



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Evaluación de la actividad antibacteriana de los aceites  
esenciales de *Citrus latifolia* y *Citrus sinensis* por  
citometría de flujo**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

**PRESENTA:  
ALEJANDRA ANAID GOMEZ VALDEZ**

**ASESOR:  
M.C. NANCY JANNET RUIZ PÉREZ**

**COASESOR:  
M.C. ANDREA BECERRIL OSNAYA**

**Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2021**



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.

## **Agradecimientos**

A mis padres y mi hermano porque siempre me han impulsado y apoyado cada instante de mi vida. Papá, te admiro porque eres una persona que siempre tiene metas y las cumple, nunca te das por vencido y eso siempre me ha motivado a dar lo mejor de mí. Mami, te agradezco por que cuidar de mí siempre, por alegrar siempre mi vida y mis días difíciles. Marcos, te agradezco ser mi motivación para seguir estudiando, por tu apoyo incondicional y porque siempre alegras mis días.

También agradezco a Atom, Grizzly y Jarritos por animarme todos los días después de regresar de la escuela, son de los mejores regalos que me ha dado Dios.

Jessi, Karla, Luz, Vale y Rubén, agradezco su amistad y que siempre me motivaran a ser más responsable, mejor estudiante. Se que cada uno de ustedes cumplirá las metas que se proponga, porque tiene la capacidad y mucho espíritu de crecimiento.

A la Dra. Nancy, Dra. Julia y a la Dra. Goreti, por la oportunidad para realizar este proyecto, por su tiempo y paciencia, y por todo el conocimiento que me proporcionaron, son personas que motivan a seguir aprendiendo y a amar la investigación.

Por último, agradezco a mi Alma Mater por permitirme pertenecer a ella, por todos los conocimientos proporcionados y por todas las personas que puso en mi camino.

*Por mi raza hablara mi espíritu.*

## Índice

Abreviaturas.....	5
Índice de figuras y tablas .....	7
Resumen .....	9
Abstract .....	10
1. Marco teórico .....	11
1.1 Aceites esenciales .....	11
1.1.1 Género <i>Citrus</i> .....	15
1.1.1.1 <i>Citrus latifolia</i> .....	18
1.1.1.2 <i>Citrus sinensis</i> .....	19
1.2 Evaluación antimicrobiana .....	21
1.2.1 Métodos disponibles para evaluación antimicrobiana.....	21
1.2.1.1 Citometría de flujo .....	23
2. Justificación .....	27
3. Objetivo General.....	27
3.1 Objetivos específicos .....	27
4. Material y métodos.....	28
4.1 Material .....	28
4.2 Métodos .....	29
5. Diagrama .....	35
6. Resultados.....	36
6.1 Evaluación de susceptibilidad antibacteriana de <i>S. pneumoniae</i> frente a cefotaxima por citometría de flujo. ....	36

6.2 Evaluación de susceptibilidad antibacteriana de <i>E. coli</i> frente a cefotaxima por citometría de flujo.....	39
6.3 Evaluación de la tinción dual SYTO9/PI por la técnica de microscopia de fluorescencia.....	40
6.4 Evaluación de susceptibilidad antibacteriana de <i>E. coli</i> frente a amikacina y los AE's de <i>C. latifolia</i> y <i>C. sinensis</i> por citometría de flujo.....	42
6.5 Evaluación de susceptibilidad antibacteriana de <i>E. coli</i> frente a amikacina y los AE's de <i>C. latifolia</i> y <i>C. sinensis</i> por cuenta viable.....	48
7. Discusión .....	51
8. Conclusión .....	55
9. Perspectivas .....	56
10. Referencias.....	57

## Abreviaturas

<b>AEs</b>	Aceites esenciales
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>AChE</b>	Acetilcolinesterasa
<b>BChE</b>	Butirilcolinesterasa
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>FIC</b>	Fractional inhibitory concentration
<b>FAO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>CLSI</b>	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, por sus siglas en inglés
<b>EUCAST</b>	Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos, por sus siglas en inglés
<b>IMC</b>	Microcalorimetría isotérmica, por sus siglas en inglés
<b>VBNC</b>	Bacterias en estado viable pero no cultivables, por sus siglas en inglés
<b>BD</b>	Becton Dickinson
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>PI</b>	Yoduro de propidio
<b>CFDA</b>	Diacetato de carboxifluorosceína
<b>DCFH-DA</b>	Diacetato-2,7-diclorodihidrofluoresceína
<b>DiBAC4</b>	2, 4,6(1H, 3H, 5H)-pirimodinatriona
<b>DiSC3</b>	Yoduro de 3-dipropiltiadicarbo-cianina
<b>CTC</b>	Clorotetraciclina
<b>2-NBGD</b>	NBD-glucosamina
<b>DRAQ5</b>	1,5-bis {[2-(dimetilamino) etil] amino}-4, 8-dihydroxiantraquinona-9,10-diona

<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>µg</b>	microgramo
<b>µL</b>	microlitro
<b>SBC</b>	Suspensión bacteriana calibrada
<b>SBT</b>	Suspensión bacteriana tratada
<b>SCV</b>	Suspensión de células vivas
<b>SCM</b>	Suspensión de células muertas
<b>PBP</b>	Proteína de unión a penicilina, por sus siglas en inglés
<b>FRET</b>	Transferencia de energía de fluorescencia
<b>SOS</b>	“Salva el alma”

## Índice de figuras y tablas

Figura 1. Flor de <i>C. latifolia</i> .....	18
Figura 2. Fruto de <i>C. latifolia</i> .....	18
Figura 3. Flor de <i>C. sinensis</i> .....	20
Figura 4. Fruto de <i>C. sinensis</i> .....	20
Figura 5. Esquematación del citómetro de flujo [33].....	24
Tabla 1. Dosis empleadas de los agentes antimicrobianos para la evaluación de susceptibilidad antimicrobiana .....	30
Tabla 2. Dosis empleadas de los AE's y amikacina para el ensayo de sinergia.....	31
Figura 6. Gráficas de puntos de la evaluación de susceptibilidad antibacteriana de <i>S. pneumoniae</i> frente a cefotaxima, en el rango de concentraciones. A).....	37
Figura 7. Gráficas de puntos de la evaluación de susceptibilidad antibacteriana de <i>S. pneumoniae</i> frente a cefotaxima. ....	38
Figura 8. Gráfica de puntos de la estandarización de las regiones de bacterias vivas y muertas de <i>E. coli</i> .....	39
Figura 9. Gráficas de puntos de la evaluación de susceptibilidad antibacteriana de <i>E. coli</i> frente a cefotaxima.....	39
Figura 10. Gráficas de puntos de la respuesta de <i>E. coli</i> frente a diferentes porcentajes isopropanol.....	40
Figura 11. Respuesta de <i>E. coli</i> a tratamiento con cefotaxima. ....	42
Figura 12. Gráfica de puntos de la evaluación de susceptibilidad antimicrobiana de <i>E. coli</i> frente a cefotaxima.....	42
Figura 13. Gráficas de puntos de la evaluación de sensibilidad antimicrobiana de <i>E. coli</i> frente a amikacina. ....	43
Figura 14. Efecto dosis-respuesta de amikacina frente a <i>E. coli</i> .....	44
Figura 15. Gráficas de puntos de la evaluación de sensibilidad antimicrobiana de <i>E. coli</i> frente a <i>C. latifolia</i> .....	45
Figura 16. Gráficas de puntos de la evaluación de sensibilidad antimicrobiana de <i>E. coli</i> frente a <i>C. sinensis</i> .....	45
Figura 17. Efecto de los AE's de <i>C. latifolia</i> y <i>C. sinensis</i> frente a <i>E. coli</i> . ....	46
Figura 18. Gráficas de puntos de los ensayos de sinergia frente a <i>E. coli</i> , analizados con el PMT de fluorescencia verde FL3-H (IP) y el PMT de fluorescencia roja FL2-H (SYTO9).....	47



Figura 19. Efecto de la combinación de los AE's de <i>C. latifolia</i> + amikacina y <i>C. sinensis</i> + amikacina frente a <i>E. coli</i> .....	48
Figura 20. Determinación de la CMI de amikacina para cepa de <i>E. coli</i> .....	49
Figura 21. Efecto de los AE's de <i>C. latifolia</i> y <i>C. sinensis</i> frente a <i>E. coli</i> . .....	49
Figura 22. Efecto de la combinación de los AE's + antibiótico frente a <i>E. coli</i> .....	50

## Resumen

**Introducción.** Contar con método rápido y fiable para la determinación de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) es clave para reducir la prescripción inapropiada de antibióticos, causa principal de la resistencia bacteriana. Además, el efecto tóxico de estos, ha motivado al estudio de nuevas alternativas de tratamiento. Los aceites esenciales (AEs) de *Citrus latifolia* y *Citrus sinensis* por sus componentes químicos principales, han demostrado en estudios previos tener actividades biológicas importantes, tales como antibacteriana, antimicótica y antimutagénica. **Objetivo.** Evaluar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Citrus latifolia* y *Citrus sinensis* por citometría de flujo comparando su reproducibilidad con el método de cuenta viable. **Material y métodos.** El microscopio de fluorescencia fue utilizado para observar la especificidad de la tinción dual SYTO9/PI. Las propiedades antibacterianas de los AEs de *C. latifolia* y *C. sinensis* fueron evaluadas por la técnica de citometría de flujo y cuenta viable en *E. coli*. **Resultados.** La tinción dual SYTO9/PI mostró algunas limitaciones tales como la observación de una “población desconocida” cuando se realizó la contratinción en las evaluaciones de sensibilidad antibacteriana, así como una fluorescencia amarilla en la población teñida con PI cuando fue observada con el filtro rojo del microscopio de fluorescencia. Se determinó la CMI de amikacina por el método de cuenta viable, pero no por la técnica de citometría de flujo. Los AEs de *C. latifolia* y *C. sinensis* presentaron un efecto constante cuando fueron evaluados por la técnica de citometría de flujo a las condiciones de 3h de incubación a 37°C y 70 rpm. Además, se observó una disminución del efecto antibacteriano de amikacina en combinación con los AE's cuando fueron evaluados, generando valores de CMI para amikacina menores a los obtenidos cuando este antibiótico fue evaluado individualmente. **Conclusiones.** Los AEs de *C. latifolia* y *C. sinensis* no presentan actividad antibacteriana frente a *E. coli* a las condiciones de evaluación, por la técnica de citometría de flujo y el método de cuenta viable. Puede deberse a el tiempo de exposición de *E. coli* a los AEs. Además, presentan un efecto antagónico contra amikacina, que puede deberse a la modificación la solubilidad de amikacina por solventes orgánicos presentes en los AE.

## Abstract

A fast and reliable method for the determination of MIC is key to reducing the inappropriate prescription of antibiotics, the main cause of bacterial resistance. In addition, the toxic effect of these has motivated the study of new treatment alternatives. *Citrus latifolia* and *Citrus sinensis* essential oils (EOs) due to their main chemical components, have been shown in previous studies to have important biological activities, such as antibacterial, antifungal and antimutagenic. **Objective.** Evaluate the antibacterial activity of the essential oils of *Citrus latifolia* and *Citrus sinensis* by flow cytometry comparing their reproducibility with the viable count method. **Material and methods.** The fluorescence microscopy was used to observe the specificity of SYTO9/PI dual staining. The antibacterial properties of EOs of *C. latifolia* and *C. sinensis* were evaluated by the flow cytometry technique and viable count in *E. coli*. **Results.** SYTO9/PI dual staining showed some limitations such as the observation of an “unknown” population” when we made the counterstaining in antibacterial sensitivity evaluations and yellow fluorescence in the PI-stained population when it was observed with the red filter under the fluorescence microscopy. MIC of amikacin was determined by the viable counting method, but not by the flow cytometry technique. The EOs of *C. latifolia* and *C. sinensis* showed a constant effect when were evaluated by the flow cytometry technique at the conditions of 3 h of incubation at 37°C and 70 rpm. In addition, a decrease in the antibacterial effect of amikacin was observed with EOs when they evaluated, generating MIC values for amikacin lower than those obtained when this antibiotic was evaluated individually. **Conclusion.** The EOs of *C. latifolia* and *C. sinensis* don't show antibacterial activity against *E. coli* under the evaluation conditions by flow cytometry and the viable count method. It may be due to the time of exposure of *E. coli* to EOs. In addition, they present an antagonistic effect against amikacin, which may be due to the modification of the solubility of amikacin by organic solvents present in Eos.

## **1. Marco teórico**

El aumento en el número de patógenos resistentes a agentes antibacterianos ha comprometido la eficacia de los antibióticos y han estado involucrados en rangos elevados de morbilidad, mortalidad y conducido a una importante carga económica. De hecho, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha identificado a la resistencia antibacteriana como una de las amenazas más graves para la salud en todo el mundo [1].

Este riesgo de resistencia ha motivado el desarrollo de nuevas opciones antibacterianas profilácticas y terapéuticas, particularmente aquellas de origen natural. Los aceites esenciales (AEs) y sus componentes químicos son considerados como candidatos prometedores [2].

### **1.1 Aceites esenciales**

#### **Definición**

Son aceites volátiles, producto del metabolismo secundario de las plantas, generalmente obtenidos a través de destilación por arrastre de vapor o cold-pressing, a diferencia de los extractos de plantas, que involucran el uso de solventes tales como acetona, etanol o hexano para su extracción [3].

#### **Propiedades físicas**

Se caracterizan por ser transparentes, raramente coloridos y solubles en lípidos y compuestos orgánicos [4]. Son una mezcla de componentes, como monoterpenos, sesquiterpenos, derivados oxigenados y alcanos de bajo peso molecular, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos, los cuales se encuentran asociados a compuestos no volátiles como: parafinas y ceras [5]. Pueden estar presentes en todos los órganos de la planta, incluyendo capullo, flor, hoja, semilla, tallo, fruto, raíz, madera o corteza, pero generalmente están almacenados en las células secretoras, cavidades, canales y células epidérmicas [6]. Son ampliamente utilizados en la industria cosmética farmacéutica y de alimentos [7].

## Propiedades biológicas

Poseen propiedades antisépticas como son: bactericida, viricida y fungicida, y medicinales como, antiinflamatoria, sedante, neuroprotector, neuromodulador y espasmolítico [8]. Además de su actividad antimutagénica y antioxidante [4].

Beum *et al.* [9] ha demostrado el efecto antiinflamatorio del AE *Chamaecyparis obtusa* sobre la inflamación inducida por LPS (lipopolisacárido) en ratas. La concentración sérica de PGE2 (Prostaglandina E2) fue reducida cuando las ratas fueron tratadas con el AE.

Por otro lado, Okello *et al.* [10] ha reportado la actividad inhibitoria *in vitro* del AE de *Narcissus poeticus* perteneciente a la familia *Amaryllidaceae* frente a las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BChE), involucradas en la degradación del neurotransmisor acetilcolina. Un porcentaje de inhibición del 39% fue observado a la concentración de 0.1 mg/mL. El análisis de GC-MS reveló la presencia de dos componentes principales: benzoato de bencilo (19%) y alcohol bencílico (11%) con una serie de compuestos menores.

Un estudio realizado por Pandini, J.A *et al.* [11] demostró la actividad antimicrobiana del AE de *Guarea kunthiana* frente a *Salmonella entérica* (*S. entérica*) subsp. *Enterica* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ATCC 27853, *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) ATCC 25933, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 25923; *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) ATCC 19433; *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) ATCC 12228; y *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) CCD-04 con rango de valores de CMI de 13.6 a 3500 µg/mL para bacterias Gram positivas y de 7000 µg/mL para bacterias Gram negativas, con excepción frente a *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922 y *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) ATCC 13883 que presentaron resistencia a la acción del AE. Las bacterias Gram positivas mostraron mayor susceptibilidad a la acción del AE que las bacterias Gram negativas. Siendo sus componentes principales  $\alpha$ -zingibereno (34.48 %),  $\beta$ -sesquifelandreno (22.90 %) y  $\alpha$ -curcumeno (16.17 %).

## **Mecanismo de acción en bacterias**

Diversos AEs han sido reportados por poseer un amplio rango de inhibición contra un gran número de bacterias Gram negativas y Gram positivas. Debido a su naturaleza lipofílica, pueden penetrar fácilmente a la célula bacteriana, por ello se ha observado que el mecanismo de acción está basado en su habilidad para alterar la pared celular y la membrana citoplasmática, conduciendo a lisis y pérdida de componentes intracelulares, especialmente iones [12], así como de generar reducción del potencial de membrana, interrupción de la bomba de protones y agotamiento de ATP's (adenosina trifosfato), entre otros. Se ha establecido también, que el efecto antibacterial puede depender de una serie de reacciones bioquímicas propias de la bacteria, asociadas a la proporción y tipo de constituyentes de los aceites [13].

