



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE  
MICROORGANISMOS DE INTERÉS MÉDICO Y  
ODONTOLÓGICO MEDIANTE ACEITES ESENCIALES  
DE PLANTAS.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**C I R U J A N A   D E N T I S T A**

P R E S E N T A:

MARÍA FERNANDA BADILLO RANGEL

TUTOR: DR. ENRIQUE ROMO ARÉVALO

ASESORA: MTRA. ISABEL MARTÍNEZ SANABRIA



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

***A DIOS, mi madre Ana Rangel y mi hija  
Regina...***

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Enrique Romo Arévalo por darme la oportunidad de trabajar con él, por su apoyo, guía y enseñanza.

Al Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados de la Facultad de Odontología por proveerme de lo necesario para el proceso de investigación y por el apreciable recibimiento a su equipo de trabajo.

Al Biol. Gabriel Palma Cortes y Dr. Carlos Cabello Gutiérrez del Departamento de Investigación en Virología del INER quienes amablemente realizaron la donación de la cepa de *Candida albicans* ATCC 40028

A la Mtra. Sonia López Letayf por su apoyo para realizar el análisis estadístico de mi trabajo.

A los miembros del jurado por dedicar parte de su tiempo para leer el presente trabajo y por sus valiosos comentarios al respecto.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la UNAM proyecto: IA202618

## **DEDICATORIAS**

A mi hermosa Universidad Nacional Autónoma de México y apreciada Facultad de Odontología.

A mi madre Ana Rangel por siempre brindarme su apoyo incondicional y jamás dejarme sola, por su educación y cariño.

A mi hija Regina por ser la razón principal de aferrarme a llegar a este momento y poder mostrarle que, aunque a veces hay dificultades siempre con esfuerzo se pueden alcanzar las metas.

A mi hermana Lily y mi cuñado Marco Miramontes (en paz descanse) por siempre en medida de lo posible haber hecho más fácil recorrer este camino.

A mi abuelita Carmen Colín que, aunque ya no está con nosotros fue una persona importante en mi educación, y en mis ganas de siempre tratar de ser mejor persona.

A mi tía Hilda Badillo y mi prima Ángeles López por haber sido participes en momentos complicados y por el buen ánimo que siempre mostraron al brindarme su apoyo durante mis estudios.

A mi pareja Gabriel Jiménez por su paciencia, amor, dedicación y apoyo en todo momento para no rendirme en este proceso.

ÍNDICE.....	1
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. Resistencia antimicrobiana.....	5
1.1.1. Mecanismos de resistencia.....	6
1.2. Aceites esenciales de plantas y sus componentes.....	9
1.2.1. <i>Melaleuca alternifolia</i> .....	10
1.2.2. <i>Eucalyptus</i> sp.....	10
1.2.3. <i>Citrus bergamia</i> .....	11
1.2.4. <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	11
1.3. Microorganismos de importancia médica y odontológica.....	12
1.3.1. <i>Candida albicans</i> .....	12
1.3.2. <i>Streptococcus mutans</i> .....	14
1.3.3. <i>Escherichia coli</i> .....	15
2. ANTECEDENTES.....	18
2.1. Hallazgos de <i>Melaleuca alternifolia</i> .....	18
2.2. Hallazgos de <i>Eucalyptus</i> sp.....	19
2.3. Hallazgos de <i>Citrus bergamia</i> .....	19
2.4. Hallazgos de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	21
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
4. JUSTIFICACIÓN.....	22
5. HIPÓTESIS.....	23
6. OBJETIVOS.....	23
6.1. Objetivo general.....	23
6.2. Objetivos específicos.....	23
7. MATERIALES.....	24
7.1. Recursos para cultivo de microorganismos.....	24
7.2. Recursos para la extracción de aceites esenciales.....	24
7.3. Recursos para las pruebas de inhibición microbiana.....	24
8. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	26
8.1. Extracción de los aceites esenciales.....	26
8.2. Cultivo de los microorganismos.....	26
8.3. Procedimiento general del ensayo para el control positivo.....	27

8.4. Procedimiento general del ensayo de inhibición de microorganismos.....	28
8.5. Formación de grupos de estudio.....	28
8.6. Análisis estadístico.....	29
9. RESULTADOS.....	30
9.1. Extracción de los aceites esenciales.....	30
9.2. Pruebas de inhibición microbiana mediante aceites esenciales.....	30
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	60
10.1. Comparativo.....	61
11. DISCUSIÓN.....	64
12. CONCLUSIÓN.....	65
13. PERSPECTIVAS.....	66
14. REFERENCIAS.....	67

## RESUMEN

La generación de microorganismos resistentes a antimicrobianos se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial y ha establecido un desafío importante para la comunidad científica de todo el mundo. El proceso de resistencia a antimicrobianos se puede originar por una incorrecta selección del medicamento, tratamientos incompletos, automedicación e infecciones crónicas o donde participan diferentes tipos de microorganismos.

El objetivo de nuestro trabajo fue comprobar si aceites esenciales de diversas plantas (*Eucalyptus* sp., *Melaleuca alternifolia*, *Rosmarinus officinalis* y *Citrus bergamia*) inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos de relevancia médica y odontológica (*Escherichia coli*, *Candida albicans* y *Streptococcus mutans*).

Para lograr nuestro objetivo, obtuvimos los aceites esenciales de *Eucalyptus* sp. y *Rosmarinus officinalis* mediante hidrodestilación a partir de hojas frescas de las respectivas plantas, mientras que para Bergamota y Melaleuca se usó el aceite esencial comercial. Los microorganismos de estudio fueron: *Candida albicans* ATCC 40028, *Escherichia coli* (Invitrogen Cat. C600003) y *Streptococcus mutans* ATCC 2517. Las pruebas de inhibición del crecimiento se realizaron por triplicado en ocasiones distintas mediante cultivo en medio líquido y seguimiento del crecimiento de los microorganismos mediante espectrofotometría de luz visible. Los grupos controles consistieron del microorganismo únicamente en el medio de cultivo y a los grupos experimentales se les adiciono al inicio del experimento el aceite esencial.

Se determinaron las cinéticas de crecimiento de las tres cepas de microorganismos en condiciones control y las concentraciones mínimas inhibitorias los aceites esenciales para cada microorganismo. Los aceites esenciales de *Melaleuca alternifolia*, *Rosmarinus officinalis* y *Citrus Bergamia* presentaron el mejor efecto de inhibición del crecimiento en los tres microorganismos.

Basándonos en nuestros resultados podemos concluir que el uso de aceites esenciales puede ser una alternativa terapéutica y profiláctica en casos donde los antimicrobianos clásicos han perdido su efectividad.

**Palabras clave:** *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, aceites esenciales de plantas, inhibición microbiana.



## ABSTRACT

The generation of antimicrobial resistant microorganisms has become a worldwide public health problem and has established an important scientific challenge. The process of antimicrobial resistance can be originated by an incorrect selection of the drug, incomplete treatments, self-medication, chronic infections and infections where different types of microorganisms participate.

The objective of our work was to demonstrate if essential oils from various plants (*Eucalyptus* sp., *Melaleuca alternifolia*, *Rosmarinus officinalis* and *Citrus bergamia*) inhibit the growth of pathogenic microorganisms with medical and dental relevance (*Escherichia coli*, *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*).

To achieve our objective, we obtained the essential oils of *Eucalyptus*, *Rosmarinus* and *Bergamot* by hydrodistillation from fresh leaves of the respective plants, while a commercial oil was used for *Melaleuca*. Microorganisms in our experiments were: *Candida albicans* ATCC 40028, *Escherichia coli* (Invitrogen Cat. C600003) and *Streptococcus mutans* ATCC 2517. Growth inhibition tests were performed by triplicate on different occasions by liquid culture medium and monitoring the growth of microorganisms used optical density by visible light spectrophotometry. The control groups consisted of microorganism only in the culture medium and the essential oil was added to the experimental groups at the beginning of the experiment.

The growth kinetics of the three strains under control conditions and the minimum inhibitory concentrations for essential oils were determined. The essential oils of *Melaleuca*, *Rosmarinus* and *C. bergamia* had the best growth inhibition effect in the three microorganisms.

Based on our results we can conclude that the use of essential oils can be a therapeutic and prophylactic alternative in cases where classic antimicrobials have lost their effectiveness.

**Key words:** *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, essential oils, microorganisms inhibition.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Resistencia antimicrobiana

La generación de microorganismos resistentes a antimicrobianos se ha convertido en un desafío importante para la comunidad científica de todo el mundo. Motivada por la gravedad de tal situación, la Organización Mundial de la Salud (OMS) llevó a cabo la publicación del informe *Resistencia a los antimicrobianos: Vigilancia de informes globales*. Dicho informe describe como la resistencia a los antimicrobianos desarrollada por los principales microorganismos patógenos para el ser humano representa un claro riesgo para la salud en el contexto internacional.<sup>1</sup>

En el informe se describen los protocolos de vigilancia y las recomendaciones de la OMS en el estudio de enfermedades. Además, se ha creado una red de hospitales y laboratorios cuya función es proporcionar datos sobre distribución de serotipos y antimicrobianos con susceptibilidad hacia diferentes microorganismos, así como la información epidemiológica para estimar la carga de estas enfermedades y el desarrollo de tratamientos cada vez más eficientes.<sup>1</sup>

No solamente se describe en el informe la resistencia creciente ante enfermedades causadas por bacterias sino también las causadas por hongos como la candidiasis, aspergilosis, histoplasmosis y dermatofitosis. En algunos países, los datos recientes tienen un cambio marcado en los organismos causales de candidemia hacia especies de *Candida* sp, que tienen aumento de la resistencia a los azoles como el fluconazol, el fármaco antimicótico estándar de elección en muchos países y a los antifúngicos conocidos como equinocandinas.<sup>1</sup>

El incremento de la resistencia microbiana por la presión selectiva que representa la utilización de antibióticos a gran escala, sobre todo en los hogares, ha permitido cepas con mecanismos de resistencia que, en muchas ocasiones, dejan prácticamente sin alternativas de tratamiento, además se puede presentar multiresistencia en gran número de microorganismos. La resistencia a los antimicrobianos reduce las posibilidades de tratamiento eficaz de enfermedades,

prolonga el tiempo de agonía de los enfermos y los obliga a utilizar medicamentos costosos, además de alargar el tiempo de hospitalización y aumentar el riesgo de mortalidad.<sup>2</sup>

Otros de los factores más importantes por los que se ha llegado a la alarmante situación actual: empleo de antibióticos sin prescripción médica, tiempo inapropiado de consumo, incumplimiento de los horarios de administración e infra dosificación. Por otro lado, muchos de nuestros médicos los prescriben innecesariamente, especialmente en patologías de vía aérea superior, de etiología viral en la mayoría de los casos o inclusive en cuadros alérgicos. Según estudios sobre consumo de antibióticos, los cuadros de vía aérea superior son las patologías en las que se emplean antibióticos innecesarios con mayor frecuencia.<sup>2</sup>

### 1.1.1.Mecanismos de resistencia

Las bacterias pueden presentar resistencia a los antibióticos como resultado de mutaciones cromosomales e intercambio de material genético de otras bacterias o fagos (virus que utilizan bacterias para su desarrollo y reproducción), a través de mecanismos como: <sup>3</sup>

1. **Transformación:** Transferencia o incorporación por una bacteria, de ADN libre extracelular procedente de la lisis de otras bacterias.
2. **Transducción:** Transferencia de ADN plasmídico de una bacteria a otra mediante un bacteriófago (virus que infecta bacterias).
3. **Transposición:** Movimiento de una sección de ADN (transposón) que puede contener genes para la resistencia a diferentes antibióticos y otros genes cassettes unidos en equipo para expresión de un promotor en particular.
4. **Conjugación:** Intercambio de material genético entre dos bacterias (donante y receptor), a través de una “hebra” sexual o contacto físico entre ambas.

La resistencia de los microorganismos puede ser natural o intrínseca y adquirida, debe ser analizada desde varios puntos de vista (farmacocinético, farmacodinámico, poblacional, molecular y clínico). La resistencia natural o

intrínseca es una propiedad específica de las bacterias, su aparición es anterior al uso de los antibióticos y tiene la característica de ser inherente a una especie en particular.<sup>3</sup> La resistencia adquirida es un verdadero cambio en la composición genética de la bacteria y constituye un verdadero problema en la clínica. Existe un fenómeno conocido como tolerancia, considerado como un tipo de resistencia adquirida, aun cuando el microorganismo siga siendo sensible al medicamento.<sup>3</sup>

Los siguientes son los principales mecanismos de resistencia desarrollados por las bacterias: <sup>3</sup>

### **1. Bombas de flujo o expulsión del antibiótico del interior de la célula bacteriana:**

Transporta al antimicrobiano hacia el exterior de la célula sin modificaciones, pero sin acción antimicrobiana. Para ello, la bacteria dispone de bombas de expulsión dependientes de energía, que pueden comportarse como sistemas de eliminación de uno o varios antibióticos.

### **2. Modificación o inactivación del antibiótico mediante enzimas hidrolíticas:**

Es el mecanismo más común de resistencia adquirida y está determinado en gran medida por la producción de enzimas que hidrolizan al antimicrobiano. El ejemplo más representativo son las betalactamasas, enzimas que inactivan el antibiótico al hidrolizar el anillo betalactámico de la molécula. Otra clase importante de antibióticos que son destruidos por enzimas son los aminoglucósidos. Clases de betalactamasas: Clase A Penicilinasas, Clase B betalactamasas, Clase C Cefalosporinas y Clase D Oxacilinas.

### **3. Bloqueo de la penetración del antibacteriano mediante modificación del sitio activo:**

La alteración o modificación del sitio de unión del antimicrobiano se traduce en una pérdida de la afinidad y por ende le impide ejercer su acción. La modificación de un aminoácido genera un blanco diferente y así disminuye la afinidad de unión por el antimicrobiano. Hay dos tipos de modificación del sitio activo:

- Modificación de PBP (penicilin-binding-protein): complejo enzimático que permite la síntesis del peptidoglicano, compuesto de pared celular de bacterias principalmente Gram positivas, si se produce la mutación del sitio de unión al antimicrobiano como los betalactámicos, estos no pueden actuar y se genera resistencia.
- Modificación ribosomal: los genes erm A y erm B modifican el sitio activo del ribosoma mediante metilación, mecanismo importante en la resistencia a macrólidos.

#### **4.Alteración o disminución de la permeabilidad de la membrana celular**

**bacteriana:** Cambios en el diámetro y/o número de porinas pueden bloquear el ingreso del antimicrobiano a la bacteria, de esta manera el antibiótico no puede penetrar la superficie bacteriana y alcanzar el núcleo celular, esta es la forma más frecuente de resistencia natural. Es un mecanismo importante en las bacterias Gram negativas, pues poseen canales proteicos denominados porinas que permiten o impiden el paso de moléculas hidrofóbicas.

**5.Biopelículas:** Los microorganismos que forman biopelículas están protegidas de la luz ultravioleta, la deshidratación, la acción de los antibióticos, los mecanismos de defensa del organismo como la fagocitosis y otras amenazas ambientales. La resistencia antimicrobiana a los antibióticos dentro de la biopelícula se debe a múltiples mecanismos, que pueden incluso actuar de forma sinérgica.

**6.Sobre-expresión del sitio blanco:** Este mecanismo solamente se ha descrito en aislados clínicos de micobacterias. La duplicación génica a las mutaciones de los promotores implicados en la transcripción de estos genes, son probablemente el mecanismo responsable. La disminución o inactivación del antimicrobiano consiste en una serie de cambios estructurales y mecanismos desarrollados por las bacterias para evadir la acción que ejercen sobre ellas los antibióticos, con lo que disminuyen las opciones farmacológicas para el tratamiento de los pacientes, generando

resultados no satisfactorios en el tratamiento de las enfermedades infecciosas, y aumentando los días de hospitalización y mortalidad.

## **1.2. Aceites esenciales de plantas y sus componentes**

Ante la problemática de resistencia antimicrobiana, se han propuesto algunas alternativas prometedoras como son los aceites esenciales (EO) de diversas plantas que pueden ser usadas como antimicrobianos. Dichos aceites tienen un gran potencial para aumentar la eficacia de la terapia antifúngica / antibacteriana proporcionando un amplio rango de acción.<sup>4</sup> Muchas plantas tienen propiedades antimicrobianas que están relacionadas por sus componentes químicos entre los que se incluyen: alcaloides, terpenos, polisacáridos, ésteres, cetonas y quinonas.<sup>4</sup>

Los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos volátiles producidos por plantas aromáticas y extraídas por destilación o presión. Se conocen más de 3000 aceites esenciales, de los cuales aproximadamente 300 son comercialmente relevantes como perfumes, cosméticos, productos de limpieza, alimentos y productos farmacéuticos.<sup>5</sup>

Un progreso notable en el desarrollo de métodos analíticos ha contribuido a una caracterización precisa y más confiable de los aceites esenciales. Los compuestos volátiles de origen terpenoide, principalmente monoterpenos y sesquiterpenos, se han identificado como hidrocarburos y sus derivados oxigenados en forma de alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres, peróxidos y fenoles. Además, también están presentes compuestos no terpenoides, a saber: fenilpropanoides, ácidos grasos y sus ésteres y más raramente, compuestos que contienen nitrógeno y azufre. Numerosos parámetros (factores fisiológicos, ambientales y genéticos) influyen en la composición del aceite esencial.<sup>5</sup>

### 1.2.1. *Melaleuca alternifolia*

La *Melaleuca alternifolia* pertenece a la familia *Myrtaceae*, esta planta se describe como una especie de matorral y se puede encontrar principalmente en Sudamérica, el oeste de India y Australia. <sup>4</sup> En Australia esta planta es conocida como árbol de té (Tea Tree Oil “TTO”) y se ha utilizado ampliamente en la medicina popular por los aborígenes. Algunas actividades biológicas de *M. alternifolia* incluyen acción antibacteriana, antiviral y antifúngica. <sup>4</sup>

TTO está compuesto de hidrocarburos terpénicos, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos y sus alcoholes asociados. <sup>6</sup> Se han examinado muestras de TTO por cromatografía de gases y espectrometría de masas-cromatografía de gases, dando como resultado aproximadamente 100 componentes con concentraciones diferentes. <sup>6</sup>

Su aceite esencial se puede obtener a partir de la hidrodestilación de sus hojas y la composición química varía según el método de la extracción y la región del cultivo. <sup>4</sup> En general este aceite es una mezcla compleja de monoterpenos y terpenoides (50% oxigenados y 50% de hidrocarburos) y aproximadamente otras 100 sustancias. <sup>4</sup> Entre estas sustancias, el terpinen-4-ol es el compuesto primario y está reportado como el ingrediente activo responsable de las propiedades terapéuticas antimicrobianas.

