

Nanoencapsulación del aceite esencial de *lippia organoides* quimiotipo carvacol/timol en sinergia con un antibiótico de referencia contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y

Escherichia coli ATCC 11775

Lady Marcela Quintero Peña

Proyecto de Grado para optar por el título Magister en Química

Directora

Stelia Carolina Méndez Sánchez

Ph.D. en Ciencias Bioquímicas

Codirectora

Claudia Cristina Ortiz

Ph.D. en Ciencias-Biología Molecular

Asesor internacional

Eduardo Ricci

Ph.D. en Ciencias Farmacéuticas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Maestría en Química

Bucaramanga

2026

Agradecimientos

A **Dios**, por ser mi guía constante, mi refugio en los momentos de incertidumbre y la fuerza que sostuvo cada uno de mis pasos durante este camino. Gracias por darme sabiduría, paciencia y la fortaleza necesaria para no rendirme, incluso cuando parecía difícil continuar.

A **mis padres**, por ser el pilar fundamental de mi vida. Gracias por su amor incondicional, por cada sacrificio silencioso, por creer en mí incluso cuando yo dudaba, y por enseñarme con su ejemplo el valor del esfuerzo, la disciplina y la perseverancia.

A **mis hermanos y mis sobrinos**, por acompañarme en cada etapa de mi vida, por ser compañía, apoyo y motivo de inspiración.

A **mi familia**, que de una u otra manera ha sido parte de este proceso, brindándome cariño, comprensión y motivación.

A **Stefania y Nathalia**, cuya presencia fue un regalo invaluable durante este recorrido. Su apoyo sincero y tu amistad hicieron este camino mucho más llevadero y significativo.

A esa persona que, aunque hoy forma parte de otro capítulo de mi historia, dejó una huella importante en este proceso. Gracias por haber sido apoyo, compañía y motivación.

A la doctora Stelia y a la doctora Claudia por su orientación, apoyo y compromiso durante el desarrollo de esta investigación. Sus conocimientos, recomendaciones y acompañamiento fueron fundamentales para mi crecimiento profesional.

Al programa BIO-RETO XXI 15:50, MinCiencias, Ministerio de Educación Nacional, Ministerio de Industria, Comercio y Turismo e ICETEX, Convocatoria Ecosistema Científico - Colombia Científica. Fondo Francisco José de Caldas, ContratoRC-FP44842-212-2018.

Este logro es el reflejo del amor, apoyo y aprendizaje que cada uno de ustedes ha dejado en mi vida. Con profunda gratitud, les dedico este trabajo.

Tabla de contenido

Introducción	11
1. Hipótesis	15
2. Objetivos.....	16
2.1. Objetivo general.....	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. Marco conceptual	17
3.1. Microorganismos de estudio.....	17
3.2. Mecanismos de resistencia de las bacterias	19
3.3. Papel de los aceites esenciales en la evasión de la resistencia	20
3.4. <i>Lippia origanoides</i> : especie vegetal y aceite esencial.....	20
3.5. Nanoemulsiones como sistema de entrega de agentes antimicrobianos.	22
3.6. Nanoemulsiones en combinación con aceites esenciales y antimicrobianos.	22
3.7. Sinergia entre aceites esenciales y antibióticos: estado del arte.....	23
4. Materiales y métodos.....	25
4.1. Materiales	25
4.2. Cepas bacterianas.....	25
4.3. Aceite esencial.....	25
4.4. Selección de antibióticos M100.....	27
4.5. Determinación de la CMI de los Antibióticos, el aceite Bio-Reto 0019 y las Nanoemulsiones.....	27
4.6. Actividad antimicrobiana de nanoemulsiones mediante el método de difusión en disco..	28