La diferencia en la susceptibilidad microbiana entre bacterias Gram positivas y Gram negativas puede ser atribuida a la estructura y composición de la envoltura celular (membrana citoplasmática y/o membrana externa y pared celular). La pared de las bacterias Gram negativas es más compleja la cual está constituida por una delgada capa de peptidoglucano adyacente a la membrana citoplasmática y una membrana externa compuesta por fosfolípidos y lipopolicáridos; presenta canales hidrofílicos, llamados porinas, que generalmente excluyen la entrada de sustancias hidrofóbicas a través de la membrana externa, lo cual nos explicaría porque se ha hipotetizado que los AE's son más eficaces contra bacterias Gram positivas que contra las Gram negativas. Sin embargo, López-Romero *et al.* [12] ha demostrado que las bacterias Gram negativas no presentan resistencia a componentes de los AE's mientras que las bacterias Gram positivas debido a la presencia de capa gruesa de peptidoglucano en su pared que le confiere rigidez y dificultad en la penetración de antimicrobianos, son menos sensibles. De hecho, se ha evidenciado que algunos componentes fenólicos como son carvacrol y timol, han presentado capacidad para alterar la membrana externa a través de la liberación del LPS.

## Efecto sinérgico

Se ha demostrado que los AEs pueden no producir un efecto inhibitorio cuando se utilizan solos, pero cuando son usados en combinación con un fármaco estándar, el efecto sobrepasa su desempeño individual generando una mejor actividad antibacteriana. Esta actividad sinérgica ha sido encontrada para reducir la dosis de antibiótico en el tratamiento de infecciones, disminuyendo así los efectos adversos [3].

Por ejemplo, Fadli et al. [14] evaluó el efecto antibacteriano de la asociación entre antibióticos (ciprofloxacino, gentamicina, pristinamicina y cefixima) y los AEs de *Thymus maroccanus* y *Thymus broussonetii*, en bacterias involucradas en infecciones nosocomiales resistentes a antibióticos. De 80 combinaciones evaluadas entre los dos AEs y los 4 antibióticos, 57 (71%) mostraron sinergismo total, 16 (20%) presentaron una interacción sinérgica parcial y 7 combinaciones (9%) no presentaron efecto. De las 10 combinaciones realizadas entre *T. maroccanus* y *T. broussonetii*, seis mostraron sinergismo total ( $FIC \leq 0.5$ ) y 4 fueron parcialmente sinérgicas; su rango de FIC fue de 0.56 a 0.75. La mejor actividad antimicrobiana fue obtenida con la combinación del AE de *T. maroccanus* y ciprofloxacino en la cual el rango del índice FIC fue de 0.09 a 0.37, el cual fue observado en bacterias Gram positivas y Gram negativas. La combinación del AE de *T. maroccanus* con gentamicina o pristinamicina mostró efecto sinérgico total contra todas las cepas evaluadas, excepto para *Salmonella spp.* Además, el sinergismo total ( $FIC \leq 0.5$ ) y parcial ( $0.5 < FIC \leq 0.75$ ) fue observado entre el AE de *T. broussonetii* y los antibióticos ciprofloxacino, gentamicina y pristinamicina, y el rango de FIC fue de 0.14 a 0.62, de 0.09 a 0.62 y de 0.31 a 0.75, respectivamente. El carvacrol, el principal componente de los dos AE's, logró reducir la resistencia a ciprofloxacino de diferentes cepas evaluadas. Para bacterias Gram negativas (*E. coli*, *Salmonella sp.*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*), logró disminuir la CMI de ciprofloxacino cuatro veces. Mientras que para las bacterias Gram positivas se observó una mayor reducción para *Bacillus cereus* (*B. cereus*) y *Micrococcus luteus*, y para *S. aureus*, la CMI aumentó respectivamente a 16 y 18 veces.

Existen pocos reportes acerca de los mecanismos de acción de la combinación de los AE's, AE's + antibiótico o sus componentes purificados en organismos. Algunos mecanismos generalmente aceptados de interacción antibacteriana que producen sinergismo incluyen, la inhibición secuencial de una vía bioquímica común, inhibición de enzimas protectoras y el uso de agentes activos de pared celular para mejorar la difusión de otros antibacterianos [15].

### **1.1.1 Género *Citrus***

El género *Citrus* es uno de los cultivos más importantes en el mundo en términos de producción, de acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), con 240,780 millones de toneladas producidas en 2013 [16].

Pertenece a la familia *Rutaceae*, la cual comprende alrededor de 140 géneros y 1300 especies. Las especies más conocidas son *C. aurantifolia* (lima), *C. hystrix* (lima kafir), *C. limonia* (lima mandarina), *C. limon* (limón), *C. jambhiri* (limón duro), *C. sinensis* (naranja dulce), *C. aurantium* (naranja amarga), *C. limetta* (lima dulce), *C. macroptera* (naranja silvestre), *C. tachibana* (naranja tachibana), *C. medica* (citrón), *C. nobilis* (tangor), *C. paradise* (toronja), *C. reticulata* (mandarina), y *C. tangelo* (tangelo) [17]. Este género, ha jugado un papel muy importante desde hace siglos y ha sido utilizado en la industria farmacéutica, cosmética y alimenticia como aditivo, contienen una abundante cantidad de vitamina C y de macronutrientes, incluyendo azúcar, fibra dietética, potasio, folato, calcio, tiamina, niacina, vitamina B6, magnesio, riboflavina y ácido pantoténico, además de un sin número metabolitos secundarios, tales como flavonoides, alcaloides, cumarinos, limonoides, carotenoides, ácidos fenólicos y aceites esenciales, los cuales muestran diversas bioactividades de vital importancia para la salud humana, incluyendo antioxidativa, antiinflamatoria, efecto protector cardiovascular, efecto neuroprotector, etc. Además, se encuentran principalmente en la piel de estas frutas que tienen múltiples cámaras de aceite con sabores aromáticos únicos, los cuales difieren según la especie y variedad [18].



Entre las especies más importantes del género *Citrus* se encuentra *C. latifolia*, conocido comúnmente como limón persa, el cual ha sido utilizado desde la antigüedad por su efecto como antiséptico, carminativo, diurético y eupéptico. Algunos de sus componentes como:  $\beta$ -cariofileno, D-limoneno y linalool, han demostrado efectos antiinflamatorios; mientras que el  $\alpha$ -pineno y  $\beta$ -pineno inhiben la síntesis de óxido nítrico, lo que sugiere un efecto antioxidante [19]. Adicionalmente, un estudio reciente mostró que  $\beta$ -pineno ejerce un efecto antiespasmódico en íleon de ratas y provoca acciones antinociceptivas y D-limoneno efectos de antiulcerogénico, gastroprotector, quimioprotector, antiproliferativo, insecticida, antimicrobiano, inmunomodulador y aplicado en la aromaterapia, reduce los síntomas de la ansiedad [19] [13].

El jugo de naranja dulce (*C. sinensis*) se caracteriza por ser el jugo de fruta más consumido mundialmente, por su excelente fuente de vitamina C y por sus propiedades como antioxidante natural que fortalece el sistema inmune del cuerpo [20]. Ha sido tradicionalmente utilizado para tratar problemas de estreñimiento, calambres, cólicos, diarrea, tos, hipertensión, ansiedad, depresión y estrés [21]. Singh *et al.* [22] ha revelado a través GC-MS que los principales componentes de los aceites esenciales de *Citrus máxima* (*C. máxima*) y *C. sinensis* son D-limoneno, seguido de E-citral, Z-citral, carveol, los cuales son reconocidos como conservadores de alimentos y antioxidantes naturales.

### **Actividad antimicrobiana**

La capacidad de los AEs del género *Citrus* para inhibir bacterias patógenas ha sido reportada en varios estudios. Por ejemplo, a el AE de *C. aurantifolia* se le ha atribuido actividad antibacteriana, particularmente frente a bacterias Gram positivas (*S. aureus*, *Bacillus subtilis* y *S. epidermidis*), siendo  $\beta$ -pineno (12.6%), limoneno (53.8%),  $\gamma$ -terpineno (16.5%), terpinoleno (0.6%),  $\alpha$ -terpineol (0.4%) y citral (2.5%) los principales componentes y responsables [8].

Asimismo, un estudio realizado por Frassinetti *et al.* [21] mostró que los AEs de *C. aurantium*, *C. sinensis*, *C. limón* y *C. reticulata* tienen gran potencial contra cepas de bacterias Gram positivas (*S. aureus* ATCC 25923 y *E. faecalis* ATCC 29212) y Gram negativas (*Enterobacter aerogenes* (*E. aerogenes*) ATCC 13048, *Xanthomonas campestris pv citri* NCPPB 3236, *Xanthomonas campestris pv citri* NCPPB 3562, *Xanthomonas campestris pv citri* NCPPB 3832, *E. coli* ATCC 10536, *E. coli* ATCC 25922, *S. choleraesuis* ATCC 14028 y *P. aeruginosa* ATCC 27853). Esta actividad antimicrobiana puede ser atribuida a la presencia de R- (+)-limoneno y  $\gamma$ -terpineno, los cuales han sido reportados por ejercer sus efectos tóxicos a través de la alteración de la integridad de la membrana de bacterias y hongos e inhibición de la respiración y los procesos de transporte iónico.

Además, estudios realizados por Ruiz *et al.* [23] sobre los AEs de *C. latifolia* y *C. sinensis*, indicaron que *C. latifolia* está compuesto principalmente por R-(+)-limoneno (51.64%),  $\beta$ -thujeno (14.85%) y  $\gamma$ -terpineno (12.8%), mientras que *C. sinensis* por R-(+)-limoneno (96%) y  $\alpha$ -myrceno (2.79%). Ambos presentan buena actividad antimicótica frente a diferentes especies de *cándida* con excepción del aceite de *C. sinensis* frente a *Candida guilliermondii*.

No son genotóxicos, es decir no producen mutaciones por desplazamiento del marco de lectura, por sustitución de pares de bases, ni por generación de daño por ROS cuando fueron evaluados por la prueba de Ames. Adicionalmente *C. sinensis* no mostró efecto citotóxico en células del epitelio bucal de humano a las dosis utilizadas para la evaluación de su actividad antimicótica. Sin embargo, el AE de *C. latifolia* presentó citotoxicidad a la dosis de 21.8  $\mu$ g que fue la más alta utilizada en la prueba.

Adicionalmente Toscano *et al.* [24] demostró que estos mismos aceites tienen efecto antimutagénico contra mutágenos alquilantes, policíclicos aromáticos y prooxidantes en prueba de Ames.

Como se ha descrito ya, los AEs del género *Citrus* han demostrado tener una buena actividad antimicrobiana y basado en los antecedentes de *C. sinensis* y *C. latifolia* consideramos que son buenos candidatos para su evaluación antibacteriana.

Además, se ha demostrado la actividad sinérgica del AE's de *Citrus limon* en combinación con amikacina frente a *Acinetobacter spp.* con un valor de FIC de 0.037. Este AE presenta componentes y en proporciones similares a los AE's de *C. latifolia* y *C. sinensis*, por lo cual la evaluación antibacteriana de la combinación de estos AE + Amikacina es sugerida [25].

#### 1.1.1.1 *Citrus latifolia*

- Familia: Rutaceae
- Nombre común: lima o limón persa, lima de Tahití, limón criollo, limón pérsico, limón Mesina, limón sin semilla o lima Bearss.
- Lugar de origen: Desconocido. Se considera un híbrido entre *Citrus aurantifolia* (Christm.) y alguna especie de otro género.
- Etimología: nombrada así en honor de John T. Bearss, quien desarrollo esta variedad sin semillas hacia 1895 en un vivero de Porterville, California.

*C. latifolia* es la especie de limón más comúnmente cultivada para uso comercial. El árbol de *C. latifolia* tiene un tamaño mediano que oscila entre 4.5 m y 6 m de largo. Sus ramas son largas y extendidas las cuales presentan casi pocas espinas. Las flores son blancas, teñidas de púrpura y no tienen polen viable. La fruta presenta una forma ovalada o alargada, mide de 4.5-6.25 cm de ancho y de 5-7.25 cm de largo, frecuentemente con una elongación final, generalmente sin semillas o pocas semillas; es más grande y tiene piel más gruesa que la lima. La fruta contiene una fragancia, un aroma picante y un sabor ácido, pero el aroma y el sabor son menos intensos que los de la lima [26].



Figura 1. Flor de *C. latifolia*



Figura 2. Fruto de *C. latifolia*

### 1.1.1.2 *Citrus sinensis*

- Familia: Rutaceae
- Nombre común: naranjo dulce, naranjo chino
- Lugar de origen: especie nativa de china
- Etimología: Citrus, del griego y significa limón. Sinensis del latín sinensis-e originario de la china

La naranja dulce se ha convertido en el árbol frutal más ampliamente plantado en el mundo. El árbol de *Citrus sinensis* generalmente mide 7.5 m, pero ocasionalmente ha alcanzado alturas de hasta 15 m. Sus ramas presentan largas espinas. Sus hojas son correas y perennes, varían de elípticas a oblongas a ovals, miden de 6.5-15 cm de largo y 2.5-9.5 cm de ancho, a menudo con alas estrechas en los pecíolos. Las flores son axilares nacidas individualmente o en espirales de 6, tienen alrededor de 5 cm de ancho, con cinco pétalos blancos y 20-25 estambres amarillos. La fruta puede ser esférica u ovalada, mide normalmente de 6.5-9.5 cm de ancho cuando madura presenta un color naranja o amarillo y está adaptada a una variedad de climas. Presenta dos regiones, el pericarpio, también llamada cáscara o piel, y el endocarpio o pulpa, la cual es normalmente jugosa y dulce, y numerosas semillas. La piel se compone de una epidermis de cera epicuticular con numerosas pequeñas glándulas sebáceas aromáticas que le dan su particular olor. El pericarpio consiste del flavedo externo o epicarpio, en gran parte compuesto de células parenquimatosas y cutícula. El albedo o mesocarpio que se encuentra debajo del flavedo consiste en células tubulares unidas para constituir la masa de tejido comprimida en el área intercelular [27].

Ha sido tradicionalmente utilizado para tratar estreñimiento, calambres, cólicos, diarrea, bronquitis, tos, resfriado, ansiedad y estrés [27].

*C. sinensis* es consumido en todo el mundo por ser un poderoso antioxidante, una excelente fuente de vitamina C y de metabolitos secundarios que contribuyen a las actividades farmacológicas atribuidas. Varios tipos de compuestos químicos han sido identificados en su fruta, piel, hojas, jugo y raíz, que incluye los siguientes grupos: flavonoides, esteroides, hidroxiamidas, alcanos y ácidos grasos, cumarinos, péptidos, carbohidratos, carbamatos y alquilaminas, carotenoides, compuestos volátiles, y elementos nutricionales tales como: potasio, magnesio, calcio y sodio [27].



Figura 3. Flor de *C. sinensis*



Figura 4. Fruto de *C. sinensis*

## 1.2 Evaluación antimicrobiana

La evaluación antimicrobiana de nuevos compuestos activos esta normada por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, por sus siglas en inglés (CLSI) [28] y se basa en la determinación y comparación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), definida como la concentración mínima de un agente antimicrobiano, que inhibe completamente el crecimiento de la bacteria, generalmente reportada en µg/mL. Esta misma organización propone en su documento M100 diferentes antibióticos con CMIs conocidas de diferentes cepas ATCC como referencia para la evaluación de susceptibilidad antimicrobiana de nuevos compuestos, los cuales cumplen con las consideraciones indicadas por la CLSI, como son:

- eficacia clínica
- prevalencia de resistencia
- costo
- indicaciones clínicas de la FDA.

Aunque, previamente deben ser evaluados por el método “estándar de referencia” debido al aumento de cepas resistentes a ellos [28].

### 1.2.1 Métodos disponibles para evaluación antibacteriana

#### Sistemas manuales

Varios métodos, como difusión en disco, E-test, dilución en agar, microdilución en caldo y microdilución en agar están disponibles para la evaluación *in vitro* de la susceptibilidad antibacteriana, siendo el método de microdilución en caldo, el estándar de referencia recomendado por la CLSI y EUCAST (Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos) [15]. Estas pruebas de susceptibilidad requieren de un cultivo puro del patógeno y un tiempo prolongado de 18-24 h para organismos de crecimiento rápido y de hasta un mes para organismos de lento crecimiento para la obtención de resultados, tal es el caso de *Mycobacterium tuberculosis* [29].