### 1.2.2. *Eucalyptus* sp.

Otra planta que ha demostrado acción biológica antimicrobiana es el eucalipto (*Eucalyptus*). Su aceite esencial posee un amplio espectro antimicrobiano, fungicida, herbicidas, acaricida y nematicida. <sup>7</sup>

Se puede obtener de varias partes diferentes de la planta, sin embargo, la mayor concentración de aceite esencial de *Eucalyptus* se ha encontrado en las hojas. <sup>7</sup>

Los compuestos dominantes en el aceite incluyen a los terpenos 1,8-cineol, limoneno, p-cimeno,  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$ -pineno,  $\alpha$ -terpineol, canfeno, linalol y ocimeno. <sup>7</sup> La acción antimicrobiana de este aceite es bien conocida y se ha

reportado que extractos de *Eucalyptus* como *E. citriodora*, *E. globulus* y *E. staigeriana* tienen una acción antimicrobiana clara contra muchos tipos de microorganismos patógenos.<sup>7</sup>

El *eucalipto* corresponde a uno de los principales géneros de la familia *Myrtaceae*, nativo de Australia y cultivado en todo el mundo. Los *eucaliptos* tienen hojas perennes que son olorosas debido a la presencia de aceites esenciales que se producen y almacenan en las células secretoras. Estos aceites son aromáticos, picantes e incoloros o de color amarillo pálido, aunque hay estudios que han informado que el color es parduzco o verdoso.<sup>8</sup>

### **1.2.3. *Citrus bergamia***

La Bergamota es una planta perteneciente a la familia *Rutaceae*, definida como un híbrido de naranja amarga y limón. Es una planta endémica de la región de Calabria (Italia). La fruta de bergamota se usa principalmente para la extracción de su aceite esencial (aceite esencial de bergamota: BEO) que se obtienen raspando y presionando en frío la cáscara de la fruta.<sup>9</sup>

BEO contiene varias moléculas bioactivas con posibles beneficios para la salud. Se compone de una fracción volátil (93–96% del total) y no volátil (4–7% del total).<sup>9</sup> El primero está representado principalmente por los hidrocarburos monoterpenos y sesquiterpénicos, y sus derivados oxigenados, junto con aldehídos alifáticos, alcoholes y ésteres. Incluyen monoterpeno limoneno (25–53%) y grandes cantidades de compuestos oxigenados, como linalool (2–20%), acetato de linalilo (15–40%),  $\gamma$ -terpinene y  $\beta$ -pineno. La fracción no volátil (4–7% del total) contiene pigmentos, ceras, cumarinas y psoralenos (como 5-metoxipsoraleno, también conocido como bergapten o 5-MOP, contenidos en aproximadamente 0.2%), así como bergamottina ([5-geraniloxipsoraleno])<sup>9</sup>

### **1.2.4. *Rosmarinus officinalis***

La planta *Rosmarinus officinalis* “Romero” pertenece a la familia *Lamiaceae* esta planta también es ampliamente utilizada por las poblaciones indígenas, donde crece de forma silvestre, en países de clima templado de la región mediterránea, como Portugal. Varios estudios informan la presencia de una amplia variedad de



compuestos como terpenos, iridoides, flavonoides y compuestos fenólicos en estas plantas.<sup>10</sup>

La familia *Lamiaceae* incluye especies de plantas que contienen grandes cantidades de ácidos fenólicos, como el ácido rosmarínico, que tienen propiedades antibacterianas, antivirales, antioxidantes y antiinflamatorias. Los métodos de extracción se aplican a las porciones más activas de la planta (hojas, raíces, tallos o flores).<sup>10</sup>

Los principales componentes del aceite esencial de romero son alcanfor (5.0–21%), 1,8-cineol (15–55%),  $\alpha$ -pineno (9.0–26%), borneol (1.5–5.0%), canfeno (2.5–12%),  $\beta$ -pineno (2.0–9.0%) y limoneno (1.5–5.0%) en proporciones que varían según la etapa vegetativa y las condiciones bioclimáticas.<sup>10</sup> Los métodos de extracción más utilizados para obtener los compuestos bioactivos de *R. officinalis* son maceración, hidrodestilación, destilación y Soxhlet por extracción de fluidos supercrítico.<sup>10</sup>

### **1.3. Microorganismos de importancia médica y odontológica (*Candida albicans*, *Streptococcus mutans* y *Escherichia coli*)**

#### **1.3.1. *Cándida albicans***

Se encuentra entre las especies de hongos más prevalentes de la microbiota humana y coloniza asintóticamente a individuos sanos, sin embargo también es un patógeno oportunista que puede causar infecciones graves y en ocasiones fatales.<sup>11</sup> El impacto médico de *C. albicans* generalmente depende de su capacidad para formar biopelículas, que son comunidades muy compactas de células que se adhieren a las superficies, como tejidos y dispositivos médicos implantados. Las biopelículas de *C. albicans* están altamente estructuradas, contienen células en forma de levadura, células pseudohifas y células hifales rodeadas por una matriz extracelular.<sup>11</sup>

*C. albicans* es altamente polimorfo, su flexibilidad fenotípica es un importante factor de virulencia que ayuda en su invasión de los tejidos. La diseminación de todo el hospedero y la supervivencia también ayuda a modular la respuesta

inmunitaria del huésped y contrarrestar la vigilancia inmunitaria. Estos microorganismos son flexibles metabólicamente y pueden utilizar diferentes fuentes de nutrientes.<sup>11</sup> La formación de biopelículas de *C. albicans* se ha dividido en cuatro etapas principales: adherencia, proliferación, maduración y dispersión.<sup>11</sup>

Algunos antimicrobianos utilizados para el tratamiento de infecciones micóticas por *C. albicans* son miconazol y clotrimazol (tópicos) y ketoconazol, itraconazol, fluconazol y variconazol (sistémicos).<sup>12</sup> El fluconazol (FCZ), por sus ventajas farmacocinéticas en relación con su posología, así como su disponibilidad en el mercado y su fácil uso tan generalizado se ha desarrollado en estas levaduras el riesgo potencial de resistencia principalmente en países con condiciones de extrema pobreza.<sup>13</sup> En México, aunque no se han cuantificado los casos de resistencia en hospitales de atención general y de especialidades, se ha observado un incremento importante en el número de pacientes con micosis que no responden a los tratamientos.<sup>12</sup>

Los derivados triazólicos como este antimicrobiano inhiben de forma selectiva la enzima 14  $\alpha$  esterol demetilasa en la síntesis del ergosterol, que es dependiente del citocromo p450. La depleción del ergosterol, en conjunto con la acumulación de compuestos intermedios en la síntesis de este, conlleva a una pérdida de la funcionalidad de la membrana plasmática.<sup>13</sup>

En el caso de los azoles los posibles mecanismos que generan resistencia son: la modificación del enzima blanco y la incapacidad de alcanzar concentraciones adecuadas en el sitio de acción por la presencia de barreras de permeabilidad.<sup>13</sup>

En las especies de *Candida* sp. y en muchos otros hongos, el gen ERG11 se encarga de la síntesis de la Erg11p o la enzima 14  $\alpha$  demetilasa indispensable para la síntesis del ergosterol.<sup>13</sup> La resistencia a los azoles se ha descrito como una disminución de la expresión de dicha enzima o la presencia de mutaciones específicas que la afectan en su estructura o función; y puede ser inducida por regulación negativa de su síntesis tras la exposición prolongada al fluconazol.<sup>13</sup>

### 1.3.2. *Streptococcus mutans*

Aunque no ha generado resistencia antimicrobiana ya que no hay un tratamiento específico que lo inhiba, lo mencionaremos por su gran relevancia en odontología y la oportunidad de descubrir su uso como un mecanismo profiláctico.

Es un microorganismo Gram positivo, dispuesto en cadena, no móvil, productor rápido de ácido láctico con capacidad de cambiar un medio pH 7 a pH 4.2 en 24 horas aproximadamente. Es un fermentador de glucosa, lactosa, rafinosa, manitol, inulina y salicina con la producción de ácido. Su hábitat natural es la boca humana y es capaz de adherirse a superficies, establecer uniones con otros estreptococos y con bacterias de otras especies.<sup>14</sup>

En el caso del *Streptococcus mutans*, los factores de virulencia más involucrados en la producción de caries son:

1. *Acidogenicidad*: el estreptococo puede fermentar los azúcares de la dieta para originar principalmente ácido láctico como producto final del metabolismo. Esto hace que baje el pH y se desmineralice el esmalte dental.<sup>15</sup>
2. *Aciduricidad*: Es la capacidad de producir ácido en un medio con pH bajo.<sup>15</sup>
3. *Acidofilicidad*: *S. mutans* puede resistir la acidéz del medio bombeando protones (H<sup>+</sup>) fuera de la célula.<sup>15</sup>
4. Síntesis de glucanos y fructanos: por medio de enzimas como glucosil y fructosiltransferasas (GTF y FTF), se producen los polímeros glucano y fructano, a partir de la sacarosa. Los glucanos insolubles pueden ayudar a la bacteria a adherirse al diente y ser usados como reserva de nutrientes.<sup>15</sup> Las glucosiltransferasas catalizan la hidrólisis de dos moléculas de sacarosa en sus monosacáridos constituyentes: la alfa-D-glucosa y la beta-D-fructuosa. Las moléculas de glucosa resultantes, son polimerizadas por enlaces alfa (1-6), alfa (1-4) o alfa (1-3) y forman los glucanos extracelulares bacterianos y se liberan dos moléculas de fructuosa.<sup>15</sup>

De acuerdo con las características de solubilidad de su producto, las glucosiltransferasas se clasifican en:

- GTF-S, las que sintetizan el dextrano, un glucano que posee predominantemente uniones lineales alfa (1-6), es soluble en agua y de aspecto globular.
- GTF-I, sintetiza un glucano insoluble y fibrilar con predominio de uniones alfa (1-3) y la GTF-SI, sintetiza ambos tipos de glucanos.<sup>15</sup>

El *S mutans* secreta los tres tipos de glucosiltransferasas. Al producto de la GTF-I y la GTF-SI, con predominio alfa (1-3), se le denomina mutano. Su insolubilidad en agua, viscosidad y aspecto fibrilar, lo involucra en los fenómenos de adherencia, agregación y acumulación bacteriana en la placa dental. De esta manera la capacidad de producir mutano, está involucrada en su actividad cariogénica<sup>15</sup>

#### 5. Producción de dextranasa.

Las bacterias tienen la posibilidad de sintetizar y liberar enzimas glucanohidrolasas, como la dextranasa y la mutanasa. Estas se disponen en la superficie de las células bacterianas en contacto con el glucano, lo hidrolizan y facilitan así el paso de los productos de la hidrólisis hacia el interior de esta.<sup>15</sup>

Por tanto, los glucanos extracelulares pueden ser utilizados por las bacterias como fuente de energía. Además de movilizar reservas de energía, esta enzima puede regular la actividad de las glucosiltransferasas removiendo productos finales de glucano.<sup>15</sup>

#### **1.3.3. *Escherichia coli***

*Escherichia coli* se clasifica como una bacteria Gram negativa en forma de bastón en la familia *Enterobacteriaceae*. La bacteria habita principalmente en el tracto intestinal inferior de animales de sangre caliente, incluidos los humanos, y a menudo se descarga al medio ambiente a través de heces o efluentes de aguas residuales.<sup>16</sup>

La presencia de *E. coli* en aguas ambientales ha sido considerada durante mucho tiempo como un indicador de la reciente contaminación fecal. Sin embargo,

numerosos estudios recientes han informado que algunas cepas específicas pueden sobrevivir durante largos períodos de tiempo y potencialmente reproducirse en entornos extraintestinales.<sup>16</sup>

*E. coli* es un microorganismo responsable de infecciones en humanos y animales, cuya variabilidad genética le permite crecer en diversos nichos ecológicos. Es reconocida como una de las causas bacterianas más frecuentes de infecciones, enfermedades diarreicas transmitidas por alimentos e infecciones extraintestinales.<sup>17</sup> Es una de las especies bacterianas más versátiles y la diversidad de sus estilos de vida se logra a través de un alto grado de plasticidad genómica, a través de la pérdida, ganancia o transferencia de genes. En los últimos años ha existido un número creciente de informes sobre la adquisición de resistencia a los antimicrobianos.<sup>17</sup>

Dado que esta bacteria reside en los intestinos de los animales de sangre caliente, está sujeto a frecuentes encuentros con antibióticos lo que le proporciona una alta presión de selección que conduce a la resistencia contra los antibióticos consumidos por su huésped.<sup>16</sup> Los grupos filogenéticos exhiben diferentes niveles de resistencia a los antibióticos, independientemente de la adquisición de resistencia, lo que indica que el fondo genético de *E. coli* también afecta su patrón de resistencia a los antibióticos.<sup>16</sup>

Los ambientes naturales, tales como agua, los suelos y plantas de tratamiento de aguas residuales, se han considerado para ser reactores bacterianos genéticos, en el que los intercambios genéticos activos se producen rutinariamente entre diferentes bacterias, similar a la que se producen en el intestino.<sup>16</sup> Los genes que codifican la resistencia a los antibióticos se asocian frecuentemente con elementos genéticos móviles, como plásmidos y transposones, que pueden intercambiarse entre bacterias que pertenecen a diferentes linajes filogenéticos.<sup>16</sup>

La afectación de esta bacteria en vías urinarias permitió obtener resultados en un estudio al respecto de su resistencia ante algunos tratamientos. *E. coli* ha sido la bacteria más frecuentemente aislada durante estos años, suponiendo el 61,08% del total de urocultivos positivos enviados desde atención primaria.<sup>18</sup> De forma

global, ha habido un aumento de la resistencia de los aislamientos de *E. coli* a todos los antimicrobianos estudiados. Aun así, la resistencia se ha mantenido por debajo del 4% frente a fosfomicina y nitrofurantoína y por debajo del 10% en cefalosporinas de segunda y tercera generación.<sup>18</sup>

La resistencia frente a amoxicilina-clavulánico ha ido aumentando en estos años hasta alcanzar el 21,5% en 2013, siendo este antibiótico el único que ha presentado un incremento estadísticamente significativo. Los máximos niveles de resistencia (superior al 30%) se encontraron en los antibióticos administrados vía oral y frecuentemente indicados en infecciones urinarias no complicadas: trimetoprim-sulfametoxazol, ciprofloxacino y ampicilina.<sup>18</sup>

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Hallazgos sobre *Melaleuca alternifolia*

Según Calo et al. (2015), la actividad antimicrobiana de los terpenos del TTO se asocia con la hidrofobicidad en la que los terpenos interactúan con los lípidos de la membrana celular del microorganismo, cambiando la permeabilidad de la membrana<sup>19</sup> Los principales resultados de la permeabilidad de la membrana es la modificación de la fuerza motriz protónica, que conduce a un déficit en la producción de energía celular causada por la disminución en la generación de Adenosin Trifosfato (ATP) y lisis celulares debido a fugas o coagulación del citoplasma.<sup>20,21</sup>

Según Pachava et al (2015), usando TTO al 15% incluido en material de rebase suave para dentadura durante el mezclado del mismo, disminuyó de manera significativa el crecimiento de *C. albicans* a los días 1, 30 y 60 empleando cultivos de agar dextrosa y mediciones de halos de inhibición.<sup>22</sup>

Sharma y Hegde (2014) En su estudio *in vitro* buscó comparar la actividad antifúngica del aceite de *Melaleuca alternifolia* y el fluconazol mezclado con un acondicionador de tejidos. Al probar varias concentraciones de fluconazol y aceite de *Melaleuca* en Visco-gel, se determinó la concentración mínima más efectiva de cada agente antifúngico contra *Candida albicans*. La concentración mínima más efectiva de fluconazol en Visco-gel, fue del 5%, tomando el resultado con mediciones a las 24 horas y el día 7, mientras se realizaba el monitoreo todos los días. Del mismo modo, se encontró la concentración mínima más efectiva de aceite de *Melaleuca* en Visco-gel del 30%.<sup>23</sup>

Se concluyó que el treinta por ciento de aceite de *Melaleuca* era el más efectivo ( $p < 0.001$ ), superior al 5% de fluconazol en Visco-gel, ya que conservó una actividad antifúngica sustancial, el fluconazol perdió su efecto completamente como lo demostró el nuevo crecimiento de *C. albicans* en el día 7, mientras que el aceite de *Melaleuca* había retenido su acción antifúngica.

## 2.2. Hallazgos sobre *Eucalyptus* sp.

Un trabajo de investigación realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano (UNAP) durante los meses de diciembre a abril del 2017, determinó el efecto inhibitorio del aceite esencial del *Eucalyptus globulus* sobre *Streptococcus mutans* y el hongo *Candida albicans*. Por lo que se comparó el efecto inhibitorio en diferentes concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% respectivamente.<sup>24</sup>

El resultado obtenido fue que el aceite esencial tiene actividad inhibitoria para *Streptococcus mutans* con un promedio de halo de inhibición 11.85 mm para una concentración del 25%, 13.3 mm para una concentración del 50%, 13.97 mm para una concentración del 75% y 15.54 mm para una concentración del 100%. La actividad antifúngica para *Candida albicans* se dio con un promedio de 9.34 mm para una concentración del 25%, 10.41 mm para una concentración del 50%, 11.39 mm para una concentración del 75% y 12.45 mm para una concentración del 100%.<sup>24</sup>

Esto demuestra que a mayor concentración existe un mayor halo inhibitorio, por lo que el aceite esencial del *Eucalyptus globulus* presenta efecto inhibitorio sobre la cepa de la bacteria *Streptococcus mutans* y la levadura *Cándida albicans* de modo que puede ser usado como un agente en el control de la caries dental y candidiasis oral.<sup>24</sup>

## 2.3. Hallazgos sobre *Citrus bergamia*

Se ha informado que el aceite esencial de bergamota (BEO) tiene actividad antibacteriana y antifúngica contra *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*.<sup>9</sup>

La actividad *in vitro* de BEO contra especies de *Candida* sugiere el papel potencial de BEO en el tratamiento tópico de las infecciones por *Candida*. Además, se ha investigado la efectividad *in vitro* del aceite y los vapores de bergamota y sus componentes contra los patógenos comunes transmitidos por los



alimentos, y se ha revelado que el linalool es el componente antibacteriano más efectivo.<sup>9</sup>

En otra investigación donde el objetivo fue evaluar las propiedades antimicrobianas de las fracciones de bergamota ricas en flavonoides e investigar la influencia de la desglicosilación enzimática en su actividad antibacteriana contra bacterias Gram negativas, bacterias Gram positivas y levaduras, se crearon cuatro fracciones líquidas para cada fraccionamiento etanólico secuencial de la cáscara con dos alcohol etílico (EtOH) al 70% v / v seguido de dos EtOH al 100% v / v las extracciones se denominaron 70 E1, 70 E2, 100 E1 y 100 E2.

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de las fracciones de bergamota (70 E1, 70 E2, 100 E1 y 100 E2) y los compuestos flavonoides puros se determinaron utilizando una Bioscreen C (Labsystems, Helsinki, Finlandia). Los organismos de prueba se cultivaron durante 16 h en medios apropiados y la densidad óptica a 600 nm ( $OD_{600}$ ) se ajustó a 0, por dilución en medios frescos.<sup>9</sup> Todos los ensayos se realizaron por duplicado y el crecimiento en presencia de etanol actuó como control. Para mejorar potencialmente la actividad antimicrobiana, la fracción 70 E1 (0,5 g) se incubó con 10 U de actividad equivalente de poligalacturonasa (PGasa) de la pectinasa 62L, durante 2 h en una incubadora con agitación ( $37^{\circ} C$ ,  $100 \text{ rev min}^{-1}$ ) en un volumen final de 50 ml. La actividad de PGasa se determinó contra 1% (p / v) de pectina de piel de naranja.<sup>9</sup>

Los resultados de los controles negativos que contienen etanol (máximo 1% v / v) indican la ausencia total de inhibición de todas las cepas analizadas. *Escherichia coli* fue la cepa más sensible (inhibición completa lograda con una concentración de  $200 \mu\text{g ml}^{-1}$  100 E1). Como se esperaba, las propiedades antimicrobianas de 70 E1 aumentaron después del tratamiento con pectinasa 62L debido a la conversión de glucósidos flavonoides en sus aglicones más lipofílicos y biológicamente activos.<sup>9</sup>

## 2.4. Hallazgos sobre *Rosmarinus officinalis*

Se reportó un estudio donde se evaluaron las actividades biológicas de su extracto como el efecto antimicrobiano sobre las biopelulas mono y polimicrobianas, la citotoxicidad, la capacidad antiinflamatoria y la genotoxicidad. Las biopelículas monomicrobianas de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans* y *Pseudomonas aeruginosa* y las biopelículas polimicrobianas compuestas de *C. albicans* con cada bacteria, se formaron en microplacas durante 48 hrs, se expusieron durante 5 min a *R. officinalis* extracto (200 mg / ml). Los datos fueron analizados por la prueba ANOVA. Se observaron reducciones significativas en las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC / ml) en todas las biopelículas. Con respecto a las células, se observó que las concentraciones  $\leq 50$  mg / ml proporcionaron una viabilidad celular superior al 50%. La producción de citocinas proinflamatorias en los grupos tratados fue similar o inferior en comparación con el grupo control. Se demostró que el extracto de *R. officinalis* era efectivo en biopelículas mono y polimicrobianas; también proporcionó una viabilidad celular superior al 50% (a  $\leq 50$  mg / ml), mostró efecto antiinflamatorio y no fue genotóxico.<sup>25</sup>

El extracto de *Rosmarinus officinalis* contribuyó efectivamente al control in vitro de especies importantes de microorganismos como *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans* y *Pseudomonas aeruginosa* en biopelículas mono y polimicrobianas que son responsables de varias infecciones en la cavidad oral como en otras regiones del cuerpo. Además, este extracto promovió también la viabilidad celular por encima del 50% a concentraciones  $\leq 50$  mg / ml, excelente efecto antiinflamatorio, que muestra inhibición o reducción de la síntesis de citocinas proinflamatorias, siendo además no genotóxico para las líneas celulares estudiadas. Por lo tanto, este extracto puede ser un agente terapéutico prometedor que se puede agregar en algunas formulaciones médicas y dentales, como pastas dentales, enjuagues bucales, irrigación de conductos radiculares, ungüentos, jabones, para controlar microorganismos patógenos y biopelículas, con efecto antiinflamatorio y ausencia de efectos citotóxicos y genotóxicos.<sup>25</sup>

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La generación de microorganismos patógenos que han desarrollado resistencia a los antimicrobianos se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial. La Organización Mundial de Salud se ha pronunciado sobre este problema y estima que la salud de millones de personas en todo el mundo se va a ver comprometida por no contar con tratamientos antimicrobianos efectivos.

