

LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA  
EN LA UNIVERSIDAD NACIONAL  
DE SANTIAGO DEL ESTERO Y  
SUS APORTES A LA SOCIEDAD VOL. II

MIGUEL A. SARMIENTO, SUSANA I. HERRERA,  
MAXIMILIANO C. D. BUDAN, MARÍA J. BENAC,  
MELCHOR E. LUQUE, MARCELA E. TERRIBILE,  
MARTA E. GUTIÉRREZ, MARCIA B. RIZZO PATRON  
(COMPILADORES)



**UNSE**

Universidad Nacional  
de Santiago del Estero

# APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE *ALOYSIA POLYSTACHYA* (BURRITO). ACTIVIDAD INSECTICIDA Y ANTIMICROBIANA

VALERIA TAPIA MATTAR<sup>1</sup>, ANAHÍ BORDÓN<sup>2</sup>, ANDREA CUTRÓ<sup>2,3</sup>,  
AXEL HOLLMANN<sup>2,4</sup>, SERGIO RODRÍGUEZ<sup>1</sup>

## Resumen

El objetivo del presente trabajo es evaluar las potenciales aplicaciones biotecnológicas del aceite esencial (AE) obtenido de las hojas de *Aloysia polystachya*. Para ello se caracterizó su

1 CONICET, Instituto de Ciencias Químicas, Facultad de Agronomía y Agroindustrias, Universidad Nacional de Santiago del Estero, RN 9 km 1125, 4206 Santiago del Estero, Argentina.

2 Laboratorio de Compuestos Bioactivos, Centro de Investigación en Biofísica Aplicada y Alimentos (CIBAAL), CONICET, Universidad Nacional de Santiago del Estero, RN 9 km 1125, 4206 Santiago del Estero, Argentina.

3 Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Santiago del Estero, Calle Reforma del 18 N° 1234, 4200 Santiago del Estero, Argentina.

4 Laboratorio de Microbiología Molecular, Instituto de Microbiología Básica y Aplicada, Universidad Nacional de Quilmes, Roque Sáenz Peña 352, B1876BXD Bernal, Argentina.

composición química y se evaluaron sus propiedades antimicrobianas, repelentes e insecticidas. Se identificaron veintiún compuestos, siendo Carvona y Limoneno los mayoritarios. El AE posee actividad insecticida y repelente contra *Rhipibruchus picturatus*, principal plaga del algarrobo blanco. Por otro lado, se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM) del AE, encontrando acción bactericida contra *Escherichia coli* y acción bacteriostática contra *Staphylococcus aureus*. Además, se evaluó el comportamiento de inhibición del crecimiento y curvas de muerte, para una mejor caracterización de la acción antibacteriana. En cuanto al mecanismo de acción, se evaluaron los efectos en la membrana bacteriana de ambas bacterias, observándose un incremento de la permeabilidad de las mismas. Finalmente, se observó que el AE logra inhibir la formación y erradicación de biofilms de ambas bacterias.

**Palabras claves:** Biopesticidas, antimicrobianos, productos naturales, volátiles

## 1. Introducción general

Las plantas pueden ser consideradas como fábricas de compuestos químicos. Dentro de las sustancias químicas que producen, revisten de particular interés los compuestos orgánicos de bajo peso molecular conocidos como metabolitos secundarios. El rol de estos metabolitos en el metabolismo básico de las plantas aún no está claramente elucidado, pero sí se sabe que cumplen funciones complementarias (Gallego & Benavides, 2022). Las plantas aromáticas, en particular, tienen la capacidad de sintetizar mezclas complejas de estos metabolitos secundarios (Sánchez Moreno, 2017; Wińska et al., 2019).

Aplicando procesos de extracción, tanto fisicoquímicos

como mecánicos, en diferentes órganos de las plantas, pueden obtenerse estos compuestos en forma de aceites esenciales (AE). Los AE no son compuestos puros, sino mezclas de varios metabolitos secundarios como terpenos y sus derivados oxigenados; y fenilpropanoides (Wińska et al., 2019), que se encuentran en distintas proporciones y que en conjunto le otorgan a dichos aceites sus propiedades características (Ortuño Sánchez, 2006). Dentro de las cuales cuentan su baja solubilidad en medio acuoso, alta solubilidad en sustancias hidrofóbicas (grasas, alcohol, solventes orgánicos, entre otras) y bajo punto de fusión, encontrándose generalmente en estado líquido a temperatura ambiente. Cabe destacar que la composición del AE, puede variar por múltiples factores que afectan a las plantas, como por ejemplo; condiciones climáticas, tipo de suelo, estado nutricional y fisiológico de la planta, factores estresantes de tipo bióticos y abióticos, entre otros (Cutro et al., 2019). Dentro de las actividades biológicas descritas para los AEs (Do Nascimento et al., 2020), se encuentran:

1. Actuar como atrayentes de polinizadores y dispersores de semillas (Azcón- Bieto & Talón, 2008). Por ejemplo, metabolitos volátiles como el metileugenol son producidos y emitidos por los órganos de las flores, tales como el estigma y pétalos de *Clarkia breweri* (Wang & Pichersky, 1998) cuando la flor está receptiva para la polinización (Pino Alea, 2015).
2. Presentar actividad anti herbivoría. Por ejemplo, atraer a los enemigos naturales de los herbívoros atacantes, tales como avispas, moscas o ácaros, los cuales pueden proteger a la planta de daños causados por los herbívoros (Drukker et al, 2020; Kessler & Baldwin, 2001; Paré & Tumlinson, 1997; Pino Alea, 2015)
3. Presentar actividades antimicrobianas. Compuestos tales como timol, carvacrol y eugenol, que son fenilpropanoides y terpenos; poseen excelentes actividades antibacterianas (inclusive antibiofilms) y antifúngicas (Abbaszadeh, Sharifza-

deh, Shokri, Khosravi, & Abbaszadeh, 2014; Marchese et al., 2016; Memar, Raei, Alizadeh, Aghdam, & Kafil, 2017; Numpaque, Oviedo, Gil, García, & Durango, 2011; Pino Alea, 2015; Shaaban, El-Ghorab, & Shibamoto, 2012). Otros ejemplos, son las fitoalexinas como la cumarina, que posee actividad antimicrobiana y actividad *antiquorum* (Reen et al, 2018).

4. Permitir relaciones ecológicas, en las que la planta productora de estos metabolitos secundarios puede establecer alguna relación con otros organismos de su entorno. Como en el caso del establecimiento de aleopatías que influyan en el crecimiento o reproducción de otras plantas (Azcón- Bieto & Talón, 2008). Esto se reportó para el AE aislado de la especie *Rhynchosia mínima*, el cual mostró acción inhibitoria significativa ante la germinación de dos malezas (*Dactyloctenium aegyptium* y *Rumex dentatus*). (Ahmed M. Abd El-Gawad et al, 2018)

5. Presentar actividad insecticida. Ciertos constituyentes de los AE pueden actuar como agentes insecticidas para el control de diferentes plagas. (Liu et al., 2021; Mattar, Borioni, Hollmann, & Rodriguez, 2022).