### **Sistemas automatizados**

Debido al tiempo que toma procesar y obtener resultados por sistemas manuales, los sistemas automatizados están siendo utilizados con mayor frecuencia, ya que proporcionan resultados en menor tiempo [29], tales como:

- BD Phoenix (3.5-16h)
- Vitek 2 (3.5-16h)
- Sensititre (3.5–16h)
- Microscan (4.5-7h)

### **Sistemas emergentes**

Con la finalidad de reducir aún más el tiempo de obtención de resultados los sistemas:

- BacterioScan FLLS (6-18h)
- Smarticles (<4h)
- Accelerate Pheno (~ 7 h)
- LifeScales (~ 3-4h o más) han sido enfocados en reducir el tiempo de procesamiento de la muestra [29].

### **Tecnologías futuras**

Actualmente aún se siguen desarrollando sistemas que optimicen aún más el procesamiento de la muestra y obtención de resultados y sistemas como:

- AFM Cantilever (< 1h)
- "fAST" (< 1h)
- Microcalorimetría isotérmica (IMC) (~ 24h) están siendo evaluados [29].

### 1.2.1.1 Citometría de flujo

A principios de la década de los ochenta aparecieron los primeros estudios en los que se mostró la aplicación de la citometría de flujo (CF) fluorescente en la evaluación de sensibilidad antibacteriana, esta técnica ha demostrado resultados reproducibles y estadísticamente comparables con los obtenidos por el método de microdilución, en <6h en bacterias de crecimiento rápido y 16 h en bacterias de crecimiento lento, como *M. tuberculosis* [30]. Adicionalmente, provee información acerca de la fisiología bacteriana a través de la evaluación de la permeabilidad de membrana, actividad metabólica y reproducibilidad de la bacteria permitiendo detectar bacterias en estado viable pero no cultivables (VBNC) que por métodos cultivables no pueden ser percibidas [31].

#### Fundamento

El principio en el que se basa es: hacer pasar células u otras partículas en suspensión alineadas, y de una en una por delante de un haz luminoso. La información producida puede agruparse en dos tipos fundamentales: la generada por la dispersión de la luz y la relacionada con la emisión de luz por los fluorocromos presentes en la célula o partícula al ser excitados por el rayo luminoso.

La luz dispersada es medida por dos detectores ópticos. Un detector mide la dispersión a lo largo de la trayectoria del láser. Este parámetro es definido como dispersión frontal (FSC, por sus siglas en inglés). El otro detector mide la dispersión en un ángulo de 90° con respecto al láser. Este parámetro es denominado como dispersión lateral (SSC, por sus siglas en inglés).

La medición de la FSC permite la discriminación de células por tamaño. La intensidad de la FSC es proporcional al diámetro de la célula y es fundamentalmente debido a la difracción de la luz alrededor de la célula. FSC es detectado por un fotodiodo que convierte la luz en una señal eléctrica. La intensidad de voltaje producido es proporcional al diámetro de la célula interrogante.



La medición de la SSC provee información acerca de la complejidad interna (por ejemplo, granularidad) de la célula. La interfaz entre el láser y las estructuras intracelulares hace que la luz se refracte o se refleje. Los componentes celulares que aumentan la SSC incluyen los gránulos y núcleos. En relación con la dispersión frontal, las señales de luz de la dispersión lateral son débiles. Se utiliza un fotomultiplicador (PMT, por sus siglas en inglés) para medir la dispersión lateral porque es un detector óptico más sensible [32].

Las señales luminosas, emitidas por la excitación de los fluorocromos, son detectadas por un PMT que las transforma en impulsos eléctricos, las amplifica y convierte en señales digitales que son procesadas por una computadora [33].

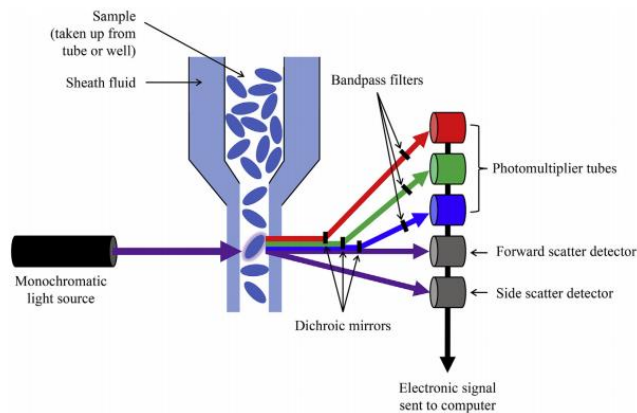


Figura 5. Esquemmatización del citómetro de flujo [34].

## Fluorocromos

Existen diversos fluorocromos que están siendo utilizados en esta técnica como:

- Yoduro de propidio (PI)
- cFDA (diacetato de carboxifluorosceína)
- DCFH-DA (diacetato-2,7-diclorodihidrofluoresceína)
- DiBAC<sub>4</sub> (2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona) y DiSC<sub>3</sub> (yoduro de 3-dipropiltiadicarbo-cianina)
- CTC (cloruro de 5-ciano-2,3-ditolil tetrazolio)

- Edu-Alexa 488 (5-etinil-2'-desoxiuridina), con el objetivo de evaluar diversos parámetros bacterianos [32], tales como: permeabilidad de membrana, actividad esterasa, detectar especies reactivas de oxígeno, potencial de membrana, actividad respiratoria, síntesis de ADN, respectivamente [35].

## **Aplicaciones**

Actualmente, está siendo completamente utilizada para realizar:

- Monitoreo microbiológico de la calidad del agua y del efecto de los aceites esenciales en microorganismos relacionados en alimentos [36]
- Evaluación de la viabilidad de levaduras durante la fermentación de vino [37].

Por ejemplo, Silva *et al.* [38] describió el mecanismo de acción del AE de *Coriandrum sativum* L. por citometría de flujo utilizando los fluorocromos PI para evaluación de la integridad de membrana, BOX potencial de membrana, CTC actividad respiratoria y EB para medir la actividad de eflujo.

Asimismo, Saint-Ruf *et al.* [39] demostró que la CF puede ser utilizada para determinar la CMI de diferentes cepas bacterianas, obteniendo los mismos valores de CMI reportados basados en método de referencia, evaluando la susceptibilidad de *E. coli* y *P. aeruginosa* a  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas utilizando los fluorocromos TO-PRO®-3, y DiBAC<sub>4</sub>.

Además, Broeren *et al.* [40] ha definido la CMI por citómetro de flujo, como la mínima concentración de antibiótico que proporciona una reducción del 80% del recuento bacteriano a los 240 min de incubación comparado con el recuento del control sin antibiótico al mismo tiempo de incubación.

### **Tinción dual de viabilidad bacteriana**

El kit LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability and Counting (L34856), compuesto por los fluorocromos SYTO9 y PI, está basado en la evaluación de la integridad de la membrana [41], donde el PI se intercala en el ADN sin preferencia por alguna secuencia en una proporción de una molécula de PI a 4 -5 pares de bases en células con membranas alteradas y SYTO9 entra en células con membrana intacta. Cuando ambos colorantes están presentes, PI exhibe mayor afinidad, por lo tanto, SYTO9 es desplazado. Siendo la constante de asociación de ambos fluorocromos de  $3.7 \times 10^5$  /M para PI y  $1.8 \times 10^5$  /M para SYTO9 [41].

Para el tratamiento del control de bacterias muertas es utilizado isopropanol, que aumenta la permeabilidad de la membrana celular de las bacterias, además de alterar la función de las proteínas presentes en la bacteria por desnaturalización de éstas. Y para el tratamiento de control de vivas, solución salina al 0.85% de NaCl, que mantiene el balance osmótico de la bacteria y su morfología [41].

## **2. Justificación**

El aumento de casos de resistencia a antibióticos y la nefrotoxicidad que estos presentan, motivan a la búsqueda de nuevos compuestos antibacteriales con baja o nula toxicidad. Los AE's de *Citrus latifolia* y *Citrus sinensis* han demostrado en estudios previos tener actividades biológicas importantes, por lo que la evaluación de su posible actividad antibacterial, así como la posible actividad sinérgica entre ellos y con el antibiótico de referencia, pueden contribuir a reducir la dosis de antibiótico y el efecto adverso que este último ocasiona. La obtención rápida de resultados confiables es de suma importancia para los tratamientos certeros, por lo que la evaluación de estos aceites por citometría de flujo podría además abrir la puerta a evaluaciones antibacterianas de rutina mediante esta metodología.

## **3. Objetivo General**

Evaluar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Citrus latifolia* y *Citrus sinensis* por citometría de flujo comparando su reproducibilidad con el método de cuenta viable.

### **3.1 Objetivos específicos**

- Evaluar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Citrus latifolia* y *Citrus sinensis* frente a *E. coli* ATCC 25922 por citometría de flujo.
  
- Evaluar si existe sinergismo antibacteriano entre los aceites esenciales de *Citrus latifolia* y *Citrus sinensis* y amikacina mediante citometría de flujo.

## **4. Material y métodos**

### **4.1 Material**

#### **Material biológico**

De acuerdo con la CLSI y siguiendo sus recomendaciones, se utilizaron las siguientes cepas de referencia:

- *Escherichia coli* ATCC 25922 (Microbiologics ®)
- *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 (Microbiologics ®)

#### **Medios de cultivo**

- Caldo Mueller Hinton (BD (Becton Dickinson))
- Agar soya tripticaseína (BD)
- Agar infusión cerebro corazón (BD)
- Agar Müeller Hinton (BD)

#### **Reactivos**

- Patrón de turbidez de 0.5 de McFarland
- Agua destilada
- Solución salina al 0.85 % de NaCl
- Dimetil sulfóxido DMSO (J.T. Baker) al 2% (diluido en Caldo Müeller-Hinton (BD))
- Ceftriaxona (AMSA)
- Cefotaxima (AMSA)
- Amikacina (AMSA)
- Agar suave (0.6 g de Agar base (BD) y 0.6 g de NaCl (Promega))
- Kit LIVE/DEAD ® BacLight™ Bacterial Viability and Counting (L34856) (Thermo Fisher)

## Equipo

- Espectrofotómetro (marca y modelo) (Coleman)
- Citómetro de flujo (BD FACS CALIBUR)
- Microscopio de fluorescencia (Carl Zeiss)
- Contador de colonias (Fisher semiautomático)

## 4.2 Métodos

Previamente, se sembraron las cepas de *S. pneumoniae* y *E. coli* en agar sangre y agar soya tripticaseína, respectivamente, y se incubaron por 24h a una temperatura de 37 °C.

Posteriormente, se realizó la preparación de las suspensiones bacterianas calibradas.

- Suspensión bacteriana calibrada (SBC)

Se procedió a la preparación de la suspensión bacteriana calibrada al 0.5 de Mc Farland para cada cepa de referencia (*Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 y *Escherichia coli* ATCC 25922).

- Agentes antibacterianos

para *S. pneumoniae*, Se prepararon siete diluciones dobles seriadas de ceftriaxona y cefotaxima, antibióticos de referencia indicados por la CLSI para obtener las concentraciones finales de 0.0075, 0.015, 0.3, 0.6, 0.12, 0.24 y 0.48 µg/mL para el ensayo por la técnica de citometría de flujo y las concentraciones de 0.0075, 0.15 y 0.3 µg/mL para la técnica de microscopia de fluorescencia para *E. coli*, como se muestra en la tabla 1 [28].

También se prepararon cinco diluciones dobles seriadas de amikacina, antibiótico de referencia indicados por la CLSI para *E. coli* ATCC 25922, para obtener las concentraciones finales de 0.25, 0.5, 1, 2 y 4 µg/mL como se muestra en la tabla 1 [28].

Además, se prepararon diluciones dobles seriadas de los AE's de *C. latifolia* y *C. sinensis*, para obtener las concentraciones finales de 0.25, 0.5, 1, 2 y 4 µg/mL, siendo este rango de concentraciones de amikacina la referencia para la evaluación de susceptibilidad antibacteriana de estos AE, como se muestra en la tabla 1 [28].

**Tabla 1. Dosis empleadas de los agentes antimicrobianos para la evaluación de susceptibilidad antibacteriana [28].**

Cefotaxima ( $\mu\text{g/mL}$ )	Amikacina ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>C. latifolia</i> ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>C. sinensis</i> ( $\mu\text{g/mL}$ )
0.0075	0.25	0.25	0.25
0.015	0.5	0.5	0.5
0.3	1	1	1
0.6	2	2	2
0.12			
0.24			
0.48			

**Nota:** Debido a la resistencia presentada por parte de *E. coli* a cefotaxima, para tener certeza en la elección del antibiótico a utilizar como referencia, se realizó previamente un antibiograma por el método de difusión en agar, siendo amikacina uno de los antibióticos al que *E. coli* mostró sensibilidad. Aunque en el documento M100 de la CLSI se indican los antibióticos y el rango a utilizar para cada cepa de referencia, se debe contemplar que van en aumento las mutaciones en genes cromosomales o a la adquisición de determinantes genéticos externos de resistencia por parte ellas.

- Sinergia

Se prepararon tres diluciones del AE de *C. latifolia* o *C. sinensis*, y el antibiótico, para obtener las concentraciones finales de 0.5 y 1  $\mu\text{g/mL}$  de *C. latifolia* y de 0.25, 0.5 y 1  $\mu\text{g/mL}$  de amikacina, como se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2. Dosis empleadas de los AE's y amikacina para el ensayo de sinergia.**

Combinación	Amikacina	<i>C. latifolia</i>	<i>C. sinensis</i>
1	1 µg/mL	1 µg/mL	
2	1 µg/mL		1 µg/mL
3	0.5 µg/mL	1 µg/mL	
4	0.5 µg/mL		1 µg/mL
5	0.25 µg/mL	1 µg/mL	
6	0.25 µg/mL		1 µg/mL

- Suspensión bacteriana tratada (SBT)

Se resuspendió 1 mL de la SBC al 0.5 de Mc Farland previamente preparada, en 1 mL de caldo Mueller-Hinton y se alícuotó 250 µL de está a 250 µL de las diferentes concentraciones de los antibióticos de referencia (Tabla 1), o de cada AE (Tabla 2) o de las diferentes proporciones de AE + amikacina y se incubó por 3h en agitación a 70 rpm y una temperatura de 37°C.

Posteriormente se centrifugó a 2500 rpm por 5 min, se removió el sobrenadante y se re suspendió en 1 mL de solución salina (SS), repitiendo este procedimiento una vez más, re suspendiendo finalmente en 1 mL de SS.



❖ Citometría de flujo

**Preparación de los fluorocromos**

- SYTO9

Se adicionó 3  $\mu\text{L}$  de la solución stock (5 mM) de SYTO9 a 97  $\mu\text{L}$  de agua destilada.

- PI

Se adicionó 3  $\mu\text{L}$  de la solución stock de yoduro de propidio (20 mM) a 97  $\mu\text{L}$  de agua destilada.

**Preparación de controles**

Se centrifugó 1 mL de la suspensión bacteriana calibrada al 0.5 de Mc Farland a 2500 g por 5 min, se removió el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL de SS para la suspensión de células vivas (SCV) y en un 1 mL de isopropanol al 70% para la suspensión de células muertas (SCM).

**Tinción**

Control de bacterias vivas

A un volumen de 178  $\mu\text{L}$  de solución SS se le adicionó 10  $\mu\text{L}$  de la SCV y 10  $\mu\text{L}$  del fluorocromo SYTO9, y se incubó por 15 min a temperatura ambiente protegido de la luz. Posteriormente, se procedió a la lectura en el citómetro de flujo a una longitud de onda de 488 nm.

Control de bacterias muertas

A un volumen de 178  $\mu\text{L}$  de SS se le adicionó 10  $\mu\text{L}$  de la SCM y 10  $\mu\text{L}$  del fluorocromo PI y se incubó por 15 min a temperatura ambiente protegido de la luz. Posteriormente, se procedió a la lectura en el citómetro de flujo a una longitud de onda de 488 nm.

**Preparación del equipo**

- Controles para ajuste del equipo.

Para el ajuste del equipo se prepararon dos controles de bacterias vivas y dos controles de bacterias muertas. Los controles de bacterias vivas fueron teñidos con SYTO9 y PI, respectivamente; y los controles de bacterias muertas fueron teñidos con SYTO9 y PI, respectivamente.