Para contrarrestar dicha problemática, constantemente se desarrollan nuevas generaciones de tratamientos antimicrobianos de diseño químico. Su proceso de desarrollo conlleva la inversión de altas sumas de dinero, tiempo y eventualmente, por el mal uso de estos se generarán nuevas cepas de microorganismos resistentes.

Analizando el conjunto de todos los antecedentes, se hace notar la importancia para la salud que múltiples especies de microorganismos, causantes de patologías en el humano, han desarrollado resistencia a los antimicrobianos de primera elección. Por lo tanto, es de interés la investigación de aceites esenciales de plantas que han demostrado acción antimicrobiana y que pueden ser empleados para el control de microorganismos de interés médico y odontológico.

### 4. JUSTIFICACIÓN

La creciente problemática encontrada en diversas investigaciones acerca de la resistencia de microorganismos ante las terapias antimicrobianas convencionales y su riesgo a la salud global, nos lleva a la necesidad de buscar alternativas que sean novedosas, de fácil obtención, económicas y principalmente efectivas para combatir las infecciones que ya no han podido ser controladas por medicamentos convencionales. La alternativa que consideramos en este trabajo son aceites esenciales extraídos de plantas: *Eucalyptus* sp, *Melaleuca alternifolia*, *Citrus bergamia* y *Rosmarinus officinalis* ya que han demostrado una acción efectiva contra diversas especies de microorganismos, siendo de nuestro interés principal probar su efectividad contra microorganismos de interés médico y odontológico como *Candida albicans*, *Streptococcus mutans* y *Escherichia coli*. Nuestros

resultados pueden derivar en el planteamiento de alternativas efectivas para el control de dichos microorganismos que ayuden en el tratamiento de infecciones complejas o servir como profilácticos naturales que eventualmente no permitan el desarrollo de resistencia a antimicrobianos convencionales.

## 5. HIPÓTESIS

Los aceites esenciales de *Eucalypto*, *Melaleuca alternifolia*, *Citrus bergamia* y *Rosmarinus officinalis* inhiben el crecimiento de *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans* y *Candida albicans in vitro*.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1. Objetivo general

- Determinar si los aceites esenciales de *Eucalypto*, *Melaleuca alternifolia*, *Citrus bergamia* y *Rosmarinus officinalis* inhiben el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*, *Streptococcus mutans* y *Escherichia coli*.

### 6.2. Objetivos específicos

- Extraer mediante hidroddestilación el aceite esencial de *Eucalypto* sp. y *Rosmarinus officinalis* a partir de hojas frescas de las respectivas plantas.
- Obtener los aceites esenciales comerciales de origen orgánico de *Citrus bergamia* y *Melaleuca alternifolia*.
- Realizar las cinéticas de crecimiento de los microorganismos *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans* y *Candida albicans* mediante espectrofotometría de luz visible
- Utilizar dos concentraciones (0.2% y 0.5%) de los aceites esenciales en los cultivos de microorganismos y comparar su efecto inhibitorio.

## **7. MATERIALES**

### **7.1. Recursos materiales para el cultivo de microorganismos**

- Matraz Erlenmeyer de diferentes volúmenes
- Incubadora orbital con control de temperatura
- Tubos Falcon de 15 y 50 ml
- Tubos Eppendorf de 1.5 ml
- Autoclave
- Micropipetas 10 ul, 20 ul y 200 ul
- Campana de flujo laminar
- Medio Luria Bertani
- Medio Dextrosa Sabouraud
- Medio Soya tripticasa

### **7.2. Recursos para la extracción de aceites esenciales**

- Equipo de destilación por arrastre de vapor con serpentín refrigerado
- Mechero de gas
- Matraz Kitasato
- Bomba peristáltica
- Microcentrífuga
- Micropipetas
- Embolo de separación
- Tubos Eppendorf de 1.5ml

### **7.3. Recursos para las pruebas de inhibición microbiana**

- Espectrofotómetro de luz visible Du 640 (Beckman)
- Celdas para espectrofotómetro de 1cm de paso óptico
- Agua bidestilada y medios de cultivo estériles
- Aceites esenciales de Romero y Eucalipto (obtención en el laboratorio), de Bergamota marca Avant aromatherapy (México) y Árbol de té marca Aromaterapia Esencial S.A de C.V.

**Recursos humanos:**

- Tutor de tesis.
- Tesista calibrada para el uso de los equipos de laboratorio y pruebas microbiológicas

## **8. DESARROLLO EXPERIMENTAL**

### **8.1. Extracción de los aceites esenciales**

Se seleccionaron 600 gramos de biomasa (hojas frescas de la planta, sin ramas) y se lavaron con agua purificada para eliminar polvo y contaminantes macroscópicos. En el Laboratorio de Biología Periodontal de la Facultad de Odontología (División de estudios de Posgrado e Investigación) la biomasa se colocó en un matraz Kitasato de 1000 ml y se adicionaron 250 ml de agua bidestilada estéril. El matraz se conectó a un sistema de hidrodestilación por arrastre de vapor de serpiente con camisa externa de refrigeración por agua fría proporcionado por una bomba peristáltica a un flujo constante de 10 ml por minuto.

La biomasa se mantuvo a 90°C usando un mechero de gas durante 45 minutos y el hidrodestilado se almacenó en un tubo Falcon de 50 ml a temperatura ambiente durante 30 minutos. Transcurrido este periodo de tiempo se separó el aceite esencial con el uso de una micropipeta tomándolo de la parte superior del hidrodestilado del tubo Falcon.

Los aceites se almacenaron en tubos Eppendorf en obscuridad y en un lugar fresco hasta el momento de su uso.

### **8.2. Cultivo de los Microorganismos**

*Escherichia coli* BL21 DE3.

La cepa fue obtenida de Invitrogen (Cat. C600003, Carlsbad US). Se realizó un cultivo inicial de 20 ml en medio Luria Bertani, el cual se mantuvo en agitación a 200 rpm a 37°C. Después de una noche de crecimiento del cultivo inicial se colectaron las células por centrifugación a 7,500 rpm durante 20 minutos para separar la biomasa y esta se resuspendió en medio LB estéril para obtener un stock del microorganismo a una densidad óptica de 1 a 600nm. Las células se conservaron en glicerol a -80°C hasta su uso.

### *Candida albicans* ATTC 40028

La cepa fue donada por el Área de Investigación en Virología y Micología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Se realizó un cultivo inicial de 20 ml en medio caldo dextrosa Sabouraud (CDS). Después de una noche de crecimiento del cultivo inicial se colectaron las células a 7,500 rpm para separar la biomasa y fueron resuspendidas en medio CDS estéril para obtener un stock del microorganismo a una densidad óptica de 1 a 600nm. Las células se conservaron en glicerol a -80°C hasta su uso.

### *Streptococcus mutans* ATCC 2517

Se realizó un cultivo inicial de 20 ml en medio caldo de soya tripticasa y después de una noche de crecimiento del cultivo en agitación, este se centrifugo a 7,500 rpm para separar la biomasa y se resuspendió en caldo de soya tripticasa (CST) estéril para obtener un stock del microorganismo a una densidad de 1 a 600nm. Las células se conservaron en glicerol a -80°C hasta su uso.

## **8.3. Procedimiento general del ensayo para el control positivo**

Se prepararon y esterilizaron los medios de cultivo para cada microorganismo (LB para *E. coli*, CDS para *C. albicans* y CST para *S. mutans*). Con los medios listos y bajo condiciones estériles se agregaron 10 ml en tubos Falcón estériles de 15 ml.

De cada stock de microorganismo previamente homogenizado se agregaron 10 µl a los 10 ml de medio respectivo y en los tubos de *E. coli* y *S. mutans* se agregaron 100 µg/ml de ampicilina mientras que en el tubo con *C. albicans* se agregaron 30µg /ml de fluconazol. En este momento se tomó la lectura inicial en el espectrofotómetro (tiempo cero). Los tubos con los cultivos permanecieron a 37°C en agitación constante de 230 rpm durante 24 hrs. Cada hora durante 6 hrs y después a las 8, 20, 22 y 24 hrs, se tomó una muestra de cada cultivo para obtener su densidad óptica con el espectrofotómetro.



#### **8.4. Procedimiento general del ensayo de inhibición de microorganismos**

Se prepararon y esterilizaron los medios de cultivo para cada microorganismo (LB para *E. coli*, CDS para *C. albicans* y CST para *S. mutans*). Con los medios listos y bajo condiciones estériles se agregaron 10 ml en tubos Falcón estériles de 15ml.

De cada stock de microorganismo previamente homogenizado se agregaron 10  $\mu$ l a los 10 ml de medio respectivo y el volumen deseado de aceite esencial. En este momento se tomó la lectura inicial en el espectrofotómetro (tiempo cero). Los tubos con los cultivos permanecieron en incubación a 37°C en agitación constante a 230rpm durante 24 horas. Cada hora durante 6 hrs y después a las 8, 20, 22 y 24 hrs, se tomó una muestra de cada cultivo para obtener su densidad óptica con el espectrofotómetro.

Como control de crecimiento se utilizaron los tubos con medio y el inóculo de cada microorganismo sin la adición de aceites, estos cultivos se utilizaron para determinar las cinéticas de crecimiento de los microorganismos de estudio. Se tomaron mediciones con el espectrofotómetro cada hora durante 6 horas y a las 8, 20, 22 y 24 hrs, usando las mismas condiciones de crecimiento antes señaladas.

Los grupos experimentales consistieron en tubos Falcon con 10 ml de medio estéril más 10  $\mu$ l del stock del respectivo microorganismo más 20 o 50  $\mu$ l de aceite esencial (concentración final 0.2 y 0.5% respectivamente). Se tomaron lecturas con espectrofotómetro en los mismos tiempos que los grupos control y bajo las mismas condiciones de crecimiento que los grupos control.

### **8.5. Formación de grupos de estudio**

En un tubo falcón se colocaron 10 ml de medio LB, utilizado como blanco para la calibración del espectrofotómetro. En un segundo tubo se colocaron 10 ml de medio LB y 10 µl del stock de *E. coli* utilizado para medir la cinética de crecimiento del microorganismo. En los siguientes 8 tubos se colocaron 10 ml de medio LB, 10 µl del stock y 20 µl y 50 µl de cada uno de los aceites (*Melaleuca alternifolia*, *Eucalyptus* sp., *Citrus bergamia* y *Rosmarinus officinalis*) respectivamente.

De esta manera también se formaron los grupos de estudio de *S. mutans* utilizando medio CST y *C. albicans* con medio CDS.

### **8.6. Análisis estadístico**

Las pruebas se realizaron por triplicado en diferentes ocasiones, la lectura se llevó a cabo por medio del espectrofotómetro. Los datos de la absorbancia (crecimiento de los cultivos) fueron graficados (tiempo contra absorbancia) comparando los mismos tiempos de grupo control contra los experimentales utilizando el análisis estadístico de ANOVA de dos vías con corrección de Bonferroni para determinar si existían diferencias significativas entre los grupos experimentales con su respectivo control de crecimiento y entre los diferentes aceites esenciales.

## 9. RESULTADOS

### 9.1.Extracción de los aceites esenciales.

A partir de la destilación por arrastre de vapor se obtuvieron en el caso de *Rosmarinus officinalis* 35 ml de hidrato (agua de arrastre del aceite esencial) y 1.2 ml de aceite esencial. Para el *Eucalyptus* sp. se obtuvo 42 ml de hidrato y 1.8 ml de aceite esencial.

Los aceites de *Melaleuca alternifolia* y *Citrus bergamia* fueron obtenidos comercialmente de Aromaterapia Esencial S.A de C.V. y Avant aromatherapy (México), respectivamente. Se indica por parte del fabricante que su extracción es a base de arrastre de vapor usando hojas de las respectivas plantas y se asegura una pureza del 100% sin la adición de ningún solvente o esencia.

### 9.2. Pruebas de inhibición microbiana mediante aceites esenciales.

A continuación, se presenta la cinética de crecimiento de los microorganismos que se cultivaron en los medios control (LB para *E. coli*, CDS para *C. albicans* y CST para *S. mutans*. Sin la adición de aceite esencial).

### ***Escherichia coli* (Cinética de Crecimiento)**

Tiempo	EXP 1	EXP 2	EXP 3	Promedio	Error stn
	<i>Cinética E. coli</i>	<i>Cinética E. coli</i>	<i>Cinética E. coli</i>		
<b>0</b>	0.0986	0.1002	0.1003	<b>0.0997</b>	0.0006
<b>1</b>	0.1576	0.1600	0.1420	<b>0.1532</b>	0.0056
<b>2</b>	0.2236	0.2120	0.2816	<b>0.2391</b>	0.0215
<b>3</b>	0.3554	0.3430	0.3670	<b>0.3551</b>	0.0069
<b>4</b>	0.4262	0.3910	0.4220	<b>0.4131</b>	0.0111
<b>5</b>	0.4667	0.4540	0.5010	<b>0.4739</b>	0.0140
<b>6</b>	0.5154	0.5091	0.6254	<b>0.5499</b>	0.0378
<b>8</b>	0.6141	0.6110	0.7441	<b>0.6564</b>	0.0439
<b>20</b>	0.8001	0.8210	0.8350	<b>0.8187</b>	0.0101
<b>22</b>	0.8132	0.8321	0.8390	<b>0.8281</b>	0.0077
<b>24</b>	0.8216	0.8312	0.8480	<b>0.8336</b>	0.0077

**Tabla 1.** Cinética de crecimiento de *E. coli* del grupo control, se muestran las absorbancias de los tres experimentos, así como el promedio de los tres y su error stn.

### ***S. mutans* (Cinética de Crecimiento)**

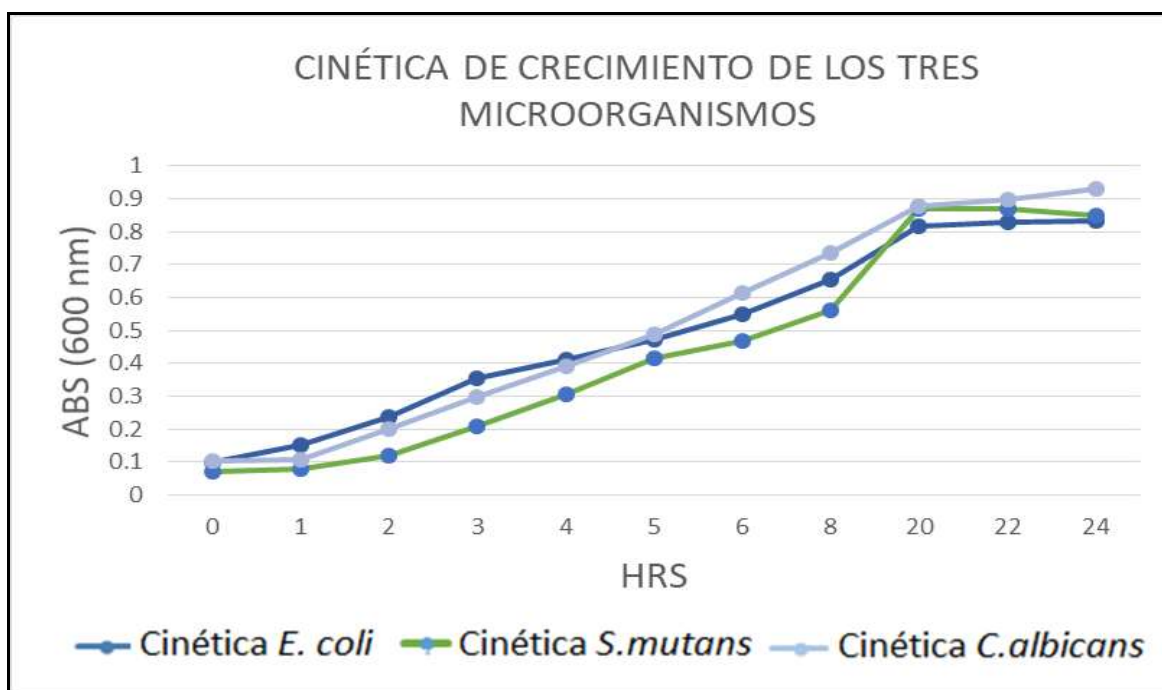
Tiempo	EXP 1	EXP 2	EXP 3	Promedio	Error stn
<b>0</b>	0.0507	0.0823	0.0799	<b>0.0710</b>	0.0102
<b>1</b>	0.0740	0.0814	0.0870	<b>0.0808</b>	0.0038
<b>2</b>	0.1201	0.1210	0.1241	<b>0.1217</b>	0.0012
<b>3</b>	0.2396	0.2016	0.1826	<b>0.2079</b>	0.0168
<b>4</b>	0.3562	0.3220	0.2462	<b>0.3081</b>	0.0325
<b>5</b>	0.4981	0.4441	0.3041	<b>0.4154</b>	0.0578
<b>6</b>	0.4795	0.5650	0.3560	<b>0.4668</b>	0.0607
<b>8</b>	0.5298	0.7180	0.4380	<b>0.5619</b>	0.0824
<b>20</b>	0.8699	0.9190	0.8190	<b>0.8693</b>	0.0289
<b>22</b>	0.8656	0.9060	0.8360	<b>0.8692</b>	0.0203
<b>24</b>	0.8216	0.9020	0.8244	<b>0.8493</b>	0.0263

**Tabla 2.** Cinética de crecimiento de *S. mutans* del grupo control, se muestran las absorbancias de los tres experimentos, así como el promedio de los tres y su error stn.

### **C. albicans (Cinética de Crecimiento)**

Tiempo	EXP 1	EXP 2	EXP 3	Promedio	Error stn
0	0.0920	0.1098	0.1030	<b>0.1016</b>	0.0052
1	0.0918	0.0916	0.1433	<b>0.1089</b>	0.0172
2	0.1590	0.1890	0.2550	<b>0.2010</b>	0.0284
3	0.2524	0.2794	0.3660	<b>0.2993</b>	0.0343
4	0.3748	0.3780	0.4250	<b>0.3926</b>	0.0162
5	0.4964	0.4214	0.5430	<b>0.4869</b>	0.0354
6	0.5936	0.5650	0.6880	<b>0.6155</b>	0.0372
8	0.6810	0.7211	0.8044	<b>0.7355</b>	0.0363
20	0.8299	0.8990	0.9030	<b>0.8773</b>	0.0237
22	0.8772	0.8820	0.9340	<b>0.8977</b>	0.0182
24	0.8974	0.9010	0.9940	<b>0.9308</b>	0.0316

**Tabla 3.** Cinética de crecimiento de *C. albicans* del grupo control, se muestran las absorbancias de los tres experimentos, así como el promedio de los tres y su error stn.



**Fig. 1.** En esta gráfica se muestra el crecimiento logarítmico de cada uno de los microorganismos cada hora durante 8 horas y a las 20, 22 y 24 hrs por medio del espectrofotómetro con una longitud de onda de 600nm. La absorbancia máxima de *E. coli* fue de 0.8336 a las 24 hrs, *S. mutans* de 0.8693 a las 20 hrs y *C. albicans* de 0.9308 a las 24 hrs.

