesta al Cineol (Figura 3) es de tipo fungistático ya que desde las primeras 2 horas se observa que no permite mucho la proliferación de la cepa por 4 horas, sin embargo, después de esas 4 horas la proliferación de la levadura continúa siguiendo la tendencia del testigo. En los demás tratamientos, el Limoneno y las 3 mezclas (Figuras 2,4,5 y 6) muestran un comportamiento fungicida, ya que los 4 tratamientos eliminan totalmente a la levadura, unos más rápido que otros, por ejemplo, el Limoneno lo hizo trascurridas las primeras 2 horas, las mezclas 1:1 y 25:75 los hicieron en 4 horas y la mezcla 75:25 fue a las 6 horas.

En *C. glabrata* los compuestos Limoneno y Cineol (Figuras 7 y 8) tuvieron un efecto fungistático, en el caso del limoneno las primeras 4 horas tuvo un comportamiento fungicida, sin embargo, en la cuarta hora y la sexta hora hubo un crecimiento de la población y a partir de ahí el número de colonias se mantuvo constante hasta las 24 h; en el caso del Cineol las primeras 12 horas no se observa un crecimiento exponencial de la levadura, pero de las 12 horas a las 24 se observa un comportamiento fungistático. Para los tratamientos de las mezclas se observa un efecto fungicida, y al igual que en el caso de *C. albicans* los tiempos en los que se comenzó a ver el efecto fungicida fue diferente, para el caso de la mezcla 1:1 fue a las 4 horas del experimento, la mezcla de 25:75 fue a las 2 horas y la última 75:25 fue a las 6 horas.

Para el caso de *C. tropicalis* el Limoneno y la mezcla 1:1 a las 2 horas del experimento mostraron un comportamiento fungicida, al igual que el tratamiento de la mezcla 75:25 pero el efecto fungicida de este tratamiento se dio a las 12 horas y el tratamiento de la mezcla 25:75 tiene un comportamiento fungicida desde las 2 horas que va en incremento hasta las 8 horas que elimina a todas las UFC. En el caso del Cineol en las primeras 8 horas se observa un comportamiento fungistático y después de esas horas y hasta las 24 el efecto es fungicida.

Discusión

Actividad antimicrobiana

De las 18 cepas bacterianas en las que se evaluó el efecto del Limoneno y el Cineol, 9 fueron Gram positivas y 9 Gram negativas; el Limoneno presentó efecto en todas las cepas, mientras que el Cineol, solo presentó actividad en 17.

Las diferencias de la estructura entre las bacterias Gram negativas y positivas, vuelven a estas últimas más sensibles a la actividad de los aceites esenciales que a las negativas (Ait-Ouazzou *et al.*, 2011). En general las bacterias Gram negativas son más resistentes a la acción de los antimicrobianos (Duarte *et al.*, 2012), esto debido a que se encuentra constituida por tres estructuras, empezando por la membrana citoplasmática, el espacio periplasmático el cual se encuentra separando dos membranas, este espacio presenta una delgada y fina capa de peptidoglucano, por fuera se encuentra una última estructura denominada membrana externa (Lucana y Huanca, 2004), pero como ambos compuestos son efectivos contra bacterias Gram positivas y negativas, las diferencias estructurales de estos grupos no son problema para que los compuestos puedan ejercer su acción.

La efectividad de los aceites esenciales difiere de un tipo a otro, así como contra diferentes bacterias diana dependiendo de su estructura (Gram positivas y negativas). Por ejemplo, los aceites esenciales de sándalo tienen una mayor actividad antibacteriana contra Gram positivas; sin embargo, no inhiben las cepas Gram negativas (Swamy *et al.*, 2016).

El Cineol no presentó actividad frente a *K. pneumoniae*, en la literatura se ha reportado que este compuesto si presenta actividad contra dicha cepa cuando se encuentra en mezcla, es decir, en el aceite extraído directo de alguna planta (*Ocimum basilicum*) ya que está en contacto con otros componentes, como el Eugenol, el Linalol, entre otros (Rojas *et al.*, 2012).

Los datos que se encuentran en la bibliográfica acerca de la actividad antimicrobiana de Cineol, muestran que posee una actividad antibacteriana tanto para bacterias Gram positivas, como *Listeria monocytogenes* (Ait-Ouazzou *et al.*, 2011), *S. aureus* (Silvestre *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2011), *S. epidermidis*, *Bacillus subtilis* (Jiang *et al.*, 2011).