- Análisis de la tinción bacteriana por citometría de flujo

Se utilizó el control de bacterias vivas teñido con SYTO9 y el control de bacterias muertas teñido con IP para localizar las respectivas poblaciones bacterianas y estandarizar los parámetros evitando la superposición de los espectros de emisión de los fluorocromos.

Las células tenidas fueron analizadas en un citómetro de flujo equipado con un láser que emite a 488 nm. La fluorescencia fue colectada en los canales rojo y verde.

La dispersión frontal, la dispersión lateral y la fluorescencia fueron colectadas con la amplificación de señal logarítmica. Se configuró la amplificación de las señales de dispersión frontal y dispersión lateral y posteriormente la amplificación del canal de fluorescencia verde con la finalidad de que aparecieran las señales de las bacterias vivas teñidas con SYTO9 y después la amplificación del canal de fluorescencia roja con el objetivo de que aparecieran las señales de las bacterias muertas teñidas con IP. Posteriormente, se realizó la lectura de un control con microesferas utilizando los parámetros de fluorescencia frente a dispersión lateral.

### **Parámetros de lectura**

Se definió la región de bacterias vivas y muertas utilizando los controles antes mencionados aplicando los siguientes parámetros de lectura, para *S. pneumoniae*: SSC (side scatter): 400, FL1: 600, FL2: 520 y FL3: 410 y para *E. coli*: SSC: 430, FL1: 659, FL2: 520 y FL3: 55, cuantificando número de bacterias vivas y bacterias muertas por adición de las microesferas, adquiriendo 10,000 eventos de la región R1[37].

**Nota:** las microesferas se adicionaron segundos antes de la lectura, debido a que se degradan rápidamente, generando datos erróneos.

- Muestra

Se adicionó 10 mL de bacterias vivas, 10 µL de bacterias muertas, 10 µL del fluorocromo SYTO9 y 10 µL de fluorocromo PI a 158 µL de SS; se incubó por 15 min a temperatura ambiente protegido de la luz. Posteriormente, se adicionó 2 µL de SS y finalmente se procedió a la lectura en el citómetro de flujo.

- Cuantificación de bacterias/mL

Para el cálculo de bacterias/mL se aplicó la siguiente fórmula:

$$\frac{((\# \text{ de eventos en la región de bacterias}) \times (\text{factores de dilución}))}{((\# \text{ de eventos en la región de microesferas}) \times 10^{-6})} = \text{bacterias/mL}$$

[42].

- Evaluación del efecto dosis respuesta

El efecto dosis-respuesta de amikacina, de los AEs y del ensayo de sinergia se analizaron a través de una regresión lineal de los valores obtenidos de bacterias/mL de las diferentes concentraciones de antibiótico, AEs y la combinación (AE+ Antibiótico), evaluados.

- ❖ Microscopía de fluorescencia.

La SBT de *S. pneumoniae* y de *E coli* fue resuspendida en 100 µL de SS. Para la lectura se alícuotó 10 µL de PI o SYTO9 y se incubó por 15 min a temperatura ambiente protegido de la luz y se procedió a la preparación de la laminilla para su posterior observación en el microscopio.

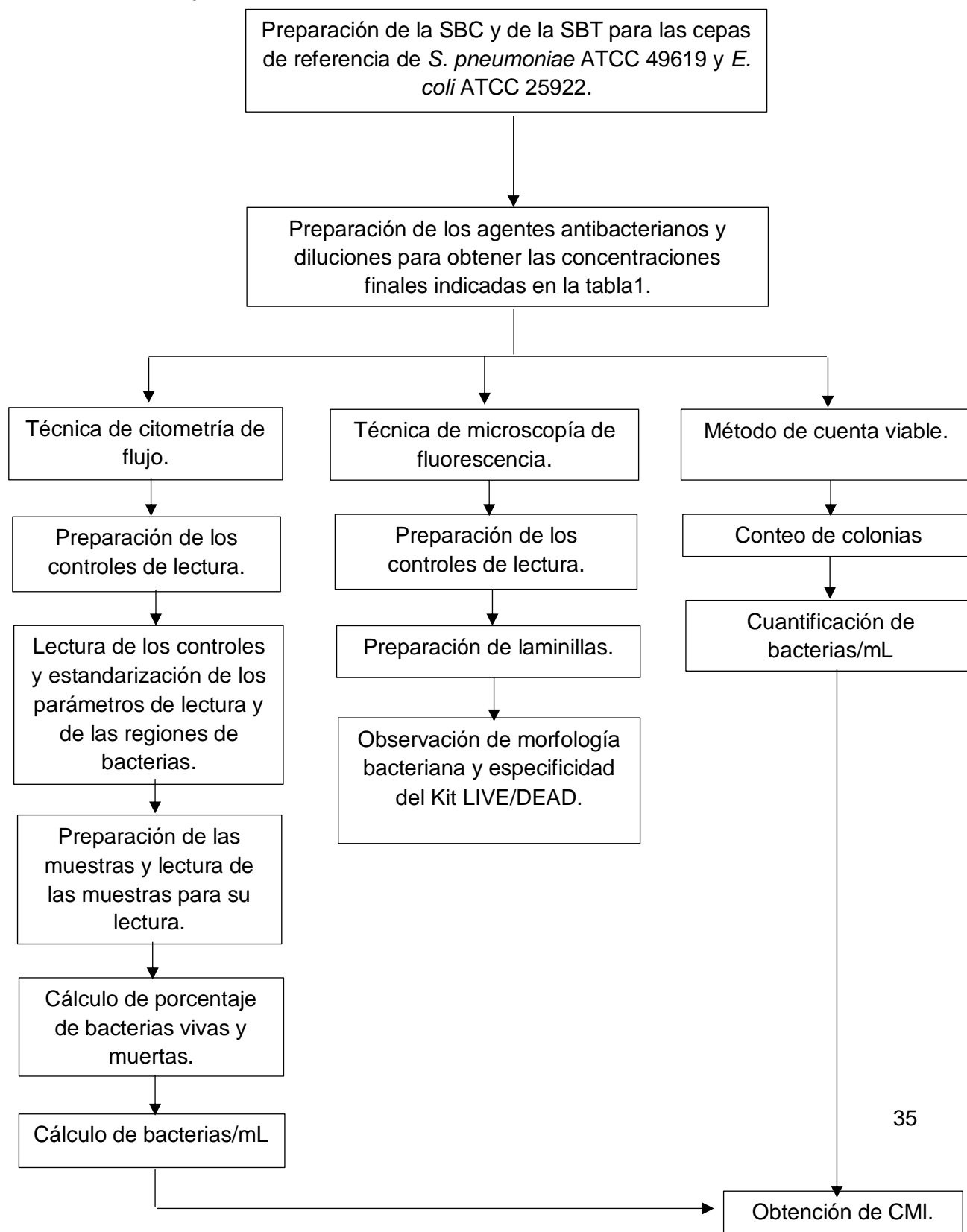
Se observó el comportamiento de la tinción y los cambios morfológicos de la bacteria ocasionados por cefotaxima e isopropanol.

- ❖ Cuenta viable

Se alícuotó 10 µL de la SBT en 10 µL de agar blando, se adicionó en una caja de agar nutritivo y se incubó 24 h a 37 °C y se realizó el conteo utilizando un contador de colonias. Para el cálculo de bacterias/mL, se multiplicó el número de colonias obtenido por el factor de dilución obtenido.

## 5. Diagrama

“Evaluación antibacteriana de los aceites esenciales de *Citrus latifolia* y *Citrus sinensis* por citometría de flujo”.

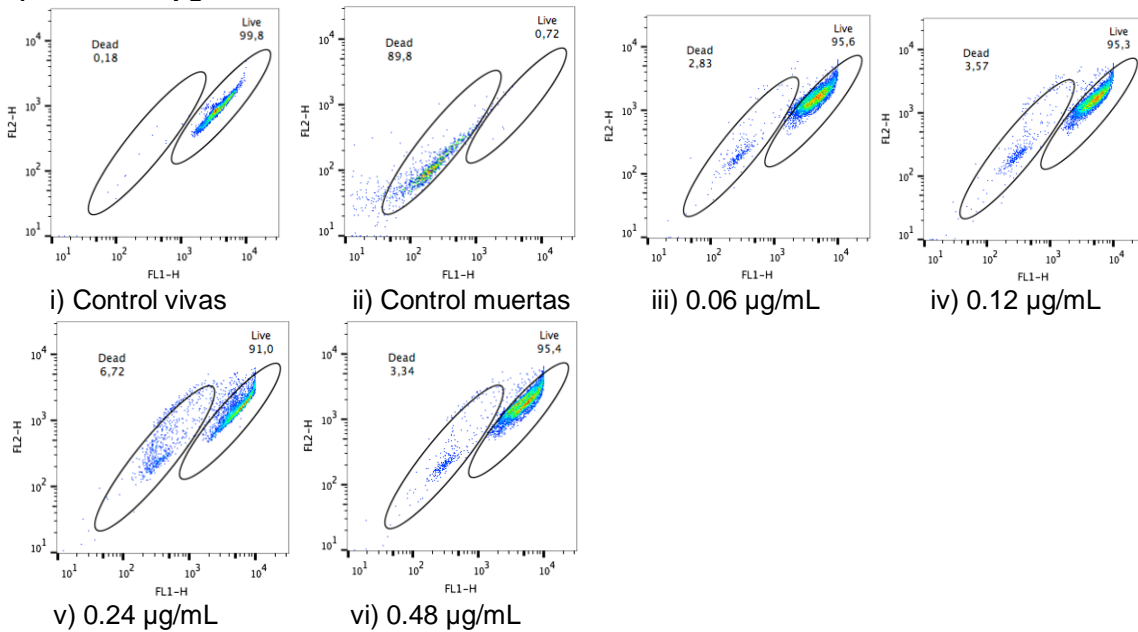


## 6. Resultados

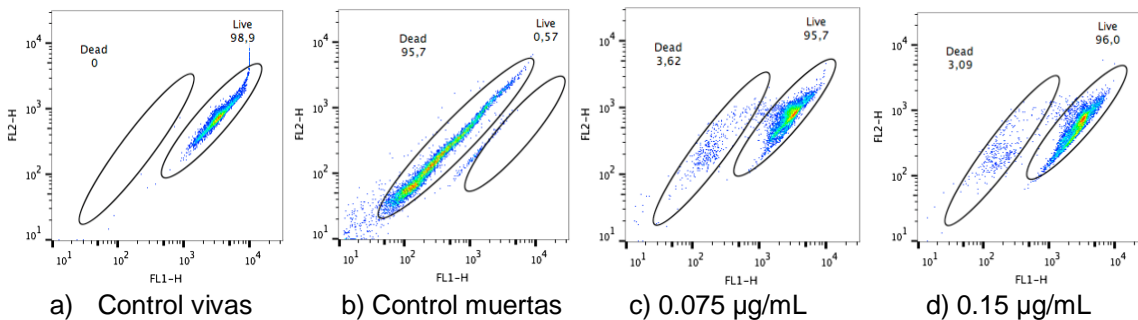
### 6.1 Evaluación de susceptibilidad antibacteriana de *S. pneumoniae* frente a cefotaxima por citometría de flujo.

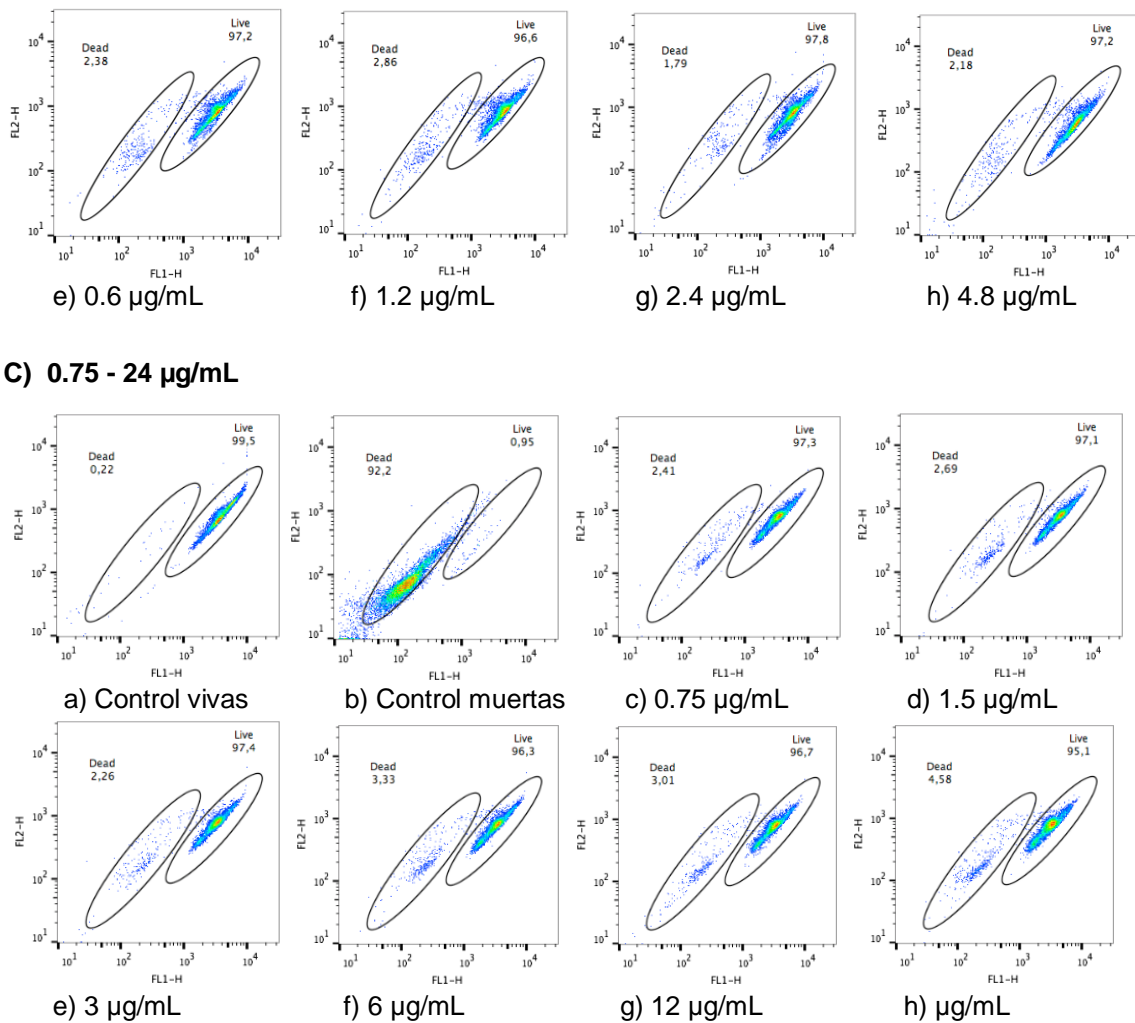
En la figura 6 se observa las regiones de bacterias (vivas y muertas) definidas, de la evaluación de sensibilidad antibacteriana realizada a *S. pneumoniae* frente a cefotaxima en los rangos de concentraciones de A) 0.0075 µg/mL-0.48 µg/mL (indicado por la CLSI), B) 0.075-4.8 µg/mL y C) 0.75-48 µg/mL. Un porcentaje <5% de bacterias muertas y un nulo aumento lineal en el porcentaje de bacterias muertas, fueron obtenidos, debido al uso de SS como medio para la evaluación de sensibilidad antimicrobiana.