A continuación, se presenta la cinética de crecimiento de los microorganismos que se cultivaron en los medios control (LB para *E. coli*, CST para *S. mutans*.) + ampicilina 100µg/ml y CDS para *C. albicans* + Fluconazol 30 µg/ml.

***E.coli* + ampicilina 100µg/ml (Control positivo)**

Tiempo	EXP 1	EXP 2	EXP 3	Promedio	Error stn
<b>0</b>	0.0110	0.0098	0.0113	<b>0.0107</b>	0.0004
<b>1</b>	0.0011	0.0123	0.0007	<b>0.0047</b>	0.0038
<b>2</b>	0.0028	0.0096	0.0098	<b>0.0074</b>	0.0023
<b>3</b>	0.0156	0.0381	0.0146	<b>0.0228</b>	0.0077
<b>4</b>	0.0032	0.0445	0.0132	<b>0.0203</b>	0.0124
<b>5</b>	0.0236	0.0365	0.0238	<b>0.0280</b>	0.0043
<b>6</b>	0.0451	0.0452	0.0459	<b>0.0454</b>	0.0003
<b>8</b>	0.0447	0.0578	0.0437	<b>0.0489</b>	0.0045
<b>20</b>	0.0685	0.0599	0.0615	<b>0.0633</b>	0.0026
<b>22</b>	0.0872	0.0625	0.0566	<b>0.0688</b>	0.0094
<b>24</b>	0.0102	0.0056	0.0126	<b>0.0095</b>	0.0021

**Tabla 4.** Cinética de crecimiento de *E.coli* + ampicilina 100µg/ml, se muestran las absorbancias de los tres experimentos, así como el promedio de los tres y su error stn.

### ***S. mutans* + ampicilina 100µg/ml**

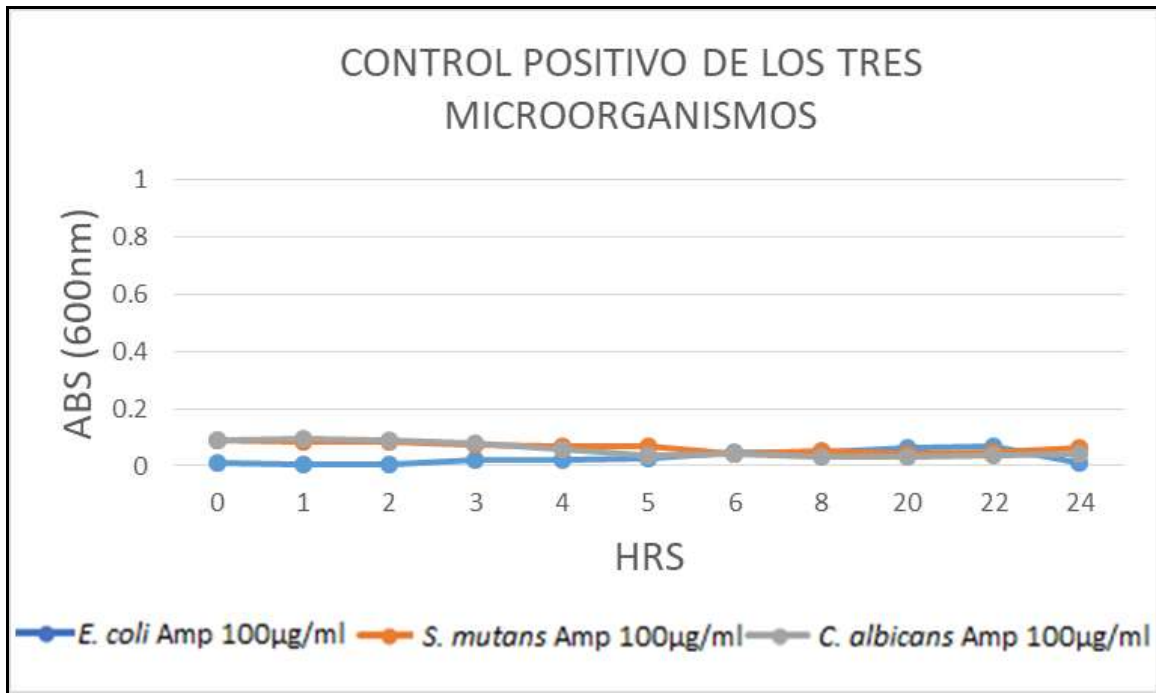
<b>Tiempo</b>	<b>EXP 1</b>	<b>EXP 2</b>	<b>EXP 3</b>	<b>Promedio</b>	<b>Error stn</b>
<b>0</b>	0.0864	0.0901	0.0877	<b>0.0881</b>	0.0011
<b>1</b>	0.0871	0.0877	0.0855	<b>0.0868</b>	0.0007
<b>2</b>	0.0825	0.0855	0.0874	<b>0.0851</b>	0.0014
<b>3</b>	0.0745	0.0751	0.0725	<b>0.0740</b>	0.0008
<b>4</b>	0.0711	0.0688	0.0632	<b>0.0677</b>	0.0023
<b>5</b>	0.0685	0.0687	0.0688	<b>0.0687</b>	0.0001
<b>6</b>	0.0455	0.0466	0.0412	<b>0.0444</b>	0.0016
<b>8</b>	0.0532	0.0521	0.0523	<b>0.0525</b>	0.0003
<b>20</b>	0.0455	0.0421	0.0402	<b>0.0426</b>	0.0016
<b>22</b>	0.0598	0.0455	0.0358	<b>0.0470</b>	0.0070
<b>24</b>	0.0751	0.0621	0.0451	<b>0.0608</b>	0.0087

**Tabla 5.** Cinética de crecimiento de *S. mutans* + ampicilina 100µg/ml, se muestran las absorbancias de los tres experimentos, así como el promedio de los tres y su error stn.

### ***C. albicans* + Fluconazol 30µg/ml**

<b>Tiempo</b>	<b>EXP 1</b>	<b>EXP 2</b>	<b>EXP 3</b>	<b>Promedio</b>	<b>Error stn</b>
<b>0</b>	0.0901	0.0942	0.0902	<b>0.0915</b>	0.0014
<b>1</b>	0.0921	0.0933	0.0925	<b>0.0926</b>	0.0004
<b>2</b>	0.0913	0.0922	0.0912	<b>0.0916</b>	0.0003
<b>3</b>	0.0785	0.0825	0.0802	<b>0.0804</b>	0.0012
<b>4</b>	0.0512	0.0619	0.0611	<b>0.0581</b>	0.0034
<b>5</b>	0.0365	0.0354	0.0322	<b>0.0347</b>	0.0013
<b>6</b>	0.0450	0.0399	0.0358	<b>0.0402</b>	0.0027
<b>8</b>	0.0301	0.0385	0.0329	<b>0.0338</b>	0.0025
<b>20</b>	0.0323	0.0327	0.0311	<b>0.0320</b>	0.0005
<b>22</b>	0.0512	0.0321	0.0299	<b>0.0377</b>	0.0068
<b>24</b>	0.0812	0.0256	0.0217	<b>0.0428</b>	0.0192

**Tabla 6.** Cinética de crecimiento de *C.albicans* + Fluconazol 30µg/ml, se muestran las absorbancias de los tres experimentos, así como el promedio de los tres y su error stn.



**Fig. 2.** En esta gráfica se muestra la inhibición de los microorganismos. *E. coli* y *S. mutans* con ampicilina 100µg/ml y *C. albicans* con fluconazol 30µg/ml. La absorbancia máxima de *E. coli* fue de 0.0688 a las 22 hrs, de *S. mutans* 0.0608 a las 24 hrs y de *C. albicans* 0.0926 a la hora, medido por medio del espectrofotómetro con una longitud de onda de 600nm, lo que demuestra que los antimicrobianos no permitieron su crecimiento.

A continuación, se presenta la cinética de crecimiento de los microorganismos que se cultivaron en los medios control (LB para *E. coli*, CDS para *C. albicans* y CST para *S. mutans*), así como la cinética de crecimiento con los experimentales.



***Escherichia coli* + *Eucalyptus* sp. 0.2%**

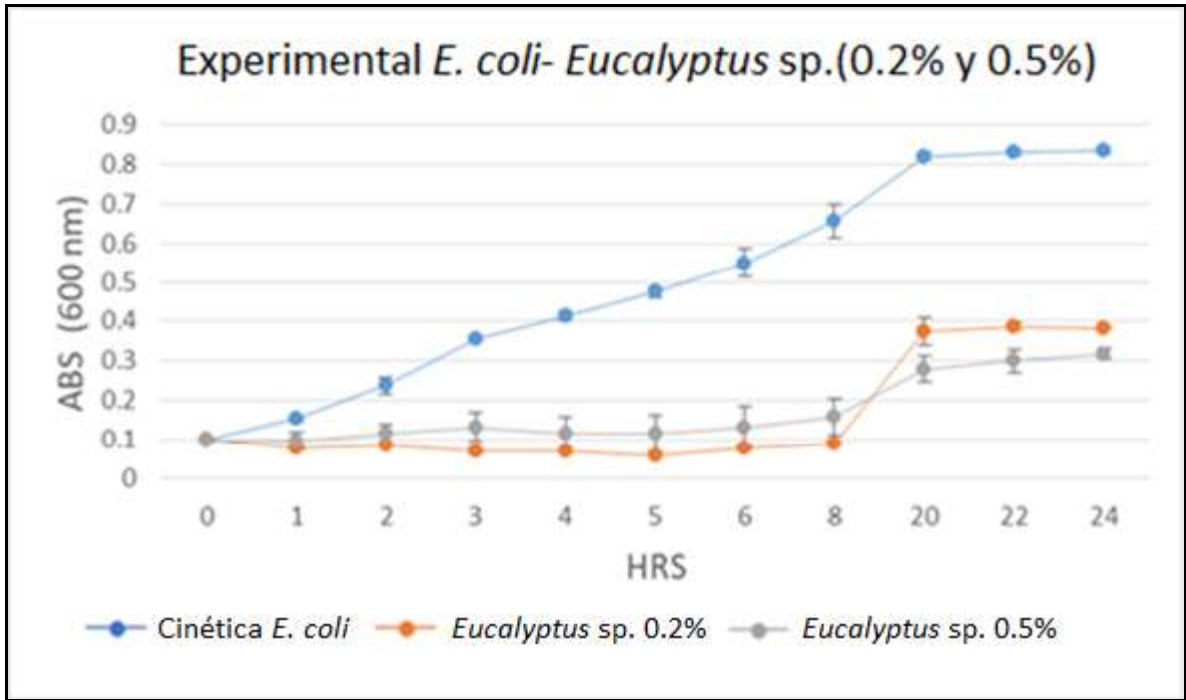
Tiempo	EXP 1	EXP 2	EXP 3	Promedio	Error stn
0	0.0930	0.1032	0.1032	<b>0.0998</b>	0.0034
1	0.0677	0.0820	0.0820	<b>0.0772</b>	0.0048
2	0.0761	0.0911	0.0911	<b>0.0861</b>	0.0050
3	0.0530	0.0763	0.0763	<b>0.0685</b>	0.0078
4	0.0677	0.0687	0.0687	<b>0.0684</b>	0.0003
5	0.0550	0.0615	0.0615	<b>0.0593</b>	0.0022
6	0.0712	0.0820	0.0820	<b>0.0784</b>	0.0036
8	0.0971	0.0871	0.0871	<b>0.0904</b>	0.0033
20	0.3061	0.4110	0.4110	<b>0.3760</b>	0.0350
22	0.3676	0.3960	0.3960	<b>0.3865</b>	0.0095
24	0.3801	0.3862	0.3862	<b>0.3842</b>	0.0020

**Tabla 7.** Cinética de crecimiento de *E. coli* + 0.2% de aceite esencial de *Eucalyptus* sp., se muestran las absorbancias de los tres experimentos, así como el promedio de los tres y su error stn.

***Escherichia coli* + *Eucalyptus* sp. 0.5%**

Tiempo	EXP 1	EXP 2	EXP 3	Promedio	Error stn
0	0.0944	0.0966	0.0982	<b>0.0964</b>	0.0011
1	0.0622	0.1022	0.1320	<b>0.0988</b>	0.0202
2	0.0791	0.1100	0.1610	<b>0.1167</b>	0.0239
3	0.0581	0.1610	0.1810	<b>0.1334</b>	0.0381
4	0.0621	0.0821	0.2010	<b>0.1151</b>	0.0434
5	0.0559	0.0881	0.2059	<b>0.1166</b>	0.0456
6	0.0634	0.1022	0.2340	<b>0.1332</b>	0.0516
8	0.0844	0.1510	0.2440	<b>0.1598</b>	0.0463
20	0.2131	0.3110	0.3150	<b>0.2797</b>	0.0333
22	0.2440	0.3440	0.3140	<b>0.3007</b>	0.0296
24	0.2957	0.3157	0.3410	<b>0.3175</b>	0.0131

**Tabla 8.** Cinética de crecimiento de *E. coli* + 0.5% de aceite esencial de *Eucalyptus* sp, se muestran las absorbancias de los tres experimentos, así como el promedio de los tres y su error stn.



**Fig. 3.** En esta gráfica se muestra la cinética de crecimiento de *E.coli* mostrando su absorbancia máxima de 0.8336 a las 24 hrs, medida por medio del espectrofotómetro con una longitud de onda de 600nm. También podemos observar el crecimiento de *E. coli* aplicándole 0.2% de aceite esencial de *Eucalyptus* sp., con el cual su absorbancia máxima fue de 0.3865 a las 24 hrs, lo cual indica que hubo una reducción en el crecimiento del 54%. Aplicando el 0.5% de *Eucalyptus* sp la absorbancia máxima fue de 0.3175 a las 24 hrs, esto indica un 62% de inhibición. Durante las primeras 8hrs la concentración con mejor inhibición fue 0.2%, después de esta hora pierde efecto, pero sin tener un crecimiento como el control.

***Escherichia coli* + *Rosmarinus officinalis* 0.2%**

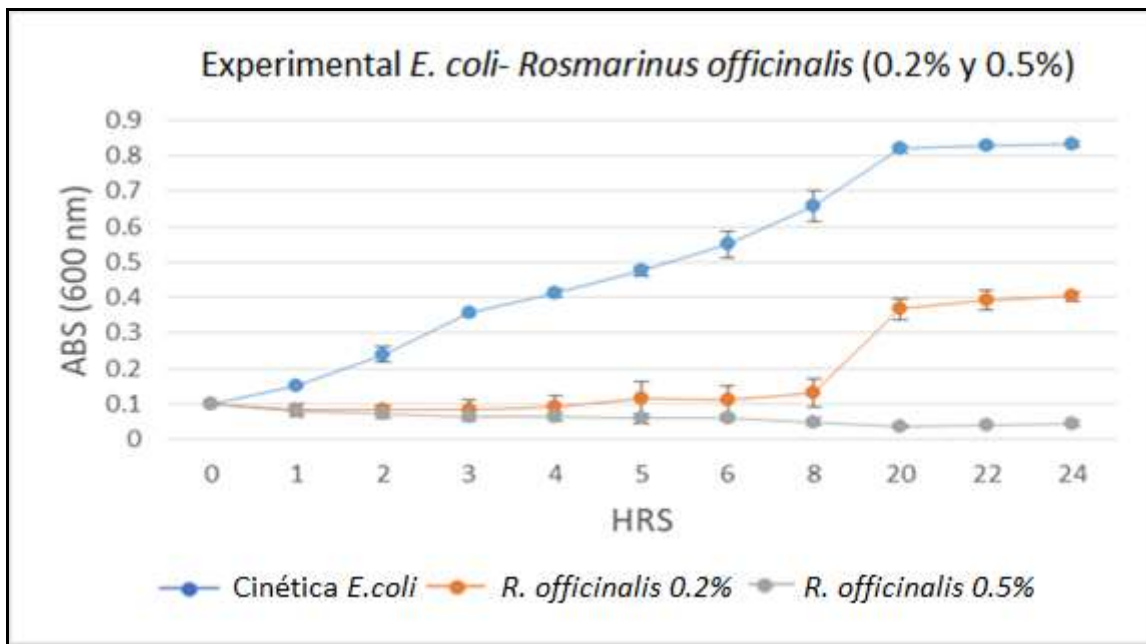
Tiempo	EXP 1	EXP 2	EXP 3	Promedio	Error stn
0	0.1001	0.0942	0.1011	<b>0.0985</b>	0.0022
1	0.0631	0.0811	0.1130	<b>0.0857</b>	0.0146
2	0.0679	0.0789	0.1049	<b>0.0839</b>	0.0110
3	0.0482	0.0770	0.1320	<b>0.0857</b>	0.0246
4	0.0454	0.0880	0.1480	<b>0.0938</b>	0.0298
5	0.0410	0.0901	0.2110	<b>0.1140</b>	0.0505
6	0.0622	0.0820	0.1920	<b>0.1121</b>	0.0404
8	0.0601	0.1330	0.2001	<b>0.1311</b>	0.0404
20	0.3611	0.4210	0.3210	<b>0.3677</b>	0.0291
22	0.3511	0.4430	0.3810	<b>0.3917</b>	0.0271
24	0.3771	0.4110	0.4210	<b>0.4030</b>	0.0133

**Tabla 9.** Cinética de crecimiento de *E. coli* + 0.2% de aceite esencial de *R. officinalis*, se muestran las absorbancias de los tres experimentos, así como el promedio de los tres y su error stn.

***Escherichia coli* + *Rosmarinus officinalis* 0.5%**

Tiempo	EXP 1	EXP 2	EXP 3	Promedio	Error stn
0	0.0993	0.1023	0.1023	<b>0.1013</b>	0.0010
1	0.0508	0.082	0.1098	<b>0.0809</b>	0.0170
2	0.0593	0.063	0.093	<b>0.0718</b>	0.0107
3	0.0515	0.0524	0.0925	<b>0.0655</b>	0.0135
4	0.0433	0.066	0.0823	<b>0.0639</b>	0.0113
5	0.039	0.0531	0.0866	<b>0.0596</b>	0.0141
6	0.0516	0.0526	0.0766	<b>0.0603</b>	0.0082
8	0.0489	0.0322	0.0699	<b>0.0503</b>	0.0109
20	0.0402	0.0406	0.0312	<b>0.0373</b>	0.0031
22	0.0411	0.041	0.0401	<b>0.0407</b>	0.0003
24	0.0428	0.058	0.0299	<b>0.0436</b>	0.0081

**Tabla 10.** Cinética de crecimiento de *E. coli* + 0.5% de aceite esencial de *R. officinalis*, se muestran las absorbancias de los tres experimentos, así como el promedio de los tres y su error stn.



**Fig. 4.** En esta gráfica se muestra la cinética de crecimiento de *E.coli* mostrando su absorbancia máxima de 0.8336 a las 24 hrs, medida por medio del espectrofotómetro con una longitud de onda de 600nm. También podemos observar el crecimiento de *E. coli* aplicándole 0.2% de aceite esencial de *R. officinalis*, con el cual su absorbancia máxima fue de 0.4030 a las 24 hrs, lo cual indica que hubo una reducción en el crecimiento del 52%. Aplicando el 0.5% de *R. officinalis* la absorbancia máxima fue de 0.0603 a las 6 hrs, esto indica un 88% de inhibición. Durante las primeras 8 hrs ambas concentraciones tuvieron una inhibición similar, sin embargo 0.02 después de este tiempo permitió nuevamente el crecimiento del microorganismo, aunque continuó por debajo del control.