Estas actividades biológicas han suscitado una creciente atención sobre los AE para diferentes aplicaciones biotecnológicas como agentes antimicrobianos e insecticidas, entre otros.

*Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae), también conocida como "burrito", "poleo de castilla" o "poleo riojano"; es un arbusto ampliamente distribuido en las regiones subtropicales de Sudamérica, especialmente, en Paraguay y Argentina (Figura 1). Este arbusto crece naturalmente en las provincias del Noroeste Argentino (Berardi, 2012). Posee hojas aromáticas cuya decocción es utilizada para fines medicinales tales como: trastornos gastrointestinales; dolor, náuseas, vómitos, dispepsia y gastritis (V. S. Benzi, Murray et al 2009; O'Leary et al, 2016; Werdin González et al, 2010). Las hojas también son utilizadas para saborizar el mate o el tereré (Pas-

sicot, Cabral et al, 2010). Esta planta puede ser encontrada en forma silvestre o domesticada en huertas y jardines. La misma puede crecer en suelos arenosos (O’Leary et al., 2016) aunque, se adapta fácilmente a los cambios del suelo y se pueden realizar trasplantes por medio de esquejes. Este arbusto aromático de 1 a 3 metros de altura (Berardi, 2012), se distingue fácilmente de las demás especies por poseer hojas alternas de hasta 5 cm de largo (O’Leary et al., 2016) que presentan un aroma a limón al ser estrujadas (Sánchez de Lorenzo Cáceres, 2020). Con respecto a su floración comienza en época de primavera y verano; siendo sus flores blancas muy pequeñas y sésiles (Atkins, 2004) que contribuyen a su aroma característico. Se han reportado para esta planta actividades antimicrobianas e insecticidas que serán desarrolladas en las siguientes secciones de este capítulo.



Figura 1. Imágenes de la planta de *A. Polystachya*.

En este contexto, el objetivo general de este trabajo fue la obtención, caracterización química y evaluación de la acción insecticida y antimicrobiana del AE aislado de la especie *Aloysia polystachya* localizada en Santiago del Estero.

## 2. Obtención y caracterización de la composición química del AE

El AE de *Aloysia polystachya* se obtuvo de muestras de hojas recolectadas en Villa El Zanjón, Santiago del Estero, Argentina (27° 52'21.5" S 64° 14'33.2" W). Estas muestras fueron secadas al aire durante 24 h. El AE se obtuvo en lotes de 200 g de hojas secas empleando un hidrodestilador durante 4 horas. El AE se extrajo con diclorometano y se secó con sulfato de sodio anhidro. El solvente orgánico se removió por corriente de nitrógeno y el AE se refrigeró hasta su uso (Figura 2). El rendimiento de extracción del AE fue de  $0.83 \pm 0.02$  % p/p.

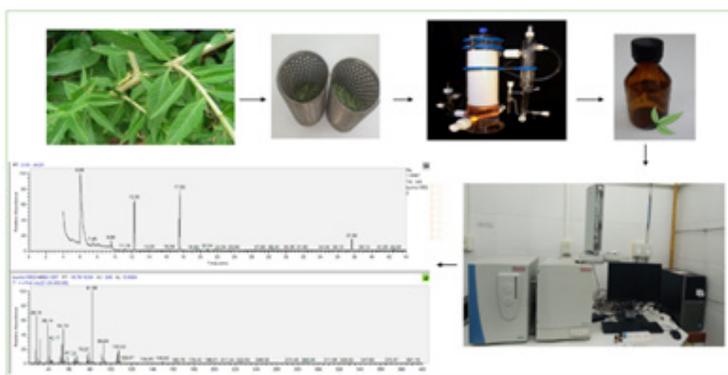
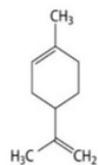
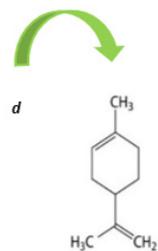
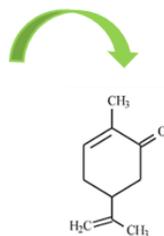


Figura 2. Obtención y caracterización química del AE de hojas de *A. Polystachya*.

La composición química del AE fue determinada mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) usando un cromatógrafo Thermo Scientific Focus GC acoplado con un detector de masas de ionización por impacto electrónico DSQ II. Los compuestos se identificaron comparando sus índices de retención (índices de Kovats) con los de compuestos conocidos y también comparando sus espectros de masas con los almacenados en las bases de datos de la biblioteca NIST08. Se identificaron veintinueve compuestos, siendo la Carvona (60,78%) y el Limoneno (34,10%) los mayoritarios (Tabla 1).

Compuestos <sup>a</sup>	RI <sup>b</sup>	Área % <sup>c</sup>
$\alpha$ -Pinoeno	931	0.01
$\beta$ -Pinoeno	979	0.50
$\beta$ -Mirceeno	990	1.39
Limonoeno	1030	34.10
$\beta$ -Linalool	1106	0.40
Myrtenol	1180	0.00
Oxido de Limonoeno	1144	0.13
p-Menta-2,8-dien-1-ol	1149	0.10
Citronelal	1160	0.11
Carvona	1271	60.78
$\alpha$ -Terpineol	1211	0.71
Verbenona	1217	0.10
Carveol	1255	0.45
Camfor	1135	0.25
$\alpha$ -Copaeno	1372	0.10



Cedreno	1393	0.09
$\beta$ -Bourboneno	1397	0.17
$\beta$ -Cariofileno	1446	0.14
$\alpha$ -Cariofileno	1483	0.21
$\alpha$ -Curcumene	1502	0.17
Zingibereno	1515	0.11

<sup>a</sup> Identificación de compuestos basada en RI, biblioteca NIST 08 y bibliografía.

<sup>b</sup> RI, índices de retención lineal experimental en columna TR5-ms.

<sup>c</sup> Valor medio de tres experimentos independientes. Desviación estándar menor al 10%.

<sup>d</sup> Estructuras químicas de los componentes mayoritarios del AE de hojas de *A. polystachya*.