#### A) 0.06 - 0.48 µg/mL



#### B) 0.075 - 4.8 µg/mL



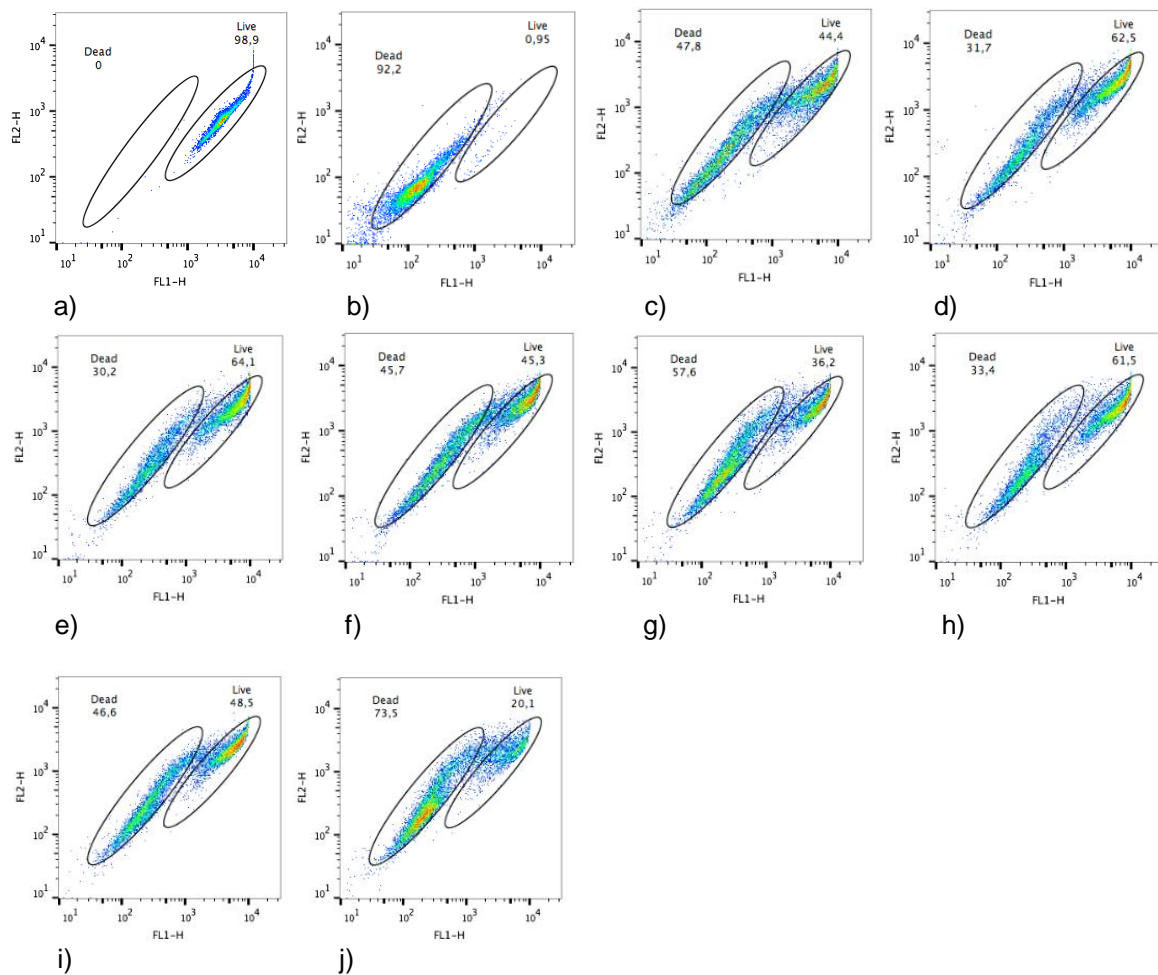


**Figura 6.** Gráficas de puntos de la evaluación de susceptibilidad antibacteriana de *S. pneumoniae* frente a cefotaxima, en el rango de concentraciones. A) 0.06 - 0.48 µg/mL, B) 0.075 - 4.8 µg/mL y C) 0.75 - 24 µg/mL, analizada con el PMT de fluorescencia roja FL2-H (SYTO9) y el PMT de fluorescencia verde FL1-H (PI). Se muestra un porcentaje menor al 5% de bacterias muertas y un nulo aumento lineal en el porcentaje de bacterias muertas.

En la figura 7 se observa las regiones de bacterias (vivas y muertas) definidas, de la evaluación de sensibilidad antibacteriana realizada a *S. pneumoniae* frente a cefotaxima en el rango de concentraciones de 0.0075-4.8 µg/mL y aumento significativo en el porcentaje de bacterias muertas debido a que se utilizó el caldo Mueller-Hinton como medio para la evaluación de sensibilidad antimicrobiana, que le permitió a la bacteria sintetizar toda su

maquinaria, entre ellas las proteínas PBP 1b y PBP III (blanco de cefotaxima). Pero no así un efecto lineal.

No fue posible reproducir este experimento, debido a que posteriormente fue difícil crecer esta cepa. Por lo cual, se realizó la estandarización de la técnica de citometría de flujo con la cepa de *E. coli*.



**Figura 7. Gráficas de puntos de la evaluación de susceptibilidad antibacteriana de *S. pneumoniae* frente a cefotaxima, analizada con el PMT de fluorescencia roja FL2-H (SYTO9) y el PMT de fluorescencia verde FL1-H (PI). a) control de vivas, b) control de muertas, c) 0.0075 µg/mL, d) 0.15 µg/mL, e) 0.03 µg/mL, f) 0.06 µg/mL, g) 0.12 µg/mL, h) 0.24 µg/mL, i) 0.48 µg/mL y j) 4.8 µg/mL. Se observa un aumento significativo en el porcentaje de bacterias muertas debido a que se utilizó el caldo Mueller-Hinton como medio para la evaluación de sensibilidad antimicrobiana. Pero no así un efecto lineal.**

## 6.2 Evaluación de susceptibilidad antibacteriana de *E. coli* frente a cefotaxima por citometría de flujo.

En la figura 8 observamos las regiones de bacterias (vivas y muertas) definidas.

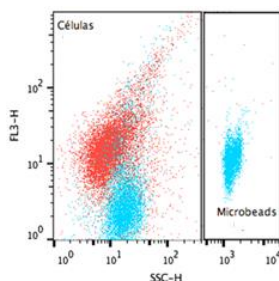


Figura 8. Gráfica de puntos de la estandarización de las regiones de bacterias vivas (color azul) y muertas (color rojo) de *E. coli*, analizada con el detector de dispersión lateral (SSC-H) y con el PMT de fluorescencia verde FL3-H.

En la figura 9 observamos las regiones de bacterias (vivas y muertas) de las dos concentraciones de cefotaxima evaluadas (0.0075 y 0.015  $\mu\text{g/mL}$ ) indefinidas con un desplazamiento a la región “población desconocida”, denominada así por el kit.

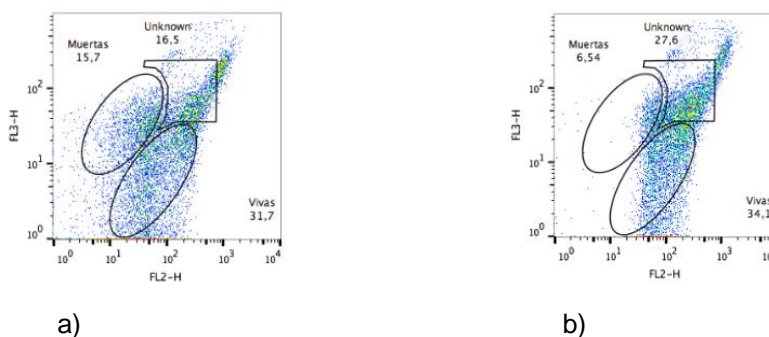
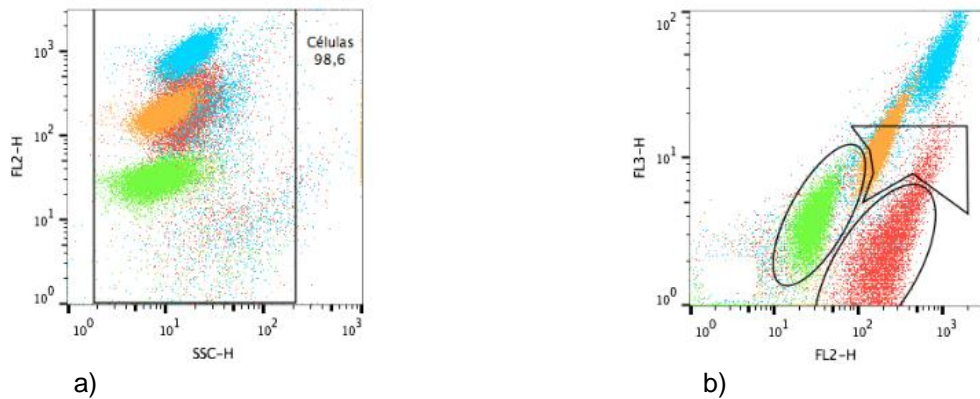


Figura 9. Gráficas de puntos de la evaluación de susceptibilidad antibacteriana de *E. coli* frente a cefotaxima. a) 0.0075 y b) 0.015  $\mu\text{g/mL}$ , analizada con el PMT de fluorescencia verde FL3-H (IP) y el PMT de fluorescencia roja FL2-H (SYTO9). Se observa un desplazamiento de las regiones de bacterias (vivas y muertas) hacia la región de “población desconocida”.

Con la finalidad de identificar si la indefinición de las regiones en los tratamientos se debía al antibiótico, se realizó una curva de isopropanol.



En la figura 10 se observa de igual manera una población definida cercana a la región de bacterias muertas pero desplazada de manera lineal en los tratamientos de isopropanol al 35% y 17.5% , se realizó el análisis considerando que eran bacterias muertas, aunque se concluyó que algo en el tratamiento de la muestra estaba provocando el aumento de fluorescencia de ambos y por consiguiente un desplazamiento de la región de bacterias muertas y la observación nula de la población de bacterias vivas.



**Figura 10. Gráficas de puntos de la respuesta de *E. coli* frente a diferentes porcentajes isopropanol. a) análisis con el detector de dispersión lateral (SSC-H) y el PMT el PMT de fluorescencia roja FL2-H (SYTO9) y b) analizada con el PMT de fluorescencia verde FL3-H (IP) y el PMT de fluorescencia roja FL2-H (SYTO9). De las concentraciones de isopropanol al 8.75 % (rojo), 17.5% (azul), 35% (anaranjado) y 70% (verde). Se observa un desplazamiento de las regiones de bacterias (vivas y muertas) debido a un aumento en la fluorescencia de ambos fluorocromos.**

### **6.3 Evaluación de la tinción dual SYTO9/PI por la técnica de microscopia de fluorescencia.**

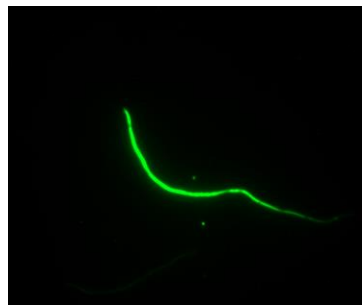
Con la finalidad de observar cómo se estaban tiñendo las bacterias, se realizó una curva de isopropanol por la técnica de microscopia de fluorescencia. En la figura 11 y 12 se observa que gran porcentaje de las bacterias que florecen en verde también florecen utilizando el filtro rojo, y que las bacterias que florecen con el filtro rojo tenían un color característico rojo-amarillo, indicándonos que SYTO9 no estaba siendo completamente desplazado por PI, provocando que en el citómetro observáramos una sola población que no podía ser definida como bacterias muertas o bacterias vivas.

También se realizó una curva de cefotaxima, con la finalidad de observar el comportamiento de la tinción con este antibiótico. En la figura 11 podemos observar el mismo comportamiento de inespecificidad por parte de los colorantes para diferenciar entre bacterias vivas y muertas y ese mismo color característico de rojo-amarillo observado con la curva de isopropanol. Además, de no observar la morfología característica de *E. coli*, sino filamentos en las concentraciones de 0.48, 0.24, 0.12, 0.06, 0.03 y 0.015  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (A), lo primero que se considero fue que se trataba de una contaminación, sin embargo, a la concentración de 0.0075  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (B) podemos observar los bacilos característicos de *E. coli*. Se ha demostrado que la producción de filamentos ocurre tanto en cepas de *E. coli* susceptibles como en cepas resistentes a antibióticos betalactámicos (cefotaxima), a concentraciones por debajo, sobre y por encima de la CMI en cepas resistentes (blaCTX-M-1 y CTX-M-15) al antibiótico y concentraciones por debajo y sobre la CMI para cepas susceptibles [43].

**A) 0.015  $\mu\text{g}/\text{mL}$**



a)



b)

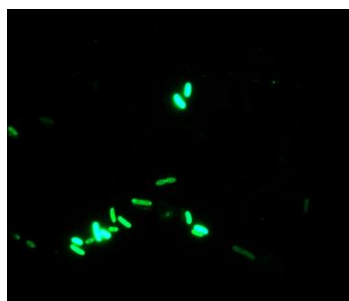


c)

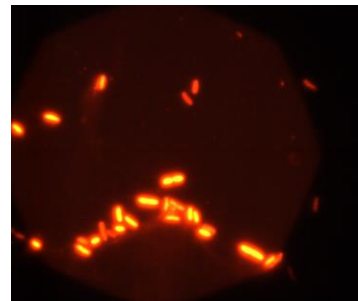
**B) 0.075  $\mu\text{g}/\text{mL}$**



a)



b)



c)

Figura 11. Respuesta de *E. coli* a tratamiento con cefotaxima. A) 0.015 de  $\mu\text{g/mL}$ . Fotografías tomadas utilizando a) luz visible, b) filtro verde y c) filtro rojo. B) 0.0075  $\mu\text{g/mL}$ . Fotografías tomadas utilizando a) luz visible, b) filtro verde y c) filtro rojo. Se observa que la población de bacterias evaluada florece en ambos filtros, un color rojo-amarillo cuando la población de bacterias teñidas con PI es observada con el filtro rojo y filamentos en el rango de concentraciones de 0.015-0.48  $\mu\text{g/mL}$  de cefotaxima.

En la figura 12 podemos observar las regiones de bacterias (vivas y muertas) definidas y la resistencia por parte de *E. coli* a cefotaxima a la concentración de 0.06  $\mu\text{g/mL}$ , realizando la tinción por separado. Confirmando que la tinción doble era la causante de la indefinición de las regiones.

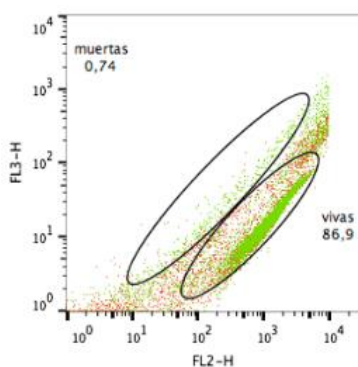
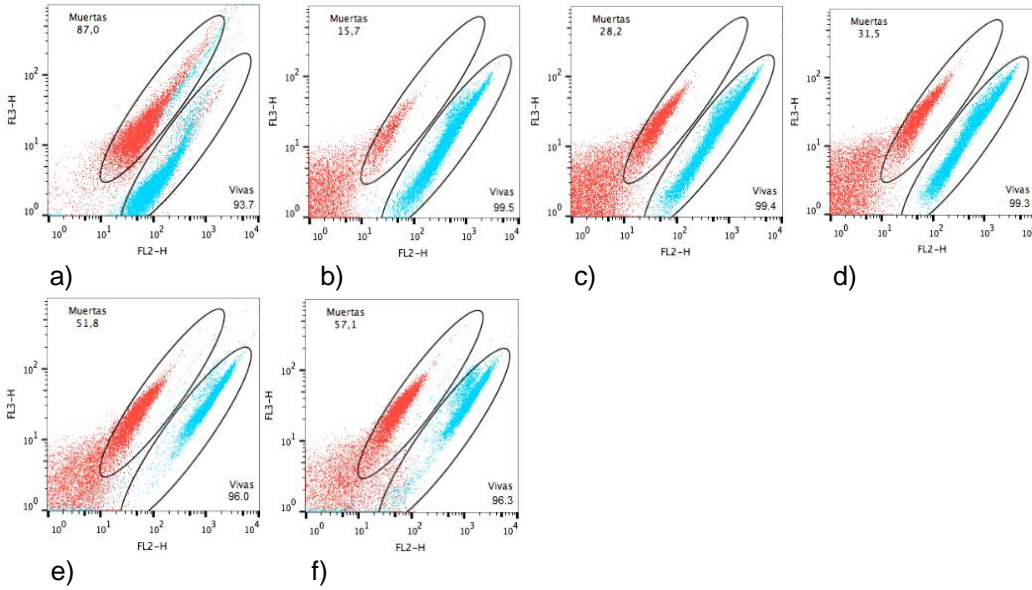


Figura 12. Gráfica de puntos de la evaluación de susceptibilidad antimicrobiana de *E. coli* frente a cefotaxima, analizada con el PMT de fluorescencia verde FL3-H (IP) y el PMT de fluorescencia roja FL2-H (SYTO9). Se observa las regiones de bacterias (vivas y muertas definidas) y la resistencia de *E. coli* a cefotaxima.

#### 6.4 Evaluación de susceptibilidad antibacteriana de *E. coli* frente a amikacina y los AE's de *C. latifolia* y *C. sinensis* por citometría de flujo.