***Escherichia coli* + *Citrus bergamia* 0.2%**

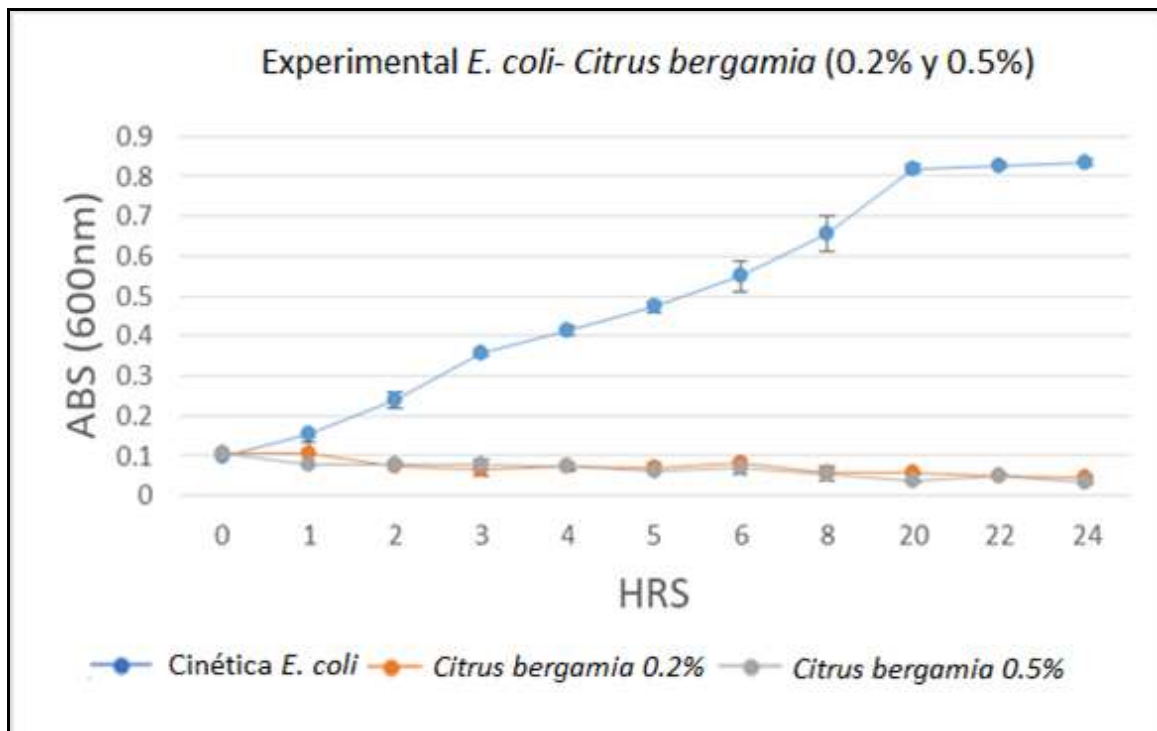
Tiempo	EXP 1	EXP 2	EXP 3	Promedio	Error stn
0	0.0989	0.1087	0.11	<b>0.1059</b>	0.0035
1	0.0766	0.0726	0.166	<b>0.1051</b>	0.0305
2	0.0774	0.0764	0.0724	<b>0.0754</b>	0.0015
3	0.0492	0.0495	0.0932	<b>0.0640</b>	0.0146
4	0.0622	0.0632	0.0912	<b>0.0722</b>	0.0095
5	0.0532	0.0662	0.0932	<b>0.0709</b>	0.0118
6	0.0874	0.0734	0.0884	<b>0.0831</b>	0.0048
8	0.0614	0.0414	0.0714	<b>0.0581</b>	0.0088
20	0.0571	0.0541	0.0564	<b>0.0559</b>	0.0009
22	0.0509	0.0555	0.0449	<b>0.0504</b>	0.0031
24	0.0517	0.0417	0.0432	<b>0.0455</b>	0.0031

**Tabla 11.** Cinética de crecimiento de *E. coli* + 0.2% de aceite esencial de *C. bergamia*, se muestran las absorbancias de los tres experimentos, así como el promedio de los tres y su error stn.

***Escherichia coli* + *Citrus bergamia* 0.5%**

Tiempo	EXP 1	EXP 2	EXP 3	Promedio	Error stn
0	0.102	0.0937	0.1230	<b>0.1062</b>	0.0087
1	0.0689	0.0790	0.0819	<b>0.0766</b>	0.0039
2	0.0703	0.0763	0.0903	<b>0.0790</b>	0.0059
3	0.0648	0.0642	0.0998	<b>0.0763</b>	0.0118
4	0.0625	0.0650	0.0895	<b>0.0723</b>	0.0086
5	0.0580	0.0680	0.0620	<b>0.0627</b>	0.0029
6	0.0910	0.0410	0.0760	<b>0.0693</b>	0.0148
8	0.0811	0.0211	0.0611	<b>0.0544</b>	0.0176
20	0.0323	0.033	0.0423	<b>0.0359</b>	0.0032
22	0.0499	0.0491	0.0509	<b>0.0500</b>	0.0005
24	0.0353	0.0333	0.0288	<b>0.0325</b>	0.0019

**Tabla 12.** Cinética de crecimiento de *E. coli* + 0.5% de aceite esencial de *C. bergamia*, se muestran las absorbancias de los tres experimentos, así como el promedio de los tres y su error stn.



**Fig. 5.** En esta gráfica se muestra la cinética de crecimiento de *E.coli* mostrando su absorbancia máxima de 0.8336 a las 24 hrs, medida por medio del espectrofotómetro con una longitud de onda de 600nm. También podemos observar el crecimiento de *E. coli* aplicándole 0.2% de aceite esencial de *Citrus bergamia*, con el cual su absorbancia máxima fue de 0.0831 a las 6 hrs, lo cual indica que hubo una reducción en el crecimiento del 87%. Aplicando el 0.5% de *Citrus bergamia* la absorbancia máxima fue de 0.0693 a las 6 hrs, esto indica un 87% de inhibición. Ambas concentraciones se mantuvieron relativamente con el mismo efecto durante las 24 hrs.

***Escherichia coli* + *M. alternifolia* 0.2%**

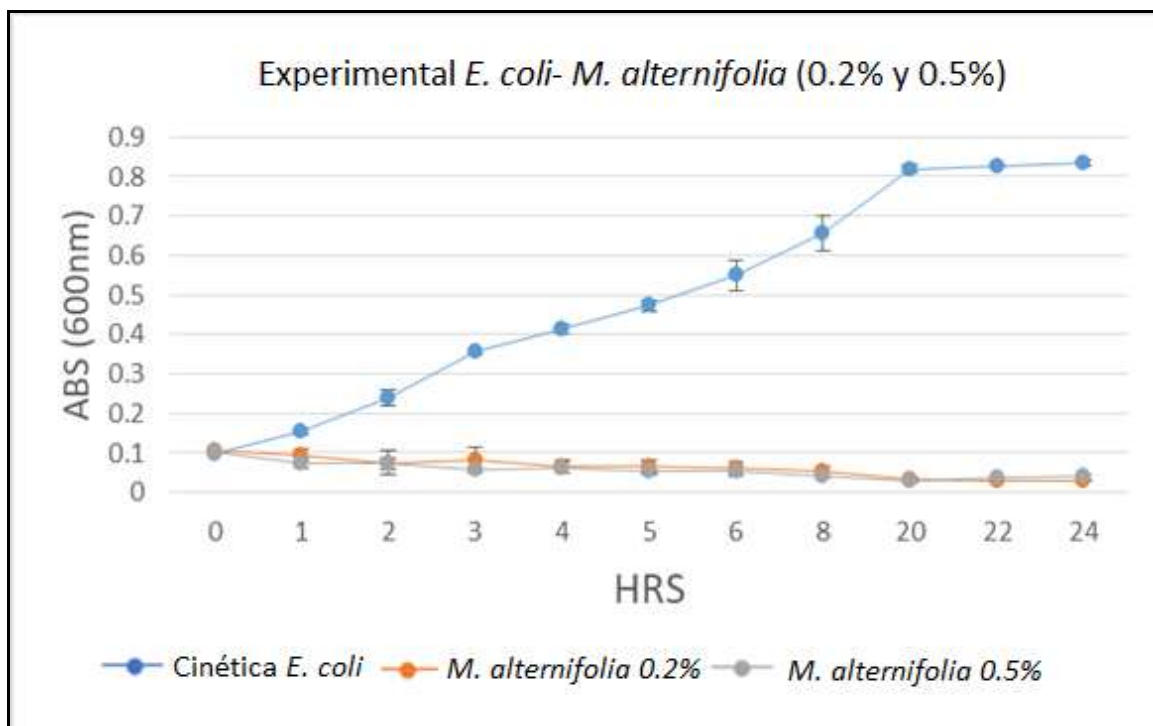
Tiempo	EXP 1	EXP 2	EXP 3	Promedio	Error stn
0	0.1014	0.1102	0.1017	<b>0.1044</b>	0.0029
1	0.0609	0.109	0.109	<b>0.0930</b>	0.0160
2	0.0484	0.044	0.134	<b>0.0755</b>	0.0293
3	0.0411	0.0651	0.144	<b>0.0834</b>	0.0311
4	0.036	0.063	0.0936	<b>0.0642</b>	0.0166
5	0.0363	0.0763	0.0863	<b>0.0663</b>	0.0153
6	0.0303	0.0603	0.0877	<b>0.0594</b>	0.0166
8	0.0289	0.0489	0.0769	<b>0.0516</b>	0.0139
20	0.0312	0.0372	0.0332	<b>0.0339</b>	0.0018
22	0.0299	0.0249	0.0309	<b>0.0286</b>	0.0019
24	0.028	0.028	0.0323	<b>0.0294</b>	0.0014

**Tabla 13.** Cinética de crecimiento de *E. coli* + 0.2% de aceite esencial de *M. alternifolia*, se muestran las absorbancias de los tres experimentos, así como el promedio de los tres y su error stn.

***Escherichia coli* + *M. alternifolia* 0.5%**

Tiempo	EXP 1	EXP 2	EXP 3	Promedio	Error stn
0	0.1014	0.0965	0.111	<b>0.1030</b>	0.0043
1	0.0525	0.0925	0.075	<b>0.0733</b>	0.0116
2	0.0498	0.098	0.0698	<b>0.0725</b>	0.0140
3	0.0468	0.0768	0.0498	<b>0.0578</b>	0.0095
4	0.036	0.086	0.0666	<b>0.0629</b>	0.0146
5	0.0414	0.0614	0.0514	<b>0.0514</b>	0.0058
6	0.0331	0.071	0.0611	<b>0.0551</b>	0.0113
8	0.0301	0.051	0.0481	<b>0.0431</b>	0.0065
20	0.0292	0.022	0.032	<b>0.0277</b>	0.0030
22	0.0304	0.0384	0.0384	<b>0.0357</b>	0.0027
24	0.0305	0.047	0.0404	<b>0.0393</b>	0.0048

**Tabla 14.** Cinética de crecimiento de *E. coli* + 0.5% de aceite esencial de *M. alternifolia*, se muestran las absorbancias de los tres experimentos, así como el promedio de los tres y su error stn.



**Fig. 6.** En esta gráfica se muestra la cinética de crecimiento de *E.coli* mostrando su absorbancia máxima de 0.8336 a las 24 hrs, medida por medio del espectrofotómetro con una longitud de onda de 600nm. También podemos observar el crecimiento de *E. coli* aplicándole 0.2% de aceite esencial de *M. alternifolia*, con el cual su absorbancia máxima fue de 0.0629 a la hora 4, lo cual indica que hubo una reducción en el crecimiento del 88%. Aplicando el 0.5% de *M. alternifolia* la absorbancia máxima fue de 0.1030 a la hora 0, esto indica un 88% de inhibición. Ambas concentraciones se mantuvieron relativamente con el mismo efecto durante las 24 hrs.



***S. mutans* + *Eucalyptus* sp. 0.2%**

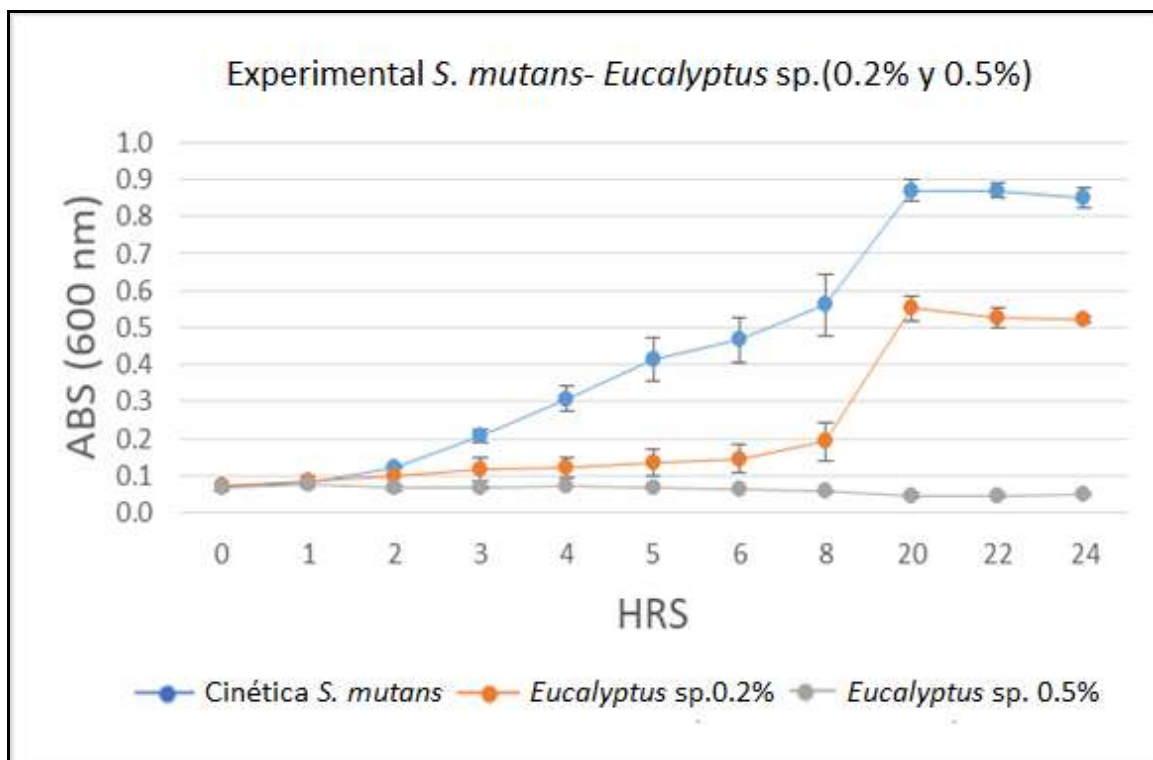
Tiempo	E1	E2	E3	Promedio	Error stn
0	0.0498	0.0788	0.0855	<b>0.0714</b>	0.0110
1	0.0601	0.1100	0.0851	<b>0.0851</b>	0.0144
2	0.0534	0.1540	0.0884	<b>0.0986</b>	0.0295
3	0.058	0.1680	0.1218	<b>0.1159</b>	0.0319
4	0.0722	0.1620	0.1320	<b>0.1221</b>	0.0264
5	0.065	0.1860	0.1555	<b>0.1355</b>	0.0363
6	0.0688	0.1830	0.1885	<b>0.1468</b>	0.0390
8	0.0898	0.2380	0.2480	<b>0.1919</b>	0.0511
20	0.5034	0.5400	0.6134	<b>0.5523</b>	0.0323
22	0.5002	0.5020	0.5772	<b>0.5265</b>	0.0254
24	0.5143	0.5100	0.5440	<b>0.5228</b>	0.0107

**Tabla 15.** Cinética de crecimiento de *S. mutans* + 0.2% de aceite esencial de *Eucalyptus* sp, se muestran las absorbancias de los tres experimentos, así como el promedio de los tres y su error stn.

***S. mutans* + *Eucalyptus* sp. 0.5%**

Tiempo	E1	E2	E3	Promedio	Error stn
0	0.0501	0.0699	0.0798	<b>0.0666</b>	0.0087
1	0.0588	0.078	0.0882	<b>0.0750</b>	0.0086
2	0.0537	0.0717	0.077	<b>0.0675</b>	0.0071
3	0.0610	0.071	0.0755	<b>0.0692</b>	0.0043
4	0.0703	0.0743	0.0732	<b>0.0726</b>	0.0012
5	0.0622	0.0642	0.0812	<b>0.0692</b>	0.0060
6	0.0684	0.0644	0.0644	<b>0.0657</b>	0.0013
8	0.0617	0.0544	0.0557	<b>0.0573</b>	0.0022
20	0.0509	0.0340	0.0588	<b>0.0479</b>	0.0073
22	0.0522	0.0342	0.0565	<b>0.0476</b>	0.0068
24	0.0519	0.0440	0.0601	<b>0.0520</b>	0.0046

**Tabla 16.** Cinética de crecimiento de *S. mutans* + 0.5% de aceite esencial de *Eucalyptus* sp., se muestran las absorbancias de los tres experimentos, así como el promedio de los tres y su error stn.



**Fig. 7.** En esta gráfica se muestra la cinética de crecimiento de *S. mutans* mostrando su absorbancia máxima de 0.8693 a las 20 hrs, medida por medio del espectrofotómetro con una longitud de onda de 600nm. También podemos observar el crecimiento de *S. mutans* aplicándole 0.2% de aceite esencial de *Eucalyptus* sp., con el cual su absorbancia máxima fue de 0.5523 a las 20 hrs, lo cual indica que hubo una reducción en el crecimiento del 37%. Aplicando el 0.5% de *Eucalyptus* sp. la absorbancia máxima fue de 0.0726 a las 4 hrs, esto indica un 91% de inhibición. *Eucalyptus* sp. 0.2% pierde en mayor proporción su inhibición a partir de las 8 hrs, mientras que Eucalipto 0.5% se mantiene muy por debajo durante las 24 hrs.

***S. mutans* + *Rosmarinus officinalis* 0.2%**

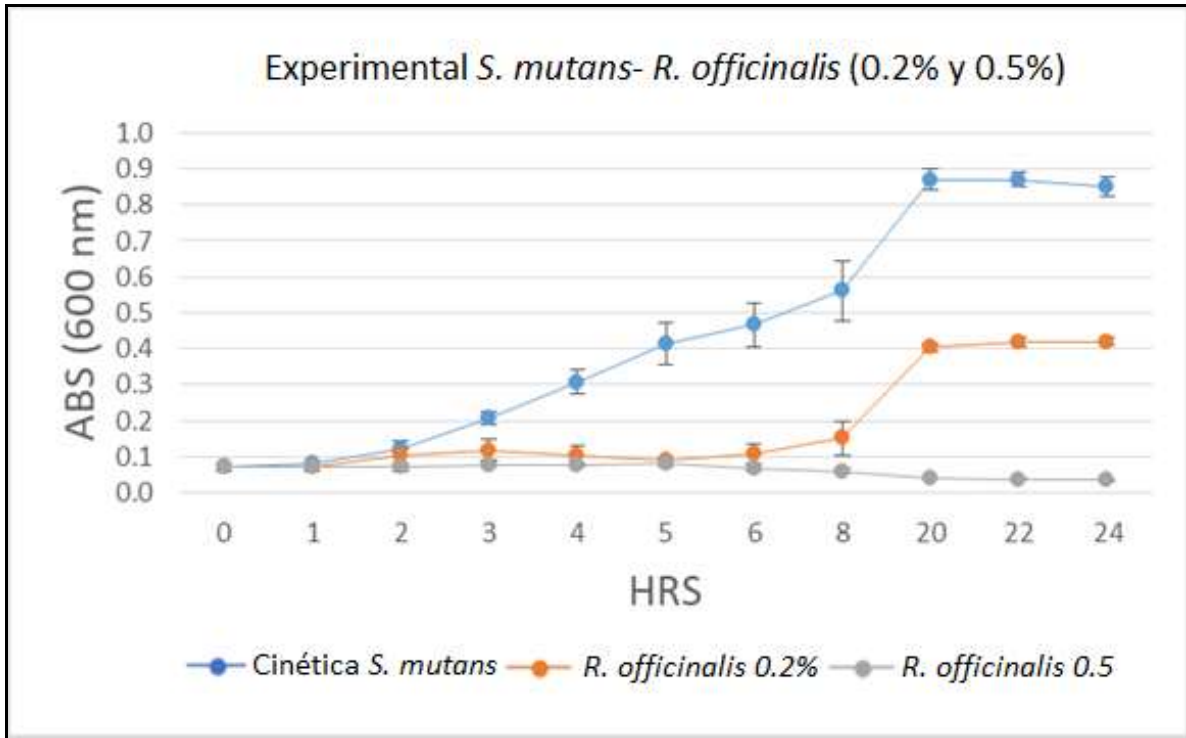
Tiempo	E1	E2	E3	Promedio	Error stn
0	0.0489	0.0734	0.0890	<b>0.0704</b>	0.0117
1	0.0533	0.0733	0.0913	<b>0.0726</b>	0.0110
2	0.0548	0.0821	0.1800	<b>0.1056</b>	0.0380
3	0.0849	0.0927	0.1779	<b>0.1185</b>	0.0298
4	0.0714	0.0877	0.1540	<b>0.1044</b>	0.0253
5	0.0740	0.0901	0.1040	<b>0.0894</b>	0.0087
6	0.0632	0.0920	0.1652	<b>0.1068</b>	0.0304
8	0.0911	0.1220	0.2431	<b>0.1521</b>	0.0464
20	0.4201	0.3871	0.4031	<b>0.4034</b>	0.0095
22	0.4130	0.3990	0.4430	<b>0.4183</b>	0.0130
24	0.4164	0.4020	0.4400	<b>0.4195</b>	0.0111

**Tabla 17.** Cinética de crecimiento de *S. mutans* + 0.2% de aceite esencial de *R. officinalis*, se muestran las absorbancias de los tres experimentos, así como el promedio de los tres y su error stn.