4.7.	Evaluación preliminar (screening) de mezclas sinérgicas entre el aceite Bio-Reto 0019 y los antibióticos seleccionados	28
4.8.	Sinergia.....	29
4.8.1.	<i>Determinación del efecto sinérgico entre el aceite Bio-Reto 0019 y los antibióticos seleccionados</i>	29
4.8.2.	<i>Determinación de Concentración Fraccional Inhibitoria (CFI)</i>	30
4.9.	Síntesis de nanoemulsiones	31
4.9.1.	<i>Nanoemulsiones a base de poloxamer</i>	31
4.9.2.	<i>Nanoemulsiones a base de Tween 80 y Tween 20</i>	31
4.10.	Caracterización fisicoquímica de nanoemulsiones	32
4.10.1.	<i>Tamaño, índice de polidispersidad y potencial Z</i>	32
4.11.	Análisis estadístico	32
5.	Resultados.....	34
5.1.	Selección de antibióticos M100.....	34
5.2.	Determinación de la CMI de los antibióticos y del aceite Bio-Reto 0019	34
5.2.1.	<i>Evaluación preliminar (screening) de mezclas sinérgicas entre el AE Bio-Reto 0019 y los antibióticos seleccionados</i>	36
5.2.2.	<i>Determinación del efecto sinérgico entre el aceite Bio-Reto 0019 y los antibióticos seleccionados</i>	37
5.3.	Síntesis de las nanoemulsiones	41
5.3.1.	<i>Nanoemulsiones a base de poloxamer</i>	41
5.3.2.	<i>Características fisicoquímicas de la mezcla tetraciclina-AE con diferentes métodos de agitación</i>	42
5.3.3.	<i>Evaluación de la actividad antimicrobiana de la emulsión tetraciclina + Bio-Reto 0019 frente a S. aureus por el método de difusión en disco en agar</i>	44
5.4.	Nanoemulsiones a base de Tween 80 y Tween 20	46
5.4.1.	<i>Evaluación del efecto inhibitorio de los tensoactivos Tween 80 y Tween 20</i>	46

5.5.	Síntesis de nanoemulsiones para <i>S. aureus</i> ATCC 29213 a base de Tween 20 y Tween 80	49
5.5.1.	<i>Síntesis de nanoemulsiones de la mezcla Bio-Reto 0019 + tetraciclina para S. aureus</i> ATCC 29213	49
5.5.2.	<i>Caracterización fisicoquímica de la nanoemulsión Bio-Reto 0019 + tetraciclina</i>	51
5.5.3.	<i>Síntesis de nanoemulsiones de la mezcla Bio-Reto 0019 + kanamicina para S. aureus</i> ATCC 29213	52
5.5.4.	<i>Caracterización fisicoquímica de la nanoemulsión Bio-Reto 0019 + Kanamicina</i>	55
5.6.	Síntesis de las nanoemulsiones para <i>E. coli</i> ATCC 11775 a base de Tween 20 y Tween 80	57
5.6.1.	<i>Síntesis de nanoemulsiones de la mezcla Bio-Reto 0019 + Ofloxacina para E. coli</i>	57
5.6.2.	<i>Caracterización fisicoquímica de la nanoemulsión Bio-Reto 0019 + Ofloxacina</i>	59
5.6.3.	<i>Síntesis de nanoemulsiones de la mezcla Bio-Reto 0019 + Tetraciclina</i>	62
5.6.4.	<i>Caracterización fisicoquímica de la nanoemulsión Bio-Reto 0019 + Tetraciclina</i>	64
6.	Discusión	68
7.	Conclusiones	82
	Referencias bibliográficas	83

Lista de Tablas

<i>Tabla 1. Concentración Mínima Inhibitoria de antibióticos frente a S. aureus ATCC 29213 y E. coli ATCC 11775</i>	29
<i>Tabla 2. Concentración Mínima Inhibitoria del AE Bio-Reto 0019 para S. aureus ATCC 29213 y E. coli ATCC 11775</i>	30
<i>Tabla 3. Porcentaje de inhibición de las mezclas antibiótico/Bio-Reto 0019 en su CMI₅₀ frente a S. aureus ATCC 29213 y E. coli ATCC 11775. Los valores incluyen la desviación estándar. Las celdas en color azul corresponden a los antibióticos seleccionados</i>	31
<i>Tabla 4. Porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano en la actividad sinérgica de la mezcla de AE LOT II y tetraciclina para S. aureus ATCC 29213. La escala de colores indica los porcentajes de inhibición, representando en rojo los porcentajes bajos y en verde los altos</i>	32
<i>Tabla 5. Porcentajes de inhibición de la sinergia con el AE LOT II y Kanamicina para S. aureus ATCC 29213. La escala de colores indica los porcentajes de inhibición, representando en rojo los porcentajes bajos y en verde los altos</i>	33
<i>Tabla 6. Porcentajes de inhibición de la sinergia con el AE LOT II y Tetraciclina para E. coli ATCC 11775. La escala de colores indica los porcentajes de inhibición, representando en rojo los porcentajes bajos y en verde los altos</i>	34
<i>Tabla 7. Porcentajes de inhibición de la sinergia con el AE LOT II y Ofloxacina para E. coli ATCC 11775. La escala de colores indica los porcentajes de inhibición, representando en rojo los porcentajes bajos y en verde los altos</i>	35
<i>Tabla 8. Características fisicoquímicas de la mezcla AE-Tetraciclina variando el método de agitación</i>	37
<i>Tabla 9. Porcentaje de inhibición a diferentes concentraciones de Tween 20 y Tween 80 para S. aureus ATCC 29213</i>	42
<i>Tabla 10. Porcentaje de inhibición a diferentes concentraciones de Tween 20 y Tween 80 para E. coli ATCC 11775</i>	42
<i>Tabla 11. Porcentaje de inhibición de la mezcla sinérgica AE (110 µg/mL) + Tetraciclina (2,45 µg/mL) y</i>	