En cuanto a las cepas Gram negativas inhibidas por el Cineol se ha reportado actividad en *E. coli* (Ait-Ouazzou *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2011),

Proteus vulgaris, *P. aeruginosa* (Silvestre *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2011), *Klebsiella pneumoniae* (Rojas *et al.*, 2012), *Proteus mirabilis* (Soković *et al.*, 2010), *Salmonella typhimurium* (Soković *et al.*, 2010).

La información que proporciona la literatura en cuanto a las cepas en las que el Limoneno posee actividad antimicrobiana es la siguiente: *E. coli* (Espina *et al.*, 2013), *S. aureus*, *Bacillus subtilis* (Zhanga *et al.*, 2014), *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Micrococcus flavus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *S. epidermidis*, *S. typhimurium* (Soković *et al.*, 2010).

En bacterias Gram positivas ambos compuestos tuvieron actividad en todas las cepas, de las cuales, la mayoría son del género *Staphylococcus*, en donde las concentraciones de MIC fueron >4 mg/mL. Lo cual no concuerda con lo reportado en la literatura, por ejemplo, (Zhanga *et al.*, 2014) reportan MIC's de Limoneno de 1 µg/mL y (Jiang *et al.*, 2011) reportan una concentración de Cineol de 0.3 %v/v ambos para *S. aureus*. Para *S. epidermidis* (Jiang *et al.*, 2011) reportan 0.5 %v/v de cineol.

La diferencia en las cifras de concentraciones requeridas para que el compuesto pueda inhibir el crecimiento de *S. aureus* indica que muy posiblemente, el efecto inhibitorio no depende solo del compuesto, sino que también depende del microorganismo con el que se evalúa dicho efecto, lo cual supone un obstáculo para predecir la susceptibilidad. Esto no solo se refiere a una cepa de bacteria en específico, sino de distintas bacterias de la misma especie contra un mismo medicamento o un aceite esencial (Duarte *et al.*, 2012).

Para el caso de *E. faecalis* Rojas *et al.*, 2012 reportan que el Limoneno no posee actividad antibacteriana contra dicha cepa, lo cual no concuerda con este trabajo, ya que *E. faecalis* ATCC 14506 presentó susceptibilidad ante tal compuesto en la prueba de Kirby-Baüer, sin embargo, no fue posible determinar una concentración de MIC ya que esta se encontraba por encima de la concentración más alta probada que fue de 4 mg/mL. Algo similar ocurrió con el Cineol, la MIC que se obtuvo fue de 3 mg/mL. Rojas *et al.*, 2012 reporta que en la prueba cualitativa de Kirby-Baüer, el Cineol sí inhibió a *E. faecalis* ATCC14506, sin embargo, no hay estudios en los que se muestre reportada una MIC con el cual podríamos comparar los resultados obtenidos.

Para *M. luteus* ATCC 10240 se ha reportado que es inhibido por el aceite esencial de plantas donde su componente mayoritario es el Limoneno (Saet *et al.*, 2007). El aceite puro no tiene efecto antimicrobiano para esta cepa, según lo que reporta (Rojas *et al.*, 2012) lo cual no concuerda con los

resultados obtenidos, lo que es diferente al Cineol ya que mismos autores registraron actividad antimicrobiana de Cineol en la cepa de *M. luteus*, pero no se reportan MIC's para este compuesto ni para el Limoneno.

En las bacterias Gram negativas la actividad antimicrobiana del Limoneno ejerció efecto en todas las cepas, mientras que el Cineol no mostro efecto en *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, lo cual no concuerda con lo reportado por (Swamy *et al.*, 2016), ya que muestra que el aceite esencial de *Achillea clavennae*, en el que uno de sus componentes principales es el Cineol tiene acción antimicrobiana en esa cepa, lo cual concuerda con (Rojas *et al.*, 2012) que reporta que el Cineol puro tuvo efecto antimicrobiano.

Para *E. coli* (Zhanga *et al.*, 2014; Soković *et al.*, 2010; Swamy *et al.*, 2016; Rojas *et al.*, 2012) reportan que Limoneno tiene efecto antimicrobiano contra esa cepa, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el trabajo. También Zhanga *et al.*, 2014 y Soković *et al.*, 2010 reportan MIC's más bajas que 4 mg/mL que fue lo obtenido en este trabajo, (Zhanga *et al.*, 2014) reporta una MIC para *E. coli* de 1 µg/mL, mientras que (Soković *et al.*, 2010) reporta una MIC de 10 µg/mL.