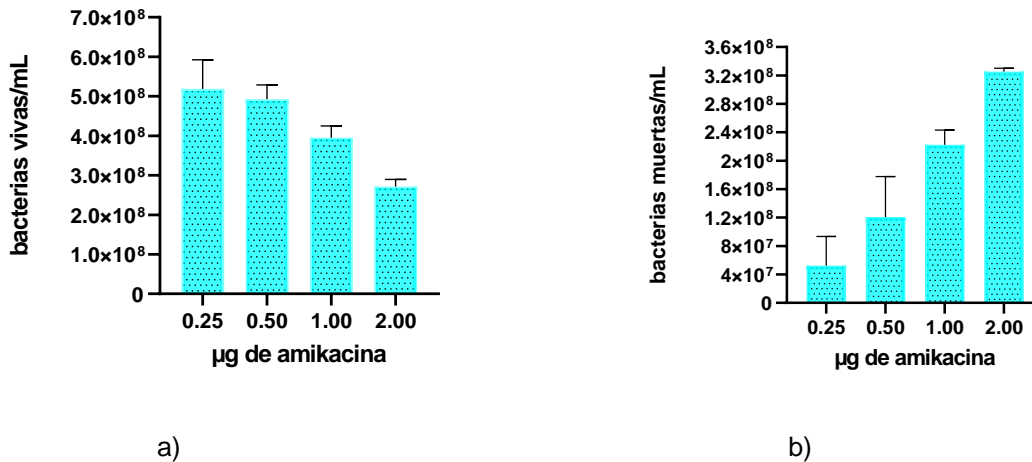
Antibiótico

En la figura 13 se observa las regiones de bacterias (vivas y muertas) definidas en el rango de concentraciones de 0.25-4  $\mu\text{g/mL}$  de amikacina evaluadas, sensibilidad y un efecto dosis-respuesta por parte de *E. coli* a este antibiótico.



**Figura 13.** Gráficas de puntos de la evaluación de sensibilidad antimicrobiana de *E. coli* frente a amikacina, analizada con el PMT de fluorescencia verde FL3-H (IP) y el PMT de fluorescencia roja FL2-H (SYTO9). a) Controles, b) 0.25 µg/mL, c) 0.5 µg/mL, d) 1 µg/mL, e) 2 µg/mL y f) 4 µg/mL. Se observa las regiones de bacterias (vivas y muertas) definidas y un efecto dosis-respuesta por parte de esta cepa a este antibiótico.

En la figura 14 se observa el comportamiento lineal por parte de amikacina frente a *E. coli* en el rango de concentraciones evaluada (0.25 µg/mL- 4 µg/mL), viéndose reflejado en valores de  $r^2= 0.9896$  para bacterias vivas y  $r^2=0.9535$  bacterias muertas. Sin embargo, no se observó un recuento del 80% o mayor a este de bacterias muertas, razón por la cual no pudo ser determinada la CMI de amikacina para *E. coli* por esta técnica.



**Figura 14. Efecto dosis-respuesta de amikacina frente a *E. coli*. (a) bacterias vivas/mL y b) bacterias muertas/mL). Se observa un comportamiento lineal por parte de amikacina frente a *E. coli*, pero no así un recuento del 80% o mayor a este de bacterias muertas. Cada punto es la media  $\pm$  la S.D. de tres experimentos realizados por triplicado.**

**AE's**

En la figura 15 se observa las regiones de bacterias (vivas y muertas) y un porcentaje <2% de bacterias muertas en el rango de concentraciones en el rango de concentraciones del AE de *C. latifolia* evaluadas, indicado por la CLSI, y un efecto toxico a las concentraciones de 8720  $\mu\text{g/mL}$  y i) 0.872 g/mL. El AE de *C. latifolia* no presenta actividad antibacteriana frente a esta cepa.

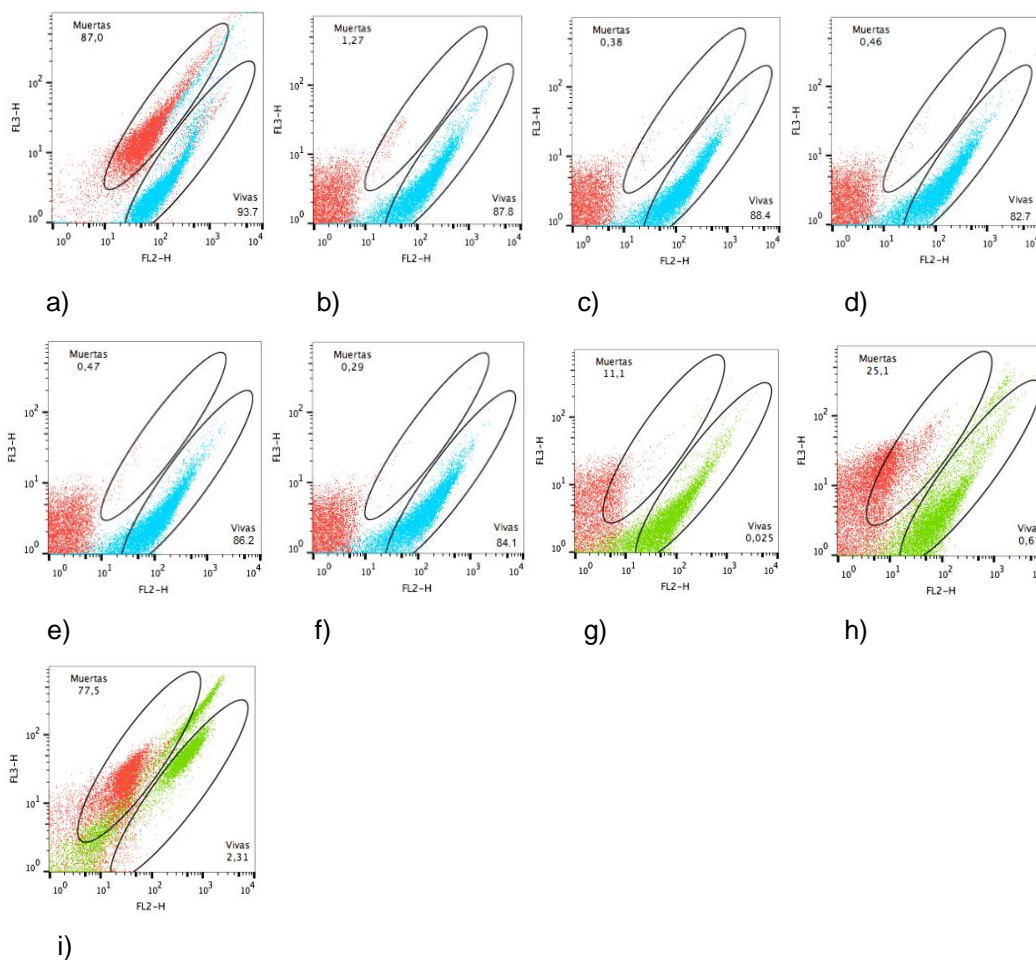


Figura 15. Gráficas de puntos de la evaluación de sensibilidad antimicrobiana de *E. coli* frente a *C. latifolia*, datos analizados con el PMT de fluorescencia verde FL3-H (IP) y el PMT de fluorescencia roja FL2-H (SYTO9). a) Controles, b) 0.25 µg/mL, c) 0.5 µg/mL, d) 1 µg/mL, e) 2 µg/mL, f) 4 µg/mL, g) 96 µg/mL, h) 8720 µg/mL y i) 0.872 g/mL (aceite puro), datos analizados con el PMT de fluorescencia verde FL3-H (IP) y el PMT de fluorescencia roja FL2-H (SYTO9). El AE de *C. latifolia* no presenta actividad antibacteriana frente a esta cepa. Cada punto es la media ± la S.D. de tres experimentos realizados por triplicado.

En la figura 16 se observa las regiones de bacterias (vivas y muertas) definidas y un porcentaje <1% de bacterias muertas en el rango de concentraciones del AE de *C. sinensis* evaluadas, indicado por la CLSI, y un efecto toxico a las concentraciones de 96 µg/mL y 0.872 g/mL. El AE de *C. sinensis* no presenta actividad antibacteriana frente a esta cepa.

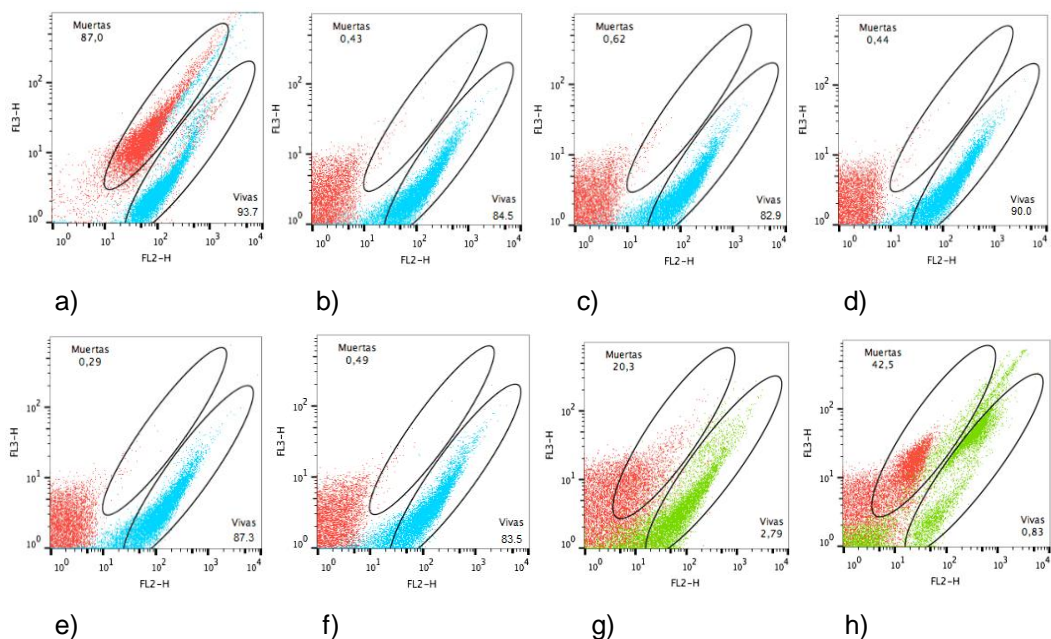


Figura 16. Gráficas de puntos de la evaluación de sensibilidad antimicrobiana de *E. coli* frente a *C. sinensis*, datos analizados con el PMT de fluorescencia verde FL3-H (IP) y el PMT de fluorescencia roja FL2-H (SYTO9). a) controles, b) 0.25 µg/mL, c) 0.5 µg/mL, d) 1 µg/mL, e) 2 µg/mL, f) 4 µg/mL, g) 96 µg/mL y h) 0.842 g/mL (aceite puro). El AE de *C. sinensis* no presenta actividad antibacteriana frente a esta cepa.

En la figura 17 se observa un comportamiento constante (figura 20) en los rangos de concentraciones de los AE's de *C. latifolia* (0.25-4 µg/mL) y *C. sinensis* (0.25-4 µg/mL) evaluadas (tabla 1) contra la cepa de *E. coli* obteniendo valores de  $r^2= 0.0327$  (bacterias vivas/mL) y 0.1671 (bacterias muertas/mL) para *C. latifolia* y de  $r^2=0.0527$ (bacterias vivas/mL y 0.1244 (bacterias muertas/mL) para *C. sinensis* (figura 20), indicándonos que no existe un efecto dosis-respuesta por parte de los AE's contra esta cepa. No se observó un aumento significativo en el número de bacterias muertas en los tratamientos con los AE's con valores de  $p\leq 0.01$  (bacterias vivas/mL) y  $p\leq 0.05$  comparado con el obtenido con amikacina.

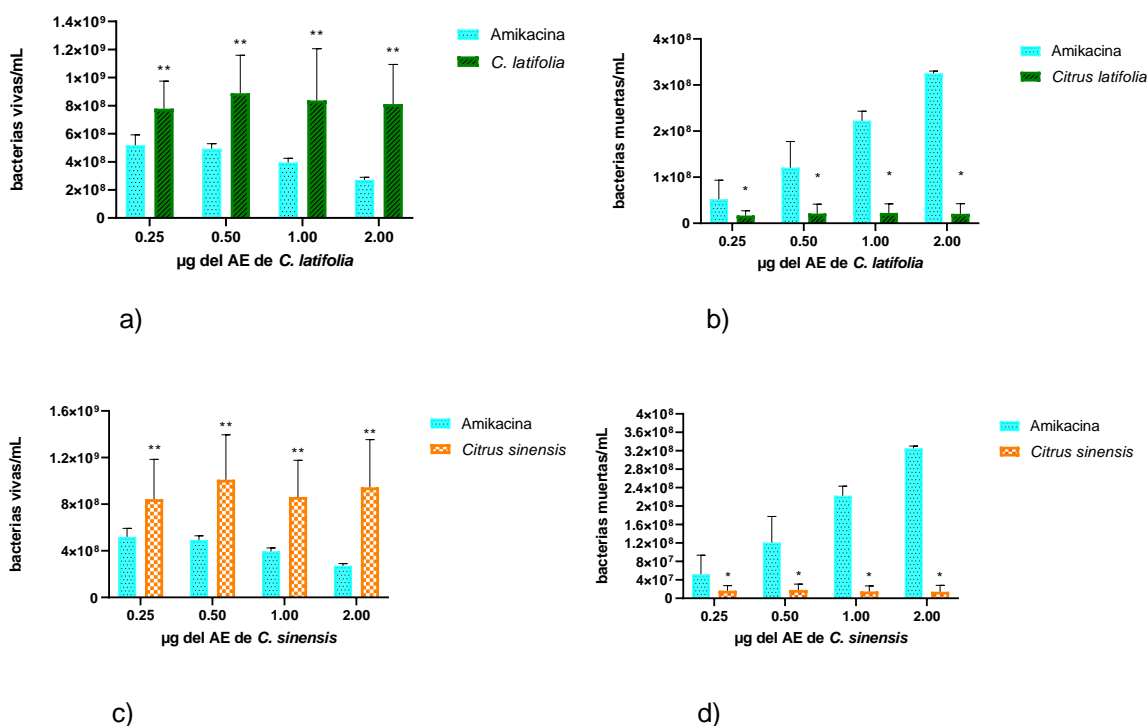
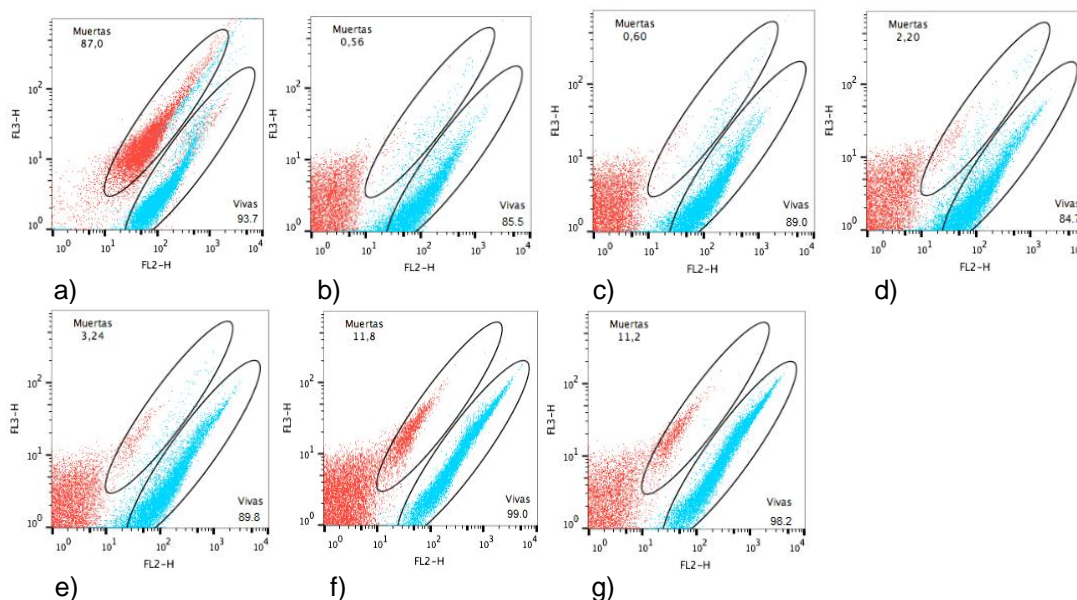


Figura 17. Efecto de los AE's de *C. latifolia* y *C. sinensis* frente a *E. coli*. a) µg del AE de *C. latifolia* vs bacterias vivas/mL, b) µg del AE de *C. latifolia* vs bacterias muertas/mL, c) µg del AE de *C. sinensis* vs bacterias vivas/mL y d) µg del AE de *C. sinensis* vs bacterias vivas/mL. Se observa un comportamiento constante en los rangos de concentraciones evaluados frente a *E. coli*. Cada punto es la media ± la S.D. de tres experimentos realizados por triplicado.