<i>tensoactivos Tween 20 y 80 al 1,5% para S. aureus ATCC 29213</i>	45
<i>Tabla 12. Características fisicoquímicas de la nanoemulsión con el tensoactivo Tween 20 + Mezcla Bio-Reto 0019 + Tetraciclina</i>	46
<i>Tabla 13. Porcentaje de inhibición de la mezcla sinérgica de AE (110 µg/mL) + Kanamicina (1,48 µg/mL) y tensoactivos Tween 20 y 80 al 1,5% para S. aureus ATCC 29213</i>	48
<i>Tabla 14. Características fisicoquímicas de la mezcla sinérgica Bio-Reto 0019 (110µg/mL) + Kanamicina (1,48 µg/mL)</i>	49
<i>Tabla 15. Características fisicoquímicas de la nanoemulsión sintetizada mezcla Bio-Reto 0019 (110 µg/mL) + Kanamicina (1,48 µg/mL) y Tween 80 al 1,5 %</i>	50
<i>Tabla 16. Porcentaje de inhibición de la mezcla sinérgica de AE (110 µg/mL) + Ofloxacina (0,065 µg/mL) y tensoactivos Tween 20 al 1% y 80 al 1,5% para E. coli ATCC 11775</i>	52
<i>Tabla 17. Características fisicoquímicas de la mezcla sinérgica Bio-Reto 0019 (110 µg/mL) + Ofloxacina 0,065 µg/mL</i>	53
<i>Tabla 18. Características fisicoquímicas de la emulsión AE (110µg/mL) + Ofloxacina 0,065 µg/mL + T20 1%</i>	55
<i>Tabla 19. Características fisicoquímicas de la emulsión Bio-Reto 0019 (110 µg/mL) + Ofloxacina 0,065 µg/mL + T80 1,5%</i>	55
<i>Tabla 20. Porcentaje de inhibición de la mezcla sinérgica de Bio-Reto 0019 (110 µg/mL) + Tetraciclina (0,71 µg/mL) y tensoactivos Tween 20 al 1% y 80 al 1,5% para E. coli ATCC 11775</i>	57
<i>Tabla 21. Características fisicoquímicas de la mezcla sinérgica AE (110 µg/mL) + Tetraciclina (0,71 µg/mL)</i>	59
<i>Tabla 22. Características fisicoquímicas de la emulsión Bio-Reto 0019 (110 µg/mL) + Tetraciclina (0,71 µg/mL) +T20 1%</i>	60
<i>Tabla 23. Características fisicoquímicas de la nanoemulsión Bio-Reto 0019 (110 µg/mL) + Tetraciclina (0,71 µg/mL) + T80 1,5%</i>	61