**Tabla 1.** Composición química del AE extraído de hojas de *A. polystachya*

Como se mencionó, la composición química de los AE varía considerablemente dependiendo de la ubicación geográfica de la especie, condiciones climáticas, grado de madurez de las especies vegetales y diferencias intraespecíficas (Fang et al., 2010; Hsu & Chen, 2020; Nerio et al, 2010)

A continuación, se muestran los compuestos químicos mayoritarios reportados del AE de hojas de *A. polystachya* recolectadas en diferentes localizaciones geográficas (Tabla 2):

Lugar de recolección	Compuestos identificados				Referencias
	Carvona	Limoneno	$\alpha$ -Tujona	Sabineno	
Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina	83,5 %	16,5 %	-	-	(González et al, 2010)
Río Negro, Argentina	83,5 %	16,5 %			(V. S. Benzi et al., 2009)
Chaco, Argentina	78,9 %	14,2 %			(Pérez-Zamora et al., 2016)
Región de Valparaíso, Chile	91,03 %	4,1 %			(Moller et al., 2021)
Córdoba, Argentina	12 %		69 %		(Gleiser et al, 2011)
San Luis, Argentina			80 %	5,1 %	(Duschazky et al, 2004)
San Pablo, Brasil	77,9 %	18,4 %			(Edieidia et al., 2012)

Tabla 2: Compuestos mayoritarios del AE de hojas de *A. polystachya* reportados en diferentes regiones geográficas.

Los compuestos identificados que se muestran en la tabla 2 corresponden a monoterpenos hidrocarbonados (Limoneno y Sabineno) y a monoterpenos oxigenados (Carvona y  $\alpha$ -Tujona). Estos resultados muestran que la composición del AE del presente trabajo es similar a lo reportado por (Pérez-Zamora et al., 2016), en la provincia del Chaco. Así también, estos resultados concuerdan con la composición química del AE de las especies recolectadas en Río Negro, Bahía Blanca y Región de Valparaíso, en donde el compuesto mayoritario identificado fue Carvona, seguido de Limoneno. Por otra parte, (Gleiser et al., 2011) informó que el compuesto mayoritario identificado en el aceite

esencial de la especie recolectada en Córdoba fue  $\alpha$ -Tujona.

### 3. Control de insectos Plaga de Algarrobo Blanco

El algarrobo blanco (*Neltuma alba*) es una de las especies arbóreas nativas más conocidas y con mayor dispersión territorial del norte argentino. Su fruto, la algarroba, también conocida como vaina o chaucha, contiene alto contenido de proteínas e hidratos de carbono (Cattaneo et al., 2016). Esto las convierte en un recurso idóneo para la elaboración de alimentos derivados. Así, a partir del secado y molienda de las vainas, las familias de la región obtienen la harina de algarroba que permite elaborar todo tipo de panificados (panes, tortas y budines). Además, con las vainas se producen bebidas tradicionales como la añapa (una especie de licor), la aloja y el arrope (Abate & Ampofo, 1996). Esto favoreció al desarrollo de las economías regionales, ya que surgieron emprendimientos donde se fomenta la comercialización de productos con alto valor agregado derivados de la algarroba.

Todos los emprendimientos mencionados anteriormente comparten la problemática de la pérdida de la cosecha de algarroba a causa de insectos de la familia Bruchidae, conocidos comúnmente como brúquidos, los cuales se alimentan de las semillas de los algarrobos afectando de manera significativa la calidad de los frutos, siendo *Riphichubrus picturatus* K. su principal plaga (Figura 3). Normalmente, estos insectos realizan una ovoposición externa, la larva atraviesa el epi, meso y endocarpo, completando su ciclo dentro de la semilla hasta convertirse en pupa, para que posteriormente pueda emerger el adulto.



Figura 3. *Riphichubrus picturatus*

El control de estos insectos depende principalmente de la aplicación de insecticidas sintéticos, los cuales son dañinos para humanos y el ecosistema debido a su alta toxicidad y persistencia (Okwute, 2012).

Los insecticidas organofosforados, carbamatos y fosfina se utilizan ampliamente para proteger productos alimenticios almacenados contra la infestación de plagas de insectos (Cespedes et al., 2013). Entre otras desventajas, la aplicación descontrolada de estos insecticidas es causante de resistencia en las poblaciones de insectos (Dhaliwal et al., 2008). Los riesgos asociados al uso de estos productos promovieron el estudio de productos naturales para el desarrollo de nuevos insecticidas. Los conocimientos tradicionales indican claramente que las plantas están dotadas de propiedades que se pueden aprovechar a bajo costo para su uso en la agricultura. Así, los insecticidas de origen natural se proponen como alternativas racionales a las sintéticas y, entre los biopesticidas, los AE están creciendo rápidamente en el mercado (Regnault-Roger, Vincent et al, 2012).

Una de las ventajas de estos AE, es que debido a los múltiples sitios de acción en los cuales pueden actuar, tienen baja probabilidad de generar resistencia en los insectos (V. Benzi et al, 2014). Además, a diferencia de los insecticidas sintéticos, son biodegradables y, por lo tanto, amigables con el medioambiente (Adenubi, McGaw et al, 2018). Se demostró que los monoterpenos Limoneno, Carvona y  $\alpha$ -Tujona, encontrados en

diferentes aceites esenciales poseen notable actividad insecticida (Grodnitzky & Coats, 2002; Isman, 2000).

Se informó que el Limoneno posee un efecto insecticida significativo contra *Rhyzopertha dominica* (F.) y *Tribolium castaneum* (Herbst), plagas de productos alimeticios almacenados (harinas, granos, cereales, entre otros) (Liang et al., 2020; Prates et al., 1998). También resultó ser tóxico para los adultos de *Bemisia tabaci* Genn., plaga de cultivos como algodón y *Sitophilus zeamais* (Motsch), gorgojo del maíz, (Fang et al., 2010; Zarrad et al, 2015). Además, Carvona mostró toxicidad contra adultos de *S. zeamais*, *T. castaneum* y se demostró que (R)-Carvona posee efectos tóxicos contra *C. pipiens* (Shamsadin-Azad et al, 2019). Por su parte,  $\alpha$ -Tujona, mostró una fuerte actividad insecticida contra *Spodoptera exigua* Hübner, plaga polífaga (Hsu & Chen, 2020)

### 3.1 Actividad insecticida

En base a la problemática planteada, se estudió la actividad insecticida del AE A. de *Polystachya* frente a *Rhipibruchus picturatus* utilizando el método descrito por Herrera et al., 2015 (Figura 4). Las colonias de *R. picturatus* se establecieron a partir de vainas infestadas de algarrobo blanco. Se realizaron diluciones seriadas del AE en acetona, siendo las concentraciones evaluadas (1000; 500; 242; 200; 120,94 y 60,47)  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Luego, 200  $\mu\text{l}$  de cada dilución fueron aplicados a un papel de filtro ubicado en una placa de Petri de 9 cm de diámetro. Se agregaron 10 insectos en cada placa de Petri (N=5).