Para el Cineol (Soković *et al.*, 2010; Swamy *et al.*, 2016; Rojas *et al.*, 2012) reportan actividad antimicrobiana en *E. coli*, (Soković *et al.*, 2010) reporta una MIC de 6 µg/mL, la concentración encontradas en la literatura es menor a la reportada en este trabajo. Para el caso del Limoneno (Soković *et al.*, 2010; Swamy *et al.*, 2016; Rojas *et al.*, 2012) muestran que tal compuesto tiene actividad antimicrobiana contra cepas de *E. coli*. La MIC reportada en este trabajo para *E. coli* con Limoneno fue de >4 mg/mL, lo que difiere por lo reportado con (Zhanga *et al.*, 2014; Soković *et al.*, 2010), que muestran unas MIC's de 1 µg/mL y 10 µg/mL respectivamente.

Según Nazaro *et al.*, 2013 los aceites esenciales de plantas o puros podrían tener uno o varios sitios diana para inhibir a una célula bacteriana. También se ha encontrado que muchas bacterias tratadas con aceites esenciales muestran alteraciones en su pared celular (Bakkail *et al.*, 2007).

En cuanto al mecanismo de acción que pueden tener el Limoneno y el Cineol, estos compuestos al ser aceites esenciales se acumulan en la membrana microbiana y por lo tanto puede causar la perdida de integridad de dicha membrana y disipación de la fuerza motriz protónica (Sikkema, 1994).

En cuanto a las interacciones que se dieron de las mezclas de Limoneno y Cineol en las diferentes proporciones, tanto en bacterias Gram positivas como negativas fueron de indiferencia.

En el 2006 Sonboli *et al.* evaluaron el efecto antimicrobiano de 3 especies de *Salvia*, así como su composición química, en la cual uno de los componentes principales fueron el Cineol y el Limoneno, entre otros y al evaluar el efecto antimicrobiano de los compuestos por separado se observó en el caso del Limoneno en las cepas *S. epidermidis* y *K. pneumoniae* una interacción de indiferencia, lo cual concuerda con los resultados obtenidos, mientras que en *Enterococcus faecalis*, *S. aureus* y *E. coli* con el mismo compuesto se mostró una interacción de tipo sinérgica. En cuanto al Cineol, el mismo autor revela que para *S. epidermidis* y *E. coli* existe una interacción de tipo indiferente, lo cual se evidencia en este trabajo, en el caso de bacterias como *Enterococcus faecalis*, *S. aureus* y *Klebsiella pneumoniae* presentaron interacciones sinérgicas, lo cual no concuerda con lo reportado en este trabajo.

Evaluación antifúngica

Hongos miceliados

De las 4 cepas de hongos miceliados, los 5 tratamientos no tuvieron actividad antifúngica con ninguna de las 4 cepas. Esto es porque posiblemente las cepas de hongos poseen resistencia hacia ambos compuestos y a las mezclas. Ya que estos hongos son utilizados en la industria química para la obtención de compuestos naturales mediante oxidación (Castellanos *et al.*, 2007).

Aspergillus niger es utilizado junto con Limoneno como biocatalizador en la obtención de alcohol perilico, el cual se utiliza para inhibir la progresión de la metástasis en el melanoma (Prieto *et al.*, 2014). También se ha reportado que algunas especies del género *Fusarium* se utiliza para la producción de compuestos de importancia para la industria química a partir de aceites como el Limoneno y el α pineno (Castellanos *et al.*, 2007) y por lo tanto se piensa que desarrollaron resistencia ante este tipo de compuestos.

Se ha encontrado que el Limoneno puede inhibir a *A. niger* a desde una concentración de 3.7 mM (Prieto *et al.*, 2014). Otros autores nos dicen que la inhibición se da a los 40 μ L/mL (Jantamas *et al.*, 2013). En cuanto al Cineol Barkai, 2017 reportan que no tiene actividad antifúngica sobre *A. niger*.

Hongos levaduriformes

La actividad antifúngica se evaluó en 3 cepas del género *Candida*, ya que es el hongo levaduriforme patógeno más común en las enfermedades micóticas.

Candida albicans fue la cepa que más presentó susceptibilidad en los tratamientos, lo cual concuerda con lo reportado en la bibliografía (Mahboubia *et al.*, 2010) donde se evalúa a *C. albicans* provenientes de distintos lugares de los cuales se registraron MIC's de 8 y 16 $\mu\text{L}/\text{mL}$ frente al aceite esencial de *Myrtus communis*, en el que el Cineol y el Limoneno son los componentes principales y Freire *et al.*, 2017 registraron 32 y 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de MIC de Limoneno, lo cual nos dice que se requirieron menores concentraciones resultantes en este trabajo.