## AEs+ Antibiótico

En la figura 18 se observa las regiones de bacterias (vivas y muertas) definidas de los ensayos de sinergia evaluados y porcentajes de bacterias muertas menores a los obtenidos en las evaluaciones realizadas solamente con el antibiótico. La actividad de amikacina frente a esta cepa se ve disminuida, cuando está en combinación con los AEs.



**Figura 18.** Gráficas de puntos de los ensayos de sinergia frente a *E. coli*, analizados con el PMT de fluorescencia verde FL3-H (IP) y el PMT de fluorescencia roja FL2-H (SYTO9). a) controles, b) 0.25 µg/mL de amikacina + 1 µg/mL del AE de *C. sinensis*, c) 0.25 µg/mL de amikacina + 1 µg/mL del AE de *C. latifolia*, d) 0.5 µg/mL de amikacina + 1 µg/mL del AE de *C. latifolia*, e) 0.5 µg/mL de amikacina + 1 µg/mL del AE de *C. sinensis* y f) 1 µg/mL de amikacina + 1 µg/mL del AE de *C. latifolia* y g) 1 µg/mL de amikacina + 1 µg/mL del AE de *C. sinensis*. La actividad de amikacina frente a esta cepa se ve disminuida, cuando está en combinación con los AEs.

En la figura 19 se muestra en el eje de las abscisas las concentraciones de la combinación antibiótico (1 µg/mL de amikacina) + AEs (*C. latifolia* (0.25-1 µg/mL) y *C. sinensis* (0.25-1 µg/mL) evaluadas y en el eje de las ordenadas el número de bacterias vivas /mL o bacterias muertas/mL. Se observó una disminución significativa en el número de bacterias muertas



con valores de  $p \leq 0.05$  en todos los tratamientos de combinación realizados, indicándonos que los AE's presentan un efecto antagónico en amikacina.

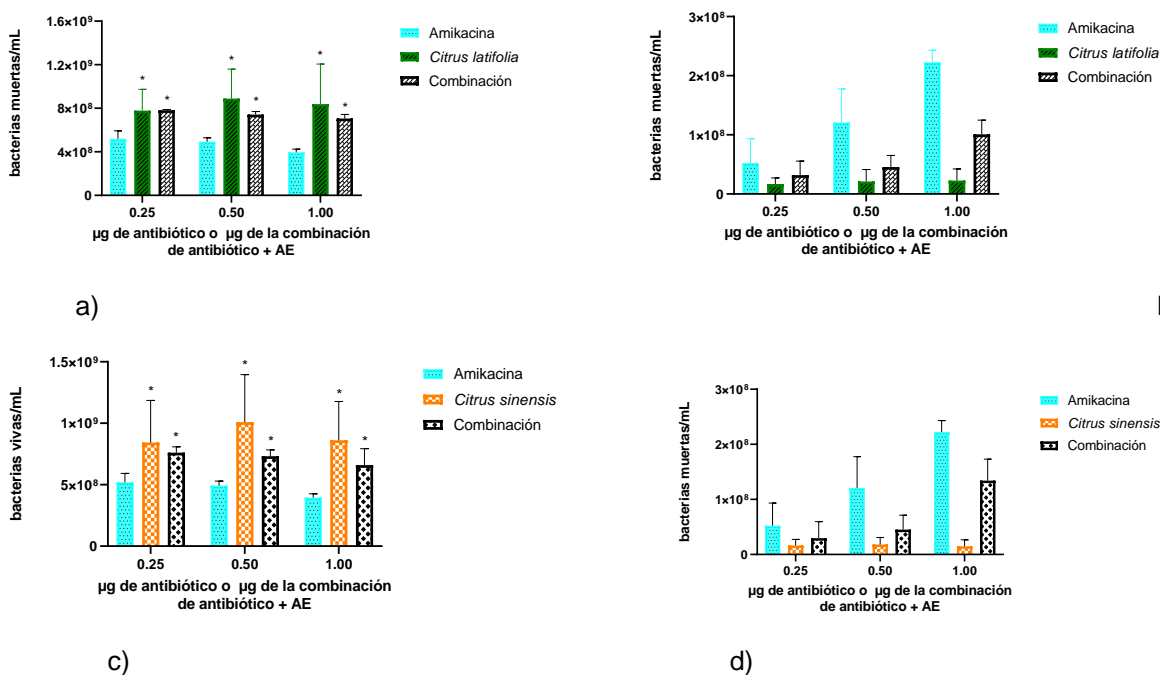


Figura 19. Efecto de la combinación de los AE's de *C. latifolia* + amikacina y *C. sinensis* + amikacina frente a *E. coli*. a) µg del AE de *C. latifolia* vs bacterias vivas/mL, b) µg del AE de *C. latifolia* vs bacterias muertas/mL, c) µg del AE de *C. sinensis* vs bacterias muertas/mL y d) µg del AE de *C. sinensis* vs bacterias muertas/mL. Se observa una disminución del efecto antibacteriano de amikacina en combinación con cada uno de los AE's frente a esta cepa. Cada punto es la media  $\pm$  la S.D. de tres experimentos realizados por triplicado.

## 6.5 Evaluación de susceptibilidad antibacteriana de *E. coli* frente a amikacina y los AE's de *C. latifolia* y *C. sinensis* por cuenta viable.

### Antibiótico

En la figura 20 se muestra en el eje de las abscisas las concentraciones evaluadas de amikacina (0.25-4 µg/mL) y en el eje de las ordenadas el número de bacterias vivas/mL. A la concentración de 1 µg/mL amikacina es capaz inhibir completamente el crecimiento de *E. coli*.

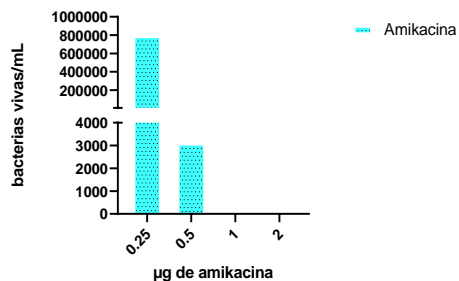


Figura 20. Determinación de la CMI de amikacina para cepa de *E. coli*. A la concentración de 1 µg/mL amikacina es capaz inhibir completamente el crecimiento de *E. coli*.

### AEs

En la figura 21, se muestra en el eje de las abscisas las concentraciones evaluadas de los AE de a) *C. latifolia* (0.25-4 µg/mL y *C. sinensis* (0.25-4 µg/mL) y en el eje de las ordenadas el número de bacterias vivas/mL. Al igual que por la técnica de citometría, una disminución del efecto antibacteriano de amikacina en combinación con cada uno de los AE's es también observada el método de cuenta viable.

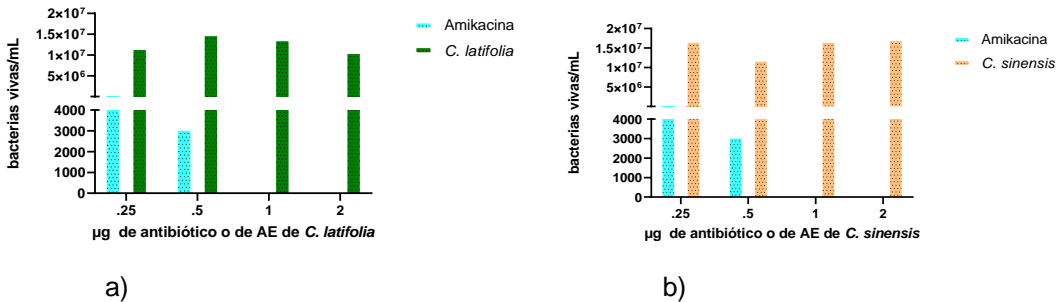
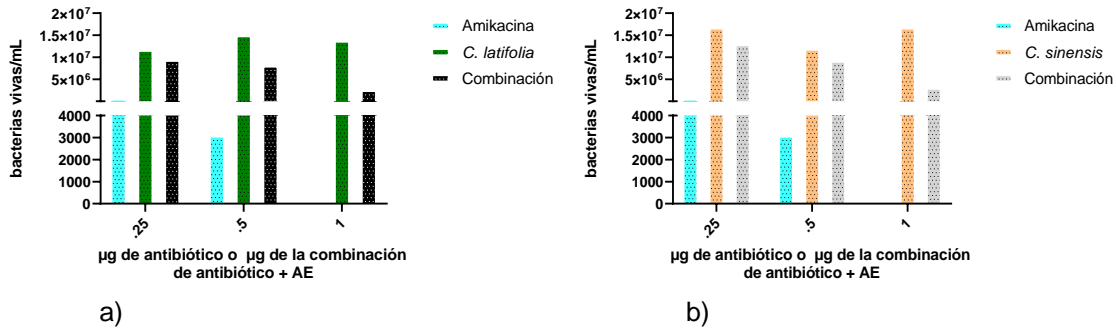


Figura 21. Efecto de los AE's de *C. latifolia* y *C. sinensis* frente a *E. coli*. a) µg del AE de *C. latifolia* vs bacterias vivas/mL, b) µg del AE de *C. sinensis* vs bacterias vivas/mL. Los AE's no presentan actividad antibacteriana frente a esta cepa.

En la figura 22, se muestra en el eje de las abscisas las concentraciones evaluadas de la combinación antibiótico (1 µg/mL de amikacina) + AEs (*C. latifolia* (0.25-1 µg/mL) y *C. sinensis* (0.25-1 µg/mL) y en el eje de las ordenadas el número de bacterias vivas/mL. Al igual que por la técnica de citometría, una disminución del efecto antibacteriano de amikacina en combinación con cada uno de los AE's es también observada por el método de cuenta viable.



**Figura 22. Efecto de la combinación de los AE's + antibiótico frente a *E. coli*. a) µg del AE de *C. latifolia* vs bacterias vivas/mL, b) µg del AE de *C. sinensis* vs bacterias vivas/mL. Se observa una disminución del efecto antibacteriano de amikacina en combinación con cada uno de los AE's frente a esta cepa.**

## 7. Discusión

Un diagnóstico rápido y fiable es una estrategia clave para reducir la prescripción inapropiada de antibióticos, causa principal de la resistencia antibacteriana [44]. Los métodos estándar de evaluación de sensibilidad antibacteriana requieren de tiempos prolongados (24 h-1mes) para la obtención de resultados. Debido a ello, se han desarrollado diferentes técnicas que generan resultados equiparables a los obtenidos por los métodos estándar, pero en menor tiempo, como los obtenidos por la técnica de citometría de flujo (6h-16h), que consiste en la evaluación de viabilidad bacteriana utilizando fluorocromos que proporcionan información de diferentes parámetros bacterianos. Se han desarrollado distintos protocolos de tinción, entre ellos la tinción doble entre SYTO9 y PI, que por varios años se fue generalizando su empleo entre los investigadores por su procesamiento rápido. Sin embargo, detectamos algunas limitaciones como: la observación de una región de estados intermedios denominada por el kit “población desconocida” [45] cuando se realiza la contratinción por citometría de flujo (figura 11) y una fluorescencia amarilla por microscopía de fluorescencia (figura 14), específicamente en los tratamientos realizados con cefotaxima e isopropanol en *E. coli*, debido a la retención de ambos fluorocromos durante el proceso dinámico de unión, liberación y competencia por los sitios de unión de ellos [45], y aumento de la fluorescencia verde por absorción de la emisión de SYTO9 por PI cuando la concentración de SYTO9 no es la óptima, proceso denominado transferencia de energía de fluorescencia (FRET) [46].

El PI es un fluoróforo con afinidad a DNA y RNA que atraviesa únicamente las membranas permeables de las bacterias y que al combinarse con otro fluoróforo que penetra membranas intactas, permite dar un recuento celular global. Por lo anterior, la tinción dual SYTO 9/PI sigue siendo sumamente utilizada en diferentes áreas para evaluar actividad antibacterial. Sin embargo, su rendimiento y efectividad aún no están claros, ni tampoco los efectos causados a la fisiología bacteriana. Diversos factores deben tomarse en cuenta para la correcta utilización de esta tinción dual como, afinidad de unión del colorante a la célula en cuestión, el estado fisiológico de ésta, la concentración del colorante, temperatura y tiempo de incubación. Se sabe por ejemplo que *E. coli* es más resistente a la penetración de SYTO 9 que una bacteria gram negativa debido a las características de la membrana celular. Estudios previos ha demostrado que SYTO 9 penetra de forma continua a la célula

y PI lo hace por citoadherencia continua y que las propiedades de la membrana pueden alterarse con altas concentraciones de estos colorantes. Por otro lado, falsas señales de mortalidad celular por del PI pueden presentarse como resultado de un alto potencial de membrana, esto puede no correlacionarse con los cultivos debido al estado viable pero no cultivable de las bacterias (VBNC). Por lo que tomar en cuenta estos factores es de suma importancia para la correcta obtención e interpretación de los resultados obtenidos [46].

Además, la retención de fluorocromos durante el proceso dinámico de unión, liberación y competencia para los sitios de unión del ADN [45] y el consiguiente aumento de la absorción de fluorescencia verde por PI (transferencia de energía de fluorescencia o FRET) en concentraciones subóptimas, podría afectar a cualquiera de los fluorocromos o señales de fondo. Por lo tanto, una proporción adecuada entre los fluorocromos y con el contenido de ADN podría minimizar dicha interferencia [46].

Por otra parte, un porcentaje menor al 80% de bacterias muertas fue observado en las concentraciones más altas de amikacina evaluadas en *E. coli* por citometría de flujo (figura 16), causando la no obtención de la CMI por esta técnica, que pudo deberse a un tiempo prolongado de exposición al antibiótico. Por ello, es necesario realizar curvas de tiempo-mortalidad, obteniendo el tiempo de incubación óptimo donde el antibiótico genere su efecto bacteriostático sin que genere toxicidad provocando la obtención de detritus bacterianos.

Como se mencionó previamente, se observaron filamentos en el rango de concentraciones de 0.0015-0.48 µg/mL de cefotaxima evaluadas (figura 13 y 14), que es una respuesta inicial por parte de *E. coli* ATCC 25922 a este antibiótico cuando la proteína PBP3, involucrada en el entrecruzamiento del peptidoglucano durante la división celular, es inhibida; proceso observado por Kjeldsen *et al* en cepas de *E. coli* MG1655 [43]. Estudios previos han demostrado que *sulA* y *capR* también están involucrados en la filamentación de *E. coli*. Además, Miller *et al.* [47] demostró que los promotores SOS (*recA*, *lexA* y *dpiA*) están involucrados en la inhibición de la división celular [43].

Se ha especulado que la producción de filamentos en cepas resistentes se debe a que cefotaxima se une inicialmente a PBP3, induciendo la producción de filamentos. Sin embargo, cuando CTX-M-1 comienza a producirse en altas cantidades, el antibiótico es hidrolizado y no es capaz de unirse a PBP3 más [43].

Por otro lado, los resultados obtenidos de la evaluación de susceptibilidad antibacteriana en *E. coli* ATCC 25922 frente a los AEs de *C. latifolia* y *C. sinensis*, en el rango de concentraciones de 0.25-4 µg/mL, a las condiciones de incubación de 3h a 37°C y 70 rpm, por la técnica de citometría de flujo (figura 17) y el método de cuenta viable (figura 21); mostraron que los AEs no presentan actividad antibacteriana frente a esta cepa. Sin embargo, Frassinetti *et al.* [22] ha demostrado la actividad antibacteriana del AE de *C. sinensis* frente a *E. coli* a través de la medición de la densidad óptica obteniendo una reducción >90% de la absorbancia a la concentración de 25 µg/mL, concluyendo que probablemente el tiempo de exposición de *E. coli* a los AEs, podría ser un factor determinante para poder observar la actividad antibacteriana de estos. Pues aún en concentraciones de 96 µg/mL, 8720 µg/mL y 0.872 g/mL del AE de *C. latifolia* y 96 µg/mL y 0.842 g/mL del AE de *C. sinensis* no se observó un porcentaje ≥80% de bacterias muertas.