Como control se realizó el mismo experimento solo con acetona. La mortalidad se evaluó transcurridas las 24 horas, considerando muertos aquellos insectos que no presentaron movilidad luego de tocarlos con pizas. Los datos de concentración-mortalidad se sometieron un análisis Probit para determinar la concentración letal que provoca el 50% de mortali-

dad ( $LC_{50}$ ). Se determinó que el AE posee un efecto insecticida contra *R. picturatus* obteniéndose un valor de  $LC_{50}$  igual a  $99,61 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Además, se evaluó la actividad insecticida de los principales compuestos identificados en el AE. Para ello, Carvona y Limoneno se separaron y purificaron mediante cromatografía en columna y cromatografía en capa fina. Se determinó, mediante este ensayo de toxicidad por contacto, que ambos compuestos poseen actividad insecticida obteniéndose un valor de  $LC_{50}$  igual a  $51,21 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para Carvona y  $140,11 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para Limoneno.

Los valores obtenidos muestran que la actividad insecticida del AE estudiado, se debe principalmente a Carvona. Estos resultados son similares a los encontrados por (Fang et al., 2010), quien determinó una fuerte toxicidad por contacto de Carvona y Limoneno, contra *Sitophilus zeamais* y *T. castaneum*.



Figura 4. Ensayo de toxicidad por contacto

### 3.2 Actividad repelente del AE

Los compuestos volátiles pueden modificar el comportamiento de los insectos. Los repelentes son sustancias que actúan localmente o a distancia, disuadiendo a un insecto de volar, aterrizar o escalar en el área donde se aplicó el producto (Nerio et al., 2010). Para el ensayo de repelencia se utilizaron papeles de filtro de 5 cm de diámetro, los cuales se dividieron en dos mitades. Una mitad se impregnó con  $15 \mu\text{l}$  del AE diluido en acetona o con los compuestos puros (tratamiento) y la otra mitad solo con acetona (control) (Figura 5).

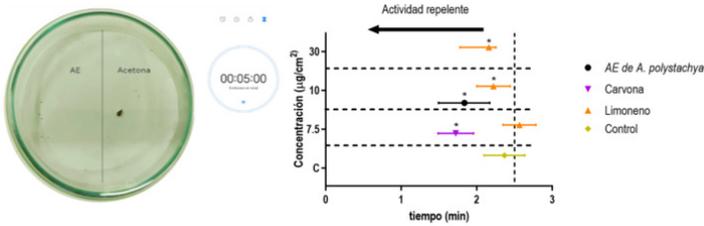


Figura 5. Ensayo de repelencia de dos opciones

El papel de filtro se colocó en la caja de Petri. Un insecto se liberó en el centro del papel se registró el tiempo de permanencia en cada zona durante 5 minutos. Este ensayo se repitió 60 veces. Los resultados obtenidos (Figura 5) mostraron que el AE, y los compuestos puros Carvona y Limoneno mostraron un efecto repelente frente a *R. picturatus*. Anteriormente, se reportó que el AE de hojas de *A. polystachya* posee actividad repelente frente a *T. castaneum* y *T. confusum*, así como también contra *A. aegypti* (V. Benzi et al., 2014; Gleiser et al., 2011). Además, Carvona mostró actividad repelente contra mosquitos y efectos sobre el sistema nervioso de insectos (Gonçalves et al., 2008; Omolo et al, 2004). Los resultados indican que el AE evaluado y sus compuestos puros son prometedoras fuentes de repelentes naturales contra *R. picturatus*.

Los resultados obtenidos demostraron que el AE posee un efecto insecticida contra *R. picturatus* a bajas concentraciones. Esta acción se debe principalmente a su compuesto mayoritario, Carvona. Asimismo, tanto el AE, como sus compuestos mayoritarios: Limoneno y Carvona mostraron repelencia en un ensayo de dos opciones. Es importante resaltar que este es el primer reporte sobre la actividad insecticida y repelente del AE de *A. polystachya* contra esta plaga. Como se mencionó, los AE tienen la ventaja, respecto de los insecticidas sintéticos, de mostrar una persistencia limitada en el medio ambiente, baja probabilidad de generar resistencia y baja toxicidad en vertebrados.

#### 4. Actividad antimicrobiana

El incremento de la presencia de bacterias resistentes a múltiples antibióticos (ATBs) representa un grave problema para la salud pública (Reid et al, 2020). Existen múltiples causas del incremento de la resistencia por parte de los microorganismos, entre ellas la inadecuada administración de los ATBs; el uso de ATBs en la agricultura, la prescripción de medicamentos inadecuada y la falta de diagnóstico. Debido a la presión selectiva de los ATBs, existe una predominancia de las cepas resistentes que eliminan las bacterias sensibles, volviendo predominantes. De este modo, el aumento de la resistencia antimicrobiana unido al poco desarrollo de nuevos ATBs llevó a la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas, así como a la revalorización de otras alternativas poco exploradas (Pacios et al., 2020).

En este contexto, los AE representan una alternativa para el control de microorganismos, existe un vasto registro bibliográfico de la actividad antibacteriana de muchos AE. Sin embargo, todavía no se logró un conocimiento detallado y acabado de sus mecanismos de acción para la mayoría de estos aceites. En el caso particular de *A. polystachya* existen pocas publicaciones que se reportaron la actividad antibacteriana de AE de esta especie (Arena et al, 2020; Edieidia et al., 2012; Pérez Zamora, 2016) y en ninguno de estos trabajos se indagan los posibles mecanismos por los cuales el AE ejerce su acción frente a estas bacterias.

En este contexto, se evaluó la actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, como modelos de bacteria gram negativa y gram positiva respectivamente, y se indagó sobre el rol de la membrana bacteriana como posible blanco de acción del AE de *A. polystachya*. Para ello, en primer lugar, se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de este AE frente a ambas bacterias mencionadas. Se en-

tiende por CIM, por la cantidad mínima requerida de un agente para inhibir el crecimiento visible de un microorganismo (Nediani M. T., 2020). Sin embargo, este método no distingue entre un agente bactericida y un agente bacteriostático, dado que el agente está presente en el medio de cultivo durante todo el período de incubación (Nediani M. T., 2020). Es por ello, que además se determinó la Concentración Bactericida Mínima (CBM), que es la concentración a la cual un agente antimicrobiano causa la muerte del 99% de los microorganismos presentes. Por lo general, los agentes bactericidas se unen fuertemente a sus dianas celulares y no son removidas por dilución (Ramírez & Marin Castaño, 2009).