Para *C. glabrata* que fue la segunda cepa más sensible (Kamble, 2015), reporta que aceites esenciales de plantas cuyos componentes esenciales son el Limoneno y el Cineol, entre otros. En el trabajo se obtuvieron concentraciones de MIC de 0.25 mg/mL para ambos compuestos, lo cual no concuerda con lo reportado 0.52 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Candida tropicalis mostro una menor susceptibilidad que *C. albicans*, lo cual concuerda con lo reportado con Kamble, 2015, pero en este caso no fue la que presentó menor susceptibilidad, ya que la MIC para *C. tropicalis* fue mayor a la de *C. glabrata*.

En los resultados de las curvas de crecimiento de *C. albicans* el efecto que ejerce el Cineol es de tipo fungistático, mientras los otros 4 tratamientos mostraron un efecto fungicida, sin embargo, no se encontraron registros bibliográficos con los cuales se pudieran contrastar estos resultados. Para *C. glabrata* y *C. tropicalis*, no se obtuvieron datos en la bibliografía para comprar los resultados obtenidos en la experimentación.

Las interacciones entre los componentes de los aceites esenciales no han sido tan estudiadas sobre levaduras.

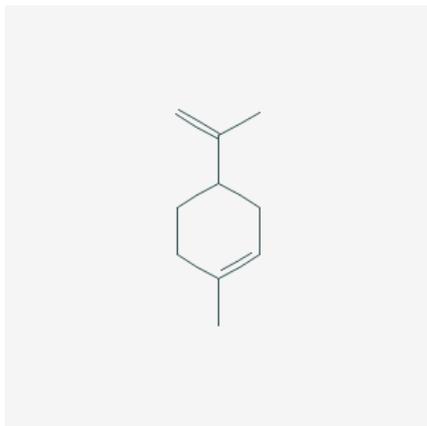
Conclusiones

- Los compuestos Limoneno y Cineol poseen actividad antimicrobiana, tanto en Gram positivas, negativas y levaduras.
- Las cepas bacterianas Gram positivas más sensibles al Limoneno y Cineol fueron *S. aureus* 23MR y *E. feacalis* ATCC 14506.
- Las cepas bacterianas Gram negativas más sensibles al Limoneno y Cineol fueron *K. pneumoniae* ATCC 13883 y *S. marcescens* ATCC 14576.
- No existieron diferencias significativas entre la actividad de ambos compuestos por separado.
- Las mezclas no presentaron diferencias significativas en la inhibición de bacterias Gram positivas y negativas.
- Las interacciones que se dieron entre los compuestos en las diferentes mezclas fueron de indiferencia.
- La actividad antifúngica que presentaron el Limoneno y el Cineol fue en los hongos levaduriformes, no en los miceliados.
- La cepa levaduriforme más sensible fue *C. albicans* 17MR.
- El efecto del Cineol sobre *C. albicans* 17MR fue fungistático, mientras que el de los demás tratamientos fue fungicida.
- El efecto que se ejerció en *C. glabrata* fue fungicida en las mezclas y en los compuestos por separado fue fungistático.
- *C. tropicalis* fue fungicida en todos los tratamientos.
- La principal interacción entre los compuestos frente a las cepas levaduriformes fue de antagonismo e indiferencia.

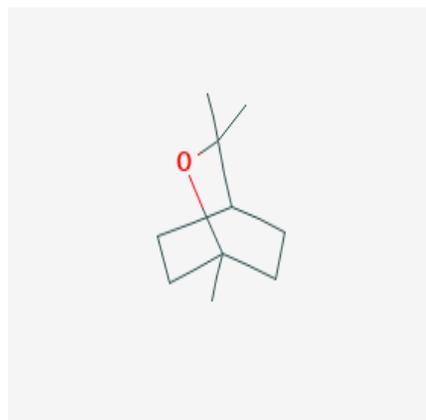
Apéndices

Apéndice 1

Estructura química de los compuestos limoneno y cineol.



Limoneno



Cineol

Apéndice 2

Método de difusión en agar Kirby-Bauer (Modificado de Koneman *et al.* 1996).