Lista de Figuras

<i>Figura 1. Flujograma de trabajo</i>	21
<i>Figura 2. Representación de la técnica del tablero de ajedrez</i>	25
<i>Figura 3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de la emulsión Tetraciclina + Bio-Reto 0019 por el método de difusión en disco en agar. A. Bio-Reto 0019 libre (110 µg/mL), B. Tetraciclina (4,9 µg/mL), C. Mezcla sinérgica Bio-Reto 0019 (110 µg/mL) - Tetraciclina (2,45 µg/mL y 1,22 µg/mL), D. Nanoemulsiones de la mezcla sinérgica con ultrasonido de punto, E. Nanoemulsión de la mezcla sinérgica con agitación magnética</i>	39
<i>Figura 4. Cinética de crecimiento para S. aureus ATCC 29213 con tensoactivo Tween 20 y Tween 80 durante 8 horas de crecimiento a 37°C</i>	41
<i>Figura 5. Cinética de crecimiento para E.coli ATCC 29213 con tensoactivo Tween 20 y Tween 80 durante 8 horas de crecimiento a 37°C</i>	41
<i>Figura 6. Cinética de crecimiento para S. aureus ATCC 29213 con las nanoemulsiones con los tensoactivos Tween 20 y 80 al 1,5% a base de la mezcla sinérgica de Bio-Reto 0019 (110µg/mL) + Tetraciclina (2,45 µg/mL) durante 8 horas de crecimiento a 37°C</i>	44
<i>Figura 7. Cinética de crecimiento para S. aureus ATCC 29213 con las nanoemulsiones con los tensoactivos Tween 20 y 80 al 1,5% a base de la mezcla sinérgica de Bio-Reto 0019 (110 µg/mL) + Kanamicina (1,48 µg/mL) durante 8 horas de crecimiento a 37°C</i>	48
<i>Figura 8. Cinética de crecimiento para E. coli ATCC 11775 con las nanoemulsiones con los tensoactivos Tween 20 (1%) y Tween 80 (1,5%) a base de la mezcla sinérgica de AE (110 µg/mL) + Ofloxacina (0,065 µg/mL) durante 8 horas de crecimiento a 37°C</i>	52
<i>Figura 9. Cinética de crecimiento para E.coli ATCC 11775 con las nanoemulsiones con los tensoactivos Tween 20 (1%) y Tween 80 (1,5%) a base de la mezcla sinérgica de Bio-Reto 0019 (110 µg/mL) + Tetraciclina (0,71 µg/mL) durante 8 horas de crecimiento a 37°C</i>	57

Resumen

Título: Nanoencapsulación del aceite esencial de *lippia organoides* quimiotipo carvacol/timol en sinergia con un antibiótico de referencia contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 11775*

Autor: Lady Marcela Quintero Peña**

Palabras Clave: Nanoemulsiones, aceites esenciales, sinergia, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*

Descripción: La creciente resistencia bacteriana a los antibióticos convencionales representa un problema de salud pública a nivel mundial, especialmente frente a patógenos como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. En este contexto, los aceites esenciales han emergido como una alternativa terapéutica debido a sus propiedades antimicrobianas y a su capacidad para actuar sinérgicamente con antibióticos. Sin embargo, su aplicación se ve limitada por su volatilidad, hidrofobicidad e inestabilidad química. Por ello, el objetivo de esta investigación fue desarrollar nanoemulsiones del aceite esencial de *Lippia organoides* en combinación con antibióticos de referencia, con el fin de potenciar su actividad antimicrobiana frente a ambas cepas bacterianas.

Inicialmente, se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de diferentes antibióticos y del aceite esencial Bio-Reto 0019. Posteriormente, mediante pruebas de screening y el método de tablero de ajedrez, se evaluó la actividad sinérgica entre el aceite esencial y los antibióticos seleccionados. Los resultados mostraron que las combinaciones Bio-Reto 0019–kanamicina frente a *S. aureus* y Bio-Reto 0019–tetraciclina frente a *E. coli* presentaron los mayores porcentajes de inhibición bacteriana y valores de concentración fraccional inhibitoria compatibles con efectos sinérgicos o aditivos.

Con las mezclas más prometedoras se desarrollaron nanoemulsiones empleando los tensoactivos Tween 20, Tween 80 y Poloxamer 407. Las formulaciones fueron caracterizadas mediante dispersión dinámica de luz, determinando tamaño de partícula, índice de polidispersidad. Asimismo, se evaluó su actividad antimicrobiana mediante microdilución en caldo y difusión en disco. Las nanoemulsiones formuladas con Tween mostraron mayor estabilidad fisicoquímica y conservaron o potenciaron la actividad antimicrobiana de las mezclas sinérgicas, especialmente frente a *S. aureus*.

Los resultados obtenidos demuestran que la nanoencapsulación del aceite esencial de *Lippia organoides* en combinación con antibióticos representa una estrategia promisoriosa para potenciar la actividad antimicrobiana y contribuir al desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas frente a bacterias de importancia clínica.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Stelia Carolina Mendez PhD. en Ciencias Bioquímicas Codirector: Claudia Cristina Ortiz PhD. en Ciencias-Biología molecular. Asesor: Eduardo Ricci PhD. en Ciencias Farmacéuticas

Abstract

Title: Nanoencapsulation of the essential oil of *lippia organoides* chemotype carvacol/thymol in synergy with a reference antibiotic against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Escherichia coli* ATCC 11775*

Author: Lady Marcela Quintero Peña **

Key Words: Nanoemulsions, essential oils, synergy, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*

Description: The increasing bacterial resistance to conventional antibiotics has become a major global public health concern, particularly against pathogens such as *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. In this context, essential oils have emerged as promising therapeutic alternatives due to their antimicrobial properties and their ability to act synergistically with antibiotics. However, their application is limited by their volatility, hydrophobicity, and chemical instability. Therefore, the aim of this study was to develop nanoemulsions containing the essential oil of *Lippia organoides* combined with reference antibiotics in order to enhance antimicrobial activity against both bacterial strains.