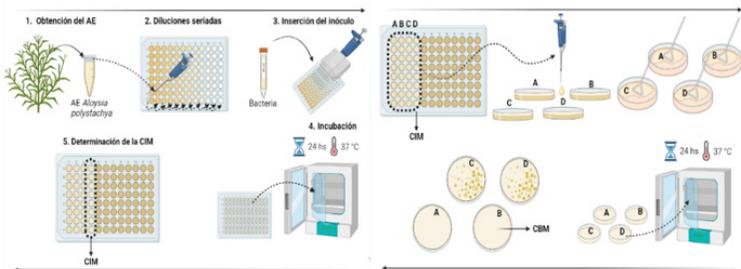


Figura 6. Determinación de CIM y CBM a partir del AE

Con respecto a la CIM, el valor obtenido para ambas bacterias ensayadas fue de 40  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de AE. Respecto a la CBM, el AE solo se presentó acción bactericida frente a *E. coli* con un valor de CBM de 80  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . De la comparación de los valores obtenidos con los reportes previos en la literatura, se observa que los valores de CIM del presente trabajo son mayores a los obtenidos por Pérez Zamora et al (Pérez-Zamora et al., 2016), para AE obtenido a partir de plantas localizadas en Chile, como se observa en la Tabla 2 este AE tiene una mayor concentración de Carvona que la obtenida en este trabajo. Sin embargo, los valores de CIM son más próximos a los obtenidos por Pina et al (Edieidia et al., 2012) a partir de plantas localizadas en

Brasil, donde los porcentajes de Carvona y Limoneno son más cercanos a los obtenidos en el presente trabajo (Tabla 2). Confirmando como esta descrito para otros AE que la composición del AE es quien determina su actividad biológica.

Para una mejor caracterización de la acción inhibitoria del AE, se realizaron curvas de crecimiento para ambas bacterias en estudio, evaluando el crecimiento bacteriano en presencia de concentraciones CIM y sub-CIM para cada bacteria. Con respecto a los resultados obtenidos, se observó una reducción significativa en el crecimiento microbiano en las diferentes concentraciones CIM y sub-CIM, para ambas bacterias modelo. Sin embargo, el efecto fue más significativo para el caso de *E. coli*. Continuando con la caracterización antibacteriana, se evaluó la actividad letal del AE tras incubar ambas bacterias en estudio durante 1 h a una concentración de 2 x CIM. El recuento de bacterias viables luego de la incubación, mostró que esta concentración del AE, es capaz de eliminar el 100% de bacterias para *E. coli* y el 90% para *S. aureus* en concordancia con los valores de CBM observados.

Se a reportado para otros AE, que debido a la naturaleza hidrofóbica de los compuestos presentes en los AE, la membrana bacteriana es un posible blanco de acción para ejercer la acción antibacteriana (Chouhan et al, 2017). En este contexto, se evaluó la capacidad del AE de dañar y permeabilizar las membranas de las bacterias en estudio utilizando para ello microscopía de fluorescencia. Esta técnica permite evaluar la integridad de la membrana por medio de dos sondas fluorescentes conocidas como, SYTO-9 (que emite fluorescencia verde) y yoduro de propidio (PI, por sus siglas en inglés, que emite fluorescencia roja). Ambos fluoróforos difieren tanto en sus características espectrales como en su capacidad para penetrar en las células bacterianas. Mientras la sonda SYTO 9 es capaz de teñir las bacterias tanto con membranas intactas como las dañadas, el IP sólo es capaz de penetrar y teñir bacterias que

poseen su membrana dañada, causando además una reducción en la fluorescencia emitida por la sonda SYTO 9; cuando ambos colorantes están presentes (Boulos et al, 1999). De esta forma luego de la tinción, las bacterias con la membrana dañada aparecerán al microscopio de fluorescencia de color rojo, mientras que las que no vieron comprometida su integridad se verán de color verde.

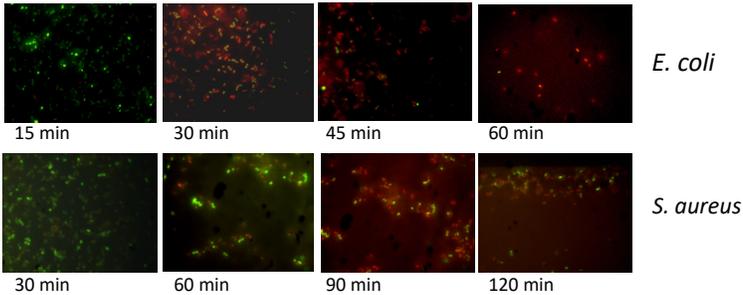


Figura 7. Imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia de *E. coli* y *S. aureus* teñidas con IP y SYTO-9, luego de diferentes tiempos de incubación con el AE

Como se observa en las imágenes de microscopía obtenidas (Figura 7), se evidenció que el AE es capaz de inducir cambios en la permeabilidad de ambas bacterias; aunque, el efecto generado es diferente para cada bacteria. En el caso de *E. coli*, se evidencia que tras una hora de incubación se logró que alrededor del 100% de la población bacteriana presentara daños en su membrana. Por otro lado, en el caso de *S. aureus* se requirió un mayor período de incubación para lograr un daño en la envoltura celular de la mayor parte de la población bacteriana. Se requirieron dos horas de incubación, para conseguir que solo alrededor de un 65% de la población bacteriana presentara daños en su envoltura celular.

Cabe mencionar que *E. coli* es una bacteria gram negativa que, por lo tanto, presenta dos membranas en su envoltura, una interna y otra externa, teniendo en cuenta que la sonda IP

solo es capaz de emitir fluorescencia cuando se intercala en el ADN bacteriano, los resultados obtenidos indican que el AE, es capaz de generar daños tanto en la membrana externa como en la membrana interna de *E. coli*, permitiendo que la sonda llegue al ADN.

De este modo, se demostró la acción antimicrobiana del AE aislado de la especie *A. polystachya* frente a bacterias planctónicas con comportamientos diferenciales; donde *E. coli* presentó mayor sensibilidad frente a este AE.

Además de realizar estos ensayos, también se evaluó la acción de este agente antimicrobiano frente a estructuras complejas formadas por las mismas bacterias conocidos como biopelículas o *biofilm*. En la caracterización de nuevos agentes antimicrobianos, es de suma importancia estudiar la capacidad de estos de prevenir la formación de *biofilm* y la destrucción de los mismos. Desde un punto de vista clínico, el *biofilm* bacteriano también se forma en instrumentos quirúrgicos, dispositivos médicos como, válvulas cardíacas o prótesis articulares, entre otros. De esta manera, se disminuiría la frecuencia de infecciones causadas por estos agentes patógenos en el ser humano (Madigan et al, 2015a).