Este método fue utilizado para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana de aceites esenciales y de extractos, método descrito a continuación:

Para las bacterias se utilizó el agar Müller-Hinton (MH), porque promueve la difusión de los antimicrobianos; por lo que es importante que el medio de cultivo tenga un grosor uniforme de 4mm aproximadamente dentro de la placa, ya que, si no se cumple este parámetro y el espesor es menor las sustancias a evaluar podrían difundir más en dirección lateral aumentando el halo; y si es mayor el espesor la difusión de la sustancia a evaluar sería hacia la parte baja, lo que estrecharía el halo de inhibición.

El inóculo se preparó colocando con un asa bacteriológica colonias de una misma bacteria, se sumergió el asa en 10 mL de caldo MH estéril, se enjuaga bien en el líquido hasta que se desprenda todo rastro de bacteria y acto seguido se retira el asa de siembra hasta que la turbidez del medio sea equivalente al No. 0.5 de McFarland, lo que equivale a una concentración de aproximadamente 1.5×10^8 de bacterias por mL.

En caso de que la suspensión no tenga la turbidez del estándar, se volverá a incubar y sí, por el contrario, resulta ser más turbia que la del estándar se agregará solución salina al 0.9 % hasta igualar la turbidez.

Cuando la turbidez se logró, se sumergió un hisopo seco y estéril en la suspensión del inóculo, antes de retirarlos se debe eliminar el exceso de líquido. Con ese hisopo se procederá a inocular la mitad de la superficie del agar MH. El sembrado se realizó mediante estrías en todas las direcciones en ángulo de aproximadamente 60° de cada estría.

Cuando el inóculo es absorbido, la placa de agar MH está lista para la que se coloquen con pinzas estériles los sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel Whatman No. 5 y después se le agregaron 4 µL de Limoneno y Cineol (3.36 mg y 3.69 mg respectivamente).

Como control positivo se utilizaron sensidiscos con las mismas características que los anteriores, impregnados con 25 µg de cloranfenicol.

Cuando las placas de agar estén sembradas y con los sensidiscos impregnados se incubaron a 37° C por 24 horas. Para la interpretación de resultados, los halos de inhibición que se formaron se midieron con regla de calibración en mm, todas las pruebas se realizaron por triplicado y se reportaron los promedios de las 3 repeticiones en mm ± la desviación estándar.

Para las levaduras se realizó el mismo procedimiento, pero con agar Dextrosa papa (PDA), los inóculos se realizaron en caldo Saboraud y como control positivo se utilizaron sensidiscos impregnados con 25 µg de nistatina.

Apéndice 3

Técnica de macrodilución en caldo (Método modificado por Koneman *et al.* 1996).

Técnica utilizada para evaluar la Concentración Mínima Inhibitoria.

El inóculo se preparó colocando con un asa bacteriológica colonias de una misma bacteria, se sumergió el asa en 10 mL de caldo MH estéril, se enjuaga bien en el líquido hasta que se desprenda todo rastro de bacteria y acto seguido se retira el asa de siembra hasta que la turbidez del medio sea equivalente al No. 0.5 de McFarland, lo que equivale a una concentración de aproximadamente 1.5×10^8 de bacterias por mL.

En caso de que la suspensión no tenga la turbidez del estándar, se volverá a incubar y sí, por el contrario, resulta ser más turbia que la del estándar se agregará solución salina al 0.9 % hasta igualar la turbidez.

Posteriormente se tomaron 10 μ L de inóculo y se suspendieron en 10 mL de solución salina al 0.9% estéril, después se realizó una segunda dilución, donde de la solución anterior se tomaron 200 μ L y se suspendieron en 10 mL de solución salina al 0.9% estéril.

Se prepararon tubos con caldo MH adicionado con Tween 80 al 1 %, con las siguientes concentraciones de los compuestos y de las mezclas 0.00, 0.50, 0.75, 1.00, 1.50, 2.00, 3.00 y 4.00, posteriormente de los tubos con las concentraciones se toman 100 μ L de cada concentración en tubos eppendorf y a esos tubos se les adiciono 100 μ L de inóculos de cada cepa.

Los tubos se incuban por 24 horas a 37°C, posterior a ese tiempo de incubación las bacterias se siembran en agar MH y las levaduras en agar PDA, para sembrar se tomaron con micropipeta 10 μ L de cada tubo eppendorf colocándose en su respectivo agar. Posterior a eso se incubo durante 24 horas a 37°C y se observó la disminución en el crecimiento del microorganismo.

Para los controles positivos se utilizaron diferentes concentraciones de cloranfenicol y nistatina para bacterias y levaduras respectivamente.