La mayoría de las propiedades biológicas de los AEs del género *Citrus* han sido atribuidas a limoneno, uno de sus principales componentes. Aunque, se ha observado que existe una discrepancia entre el contenido de limoneno y la actividad antibacteriana de los AEs. Por ejemplo, el AE de *Citrus sinensis* Osbeck cv. Newhall, que presenta a limoneno como principal componente (85.32%), a concentraciones de 1.56 µL/mL, 0.78 µL/mL, 1.56 µL/mL y 3.13 µL/mL, mostró un efecto antibacteriano contra *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), *E. coli*, *B. subtilis* y *S. aureus*; respectivamente. Sin embargo, cuando limoneno fue evaluado individualmente, generó valores de CMI de 15.68 µL/mL y 3.92 µL/mL, respectivamente. Además, observaron que componentes que coexisten en este AE en menor porcentaje, tales como α-pineno, linalool, decanal, terpineol, citral y nonanal, presentaron mayor actividad que limoneno [48].

Factores como son composición, grupos funcionales presentes en los componentes activos y sus interacciones sinérgicas, serán determinantes en la actividad de los AEs, pues se ha demostrado que el efecto que los componentes tienen individualmente difiere del que presentan cuando se encuentran en combinación con otros componentes del AE, ya que cada componente ejerce un mecanismo de acción diferente en la bacteria, razón principal por la que los AE están siendo propuestos como nuevos compuestos antibacterianos dado que sería más difícil para la bacteria generar resistencia a ellos [48].

Por otra parte, una disminución de la actividad de amikacina contra *E. coli* fue observada en las evaluaciones realizadas de la combinación de los AEs de *C. latifolia* y *C. sinensis* y antibiótico, que pudo deberse a la alteración de la solubilidad de amikacina, por la presencia de componentes hidrofóbicos como: D-limoneno,  $\beta$ -thujene,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -mirceno y  $\gamma$ -terpineno. Se ha determinado la solubilidad de amikacina en agua siendo esta de 50 mg/mL y de <1 mg/mL en DMSO (disolvente de los AE) [49], indicándonos que disminuye la solubilidad de amikacina en presencia de solventes orgánicos, tales como los presentes en los AE de *C. latifolia* y *C. sinensis*.

La evaluación de susceptibilidad antibacteriana mediante la técnica de citometría de flujo presenta ciertas limitantes, tales como: el acceso al equipo y el costo de los kits de evaluación de viabilidad bacteriana. Aunque actualmente existen diversos sistemas automatizados para la evaluación de susceptibilidad antibacteriana que proporcionan resultados en rangos de tiempo equiparables a lo de la técnica de citometría de flujo, que podrían ser menos costosos. Esta técnica presenta la ventaja que no solo determina la viabilidad de la bacteria a través de la reproducibilidad de está, sino que contempla parámetros como integridad de la membrana y actividad metabólica, permitiendo detectar bacterias en estado viable pero no cultivables (VBNC), las cuales siguen siendo virulentas y algún momento pueden comenzar a dividirse si se les provee las condiciones óptimas.

## 8. Conclusión

La técnica de citometría de flujo es una herramienta que puede ser utilizada para la evaluación de susceptibilidad bacteriana, pues ha demostrado resultados reproducibles comparados con la técnica de cuenta viable, pero en menor tiempo. Sin embargo, la investigación deben enfocarse en el desarrollo de nuevas opciones de tinción dual de viabilidad bacteriana, pues aún este campo ha sido muy poco explorado y tinciones existentes no han sido del todo estandarizadas y presentan aun ciertas limitaciones, tal es el caso de la tinción dual SYTO9/PI (tinción dual SYTO9/PI), donde la fiabilidad de sus resultados se ha visto comprometida debido a que no es capaz de discriminar entre células bacterias viables y no viables debido al desplazamiento de la población de bacterias (vivas y muertas) hacia la región de “población desconocida”, denominada así por el kit, por retención de ambos fluorocromos por parte de la bacteria

Por otro lado, un porcentaje menor al 80% de bacterias muertas fue observado en las concentraciones más altas de amikacina evaluadas en *E. coli* por citometría de flujo (figura 16), causando la no obtención de la CMI por la técnica de citometría de flujo, que pudo deberse a un tiempo prolongado de exposición al antibiótico.

Los AEs de *C. latifolia* y *C. sinensis* no presentan actividad antibacteriana frente a *E. coli* a las condiciones de evaluación, que puede deberse a que el tiempo de exposición de *E. coli* a los AEs no fue suficiente para que los estos generarán su actividad.

Además, presentan un efecto antagónico contra amikacina, que puede deberse a la modificación de la solubilidad de amikacina, por la presencia de componentes orgánicos como: D-limoneno,  $\beta$ -thujene,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -mirceno y  $\gamma$ -terpineno.



## 9. Perspectivas

Se ha observado que utilizando SYTO9 a una concentración de 2.5 mM y PI a 9.0 mM, disminuye la probabilidad de que se promueva la transferencia de energía por parte de PI a SYTO9 y que la bacteria retenga ambos fluorocromos, aumentado así la fiabilidad de los resultados obtenidos utilizando la tinción dual, se propone la realización de la evaluación de susceptibilidad antibacteriana utilizando los fluorocromos en estas concentraciones.

Se ha desarrollado el kit “Redox Sensor” compuesto por el reagente “RedoxSensor™ Green” y el fluorocromo PI, está basado en la evaluación de la actividad reductasa y de permeabilidad de membrana, que ha sido evaluado por Molecular Probes en diversas especies de bacterias, tales como: *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium phlei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. syringae*, *Salmonella oranienburg*, *Serratia marcescens*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes* y ha demostrado una buena correlación con los resultados obtenidos por el método de microdilución. Aunque, aún no hay publicaciones donde utilicen este kit para la evaluación de susceptibilidad bacteriana. Este kit tiene la ventaja de que ya no habría competencia por parte de los fluorocromos por el mismo sitio blanco (DNA).

Se ha demostrado que el AE de *Citrus sinensis* Osbeck cv. Newhall presentan actividad antibacteriana frente a las siguientes cepas: *X. campestris* pv citri NCPPB 3236, *X. campestris* pv citri NCPPB 3562, *X. campestris* pv citri NCPPB 3832, *E. coli* ATCC 10536, *E. coli* ATCC 25922, *S. choleraesuis* ATCC 14028, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212 y *E. aerogenes* ATCC 13048, se propone evaluar nuevamente el AE's de *C. latifolia* ya sea por el método de microdilución o por la técnica estandarizada de citometría de flujo, pues además de que limoneno están en menor porcentaje (que se ha observado que tiene baja actividad antibacteriana) tiene presente compuestos oxigenados, que han demostrado tener mayor actividad antibacteriana que los compuestos hidrocarbonados.

## 10. Referencias

1. Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and therapeutics*, 40(4), 277.
2. Swamy, M. K., Akhtar, M. S., & Sinniah, U. R. (2016). Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016.
3. Yap, P. S. X., Yiap, B. C., Ping, H. C., & Lim, S. H. E. (2014). Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *The open microbiology journal*, 8, 6.
4. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
5. Arce, A., & Soto, A. (2008). Citrus essential oils: Extraction and deterpenation. *Tree and Forestry Science and Biotechnology*, 2(1), 1-9.
6. Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451-1474.
7. Raut, J. S., & Karuppayil, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial crops and products*, 62, 250-264.
8. Costa, R., Bisignano, C., Filocamo, A., Grasso, E., Occhiuto, F., & Spadaro, F. (2014). Antimicrobial activity and chemical composition of Citrus aurantifolia (Christm.) Swingle essential oil from Italian organic crops. *Journal of Essential Oil Research*, 26(6), 400-408.
9. An, B. S., Kang, J. H., Yang, H., Jung, E. M., Kang, H. S., Choi, I. G., ... & Jeung, E. B. (2013). Anti-inflammatory effects of essential oils from Chamaecyparis obtusa via the cyclooxygenase-2 pathway in rats. *Molecular medicine reports*, 8(1), 255-259
10. Okello, E. J., Dimaki, C., Howes, M. J. R., Houghton, P. J., & Perry, E. K. (2008). In vitro inhibition of human acetyl- and butyryl-cholinesterase by Narcissus poeticus L. (Amaryllidaceae) flower absolute. *International Journal of Essential Oil Therapeutics*.
11. Pandini, J. A., Pinto, F. G. S., Scur, M. C., Santana, C. B., Costa, W. F., & Temponi, L. G. (2017). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant potential of the essential oil of Guarea kunthiana A. Juss. *Brazilian Journal of Biology*, 78, 53-60.
12. Lopez-Romero, J. C., González-Ríos, H., Borges, A., & Simões, M. (2015). Antibacterial effects and mode of action of selected essential oils components against Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.
13. Kummer, R., Fachini-Queiroz, F. C., Estevão-Silva, C. F., Grespan, R., Silva, E. L., Bersani-Amado, C. A., & Cuman, R. K. N. (2013). Evaluation of anti-inflammatory activity of Citrus latifolia Tanaka essential oil and limonene in experimental mouse models. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
14. Fadli, M., Saad, A., Sayadi, S., Chevalier, J., Mezrioui, N. E., Pagès, J. M., & Hassani, L. (2012). Antibacterial activity of Thymus maroccanus and Thymus broussonetii essential oils against nosocomial infection—bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine*, 19(5), 464-471.

15. Bassolé, I. H. N., & Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17(4), 3989-4006.
16. Hsouna, A. B., Halima, N. B., Smaoui, S., & Hamdi, N. (2017). Citrus lemon essential oil: chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in minced beef meat. *Lipids in health and disease*, 16(1), 1-11.
17. Narang, N., & Jiraungkoorskul, W. (2016). Anticancer activity of key lime, *Citrus aurantifolia*. *Pharmacognosy reviews*, 10(20), 118.
18. Chaudhari, S. Y., Ruknuddin, G., & Prajapati, P. (2016). Ethno medicinal values of Citrus genus: A review. *Medical Journal of Dr. DY Patil University*, 9(5), 560.
19. Jafarzadeh, M., Arman, S., & Pour, F. F. (2013). Effect of aromatherapy with orange essential oil on salivary cortisol and pulse rate in children during dental treatment: A randomized controlled clinical trial. *Advanced biomedical research*, 2.
20. Galaverna, G., & Dall'Asta, C. (2014). Production processes of orange juice and effects on antioxidant components. In *Processing and impact on antioxidants in beverages* (pp. 203-214). Academic Press.
21. Frassinetti, S., Caltavuturo, L., Cini, M., Della Croce, C. M., & Maserti, B. E. (2011). Antibacterial and antioxidant activity of essential oils from Citrus spp. *Journal of Essential Oil Research*, 23(1), 27-31.
22. Singh, P., Shukla, R., Prakash, B., Kumar, A., Singh, S., Mishra, P. K., & Dubey, N. K. (2010). Chemical profile, antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity of Citrus maxima Burm. and Citrus sinensis (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. *Food and Chemical Toxicology*, 48(6), 1734-1740.
23. Ruiz-Pérez, N. J., González-Ávila, M., Sánchez-Navarrete, J., Toscano-Garibay, J. D., Moreno-Eutimio, M. A., Sandoval-Hernández, T., & Arriaga-Alba, M. (2016). Antimycotic activity and genotoxic evaluation of Citrus sinensis and Citrus latifolia essential oils. *Scientific reports*, 6(1), 1-9.
24. Toscano-Garibay, J. D., Arriaga-Alba, M., Sánchez-Navarrete, J., Mendoza-García, M., Flores-Estrada, J. J., Moreno-Eutimio, M. A., ... & Ruiz-Pérez, N. J. (2017). Antimutagenic and antioxidant activity of the essential oils of Citrus sinensis and Citrus latifolia. *Scientific reports*, 7(1), 1-9.
25. Guerra, F. Q. S., Mendes, J. M., Sousa, J. P. D., Morais-Braga, M. F., Santos, B. H. C., Melo Coutinho, H. D., & Lima, E. D. O. (2012). Increasing antibiotic activity against a multidrug-resistant *Acinetobacter* spp by essential oils of Citrus limon and Cinnamomum zeylanicum. *Natural product research*, 26(23), 2235-2238.
26. Encyclopedia of Life. Recuperado de: [goo.gl/Aebs3z](http://goo.gl/Aebs3z)
27. Favela-Hernández, J. M. J., González-Santiago, O., Ramírez-Cabrera, M. A., Esquivel-Ferriño, P. C., & Camacho-Corona, M. D. R. (2016). Chemistry and pharmacology of Citrus sinensis. *Molecules*, 21(2), 247.
28. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2017) M100: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.

29. Puttaswamy, S., Gupta, S. K., Regunath, H., Smith, L. P., & Sengupta, S. (2018). A comprehensive review of the present and future antibiotic susceptibility testing (AST) systems. *Arch Clin Microbiol*, 9.
30. Zhu, C., Liu, Y., Hu, L., Yang, M., & He, Z. G. (2018). Molecular mechanism of the synergistic activity of ethambutol and isoniazid against *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 293(43), 16741-16750.
31. Kumar, S. S., & Ghosh, A. R. (2019). Assessment of bacterial viability: a comprehensive review on recent advances and challenges. *Microbiology*, 165(6), 593-610.
32. Shapiro, H. M. (1985). Practical Flow Cytometry, Chap 4. *New York: Alan R. Liss*.
33. Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical reviews in biotechnology*, 37(2), 163-176.
34. Safford, H. R., & Bischel, H. N. (2019). Flow cytometry applications in water treatment, distribution, and reuse: A review. *Water research*, 151, 110-133.
35. Léonard, L., Bouarab Chibane, L., Ouled Bouhedda, B., Degraeve, P., & Oulahal, N. (2016). Recent advances on multi-parameter flow cytometry to characterize antimicrobial treatments. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1225.
36. De Sousa, D. P. (2011). Analgesic-like activity of essential oils constituents. *Molecules*, 16(3), 2233-2252.
37. Thornton, R., Godfrey, W., Gilmour, L., & Alsharif, R. (2002). Evaluation of yeast viability and concentration during wine fermentation using flow cytometry. *BD Biosciences www.bdbiosciences.com*.
38. Silva, F., Ferreira, S., Queiroz, J. A., & Domingues, F. C. (2011). Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. *Journal of medical microbiology*, 60(10), 1479-1486.
39. Saint-Ruf, C., Crussard, S., Franceschi, C., Orenca, S., Ouattara, J., Ramjeet, M., ... & Matic, I. (2016). Antibiotic susceptibility testing of the gram-negative bacteria based on flow cytometry. *Frontiers in microbiology*, 7, 1121.
40. Broeren, M. A. C., Maas, Y., Retera, E., & Arents, N. L. A. (2013). Antimicrobial susceptibility testing in 90 min by bacterial cell count monitoring. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(3), 286-291.
41. Stiefel, P., Schmidt-Emrich, S., Maniura-Weber, K., & Ren, Q. (2015). Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. *BMC microbiology*, 15(1), 1-9.
42. Probes, M. (2004). LIVE/DEAD BacLight bacterial viability kits. *Fluorescence Spectroscopy Protocols. Staining Bacteria with either Kit L7007 or L, 7012*.
43. Kjeldsen, T. S., Sommer, M. O., & Olsen, J. E. (2015). Extended spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* forms filaments as an initial response to cefotaxime treatment. *BMC microbiology*, 15(1), 1-6.
44. Robertson, J., McGoverin, C., Vanholsbeeck, F., & Swift, S. (2019). Optimisation of the protocol for the LIVE/DEAD® BacLight™ bacterial viability kit for rapid determination of bacterial load. *Frontiers in microbiology*, 10, 801.

45. Berney, M., Hammes, F., Bosshard, F., Weilenmann, H. U., & Egli, T. (2007). Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry. *Applied and environmental microbiology*, 73(10), 3283-3290.
46. Deng, Y., Wang, L., Chen, Y., & Long, Y. (2020). Optimization of staining with SYTO 9/propidium iodide: interplay, kinetics and impact on *Brevibacillus brevis*. *BioTechniques*, 69(2), 88-98.
47. Miller, C., Thomsen, L. E., Gaggero, C., Mosseri, R., Ingmer, H., & Cohen, S. N. (2004). SOS response induction by  $\beta$ -lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science*, 305(5690), 1629-1631.
48. Guo, Q., Liu, K., Deng, W., Zhong, B., Yang, W., & Chun, J. (2018). Chemical composition and antimicrobial activity of Gannan navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck cv. Newhall) peel essential oils. *Food science & nutrition*, 6(6), 1431-1437.
49. LKT Labs. Amikacin disulfate. Minnesota, EU: [shorturl.at/guA12](http://shorturl.at/guA12)