Esta estructura es considerada como una matriz de polisacáridos extracelulares producidos por las bacterias, en donde las bacterias se encuentran inmersas, logrando que éstas puedan adherirse a superficies sólidas (Aires et al, 2021; Bazargani & Rohloff, 2016; Madigan et al, 2015b). Estas agrupaciones de bacterias también se encuentran rodeadas por excreciones celulares tales como proteínas, ácidos nucleicos y restos de células muertas (Madigan et al., 2015b). Dentro de las particularidades que presenta un *biofilm* bacteriano se puede mencionar su capacidad de:

- Eludir su destrucción por parte del sistema inmunológico del hospedador (Wijesundara & Rupasinghe, 2018)
- Aumentar su patogenicidad y evitar la penetración

de agentes antimicrobianos para su posterior eliminación (Benbelaïd et al., 2014). Por ejemplo, la matriz que posee alginato y otros polisacáridos como el ADN bacteriano, reducen la capacidad de los ATBs (Madigan et al., 2015a)

de este modo, se evaluó la capacidad del AE para inhibir la formación de *biofilms* así como su efecto frente a *biofilms* preformados. Estos ensayos se realizaron utilizando placas de ELISA de 96 pocillos donde se incubaron las bacterias con y sin agente, luego la cantidad de *biofilm* formado fue evaluado mediante la técnica de cristal violeta descrita en Espeche et al., 2020. Con respecto a la inhibición de formación de *biofilm*, se observa una respuesta que depende de la dosis para ambas bacterias ensayadas (Figura 8), donde el efecto resultó mucho más significativo en el caso de *E. coli*. Como es esperable, a la concentración de la CIM en ambas bacterias se observa una inhibición casi completa de la formación de *biofilms*, ya que a esta concentración directamente se inhibe el crecimiento bacteriano.

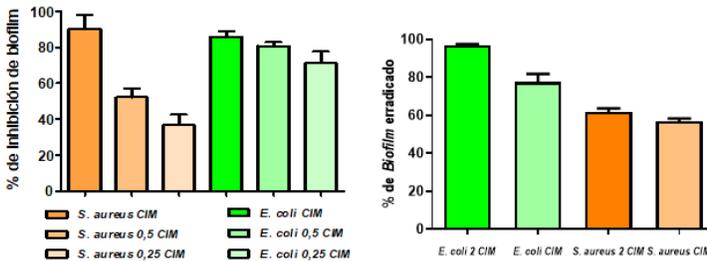


Figura 8. Porcentaje de inhibición (Izq.) y erradicación (Derecha) de *biofilm* en *S. aureus* y *E. coli*.

Para evaluar el efecto del AE en un *biofilm* preformado, se obtuvieron *biofilms* de ambas bacterias y luego fueron incubadas por 24 horas con el AE. La cantidad de *biofilm* luego de la incubación con el AE también fue evaluada por la técnica de cristal

violeta. La respuesta obtenida fue similar a la observada para los ensayos de inhibición, es decir, que el mayor porcentaje de erradicación fue alcanzado a la mayor concentración de AE testeado para ambos tipos de bacterias (Figura. 8). Nuevamente, el efecto fue mucho más significativo para *E. coli*. De este modo, AE obtenido de *A. polystachya*, no sólo se consigue prevenir la formación de *biofilm* sino que además, lograría erradicar biofilms preformados. Cabe destacar que en el caso de *E. coli* utilizando una concentración 2 x CIM se logra erradicar completamente el *biofilm*.

Los resultados obtenidos, permitieron demostrar que el AE extraído de hojas de *A. polystachya* localizadas en Santiago del Estero, posee actividad antimicrobiana frente a una bacteria gram positiva (*S. aureus*) y una bacteria gram negativa (*E. coli*) tanto en su forma planctónica como cuando estos microorganismos forman *biofilms*, más aún se determinó que sus mecanismos de acción están relacionados con la capacidad de disrumpir las membranas de estas bacterias.

## 5. Conclusión general

Los resultados presentados en este capítulo, muestran la potencialidad del AE estudiado para el desarrollo de nuevas herramientas de manejo integrado de plagas y microorganismos.

En particular, la actividad del AE frente a brúquidos que afectan a la algarroba, un fruto de particular importancia para Santiago del Estero por su aporte nutricional en la dieta humana y animal, representa una posible solución a este problema que afecta a muchos emprendimientos regionales.

Por otro lado, la capacidad del AE de actuar sobre microorganismos gram positivos y gram negativos refuerza el potencial de aplicaciones biotecnológicas en el área de salud y agricultura de este aceite.



## Referencias

- Abate, T., & Ampofo, J. K. O. (1996). Insect Pests of Beans in Africa: Their Ecology and Management. *Annual Review of Entomology*, 41(1), 45–73. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.41.010196.000401>
- Abbaszadeh, S., Sharifzadeh, A., Shokri, H., Khosravi, A. R., & Abbaszadeh, A. (2014). Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *Journal de Mycologie Medicale*, 24(2). <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.01.063>
- Adenubi, O. T., McGaw, L. J., Eloff, J. N., & Naidoo, V. (2018). In vitro bioassays used in evaluating plant extracts for tick repellent and acaricidal properties: A critical review. *Veterinary Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.03.008>
- Ahmed M. Abd El-Gawad, Yasser A. El-Amier, & Giuliano Bonanomi. (2018). Allelopathic Activity and Chemical Composition of *Rhynchosia minima* (L.) DC. Essential Oil from Egypt. *Chemistry and Biodiversity*, 15(1). <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700438>
- Aires, A., Barreto, A. S., & Semedo-Lemsaddek, T. (2021). Antimicrobial effects of essential oils on oral microbiota biofilms: The toothbrush in vitro model. *Antibiotics*, 10(1), 1–16. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010021>
- Arena, J. S., Merlo, C., Defagó, M. T., & Zygadlo, J. A. (2020). Insecticidal and antibacterial effects of some essential oils against the poultry pest *Alphitobius diaperinus* and its associated microorganisms. *Journal of Pest Science*, 93(1), 403–414. <https://doi.org/10.1007/s10340-019-01141-5>
- Atkins, S. (2004). Verbenaceae. In *Flowering Plants • Dicotyledons* (Vol. 1, pp. 449–468). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag Heidelberg.
- Azcón- Bieto, J., & Talón, M. (2008). *Fundamentos de Fisiología Vegetal* 2da edición.
- Bazargani, M. M., & Rohloff, J. (2016). Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus au-*