Apéndice 4

Curva letal (Curva de supervivencia y efecto sobre el crecimiento) (Kubo *et al.*, 19983 citado en Ávila, 1996).

Está técnica consiste en preparar y rotular un tubo con la solución problema para muestreo desde el tiempo cero y después a intervalos de dos horas hasta las primeras 8 horas, a partir de eso el muestreo se realizó a las 12 y 24 horas.

Preparar y rotular un tubo sin antídoto que servirá como control del desarrollo
Preparar el inóculo con aproximadamente 1.5×10^8 UFC/mL en un tubo con rosca con 10 ml de caldo MH.

Inocular con ayuda de una micropipeta, 0.01 mL de la suspensión de bacterias en los tubos que contienen el antimicrobiano, el cual estará en una concentración igual a la concentración bactericida mínima y sus múltiplos medios; esto será la CMI y la mitad de la CMI. La concentración final debe ser aproximadamente de 1×10^5 bacterias/mL de caldo en cada tubo. Se deberá incubar en una estufa sin presión de CO_2 a 37°C .

Muestrear cada dos horas durante los primeros cuatro tiempos (T0-0, T1-1, T2-2, T3-3, T4-4), el tiempo 5 se muestra a las 12 horas y el tiempo 6 a las 24 horas. Se realizan 2 diluciones para determinar las unidades formadoras de colonias en cada tubo, una vez incubadas durante 24 horas a 37°C .

Se grafica el Log_{10} del número de sobrevivientes contra el tiempo para determinar el número de impactos necesarios para que se produzca la inactivación.

Bibliografía

- Ait-Ouazzou Abdenour C. L., Espina Laura, Lorán Susana, Rota Carmen, Pagán Rafael. (2011). The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12, 320-329
- Ávila, J. G. (1996) Actividad anti-*Vibrio cholerae* de dos plantas utilizadas en la medicina tradicional purépecha. Tesis de Maestría. FES Cuautitlán. UNAM. México.
- Bakkali F., Averbeck D., Idaomar M. (2007) Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology Journal*. 46, 446-475.
- Bandoni, A. L., Retta, D., Di Leo Libra, P. M. y Baren, C. M. (2009). ¿Son realmente útiles los aceites esenciales?. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 8(5), 317-322.
- Barkai Hassan, E. S., El Aabedy Amal, Guissi Sanae and Ibensouda Koraichi, & Saad. (2017). Antifungal activities of β -ionone, carvone and 1,8-cineole essential oil components against *Aspergillus niger* spores. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 9(6), 52-56.
- Bassolé, I. H. N. y Juliani, H. R.(2012). Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules*. 17(4): 3989-4006.
- Cabrera Cao Y., F. F. A., Guerrero Guerrero Lazáro Gregorio (2005). Antibióticos naturales. Mito realidad. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 21(3).
- Candelaria D. S. (2016) Evaluación de la actividad antimicrobiana de algunos componentes de los aceites esenciales de plantas utilizadas en la medicina tradicional del valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla. Tesis de Licenciatura. FES Iztacala. UNAM. México.
- Castellanos F., Perea V. A., Ortíz L. C. (2007). Biotransformación de α -pineno empleando *Aspergillus niger*. *Scientia Technica*. 8(33), 71-74.
- Council on Family Health. (2004). Drug interactions: what you should know. National Consumers League and Food and Drug Administration. [En línea]. Consultado el 19 de noviembre del 2018. Disponible en:<https://www.fda.gov/downloads/drugs/resourcesforyou/ucm163355.pdf>
- Cruz, O. (2013). Potencial antimicrobiano de mezclas que incluyen aceites esenciales o sus componentes en fase vapor. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos TSIA*, 7(1), 78-86.