***S. mutans* + Romero 0.5 %**

Tiempo	E1	E2	E3	Promedio	Error stn
0	0.0488	0.0764	0.088	<b>0.0711</b>	0.0116
1	0.0511	0.0711	0.0991	<b>0.0738</b>	0.0139
2	0.0567	0.067	0.0877	<b>0.0705</b>	0.0091
3	0.0895	0.065	0.0835	<b>0.0793</b>	0.0074
4	0.0748	0.088	0.0698	<b>0.0775</b>	0.0054
5	0.071	0.0731	0.0971	<b>0.0804</b>	0.0084
6	0.0528	0.0678	0.0878	<b>0.0695</b>	0.0101
8	0.0488	0.068	0.0658	<b>0.0609</b>	0.0061
20	0.0391	0.0431	0.0401	<b>0.0408</b>	0.0012
22	0.0342	0.0442	0.0382	<b>0.0389</b>	0.0029
24	0.0319	0.0429	0.0288	<b>0.0345</b>	0.0043

**Tabla 18.** Cinética de crecimiento de *S. mutans* + 0.5% de aceite esencial de *R. officinalis*, se muestran las absorbancias de los tres experimentos, así como el promedio de los tres y su error stn.



**Fig. 8.** En esta gráfica se muestra la cinética de crecimiento de *S. mutans* mostrando su absorbancia máxima de 0.8693 a las 20 hrs, medida por medio del espectrofotómetro con una longitud de onda de 600nm. También podemos observar el crecimiento de *S. mutans* aplicándole 0.2% de aceite esencial de *R. officinalis*, con el cual su absorbancia máxima fue de 0.4195 a las 24 hrs, lo cual indica que hubo una reducción en el crecimiento del 52%. Aplicando el 0.5% de *R. officinalis* la absorbancia máxima fue de 0.0804 a la hora 5, esto indica un 91% de inhibición. Romero 0.2% pierde en mayor proporción su inhibición a partir de las 8 hrs, mientras que Romero 0.5% se mantiene muy por debajo hasta las 24 hrs.

***S. mutans* + *Citrus bergamia* 0.2 %**

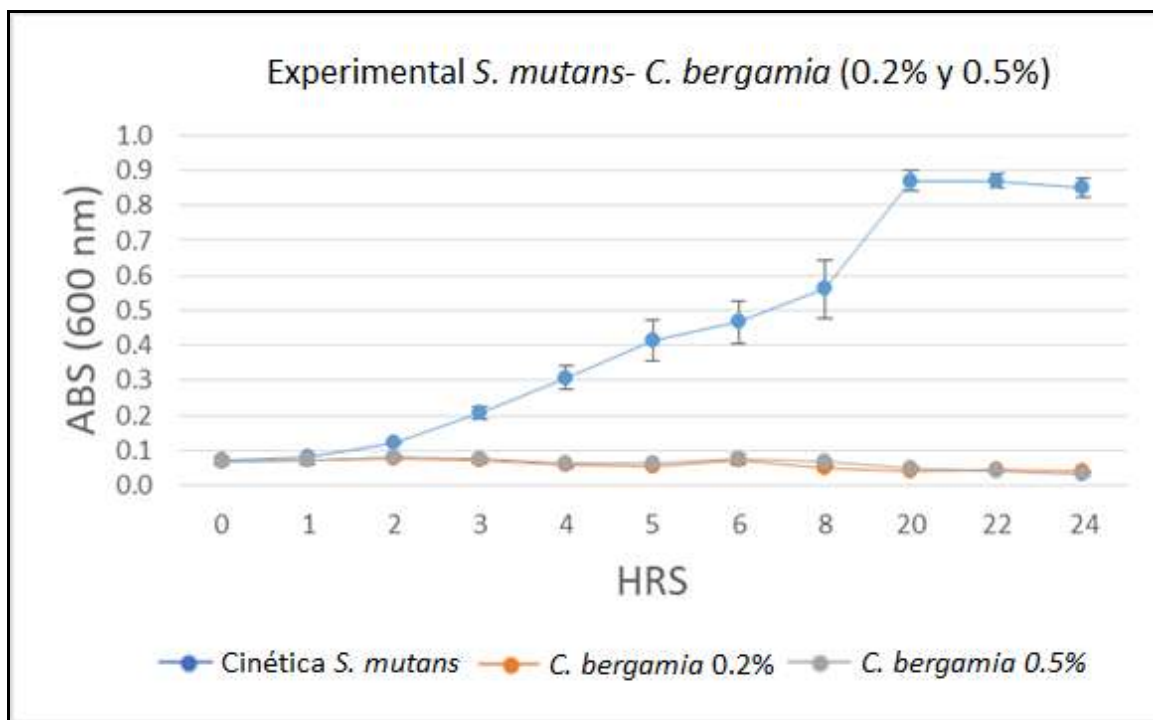
Tiempo	E1	E2	E3	Promedio	Error stn
0	0.0501	0.0751	0.0792	<b>0.0681</b>	0.0091
1	0.051	0.0851	0.0851	<b>0.0737</b>	0.0114
2	0.0712	0.0762	0.0862	<b>0.0779</b>	0.0044
3	0.0767	0.0867	0.0557	<b>0.0730</b>	0.0091
4	0.0655	0.0635	0.0450	<b>0.0580</b>	0.0065
5	0.0650	0.0534	0.0445	<b>0.0543</b>	0.0059
6	0.1044	0.0635	0.0514	<b>0.0731</b>	0.0160
8	0.0544	0.0574	0.0444	<b>0.0521</b>	0.0039
20	0.0377	0.0477	0.0447	<b>0.0434</b>	0.0030
22	0.0460	0.0467	0.0462	<b>0.0463</b>	0.0002
24	0.0396	0.0381	0.0400	<b>0.0392</b>	0.0006

**Tabla 19.** Cinética de crecimiento de *S. mutans* + 0.2% de aceite esencial de *C. bergamia*, se muestran las absorbancias de los tres experimentos, así como el promedio de los tres y su error stn.

***S. mutans* + *Citrus bergamia* 0.5 %**

Tiempo	E1	E2	E3	Promedio	Error stn
0	0.0511	0.071	0.0801	<b>0.0674</b>	0.0086
1	0.0498	0.084	0.0833	<b>0.0724</b>	0.0113
2	0.0782	0.0852	0.0824	<b>0.0819</b>	0.0020
3	0.0734	0.0774	0.0744	<b>0.0751</b>	0.0012
4	0.0632	0.0672	0.0623	<b>0.0642</b>	0.0015
5	0.0634	0.068	0.0644	<b>0.0653</b>	0.0014
6	0.0907	0.0807	0.0557	<b>0.0757</b>	0.0104
8	0.0747	0.0717	0.0547	<b>0.0670</b>	0.0062
20	0.0411	0.0631	0.0409	<b>0.0484</b>	0.0074
22	0.0398	0.0418	0.0428	<b>0.0415</b>	0.0009
24	0.0408	0.0301	0.0233	<b>0.0314</b>	0.0051

**Tabla 20.** Cinética de crecimiento de *S. mutans* + 0.5% de aceite esencial de *C. bergamia*, se muestran las absorbancias de los tres experimentos, así como el promedio de los tres y su error stn.



**Fig. 9.** En esta gráfica se muestra la cinética de crecimiento de *S. mutans* mostrando su absorbancia máxima de 0.8693 a las 20 hrs, medida por medio del espectrofotómetro con una longitud de onda de 600nm. También podemos observar el crecimiento de *S. mutans* aplicándole 0.2% de aceite esencial de *C. bergamia*, con el cual su absorbancia máxima fue de 0.0779 a las 2 hrs, lo cual indica que hubo una reducción en el crecimiento del 91%. Aplicando el 0.5% de *C. bergamia* la absorbancia máxima fue de 0.0819 a la hora 2, esto indica un 91% de inhibición. Ambas concentraciones tienen el mismo efecto.

***S. mutans* + *M. alternifolia* 0.2 %**

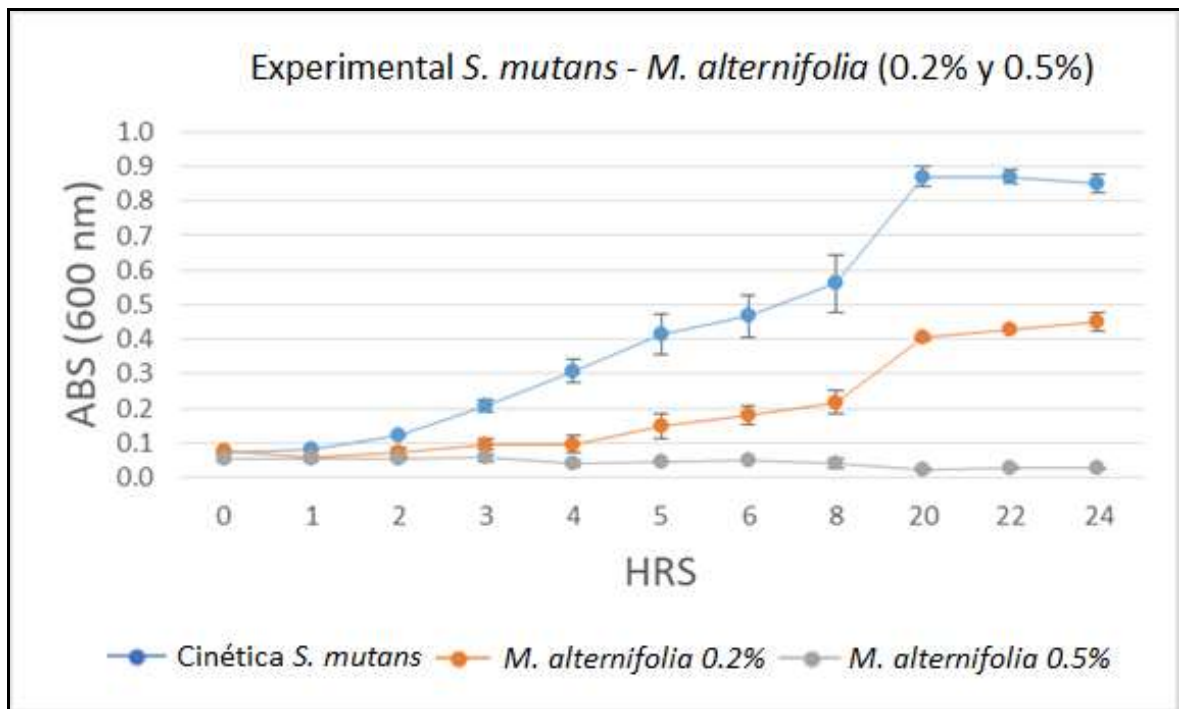
Tiempo	E1	E2	E3	Promedio	Error stn
0	0.0600	0.0786	0.0870	<b>0.0752</b>	0.0080
1	0.0510	0.0710	0.0581	<b>0.0600</b>	0.0059
2	0.0487	0.0887	0.0807	<b>0.0727</b>	0.0122
3	0.0683	0.0983	0.1230	<b>0.0965</b>	0.0158
4	0.0601	0.0901	0.1410	<b>0.0971</b>	0.0236
5	0.0957	0.1357	0.2157	<b>0.1490</b>	0.0353
6	0.1522	0.1532	0.2320	<b>0.1791</b>	0.0264
8	0.1822	0.1846	0.2880	<b>0.2183</b>	0.0349
20	0.3982	0.3942	0.4182	<b>0.4035</b>	0.0074
22	0.4273	0.4273	0.4283	<b>0.4276</b>	0.0003
24	0.4390	0.4100	0.5001	<b>0.4497</b>	0.0266

**Tabla 21.** Cinética de crecimiento de *S. mutans* + 0.2% de aceite esencial de *M. alternifolia*, se muestran las absorbancias de los tres experimentos, así como el promedio de los tres y su error stn.

***S. mutans* + *M. alternifolia* 0.5 %**

Tiempo	E1	E2	E3	Promedio	Error stn
0	0.06	0.0724	0.081	<b>0.0534</b>	0.0061
1	0.0602	0.0752	0.0802	<b>0.0539</b>	0.0060
2	0.0602	0.0802	0.0802	<b>0.0552</b>	0.0067
3	0.0691	0.0621	0.0981	<b>0.0573</b>	0.0110
4	0.0601	0.0671	0.0401	<b>0.0418</b>	0.0081
5	0.0684	0.0584	0.0584	<b>0.0463</b>	0.0033
6	0.0744	0.0644	0.0664	<b>0.0513</b>	0.0031
8	0.0722	0.0642	0.0322	<b>0.0422</b>	0.0122
20	0.0289	0.0389	0.0229	<b>0.0227</b>	0.0047
22	0.03	0.034	0.0423	<b>0.0266</b>	0.0036
24	0.0303	0.04	0.032	<b>0.0256</b>	0.0030

**Tabla 22.** Cinética de crecimiento de *S. mutans* + 0.5% de aceite esencial de *M. alternifolia*, se muestran las absorbancias de los tres experimentos, así como el promedio de los tres y su error stn.



**Fig. 10.** En esta gráfica se muestra la cinética de crecimiento de *S. mutans* mostrando su absorbancia máxima de 0.8693 a las 20 hrs, medida por medio del espectrofotómetro con una longitud de onda de 600nm. También podemos observar el crecimiento de *S. mutans* aplicándole 0.2% de aceite esencial de *M. alternifolia*, con el cual su absorbancia máxima fue de 0.0971 a las 4 hrs, lo cual indica que hubo una reducción en el crecimiento del 89%. Aplicando el 0.5% de *M. alternifolia* la absorbancia máxima fue de 0.0573 a la hora 3, esto indica un 94% de inhibición. Ambas concentraciones inician con una inhibición muy cercana hasta la hora 3, después la concentración 0.5% mantiene una inhibición



***C. albicans* + *Eucalyptus* sp. 0.2 %**

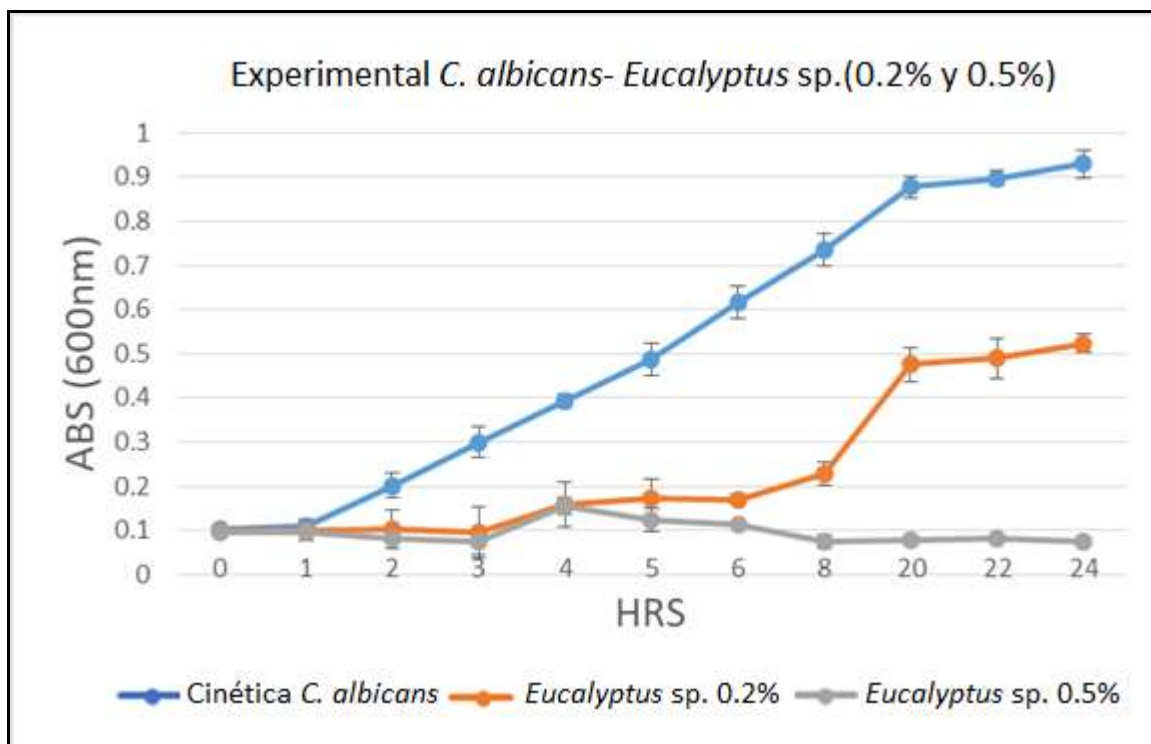
Tiempo	E1	E2	E3	Promedio	Error stn
0	0.0900	0.0954	0.106	<b>0.0971</b>	0.0047
1	0.0681	0.0871	0.145	<b>0.1001</b>	0.0231
2	0.0391	0.0791	0.1876	<b>0.1019</b>	0.0444
3	0.0189	0.0589	0.206	<b>0.0946</b>	0.0569
4	0.1409	0.0809	0.255	<b>0.1589</b>	0.0511
5	0.1613	0.1003	0.253	<b>0.1715</b>	0.0444
6	0.1703	0.1503	0.187	<b>0.1692</b>	0.0106
8	0.2010	0.2031	0.281	<b>0.2284</b>	0.0263
20	0.4988	0.528	0.398	<b>0.4749</b>	0.0394
22	0.5310	0.535	0.4002	<b>0.4887</b>	0.0443
24	0.5607	0.523	0.487	<b>0.5236</b>	0.0213

**Tabla 23.** Cinética de crecimiento de *C. albicans* + 0.2% de aceite esencial de *Eucalyptus* sp., se muestran las absorbancias de los tres experimentos, así como el promedio de los tres y su error stn.

***C. albicans* + *Eucalyptus* sp. 0.5 %**

Tiempo	E1	E2	E3	Promedio	Error stn
0	0.090	0.0922	0.0988	<b>0.0937</b>	0.0026
1	0.0604	0.1240	0.0974	<b>0.0939</b>	0.0184
2	0.0670	0.0867	0.0870	<b>0.0802</b>	0.0066
3	0.0175	0.0975	0.1055	<b>0.0735</b>	0.0281
4	0.1155	0.1750	0.1750	<b>0.1552</b>	0.0198
5	0.1316	0.1660	0.0760	<b>0.1245</b>	0.0262
6	0.1193	0.0993	0.1193	<b>0.1126</b>	0.0067
8	0.1022	0.0652	0.0550	<b>0.0741</b>	0.0143
20	0.0801	0.0732	0.0821	<b>0.0785</b>	0.0027
22	0.0823	0.0713	0.0866	<b>0.0801</b>	0.0046
24	0.0887	0.0611	0.0722	<b>0.0740</b>	0.0080

**Tabla 24.** Cinética de crecimiento de *C. albicans* + 0.5% de aceite esencial de *Eucalyptus* sp., se muestran las absorbancias de los tres experimentos, así como el promedio de los tres y su error stn.