Initially, the minimum inhibitory concentrations (MICs) of several antibiotics and the Bio-Reto 0019 essential oil were determined. Subsequently, screening assays and the checkerboard method were used to evaluate the synergistic activity between the essential oil and the selected antibiotics. The results showed that the Bio-Reto 0019–kanamycin combination against *S. aureus* and the Bio-Reto 0019–tetracycline combination against *E. coli* exhibited the bacterial growth inhibition percentages and fractional inhibitory concentration values consistent with synergistic or additive effects.

Based on the most promising mixtures, nanoemulsions were developed using Tween 20, Tween 80, and Poloxamer 407 as surfactants. The formulations were characterized by dynamic light scattering to determine particle size, polydispersity index. In addition, their antimicrobial activity was evaluated by broth microdilution and disk diffusion methods. Nanoemulsions formulated with Tween surfactants showed greater physicochemical stability and maintained or enhanced the antimicrobial activity of the synergistic mixtures, particularly against *S. aureus*.

The obtained results demonstrate that nanoencapsulation of *Lippia organoides* essential oil combined with antibiotics represents a promising strategy to enhance antimicrobial activity and contribute to the development of new therapeutic alternatives against clinically relevant bacteria.

* Degree Work

** Faculty of Sciences. School of Chemistry. Director: Stelia Carolina Mendez, PhD in Biochemical Sciences. Co-director: Claudia Cristina Ortiz, PhD in Molecular Biology. Advisor: Eduardo Ricci, PhD in Pharmaceutical Sciences.

Introducción

La creciente mortalidad asociada a infecciones bacterianas resistentes a los antibióticos convencionales ha impulsado la búsqueda de terapias innovadoras (Makabenta et al., 2021). Entre los patógenos bacterianos de mayor relevancia se encuentra *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), considerada la principal especie patógena de su género. Esta bacteria es responsable de una amplia gama de infecciones, que abarcan desde cuadros leves hasta enfermedades potencialmente mortales (Gutierrez-Tobar et al., 2024). En particular, *S. aureus* constituye una de las principales causas de bacteriemia, endocarditis infecciosa, infecciones osteoarticulares, pleuropulmonares, cutáneas y de tejidos blandos (Rasquel-Oliveira et al., 2025).

Por otro lado, la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) comprende múltiples patotipos capaces de causar enfermedades entéricas como diarrea o disentería, así como infecciones extraintestinales, incluyendo la del tracto urinario y la meningitis (Nasrollahian et al., 2024). Investigaciones recientes han documentado la aparición de cepas resistentes a carbapenémicos en infecciones recurrentes y multisistémicas, lo cual plantea un reto adicional para el tratamiento farmacológico y el diseño racional de nuevas moléculas antimicrobianas (Cheng et al., 2025).

La vigilancia de la resistencia bacteriana en Colombia revela que *S. aureus* y *E. coli* se mantienen entre los patógenos de mayor prevalencia en instituciones de salud de alta complejidad, con implicaciones clínicas significativas para la terapéutica antibiótica. En un estudio multicéntrico realizado entre 2018 y 2021 en hospitales de nivel III y IV, *S. aureus* representó aproximadamente el 29% de los aislamientos bacterianos, mientras que *E. coli* constituyó alrededor del 21%, lo que refleja su relevante participación en infecciones invasivas (De La Cadena et al., 2023). El Instituto Nacional de Salud (INS) para la resistencia bacteriana hospitalaria subraya además la persistencia de fenotipos resistentes de estos microorganismos, señalando que la presencia de cepas tales como *S.*

aureus Resistente a la Meticilina (SARM) ha mostrado porcentajes crecientes de resistencia en unidades de cuidados intensivos, lo cual dificulta el tratamiento terapéutico y se asocia a mayor morbimortalidad, prolongación de estancias hospitalarias y costos sanitarios elevados (INS, 2022). Asimismo, los boletines nacionales de vigilancia epidemiológica han demostrado que *E. coli* presenta resistencias variables frente a cefalosporinas de tercera generación, con valores que en algunos servicios de UCI y hospitalización han oscilado entre aproximadamente 14,5% y más del 28% en años recientes, indicando un desafío terapéutico creciente dado su papel en infecciones urinarias, bacteriemias y otras infecciones graves (INS, 2022).