- Duarte, M. C. T., Duarte, R. M. T., Sousa, P. D. (2012). Medicinal essential oils: Chemical, pharmacological and therapeutic aspects. Edition 1th. Editorial Nova Médica. Estados Unidos. 184-194 pp.
- Ernst, E. (2000). Herbal medicines: Where is the evidence? Growing evidence of effectiveness is counterbalanced by inadequate regulation. *Br Med J*; 321: 395-396.
- Escalona L. J. (2015). Traditional use of medicinal plants for the major adult in the mountain community Corralillo Arriba. Guisa, Granma. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 20(4), 429-439.
- Espina L., G. T. K., Lamo-Castellvi S., Pagán R., García-Gonzalo D. . (2013). Mechanism of Bacterial Inactivation by (+)-Limonene and Its Potential Use in Food Preservation Combined Processes. *PLOS One*, 8(2), 1-10.
- Fernández Riverón Fernando, L. H. J., Ponce Martínez Laida María, Machado Betarte Caridad. (2003). Resistencia bacteriana *Revista Cubana de Medicina Militar*, 32(1), 44-48.
- Freire P. J., Júnior O. J., Silva F. D., Sousa P. J., Guerra S. F. Q., Lima O. E. (2017). Antifungal activity of essential oils against *Candida albicans* strains isolated from users of dental prostheses. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-9.
- Fuhrmann, J. (2015). Antibiotic resistance: a challenge for the 21st century. *Society for General Microbiology*.
- Hendry E. R., Worthington T, Conway B. R. and Lambert P. A. (2009). Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64, 1219–1225.
- Hernández, M. (2001). La resistencia a los antimicrobianos: un problema mundial. *Panorama Cuba y Salud*, 6(1), 1-2.
- Hernández, D. C. T., Canales, M. M., Caballero, N. J., Caballero, J., Romo de Vivar, R. A., Durán, D. A. y Lira, S. R. (2003). Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de Salinas, Puebla (México). *Journal of Ethnopharmacology*, 88, 181-188.
- Hernández, D. C. T., Canales, M. M., García A. M., Durán, D. A., Meráz S., Dávila, P. y Ávila G. J. (2008) Antifungal activity of the essential oils of two Verbanaceae: *Lantana achyranthifolia* and *Lippia graveolens* of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 7(4): 203-207.

- Igal Katerine, N. B., Jorge S., Patricia V. (2018). Estudio de la actividad antifúngica de materiales conteniendo carbón proveniente de pilas en desuso. *Revista Materia*, 23(2).
- International Union of Basic and Clinical Pharmacology (IUPHAR). The Pharmacology Education Project (PEP). [en línea] Consultado el día 20 de noviembre del 2018. Disponible en: <https://www.pharmacologyeducation.org/clinical-pharmacology/drug-interactions>.
- Jantamas Sopa, M. N., Matan Nirundorn (2013). Effect of Tangerine Oil against *Aspergillus niger* Identified from Raw and Boron Treated Rubberwood. *International Journal of Environmental Science and Development*, 4(4), 408-411.
- Jiang Yang, W. N., Fu Yu-Jie , Wang Wei, Luo Meng, Zhao Chun-Jian, Zu Yuan-Gang Zu , Liu Xiao-Lei (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environmental toxicology and pharmacology*, 32, 63–68.
- Juan-Ignacio, A. (2014). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10), 692–699.
- Juergens, U. R. (2014). Anti-inflammatory Properties of the Monoterpene 1-8 cineole: Current Evidence for Co-medication in Inflammatory Airway Diseases. *Drug Research*, 64, 638–646.
- Kamble V. A. (2015). In vitro anti-fungal activity of *Cuminum cyminum* (Cumin seed) essential oil against clinical Isolates of *Candida* species. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 3(3), 264-275.
- Koneman, E. W. (1996). Diagnóstico microbiológico. Editorial Panamericana. México DF. 386-393 pp.
- Lucana N. M. R., Huanca E. R. M. (2004) Estructura bacteriana. *Revista de Actualización Clínica*, 49, 2589-2593.
- Mahboubia M. y Ghazian B. F. (2010). In vitro synergistic efficacy of combination of amphotericin B with *Myrtus communis* essential oil against clinical isolates of *Candida albicans*. *Phytomedicine*, 17, 771–774.
- Martinez-Esteso, M.J., Selles-Marchart, S., Vera-Urbina, J.C., Pedreño, M.A., y Bru-Martinez, R. (2009). Changes of defense proteins in the extracellular proteome of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Gamay) cell cultures in response to elicitors. *Journal of Proteomics*, 73, 331-341.