**Fig. 11.** En esta gráfica se muestra la cinética de crecimiento de *C. albicans* mostrando su absorbancia máxima de 0.9308 a las 24 hrs, medida por medio del espectrofotómetro con una longitud de onda de 600nm. También podemos observar el crecimiento de *C. albicans* aplicándole 0.2% de aceite esencial de *Eucalyptus* sp., con el cual su absorbancia máxima fue de 0.5236 a las 24 hrs, lo cual indica que hubo una reducción en el crecimiento del 44%. Aplicando el 0.5% de aceite esencial de *Eucalyptus* sp. la absorbancia máxima fue de 0.1552 a la hora 4, esto indica un 83% de inhibición. Ambas concentraciones inician con una inhibición muy cercana hasta la hora 4, después la concentración 0.5% mantiene su inhibición.

***C. albicans + R. officinalis 0.2 %***

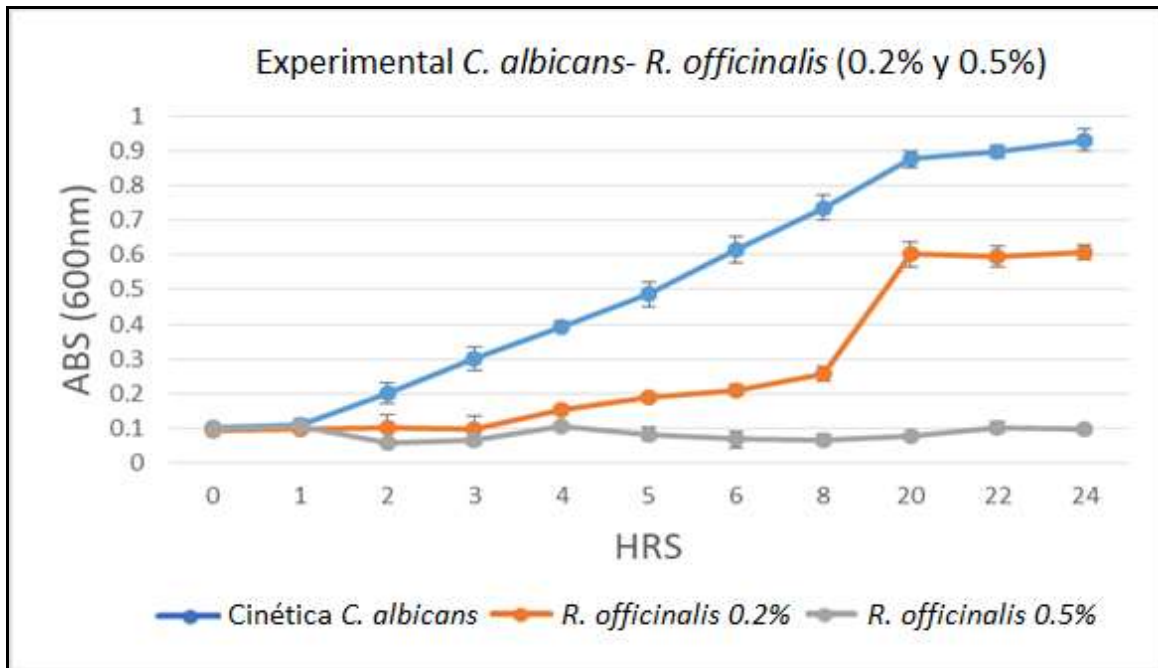
Tiempo	E1	E2	E3	Promedio	Error stn
0	0.0900	0.0987	0.0965	<b>0.0951</b>	0.0026
1	0.0779	0.0980	0.1200	<b>0.0986</b>	0.0122
2	0.04870	0.0870	0.1720	<b>0.1026</b>	0.0364
3	0.0393	0.0953	0.1630	<b>0.0992</b>	0.0358
4	0.1367	0.1570	0.1650	<b>0.1529</b>	0.0084
5	0.1743	0.1930	0.1950	<b>0.1874</b>	0.0066
6	0.1780	0.2280	0.2230	<b>0.2097</b>	0.0159
8	0.2156	0.2860	0.2670	<b>0.2562</b>	0.0210
20	0.5410	0.6610	0.6020	<b>0.6013</b>	0.0346
22	0.5936	0.6460	0.5440	<b>0.5945</b>	0.0294
24	0.5858	0.6500	0.5830	<b>0.6063</b>	0.0219

**Tabla 25.** Cinética de crecimiento de *C. albicans* + 0.2% de aceite esencial de *R. officinalis*, se muestran las absorbancias de los tres experimentos, así como el promedio de los tres y su error stn.

***C. albicans + R. officinalis 0.5 %***

Tiempo	E1	E2	E3	Promedio	Error stn
0	0.09	0.0973	0.0998	<b>0.0957</b>	0.0029
1	0.0755	0.135	0.1007	<b>0.1037</b>	0.0172
2	0.0462	0.0562	0.0765	<b>0.0596</b>	0.0089
3	0.0428	0.0628	0.0877	<b>0.0644</b>	0.0130
4	0.1165	0.0965	0.109	<b>0.1073</b>	0.0058
5	0.1203	0.0603	0.0675	<b>0.0827</b>	0.0189
6	0.1155	0.045	0.0445	<b>0.0683</b>	0.0236
8	0.0977	0.057	0.044	<b>0.0662</b>	0.0162
20	0.0721	0.0751	0.0832	<b>0.0768</b>	0.0033
22	0.0933	0.133	0.083	<b>0.1031</b>	0.0152
24	0.0891	0.119	0.081	<b>0.0964</b>	0.0116

**Tabla 26.** Cinética de crecimiento de *C. albicans* + 0.5% de aceite esencial de *R. officinalis*, se muestran las absorbancias de los tres experimentos, así como el promedio de los tres y su error stn.



**Fig. 12.** En esta gráfica se muestra la cinética de crecimiento de *C. albicans* mostrando su absorbancia máxima de 0.9308 a las 24 hrs, medida por medio del espectrofotómetro con una longitud de onda de 600nm. También podemos observar el crecimiento de *C. albicans* aplicándole 0.2% de aceite esencial de *R. officinalis*, con el cual su absorbancia máxima fue de 0.6063 a las 24 hrs, lo cual indica que hubo una reducción en el crecimiento del 35%. Aplicando el 0.5% de aceite esencial de *R. officinalis* la absorbancia máxima fue de 0.1073 a la hora 4, esto indica un 89% de inhibición. Se muestra una diferencia significativa entre la inhibición de ambas concentraciones

***C. albicans + C. bergamia 0.2 %***

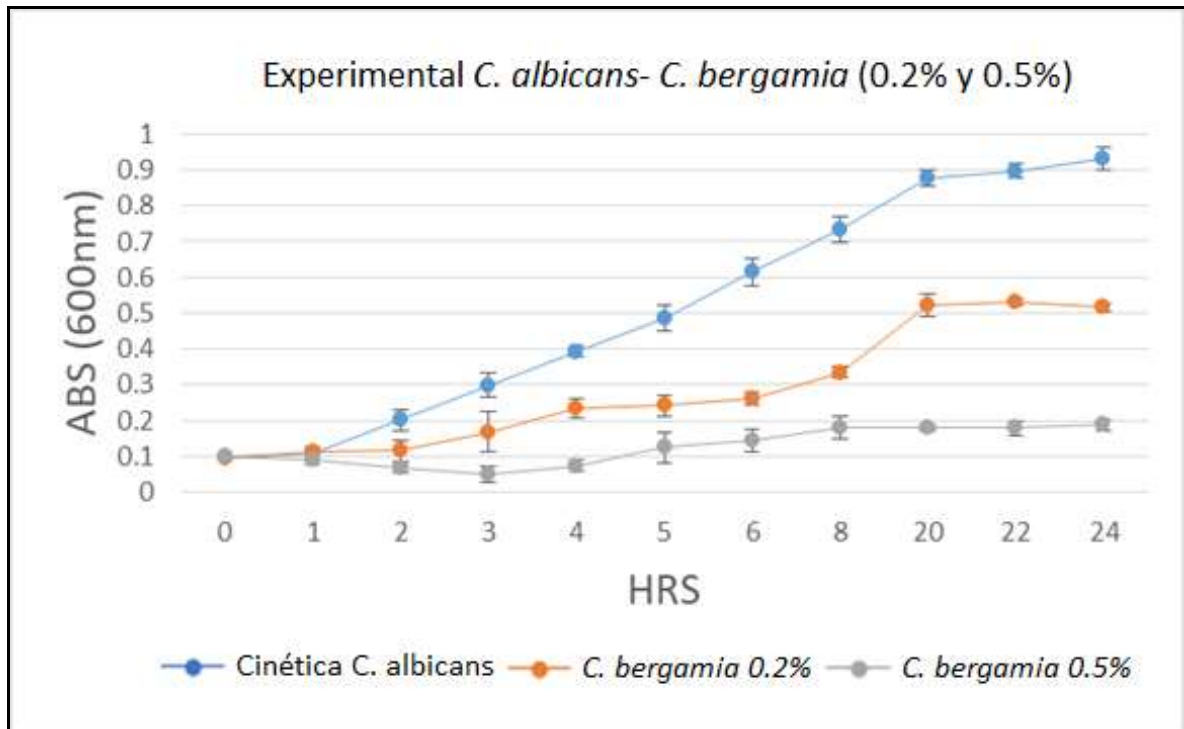
Tiempo	E1	E2	E3	Promedio	Error stn
0	0.0900	0.1022	0.0976	<b>0.0966</b>	0.0036
1	0.0830	0.1230	0.1280	<b>0.1113</b>	0.0142
2	0.0559	0.1590	0.1320	<b>0.1156</b>	0.0309
3	0.0529	0.2290	0.2260	<b>0.1693</b>	0.0582
4	0.2048	0.2080	0.2870	<b>0.2333</b>	0.0269
5	0.2110	0.2151	0.3001	<b>0.2421</b>	0.0290
6	0.2301	0.2601	0.2934	<b>0.2612</b>	0.0183
8	0.3610	0.3121	0.3340	<b>0.3357</b>	0.0141
20	0.4783	0.5830	0.5010	<b>0.5208</b>	0.0318
22	0.5102	0.5420	0.5410	<b>0.5311</b>	0.0104
24	0.4938	0.5130	0.5400	<b>0.5156</b>	0.0134

**Tabla 27.** Cinética de crecimiento de *C. albicans* + 0.2% de aceite esencial de *C. bergamia*, se muestran las absorbancias de los tres experimentos, así como el promedio de los tres y su error stn.

***C. albicans + C. bergamia 0.5 %***

Tiempo	E1	E2	E3	Promedio	Error stn
0	0.0900	0.1066	0.1029	<b>0.0998</b>	0.0050
1	0.0760	0.1260	0.0750	<b>0.0923</b>	0.0168
2	0.0473	0.0873	0.0654	<b>0.0667</b>	0.0116
3	0.0146	0.0946	0.0443	<b>0.0512</b>	0.0233
4	0.1059	0.0590	0.0552	<b>0.0734</b>	0.0163
5	0.2135	0.0735	0.0868	<b>0.1246</b>	0.0446
6	0.2021	0.1321	0.0991	<b>0.1444</b>	0.0304
8	0.2343	0.1330	0.1740	<b>0.1804</b>	0.0294
20	0.1860	0.1660	0.1860	<b>0.1793</b>	0.0067
22	0.1905	0.14050	0.2060	<b>0.1790</b>	0.0198
24	0.1994	0.1560	0.2100	<b>0.1885</b>	0.0165

**Tabla 28.** Cinética de crecimiento de *C. albicans* + 0.5% de aceite esencial de *C. bergamia*, se muestran las absorbancias de los tres experimentos, así como el promedio de los tres y su error stn.



**Fig. 13.** En esta gráfica se muestra la cinética de crecimiento de *C. albicans* mostrando su absorbancia máxima de 0.9308 a las 24 hrs, medida por medio del espectrofotómetro con una longitud de onda de 600nm. También podemos observar el crecimiento de *C. albicans* aplicándole 0.2% de aceite esencial de *C. bergamia*, con el cual su absorbancia máxima fue de 0.5311 a las 22 hrs, lo cual indica que hubo una reducción en el crecimiento del 43%. Aplicando el 0.5% de aceite esencial de *C. bergamia* la absorbancia máxima fue de 0.1885 a las 24 hrs, esto indica un 80% de inhibición. Se muestra una diferencia significativa entre la inhibición de ambas concentraciones

***C. albicans + M. alternifolia 0.2 %***

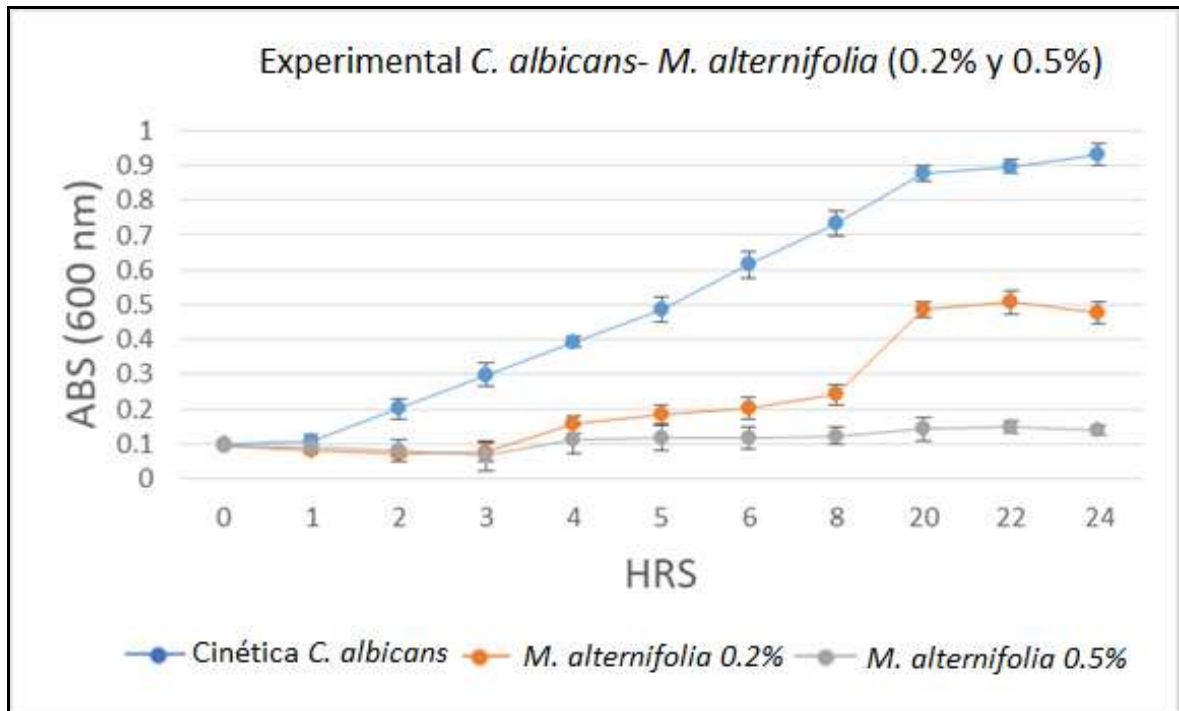
Tiempo	E1	E2	E3	Promedio	Error stn
0	0.0900	0.0967	0.0944	<b>0.0937</b>	0.0020
1	0.0681	0.0810	0.0910	<b>0.0800</b>	0.0066
2	0.0541	0.0941	0.0750	<b>0.0744</b>	0.0116
3	0.0239	0.1190	0.0877	<b>0.0769</b>	0.0280
4	0.1545	0.1145	0.2003	<b>0.1564</b>	0.0248
5	0.1792	0.1392	0.2330	<b>0.1838</b>	0.0272
6	0.1825	0.1650	0.2610	<b>0.2028</b>	0.0295
8	0.2409	0.1909	0.2930	<b>0.2416</b>	0.0295
20	0.4604	0.4640	0.5320	<b>0.4855</b>	0.0233
22	0.4622	0.4820	0.5760	<b>0.5067</b>	0.0351
24	0.4128	0.5200	0.5010	<b>0.4779</b>	0.0330

**Tabla 29.** Cinética de crecimiento de *C. albicans* + 0.2% de aceite esencial de *M. alternifolia*, se muestran las absorbancias de los tres experimentos, así como el promedio de los tres y su error stn.

***C. albicans + M. alternifolia 0.5 %***

Tiempo	E1	E2	E3	Promedio	Error stn
0	0.0900	0.0954	0.0960	<b>0.0938</b>	0.0019
1	0.0541	0.120	0.1010	<b>0.0917</b>	0.0196
2	0.0277	0.1370	0.0855	<b>0.0834</b>	0.0316
3	0.0081	0.1510	0.0440	<b>0.0677</b>	0.0429
4	0.1507	0.1547	0.0360	<b>0.1138</b>	0.0389
5	0.1430	0.1630	0.0445	<b>0.1168</b>	0.0366
6	0.1422	0.152.	0.0563	<b>0.1168</b>	0.0304
8	0.1366	0.1560	0.0760	<b>0.1229</b>	0.0241
20	0.1002	0.2100	0.1200	<b>0.1434</b>	0.0338
22	0.1120	0.1720	0.1650	<b>0.1497</b>	0.0189
24	0.1144	0.1640	0.1420	<b>0.1401</b>	0.0143

**Tabla 30.** Cinética de crecimiento de *C. albicans* + 0.5% de aceite esencial de *M. alternifolia*, se muestran las absorbancias de los tres experimentos, así como el promedio de los tres y su error stn.



**Fig. 14.** En esta gráfica se muestra la cinética de crecimiento de *C. albicans* mostrando su absorbancia máxima de 0.9308 a las 24hrs, medida por medio del espectrofotómetro con una longitud de onda de 600nm. También podemos observar el crecimiento de *C. albicans* aplicándole 0.2% de aceite esencial de *M. alternifolia*, con el cual su absorbancia máxima fue de 0.5067 a las 22 hrs, lo cual indica que hubo una reducción en el crecimiento del 46%. Aplicando el 0.5% de *M. alternifolia* la absorbancia máxima fue de 0.1497 a las 22 hrs, esto indica un 84% de inhibición. Se muestra una diferencia entre la inhibición de ambas concentraciones a partir de la hora 3.