- reus and *Escherichia coli* biofilms. *Food Control*, 61, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.036>
- Benbelaïd, F., Khadir, A., Abdoune, M. A., Bendahou, M., Musselli, A., & Costa, J. (2014). Antimicrobial activity of some essential oils against oral multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* in both planktonic and biofilm state. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(6), 463–472. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C1203>
- Benzi, V. S., Murray, A. P., & Ferrero, A. A. (2009). Insecticidal and Insect-repellent Activities of Essential Oils from Verbenaceae and Anacardiaceae against *Rhizopertha Dominica*. *Natural Product Communications*, 4(9), 1934578X0900400926. <https://doi.org/10.1177/1934578X0900400926>
- Benzi, V., Stefanazzi, N., Murray, A. P., Werdin González, J. O., & Ferrero, A. (2014). Composition, Repellent, and Insecticidal Activities of Two South American Plants against the Stored Grain Pests *Tribolium castaneum* and *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *ISRN Entomology*, 2014, 175827. <https://doi.org/10.1155/2014/175827>
- Berardi, A. (2012). “*Etnofarmacología gastrointestinal de plantas medicinales argentinas del género Aloysia, familia Verbenaceae: mecanismos de acción y relación con los principios activos.*”
- Boulos, L., Prévost, M., Barbeau, B., Coallier, J., & Desjardins, R. (1999). LIVE/DEAD(®) BacLight(TM): Application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods*, 37(1). [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(99\)00048-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(99)00048-2)
- Cattaneo, F., Costamagna, M. S., Zampini, I. C., Sayago, J., Alberto, M. R., Chamorro, V., ... Isla, M. I. (2016). Flour from *Prosopis alba* cotyledons: A natural source of nutrient and bioactive phytochemicals. *Food Chemistry*, 208, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.115>
- Céspedes, C. L., Muñoz, E., Salazar, J. R., Yamaguchi, L., Werner, E., Alarcon, J., & Kubo, I. (2013). Inhibition of cholinesterase activity by extracts, fractions and compounds from

- Calceolaria talcana and C. integrifolia ( Calceolariaceae : Scrophulariaceae ) q. *FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY*, 62, 919–926. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.10.027>
- Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines*, 4(3), 58. <https://doi.org/10.3390/medicines4030058>
- Cutro, A. C., Castelli, M. V., López, S. N., Rosales, M. A., Hollmann, A., & Rodríguez, S. A. (2019). Chemical composition of Schinus areira essential oil and antimicrobial action against Staphylococcus aureus. *Natural Product Research*. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1675065>
- Do Nascimento, L. D., de Moraes, A. A. B., da Costa, K. S., Galúcio, J. M. P., Taube, P. S., Costa, C. M. L., ... de Faria, L. J. G. (2020). Bioactive natural compounds and antioxidant activity of essential oils from spice plants: New findings and potential applications. *Biomolecules*, 10(7), 1–37. <https://doi.org/10.3390/biom10070988>
- Drukker, B., Bruin, J., & Sabelis, M. W. (2000). Anthocorid predators learn to associate herbivore-induced plant volatiles with presence or absence of prey. *Physiological Entomology*, 25(3). <https://doi.org/10.1046/j.1365-3032.2000.00190.x>
- Duschatzky, C. B., Martinez, A. N., Almeida, N. V., & Bonivardo, S. L. (2004). Nematicidal activity of the essential oils of several argentina plants against the root-knot nematode. *Journal of Essential Oil Research*, 16(6), 626–628. <https://doi.org/10.1080/10412905.2004.9698812>
- Edieidia, S. P., Juliana, da S. C., Adilson, S., Ana, L. F., Bianca, W. B., Suzelei, de C. F. a, & Ana, M. S. P. (2012). Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Aloysia polystachya (Griseb.) Moldenke grown in Brazil. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(41), 5412–5416.
- Espeche, J. C., Martínez, M., Maturana, P., Cutró, A., Semorile, L., Maffia, P. C., & Hollmann, A. (2020). Unravelling the mechanism of action of “de novo” designed peptide P1 with model membranes and gram-positive and gram-negative

- bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108549>
- Gallego, S. M., & Benavides, M. P. (2022). Metabolismo secundario en plantas. *Bioquímica Vegetal*.
- Gleiser, R. M., Bonino, M. A., & Zygadlo, J. A. (2011). Repellence of essential oils of aromatic plants growing in Argentina against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 108(1), 69–78. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2042-4>
- Gonçalves, J. C. R., Oliveira, F. D. S., Benedito, R. B., De Sousa, D. P., De Almeida, R. N., & De Araújo, D. A. M. (2008). Antinociceptive activity of (-)-carvone: Evidence of association with decreased peripheral nerve excitability. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31(5), 1017–1020. <https://doi.org/10.1248/bpb.31.1017>
- González, J. O. W., Gutiérrez, M. M., Murray, A. P., & Ferrero, A. A. (2010). Biological Activity of Essential Oils from *Aloysia polystachya* and *Aloysia citriodora* (Verbenaceae) against the Soybean Pest *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). *Natural Product Communications*, 5(2), 1934578X1000500227. <https://doi.org/10.1177/1934578X1000500227>
- Grodnitzky, J. A., & Coats, J. R. (2002). QSAR evaluation of monoterpenoids' insecticidal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), 4576–4580. <https://doi.org/10.1021/jf0201475>
- Herrera, J. M., Zunino, M. P., Dambolena, J. S., Pizzolitto, R. P., Gañan, N. A., Lucini, E. I., & Zygadlo, J. A. (2015). Terpene ketones as natural insecticides against *Sitophilus zeamais*. *Industrial Crops and Products*. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.074>
- Hsu, K. Y., & Chen, B. H. (2020). Analysis and reduction of heterocyclic amines and cholesterol oxidation products in chicken by controlling flavorings and roasting condition. *Food Research International*, 131. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109004>
- Isman, M. B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19(8–10), 603–608. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00079-X](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00079-X)

- Kessler, A., & Baldwin, I. T. (2001). Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science*, 291(5511). <https://doi.org/10.1126/science.291.5511.2141>
- Koul, O., Walia, S., & Dhaliwal, G. (2008). Essential oils as green pesticides: Potential and Constraints. *Biopestic Int*.
- Liang, J., Xu, J., Yang, Y., Shao, Y., Zhou, F., & Wang, J. (2020). *foods Toxicity and Synergistic Effect of Elsholtzia ciliata Essential Oil and Its Main Components against the Adult and Larval Stages of Tribolium castaneum*.
- Liu, J., Hua, J., Qu, B., Guo, X., Wang, Y., Shao, M., & Luo, S. (2021). Insecticidal Terpenes From the Essential Oils of *Artemisia nakaii* and Their Inhibitory Effects on Acetylcholinesterase. *Frontiers in Plant Science*, 12(August). <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.720816>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015a). Explorando el mundo microbiano. In Brock *BIOLOGÍA DE LOS MICROORGANISMOS* (p. 166).
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015b). Superficies y biopelículas. In Brock *BIOLOGÍA DE LOS MICROORGANISMOS* (p. 648).
- Marchese, A., Orhan, I. E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, S. F., ... Nabavi, S. M. (2016). Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chemistry*, 210, 402–414. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.04.111>
- Mattar, V. T., Borioni, J. L., Hollmann, A., & Rodríguez, S. A. (2022). Insecticidal activity of the essential oil of *Schinus areira* against *Rhipibruchus picturatus* (F.) (Coleoptera: Bruchinae), and its inhibitory effects on acetylcholinesterase. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 185, 105134. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105134>
- Memar, M. Y., Raei, P., Alizadeh, N., Aghdam, M. A., & Kafil, H. S. (2017). Carvacrol and thymol: Strong antimicrobial agents against resistant isolates. *Reviews and Research in Medical Microbiology*, Vol. 28. <https://doi.org/10.1097/MRM.000000000000100>
- Moller, A. C., Parra, C., Said, B., Werner, E., Flores, S., Villena, J.,