Por otra parte, desde el descubrimiento de los agentes antimicrobianos, estos han sido ampliamente utilizados para tratar infecciones bacterianas (Muteeb et al., 2023). No obstante, el desarrollo de la resistencia bacteriana a los antibióticos es impulsado principalmente por el uso inadecuado y excesivo de antibióticos en humanos, animales y agricultura, lo que genera presión selectiva que favorece la supervivencia y proliferación de cepas resistentes (OMS, 2025). La automedicación, la prescripción inadecuada de antibióticos y el incumplimiento de los esquemas terapéuticos favorecen la exposición repetida de las bacterias a concentraciones subletales de antimicrobianos, estos fenómenos se ven potenciados por mecanismos genéticos como mutaciones cromosómicas y la transferencia horizontal de genes mediante plásmidos, lo que promueve la selección y diseminación de cepas con resistencia adquirida y compromete la eficacia de los tratamientos disponibles (Murray et al., 2022). Por ejemplo, el tratamiento de infecciones por *S. aureus* ha sido particularmente problemático debido al desarrollo de resistencia a diversas clases de antimicrobianos, como penicilinas, sulfonamidas, tetraciclinas y glucopéptidos, entre otros. Esta resistencia ha sido potenciada por prácticas de uso indebido de antibióticos tanto en la medicina humana como veterinaria, incluyendo prescripciones empíricas excesivas, automedicación, y administración de fármacos (Ahmed et al., 2024).

Frente a este panorama, el surgimiento de bacterias multirresistentes ha incentivado el desarrollo de estrategias terapéuticas alternativas, tales como el descubrimiento de nuevos fármacos o la optimización de compuestos ya conocidos, entre los cuales destacan los aceites esenciales. Actualmente, numerosos estudios respaldan la actividad antimicrobiana de diversos aceites esenciales, incluyendo su eficacia frente a *S. aureus* y específicamente SARM (Khwaza & Aderibigbe, 2025). El creciente número de evidencias obtenidas a partir de variados estudios ha promovido el interés en el uso de productos naturales como alternativas terapéuticas; sin embargo, dichas opciones pueden implicar mayores costos y tiempos prolongados de tratamiento, lo que ha impulsado la búsqueda de enfoques más eficientes y viables dentro de la comunidad científica.

El interés por los aceites esenciales ha ido en aumento dentro de la comunidad científica. Estos compuestos presentan propiedades antimicrobianas, antifúngicas y antibacterianas, lo que los convierte en sustancias de alto interés para diversas industrias, entre ellas la farmacéutica, cosmética y alimentaria (Rodilla et al., 2024). No obstante, su aplicación presenta diversos desafíos, principalmente asociados a su volatilidad y a su inestabilidad química frente a factores ambientales como la luz, el aire, la humedad y las altas temperaturas. Asimismo, su carácter hidrofóbico dificulta su adecuada formulación en sistemas convencionales (Kaspute et al., 2025). Para superar estas limitaciones, se han desarrollado estrategias de encapsulación en matrices biodegradables que permiten proteger los aceites esenciales de la degradación y controlar su liberación (Jayari et al., 2022). Entre estas estrategias se encuentra la nanoencapsulación mediante técnicas como secado por pulverización y liofilización (Nguyen et al., 2021). Dentro de los sistemas nanoencapsulados se encuentran las nanoemulsiones que se destacan por su tamaño de gota nanométrico, alta área superficial y estabilidad cinética, lo que favorece una mejor dispersión de sustancias lipofílicas como los aceites esenciales y potencia su actividad biológica, ampliando su aplicabilidad en el desarrollo de formulaciones antimicrobianas (Shlosman et al., 2024). De este modo, la

nanoencapsulación representa una alternativa prometedora para potenciar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales. Se han reportado resultados satisfactorios con aceites como el de tomillo (*Thymus vulgaris*) y clavo (*Syzygium aromaticum*) encapsulados en sistemas nanoestructurados, los cuales han sido evaluados frente a microorganismos de importancia clínica, principalmente bacterias Gram positivas y Gram negativas, entre ellas *S. aureus* y *E. coli*, mostrando una mejora significativa en la actividad antimicrobiana en comparación con los aceites no encapsulados. (Jayari et al., 2022; Lim et al., 2023)

Dependiendo del método empleado, la nanoencapsulación puede involucrar nanomateriales orgánicos, inorgánicos o híbridos, capaces de ejercer mecanismos antimicrobianos novedosos que dificultan la adaptación bacteriana (Makabenta et al., 2021). Entre los nanomateriales antimicrobianos se encuentran nanopartículas metálicas, nanocompuestos de carbono, polímeros, nanoemulsiones, liposomas y nanomateriales inteligentes (Makabenta et al., 2021).