- Matute, W. I. G. (2008). Antimicrobianos. Rev. Fac. Cienc. Med, 5, 70-77.
- Natural Medicines Comprehensive Database. (2017). Eucalyptol. [En línea] consultado el 30 de noviembre del 2018. Disponible en: <http://naturaldatabase.therapeuticresearch.com/nd/PrintVersion.aspx?id=700&AspxAutoDetectCookieSupport=1>
- Nazarro. F, Fratianni F., Martino, L., Coppola R., Feo V. (2013) Effect o essential oils on pathogenic bacteria. Pharmaceuticals Journal. 6, 1451-1474.
- Obidi O. F., Adelowotan A. O., Ayoola G. A., Johnson O. O., Hassan M. O. y Nwachukwu S. C. U. (2013). Antimicrobial activity of orange oil on selected pathogens. The International Journal of Biotechnology, 2(6), 113-122.
- OMS. (1997). Programa internacional de seguridad de sustancias químicas. Seguridad química; principios básicos de toxicología aplicada. La naturaleza de los peligros químicos. 2da. Ed. (revisada). Lima; Módulo de capacitación.
- Picazo, J. 2000. Procedimientos en microbiología clínica. [en línea]. Consultado el 16 de noviembre del 2018. Disponible en: http://coesant-seimc.org/documents/métodosbásicos_sensibilidadantibióticos.pdf
- Prieto A. G., Perea Y. A., Ortiz C.C. (2014) Producción biocatalítica del alcohol perílico utilizando células completas de *Aspergillus niger* DSM 821. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, 12(1), 36-46.
- Ramakrishna, A. y. A., Gokare. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. Plant Signaling & Behavior, 6(11), 1720-1731.
- Rojas M. M., Sánchez Y., Espinosa I., Correa T. M., Pinol O. (2012). Caracterización química y actividad antibacteriana de aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L. y *Ocimum basilicum* var. *genovese* L. Revista Protección Vegetal, 27(2), 130-134.
- Saet B. L., Kwang H. C., Su N. K. (2007) The antimicrobial activity of essential oil from *Dracocephalum foetidum* against pathogenic microorganisms. Journal of Microbiology, 45(1) 53–57.
- Sena, S. B. (2004). Introducción a la Industria de los Aceites Esenciales extraídos de Plantas Medicinales y Aromáticas. In SENA (Ed.).
- Sierra, R. C. I., Guevara, E. y Guevara-Patiño, A. (2011). Actividad in vitro de piperacilina-tazobactam en combinación con aminoglucósidos

y fluoroquinolonas en *Pseudomonas aeruginosa* productoras de melato- β -lactamasas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 31: 13- 19.

- Sikkema J., Bont J., Poolman B. (1994) Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J Biol Chem* 269, 8022–8028.
- Silvestre A. J. D., Cavalerio J. A. S., Feio S. S., Roseiro J. C., Delmond B., Filliatre C. . (1999). Synthesis of some new Benzylic ethers from 1,8 cineole with antimicrobial activity. *Monatshefte für Chemie*, 130, 589-595.
- Soković Marina, Glamočlija Jasmina, Marin P. D., Brkić Dejan, van Griensven Leo J. L. D. . (2010). Antibacterial Effects of the Essential Oils of *Commonly Consumed*. Medicinal Herbs Using an *In Vitro* Model. *Molecules*, 15, 7532-7546.
- Sonboli A., Babakhani B., Reza M.A. (2006). Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia*. [En línea]. Consultado el 30 de noviembre del 2018. Disponible en: <http://www.doc4net.com./doc/2330831927372>
- Swamy M. K., Akhtar M. S., Sinniah U. R. (2016). Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Vélez-Terranova M., Campos G. G., Sánchez-Guerrero H. (2014). Uso de metabolitos secundarios de las plantas para reducir la metanogénesis ruminal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 17(3), 489-499.
- Vieira, A.J. Becerra F. P., M.C. Souza, Totti B.M., Rozza A.L.. (2018). Limonene: Aroma of innovation in health and disease. *Chemico-Biological Interactions*, 283, 97-106.
- Wang, H. y Bun, T. N. (2002). *Plant drug analyses*. Second edition, Editorial Sprinder. Germany, 15-29 pp.
- Winslow, I., Kroll D. (1998). Herbs as medicines. *Archives of Internal Medicine*. 158, 2192-2199.
- Yáñez R. X, Lugo M. L., Parada D. Y. (2007). Estudio del aceite esencial de la cáscara de la naranja dulce (*Citrus sinensis*, variedad Valenciana) cultivada en Labateca (Norte de Santander, Colombia). *BISTUA*, 5(1), 3-8.

- Zhanga Zijie , V. F., Yuana Qipeng , Liang Hao (2014). Effects of nisin on the antimicrobial activity of D-limonene and its nanoemulsion. *Food Chemistry*, 150, 307–312.
- Zulaikha R. S, Norkhadijah S. I. S., and Praveena S. M. (2015). Hazardous Ingredients in Cosmetics and Personal Care Products and Health Concern: A Review. *Public Health Research*, 5, 7-15.