**10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO CON PRUEBA ANOVA DE DOS VÍAS CON CORRECCIÓN DE BONFERRONI.**

Table Analyzed

***E. coli***

Two-way ANOVA

Source of Variation	% of total variation	P value
Interaction	30.47	< 0.0001
Grupo	57.37	< 0.0001
Tiempo	9.74	< 0.0001
Source of Variation	P value summary	Significant?
Interaction	****	Yes
Grupo	****	Yes
Tiempo	****	Yes

Table Analyzed

***S mutans***

Two-way ANOVA

Source of Variation	% of total variation	P value
Interaction	36.16	< 0.0001
Grupo	43.95	< 0.0001
Tiempo	17.43	< 0.0001
Source of Variation	P value summary	Significant?
Interaction	****	Yes
Grupo	****	Yes
Tiempo	****	Yes

Table Analyzed

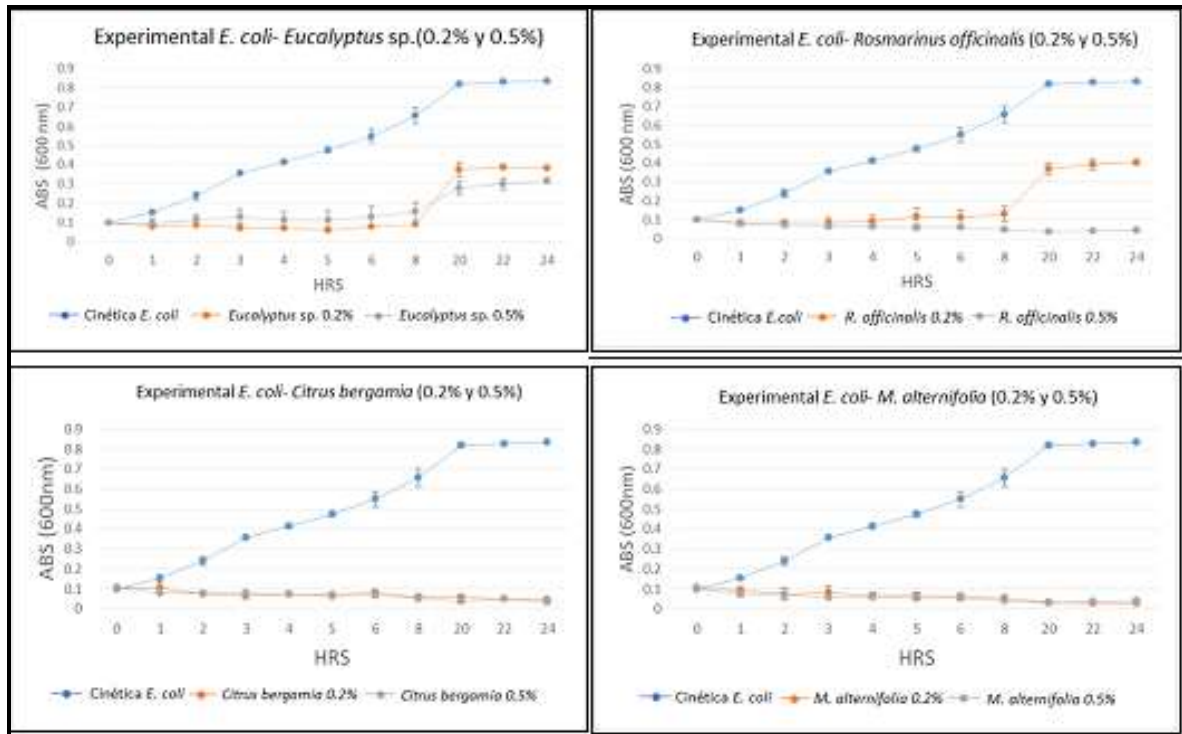
***C albicans***

Two-way ANOVA

Source of Variation	% of total variation	P value
Interaction	25.76	< 0.0001
Grupo	39.22	< 0.0001
Tiempo	31.93	< 0.0001
Source of Variation	P value summary	Significant?
Interaction	****	Yes
Grupo	****	Yes
Tiempo	****	Yes

## 10.1. Comparativo

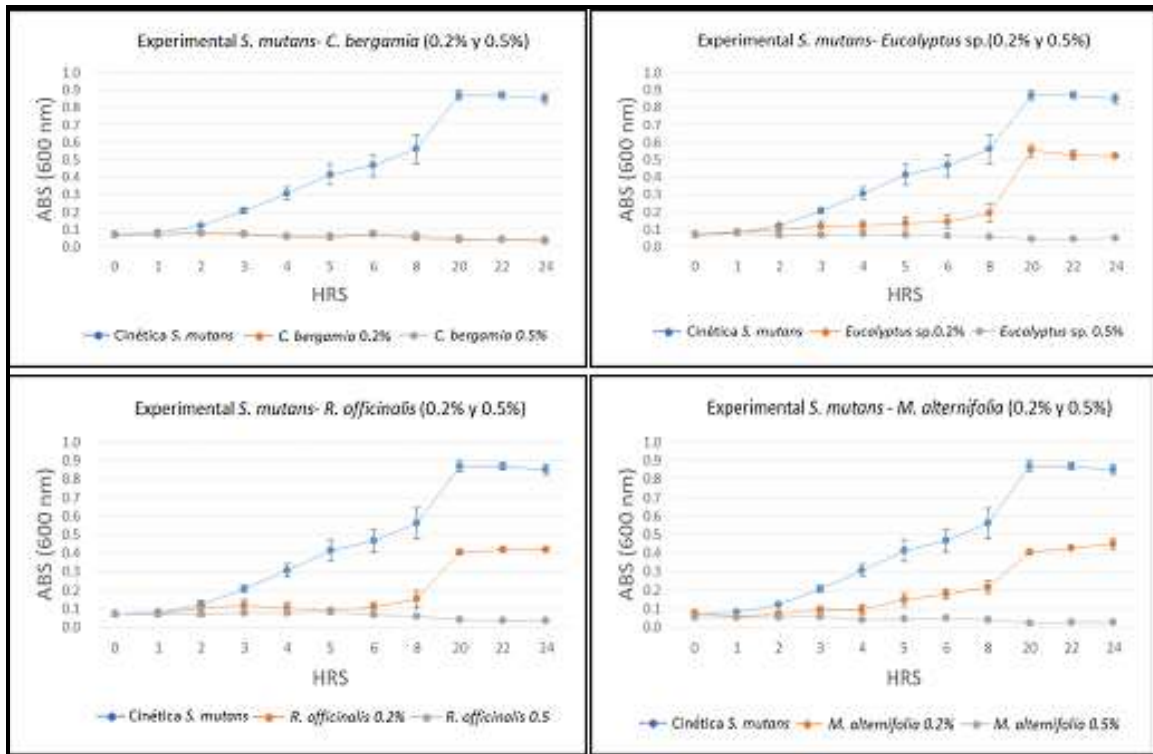
### *E. coli*



**Figura 14.** Comparativo de los perfiles de crecimiento de *E. coli* en condiciones control y con la adición de aceite de *Eucalyptus sp.*, *R. Officinalis*, *C. bergamia* y *M. alternifolia* en concentraciones de 0.2% y 0.5% respectivamente.

Se observa que para la inhibición de este microorganismo los aceites efectivos son: *R. Officinalis* en concentración de 0.5%, *C. bergamia* 0.2% y 0.5%, *M. alternifolia* 0.2% y 0.5% (al tener la misma efectividad ambas concentraciones de estos últimos aceites mencionados seleccionaríamos 0.2%)

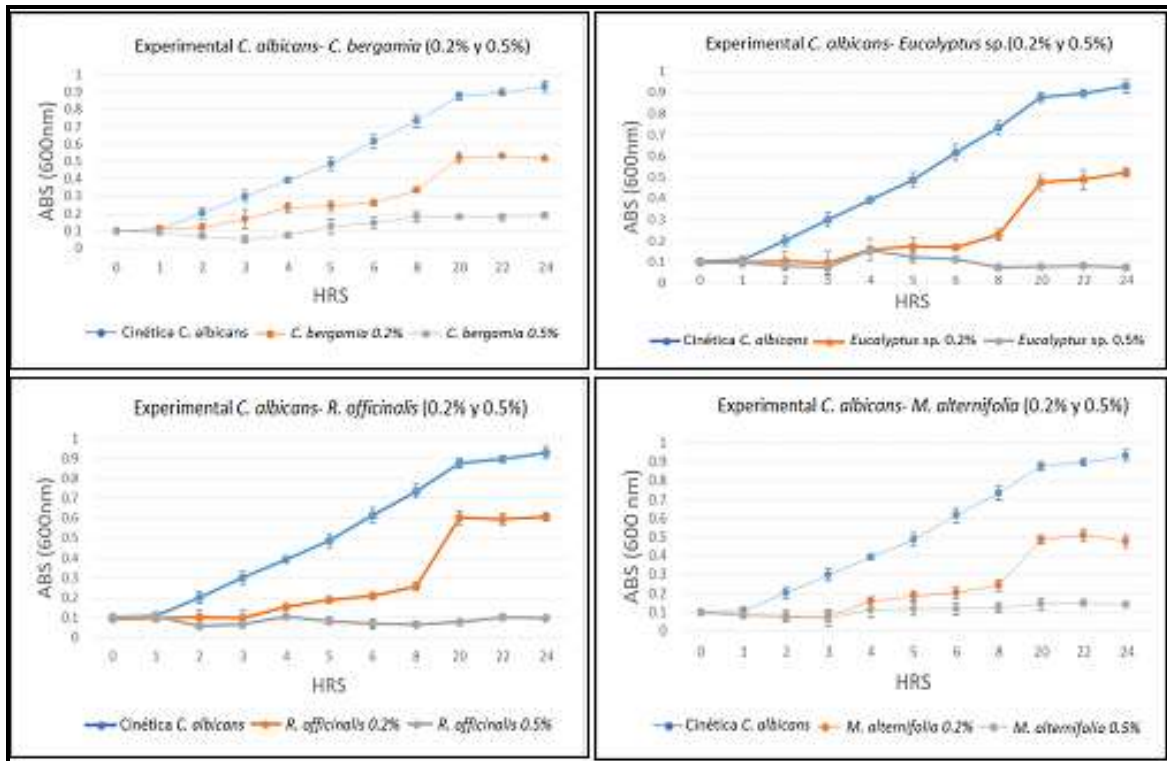
## *S. mutans*



**Figura 15.** Comparativo de los perfiles de crecimiento de *S. mutans* en condiciones control y con la adición de aceite de *Eucalyptus* sp., *R. Officinalis*, *C. bergamia* y *M. alternifolia* en concentraciones de 0.2% y 0.5% respectivamente.

En el comparativo podemos observar que *S. mutans* fue inhibido ante el uso de *Eucalyptus* sp 0.5% , *R. Officinalis* 0.5% , *C. bergamia* 0.2% y 0.5% (al tener el mismo efecto seleccionaríamos 0.2%) y *M. alternifolia* 0.5%.

## C. albicans



**Figura 16.** Comparativo de los perfiles de crecimiento de *C. albicans* en condiciones control y con la adición de aceite de *Eucalyptus* sp., *R. Officinalis*, *C. bergamia* y *M. alternifolia* en concentraciones de 0.2% y 0.5% respectivamente. Podemos observar que los cuatro aceites a una concentración de 0.5% inhiben el crecimiento de esta levadura.

## 11. DISCUSIÓN

En el presente estudio fue demostrada la efectividad antifúngica del aceite esencial de *M. alternifolia* y coincide con la investigación realizada por Sharma y Hegde 2014<sup>20</sup> con una concentración más alta (30%), probablemente debido a la combinación del aceite con Visco-gel utilizado como vehículo de aplicación, sin embargo, en ambos estudios se demostró la inhibición contra *C. albicans*.

Con respecto al Eucalipto podemos observar que en investigaciones citadas anteriormente<sup>21</sup> se demostró la inhibición contra *Bacillus subtilis* Gram positivo, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Este último microorganismo en nuestro experimento también tuvo inhibición con el aceite de *Eucalyptus* sp. en concentraciones de 0.2% y 0.5%, sin embargo, se mostró más efectividad y por mayor tiempo con *R. officinalis* en una concentración de 0.5%, *C. bergamia* en una concentración de 0.2% y *M. alternifolia* de 0.2%.

En el Laboratorio de Ciencias Biológicas de la UNAP experimentaron con dos de los microorganismos que utilizamos en este trabajo, *S. mutans*, y *C. albicans* de los cuales reportaron tener efecto de inhibición por el aceite esencial de *Eucalyptus* sp. en concentraciones mayores a las nuestras (25%, 50%, 75% y 100%) y se puede considerar que la obtención del aceite pudo tener variaciones, desde la recolección de la planta hasta el proceso de obtención del aceite esencial, sin embargo el resultado contra estos microorganismos en ambos estudios fue inhibitorio.

Biopelículas monomicrobianas de *C. albicans*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *S. mutans* y *Pseudomonas aeruginosa* y las biopelículas polimicrobianas compuestas de *C. albicans* con cada una de las bacterias antes mencionadas, fueron expuestas a *R. officinalis* y se estudió la actividad antimicrobiana, antiinflamatoria y la genotoxicidad<sup>23</sup>, se demostró que puede ser un agente terapéutico prometedor y que se puede agregar en algunas formulaciones médicas y odontológicas, mismo propósito que se tiene considerado en una siguiente etapa de nuestro estudio en el cual de inicio solo coincidimos en que tiene buena efectividad antimicrobiana, ya que en este estudio no se analizó su efecto antiinflamatorio ni genotóxico.<sup>23</sup>

Los resultados de este estudio fueron mejores que en los comparativos ya que, en la mayoría de los hallazgos de estudios similares a este, se utilizaron concentraciones

mayores para poder lograr la inhibición de los microorganismos, y en este estudio las concentraciones utilizadas aun siendo menores tuvieron buen efecto de inhibición.

En la literatura existen registros de estudios realizados similares a este con aceites esenciales de las mismas plantas que utilizamos, y no solo han demostrado su efecto antimicrobiano, sino también se han podido observar numerosos beneficios de estos aceites como antisépticos, antiinflamatorios, analgésicos y efectivos en el proceso de cicatrización. Es por ello el interés de desarrollar más productos a base de estos aceites para su uso principalmente en nuestras áreas de interés

## 12. CONCLUSIÓN

El uso de aceites esenciales *Eucalyptus* sp. 0.5%, *R. officinalis* 0.5%, *C. bergamia* 0.2% y 0.5% y *Melaleuca alternifolia* 0.5% pueden ser una alternativa terapéutica y profiláctica en casos donde los antimicrobianos clásicos han perdido su efectividad, lo cual puede ayudar a pacientes y mejorar su calidad de vida respecto a la resistencia antimicrobiana.

Al comprobar la inhibición de microorganismos con aceites esenciales de plantas de *Eucalyptus* sp., *R. officinalis*, *C. bergamia* y *M. alternifolia* podríamos considerar un uso accesible en diversas poblaciones a este tipo de tratamientos y quizá una disminución en costos en la fabricación de los mismos y de esta manera sea accesible para poblaciones de bajos recursos.

Las opciones que podemos considerar para el uso de estos aceites esenciales son a través de aplicaciones tópicas, uso en superficies protésicas o vaporizaciones.

### 13. PERSPECTIVAS

Después de determinar la efectividad antimicrobiana que fue el objetivo de este estudio, existen diferentes aspectos que se deben tomar en cuenta antes de poder considerar la aplicación en pacientes, como, por ejemplo:

- Vía de administración como: aplicación tópica, aplicación en materiales protésicos, administración vía oral o incluso en combinación con algunos otros productos como enjuagues bucales o pastas dentales.
- Citotoxicidad que puedan provocar en los tejidos adyacentes.
- Efectuar la caracterización del conjunto de Lípidos en los aceites (Lipidómica) altamente recomendable para conocer la composición química y experimentar si es posible obtener un efecto más potente. También podría realizarse por medio de una resonancia magnética.

## 14. REFERENCIAS

1. WHO.2014. Antimicrobial Resistance: Global Report Surveillance. Available at:[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1) Accessed 17.08.16. [Google Scholar]
2. Fariña N. *Resistencia bacteriana: un problema de la salud pública mundial de difícil solución*. Mem. Inst. Inves. Cien. Sal [internet].2016 Apr. 2017 14(1):04-05.
3. Calderón Rojas G. Aguilar Ulate L. Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menos actividad. Rev. Med de Costa Rica y Centro América. 2016 73(621) 757-763
4. Lorena de Oliveira Felipe, Willer Ferreira da Silva Júnior, Katialaine Correa de Araujo y Daniela Leite Fabrino. (2017). *Lactoferrin; chitosan and Melaleuca alternifolia-natural products that show promise in candidiasis treatment*. Braz J. Microbiol. 49 (2), 212-219.doi: 10.1016/j.bjm.2017.05.008.
5. Zuzarte M. Salgueiro L. (2015) *Química de aceites esenciales*. En: de Sousa D. (eds) *Bioactive Aceites esenciales y Cáncer*. Springer, Cham.
6. CF Carson, K.A. Hammer y TV Riley (2006). *Aceite de Melaleuca alternifolia (árbol de té): una revisión de los antimicrobianos y otras propiedades medicinales*. Clin Microbiol Rev. 19 (1):50-62. Doi: 10.1128/CMR.19.1.50-62.2006
7. Li- Jun Zhou, Fu- Rong Li, Li- Jie Huang, Zhi- Rong Yang, Shu Yuan y Lin- Han Bai. (2016). *Antifungal activity of Eucalyptus oil against Rice Blast Fungi and the possible mechanism of gene expression Pattern*. Molecules. (2016). 21 (5) 2-14 doi. 10.3390/molecules21050621.
8. Luiz Claudio Almeida Barbosa, Claudinei Andrade Filomeno y Robson Ricardo Teixeira (2016) Variabilidad química y actividades biológica de Eucalyptus spp. Aceites esenciales. Moléculas 2016 21(12): 1671. Doi: 10.3390/moléculas21121671.
9. G. Mandalari, RN Bennett, G. Bisignano, D. Trombeta, A. Saija, Fallas CB, MJ Gasson, A. Narbad (2007) *Actividad antimicrobiana de flavoides extraídos de la cascara de bergamota (citrus bergamia Risso), un subproducto de la industria de aceites esenciales*. J Appl Microbiol 103 (6): 2056-64 Doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03456.x
10. Joana M. Andrade, Célia Faustino, Catarina García, Diogo Ladeiras, Catarina P Reis y Patricia Riojo. (2018) *Rosmarinus officinalis L.: una revisión actualizada de su actividad fitoquímica y biológica*. Future Sci OA 4(4): FSO283. Doi: 10.4155/fsoa-2017-0124.
11. Matthew B. Lohse, Megha Gulati, Alexander D. Johnson y Clarissa J. Nobile. *Development and regulation of single-and multi-species Candida albicans biofilms*. (2018) Nat. Rev. 16(1): 19-31 doi: 10.1038/nrmicro.2017.107.
12. Patricia Manzano- Gayoso, Luis J. Méndez- Tovar, Francisca Hernández- Hernández y Rubén López- Martínez (2008). *La resistencia a los antifúngicos: un problema emergente en México*. Gac Méd Mex Vol.144 No.1, 2008.
13. Carlos H. Gómez. *Resistencia de levaduras del género Candida al fluconazol*. (2010). Asociación colombiana de infectología. Revista infectio 14(S2): S172-S180
14. Ojeda- Garcés JC, Oviedo-García E, Salas L.A. *Streptococcus mutans y caries dental*. Rev. CES Odont.2013;26(1) 44-56
15. Daniel Pedro Nuñez, Lic. Lourdes García Bacallao. *Bioquímica de la caries dental* (2010) Rev Haban cienc méd v.9 n.2. Ciudad de la Habana 2010.
16. J. Jang, H.G. Hur, MJ Sadowsky, MN Byappanahalli, T. Yan, S.Ishii. (2017). *Escherichia coli ambiental: implicaciones para la ecología y la salud pública: una revisión*.



17. Gabriela J. da Silva y Nuno Mendonca.(2012). Asociacion entre resistencia antimicrobiana y virulencia en *Escherichia coli*. Doi: 104161/viru.3.1.18382. Epub 2012
18. Ana Betrán, Ana Ma. Cortés, Concepción López. (2015) *Evaluación de la resistencia antibiótica de Escherichia coli en infecciones urinarias adquiridas en la comunidad del sector sanitario de Barbastro (Huesca)* Rev Esp Quimioter 2015; 28(5):263-266.
19. Calo J.R., Crandall P.G., O'Bryan C.A. Ric,ke S.C. *Essential oils as antimicrobials in food systems- a review*. Food Control 2015;54:111-119.
20. Martínez A., Rojas N., García L., González F. Domínguez M., Catalán A., *In vitro activity of terpenes against Candida albicans and ultrastructural alterations*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2014;118:553-559.
21. Zore G.B., Thakre A.D., Jadhav S.,Karuppayil S.M. Terpenoids inhibit Candida albicans growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle.Phytotherapy.2011;18:1181-1190.
22. Pachava K.R. Nadendla L.K., Alluri L.S.C., Tahseen H., Sajja N.P. *Invitro antifungal evaluation of denture soft liner incorporated with tea tree oil: a new therapeutic approach towards denture stomatitis*. J. Clin. Diagnóstico Res 9(6): zc62-zc64. Doi: 10.7860/jcDR/2015/12396.6132
23. Sharma S., Hegde V. *Comparative evaluation of antifungal activity of Melaleuca oil and fluconazole when incorporated in tissue conditioner: an in vitro study*. J Prosthodont 2014; 23:367-373.
24. Cahuana Pineda, Lizbeth Vanessa; Condori Cueva, Tania Vaneza. *Efectividad Inhibitoria in vitro del extracto etanólico del Eucalyptus globulus sobre cepas de Streptococcus mutans y Candida albicans* Puno. 2017. Repositorio Institucional – UNAP.
25. Jonatas Rafael de Oliveira, Daiane de Jesús, Leandro Wagner Figueira, Felipe Eduardo de Oliveira, Cristina Pacheco Soares, Samira E.A. Camargo, Antonio O. Cardoso y Luciane Dias de Oliveira. *Actividades Biológicas del extracto de Rosmarinus officinalis L. (Romero) analizado en microorganismosy células*. Exp Biol Med (Maywood) 2017 242(6): 625-634 doi: 10.1177/1535370216688571.