En este proyecto se emplearon nanoemulsiones para encapsular una mezcla de aceite esencial en combinación con un antibiótico de referencia. El aceite utilizado fue el de *Lippia origanoides* quimiotipo timol/carvacrol, aislado y caracterizado por el grupo de investigación CENIVAM (Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinas Tropicales) (Carreño et al., 2023). La actividad antimicrobiana de este aceite ha sido previamente evaluada por el grupo GIBIM (Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología), reportando Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) entre 0,37 y 0,75 mg/mL frente a *E. coli* O157:H7 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, respectivamente (Cáceres et al., 2020). Estos datos respaldan el potencial farmacológico del aceite esencial de *Lippia origanoides* quimiotipo timol/carvacrol.

En esta investigación se evaluó el efecto sinérgico del aceite esencial *Lippia origanoides* quimiotipo timol (lote II), denominado Bio-Reto 0019 en combinación con antibióticos comerciales (ofloxacina, vancomicina, trimetoprima, tetraciclina, ampicilina, kanamicina y eritromicina) frente a *S. aureus* ATCC 29213 y *E. coli* ATCC 11775. Posteriormente, se realizaron estudios de nanoencapsulación donde se utilizaron nanoemulsiones preparadas con Tween para mejorar su estabilidad y evaluar su CMI.

1. Hipótesis

El uso de nanoemulsiones como vehículo de compuestos activos permite mantener o aumentar la actividad antimicrobiana de dos mezclas del aceite Bio-Reto 0019 combinadas con un antibiótico de referencia frente a *S. aureus* ATCC 29213 y *E. coli* ATCC 25922.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Desarrollar dos formulaciones de nanoemulsiones con actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 11775, usando aceite esencial de *Lippia origanoides* en sinergia con un antibiótico de referencia.

2.2. Objetivos específicos

1. Identificar mezclas del aceite esencial *Lippia origanoides* y un antibiótico de referencia con actividad sinérgica contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 11775.
2. Desarrollar formulaciones a base de nanoemulsiones con la mezcla identificada que contribuyan en la actividad antimicrobiana contra las bacterias de estudio.
3. Analizar las propiedades fisicoquímicas y biológicas de la formulación que presente mayor efecto sinérgico frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 11775.

3. Marco conceptual

3.1. Microorganismos de estudio

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa, responsable de un amplio espectro de infecciones que van desde cuadros cutáneos leves hasta enfermedades sistémicas potencialmente mortales, incluyendo bacteriemia, endocarditis infecciosa, infecciones osteoarticulares, pleuropulmonares y del tejido blando (Rasquel-Oliveira et al., 2025). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que las infecciones asociadas a *S. aureus* causan más de 100.000 muertes atribuibles al año a nivel mundial, con tasas de mortalidad de hasta un 20–30% en bacteriemia (Murray et al., 2022; OMS, 2025). En Colombia, un estudio multicéntrico realizado entre 2018 y 2021 en 20 hospitales de nivel III y IV documentó que *S. aureus* representó aproximadamente el 29% de los aislamientos bacterianos, con porcentajes de resistencia a meticilina en unidades de cuidados intensivos (UCI) superiores al 30%, asociados a mayor morbimortalidad, prolongación de estancias hospitalarias y costos sanitarios elevados (De La Cadena et al., 2023; INS, 2022)

El fenotipo SARM se caracteriza por la expresión del gen *mecA*, que codifica la proteína de unión a penicilinas PBP2a con baja afinidad por los antibióticos β -lactámicos, confiriéndole resistencia a toda esta familia farmacológica. Adicionalmente, las cepas SARM frecuentemente presentan co-resistencia a macrólidos, aminoglucósidos, tetraciclinas y fluoroquinolonas, lo que limita severamente las opciones terapéuticas disponibles (Liu et al., 2022). La cepa *S. aureus* ATCC 29213 utilizada en el presente estudio es una cepa de referencia susceptible a meticilina empleada internacionalmente para el control de calidad en pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (CLSI, 2025); su inclusión permite establecer valores de CMI basales y evaluar la sinergia sin la interferencia de mecanismos de resistencia

adquirida propios del SARM.