- ... Madrid, A. (2021). Antioxidant and Anti-Proliferative Activity of Essential Oil and Main Components from Leaves of *Aloysia polystachya* Harvested in Central Chile. *Molecules*, 26(1). <https://doi.org/10.3390/molecules26010131>
- Nediani M. T. (2020). Microbiología General: *Carpeta de Trabajos Prácticos*.
- Nerio, L. S., Olivero-Verbel, J., & Stashenko, E. (2010). Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology*, 101(1), 372–378. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.048>
- Numpaque, M. A., Oviedo, L. A., Gil, J. H., García, C. M., & Durango, D. L. (2011). Thymol and carvacrol: biotransformation and antifungal activity against the plant pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Botryodiplodia theobromae*. *Tropical Plant Pathology*, 36(1). <https://doi.org/10.1590/s1982-56762011000100001>
- O'Leary, N., Lu-Irving, P., Moroni, P., & Siedo, S. (2016). Taxonomic Revision of *Aloysia* (Verbenaceae, Lantaneae) In South America. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 101(3), 568–609. <https://doi.org/10.3417/2013015>
- Omolo, M. O., Okinyo, D., Ndiege, I. O., Lwande, W., & Hassanali, A. (2004). Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. *Phytochemistry*, 65(20), 2797–2802. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.08.035>
- Ortuño Sánchez, M. (2006). *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes* (Copyright). AIYANA.
- Pacios, O., Blasco, L., Bleriot, I., Fernandez-Garcia, L., Bardanca, M. G., Ambroa, A., ... Tomás, M. (2020). Strategies to combat multidrug-resistant and persistent infectious diseases. *Antibiotics*. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020065>
- Paré, P. W., & Tumlinson, J. H. (1997). De novo biosynthesis of volatiles induced by insect herbivory in cotton plants. *Plant Physiology*, 114(4). <https://doi.org/10.1104/pp.114.4.1161>
- Passicot, C., Cabral, E., Salas, R., & Martín, S. (2010). Asterideas diversidad vegetal biotaxonomía de speratofitos. In *Asterideas diversidad vegetal biotaxonomía de speratofitos*.

- Pérez-Zamora, C. M., Torres, C. A., Aguado, M. I., Bela, A., Nuñez, M. B., & Bregni, C. (2016). Antibacterial activity of essential oils of *Aloysia polystachya* and *Lippia turbinata* (Verbenaceae). *Latin American and Caribbean Bulletin of Medicinal and Aromatic Plants*, 15, 199–205.
- Pérez Zamora, C. M. et al. (2016). Antibacterial activity of essential oils of *Aloysia polystachya* and *Lippia turbinata* (Verbenaceae). *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*.
- Pino Alea, J. A. (2015). Aceites Esenciales: QUÍMICA, BIOQUÍMICA, PRODUCCIÓN Y USOS. Editorial Universitaria.
- Prates, H. T., Santos, J. P., Waquil, J. M., Fabris, J. D., Oliveira, A. B., Foster, J. E., ... Horizonte, B. (1998). Insecticidal Activity of Monoterpenes Against *Rhyzopertha dominica* ( F .) and *Tribolium castaneum* ( Herbst ). 34(4), 5–8.
- Ramírez, L. S., & Marín Castaño, D. (2009). METODOLOGIAS PARA EVALUAR IN VITRO LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE COMPUESTOS DE ORIGEN VEGETAL Methodologies for evaluating the In vitro antibacterial activity of natural compounds of plant origin. *Scientia et Technica*, (42), 263–268.
- Reen, F. J., Gutiérrez-Barranquero, J. A., Parages, M. L., & O'Gara, F. (2018). Coumarin: a novel player in microbial quorum sensing and biofilm formation inhibition. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 102. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8787-x>
- Regnault-Roger, C., Vincent, C., & Arnason, J. T. (2012). Essential oils in insect control: Low-risk products in a high-stakes world. *Annual Review of Entomology*. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120710-100554>
- Reid, A., Josie, B., Short, F., & Nicholas, T. (2020). Bacterial genomes: disease outbreaks and antimicrobial resistance. <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlaa090>
- Sánchez de Lorenzo Cáceres, J. M. (2020). Árboles y arbustos ornamentales de las Islas Canarias. In *Árboles y arbustos ornamentales de las Islas Canarias* (Vol. 7).
- Sánchez Moreno, M. (2017). Nanopartículas De Plata: Preparación,

- Caracterización Y Propiedades Con Aplicación En Inocuidad De Los Alimentos. In *Journal of Chromatography* (Vol. 1040).
- Shaaban, H. A. E., El-Ghorab, A. H., & Shibamoto, T. (2012). Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review. *Journal of Essential Oil Research*, Vol. 24. <https://doi.org/10.1080/10412905.2012.659528>
- Shamsadin-Azad, Z., Taher, M. A., Cheraghi, S., & Karimi-Maleh, H. (2019). A nanostructure voltammetric platform amplified with ionic liquid for determination of tert-butylhydroxyanisole in the presence kojic acid. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(3), 1781–1787. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00096-6>
- Wang, J., & Pichersky, E. (1998). Characterization of S-Adenosyl-L-Methionine:(Iso)eugenol O-Methyltransferase Involved in Floral Scent Production in *Clarkia breweri*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 349(1), 153–160. <https://doi.org/10.1006/ABBI.1997.0452>
- Werdin González, J. O., Gutiérrez, M. M., Murray, A. P., Ferrero, A., & Nezara, P. (2010). Biological Activity of Essential Oils from *Aloysia polystachya* against the soybean pest *Nezara viridula*. *Natural Product Communications*, 5(2), 301–306.
- Wijesundara, N. M., & Rupasinghe, H. P. V. (2018). Essential oils from *Origanum vulgare* and *Salvia officinalis* exhibit antibacterial and anti-biofilm activities against *Streptococcus pyogenes*. *Microbial Pathogenesis*, 117, 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.026>
- Wińska, K., Mączka, W., Łyczko, J., Grabarczyk, M., Czubaśzek, A., & Szumny, A. (2019). Essential oils as antimicrobial agents—myth or real alternative? *Molecules*, 24(11), 1–21. <https://doi.org/10.3390/molecules24112130>
- Zarrad, K., Hamouda, A. Ben, Chaieb, I., Laarif, A., & Jemâa, J. M. Ben. (2015). Chemical composition, fumigant and anti-acetylcholinesterase activity of the Tunisian *Citrus aurantium* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 76, 121–127.