Escherichia coli

Escherichia coli comprende múltiples patotipos capaces de causar enfermedades entéricas diarrea, disentería y extraintestinales, incluyendo infecciones del tracto urinario, bacteriemia y meningitis neonatal (Nasrollahian et al., 2024). La carga global de mortalidad asociada a *E. coli* diarreogénica es significativa: se estima que las infecciones diarreicas por este patógeno causan más de 500.000 muertes anuales en niños menores de cinco años a nivel mundial, constituyendo la segunda causa de mortalidad infantil en ese grupo etario (Kyu et al., 2025). En Colombia, *E. coli* ocupa el segundo lugar como agente etiológico de enfermedad diarreica aguda, con una incidencia reportada de 110 casos por cada 100.000 habitantes y una tasa de mortalidad del 4% en niños menores de cinco años (Paredes et al., 2023).

Desde la perspectiva de la resistencia antimicrobiana, *E. coli* ha emergido como uno de los organismos de mayor preocupación clínica. Los boletines nacionales del INS señalan que en Colombia las cepas de *E. coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) presentan resistencia a cefalosporinas de tercera generación con porcentajes que oscilan entre el 14,5% y más del 28% en servicios de UCI (INS, 2022). Más recientemente, la aparición de cepas resistentes a carbapenémicos en infecciones recurrentes y multisistémicas representa un desafío adicional para el diseño racional de nuevas moléculas antimicrobianas (Cheng et al., 2025). La cepa *E. coli* ATCC 11775 es una cepa de referencia con susceptibilidad conocida, empleada en el presente trabajo para establecer la actividad basal de las combinaciones ensayadas y como control para la evaluación de las formulaciones de nanoemulsiones.

3.2. Mecanismos de resistencia de las bacterias

La resistencia bacteriana a los antibióticos es consecuencia de la presión selectiva ejercida por su uso inadecuado o excesivo en medicina humana, veterinaria y agricultura (Murray et al., 2022; OMS, 2025). Este fenómeno es impulsado por mecanismos genéticos mutaciones cromosómicas y transferencia horizontal de genes mediante plásmidos, transposones e integrones que permiten la diseminación rápida de determinantes de resistencia entre poblaciones bacterianas. A continuación, se describen los mecanismos moleculares más relevantes en el contexto de los microorganismos de estudio.

Enzimas hidrolíticas. Las bacterias producen enzimas capaces de inactivar directamente el antibiótico. Las β -lactamasas, entre ellas las de espectro extendido (BLEE) y las carbapenemasas, destruyen el anillo β -lactámico de penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos, respectivamente. En *S. aureus* la penicilinasa mediada por el gen *blaZ* fue el primer mecanismo de resistencia documentado; su prevalencia llevó al desarrollo de penicilinas semisintéticas estables como la meticilina, cuya posterior pérdida de eficacia motivó la vigilancia del fenotipo SARM (Carcione et al., 2021).

Modificación del sitio blanco. El gen *mecA* codifica la PBP2a, proteína de unión a penicilinas con baja afinidad por los β -lactámicos, responsable de la resistencia en SARM. Adicionalmente, la modificación ribosomal mediada por los genes *ermA* y *ermB* confiere resistencia a macrólidos por metilación del sitio activo del ribosoma, mecanismo de especial relevancia para el uso de eritromicina frente a *S. aureus* (Zahari et al., 2023).

Bombas de eflujo. Las bombas de eflujo multidroga expulsan el antibiótico antes de que ejerza su acción. En *S. aureus* la bomba NorA expulsa fluoroquinolonas; en *E. coli* el sistema AcrAB-TolC bombea múltiples clases de antibióticos, incluyendo tetraciclinas, fluoroquinolonas y β -lactámicos. La inhibición de estas bombas por componentes de aceites esenciales como el timol y el carvacrol ha sido reportada como uno de los mecanismos que sustentan la sinergia entre aceites esenciales y antibióticos (Angarita-Merchán et al., 2024; Limaverde et al., 2017).

Disminución de la permeabilidad de membrana. En bacterias Gram negativas, la alteración del número o la estructura de las porinas de la membrana externa reduce la entrada de antibióticos hidrofílicos al espacio periplásmico. *E. coli* puede modular la expresión de porinas como OmpF y OmpC como respuesta adaptativa a la presión antibiótica, dificultando la acción de aminoglucósidos, β -lactámicos y carbapenémicos (Lepe & Martínez-Martínez, 2022). Esta barrera estructural también es determinante para la menor susceptibilidad de las bacterias Gram negativas frente a compuestos hidrofóbicos como los aceites esenciales.

3.3. Papel de los aceites esenciales en la evasión de la resistencia

Los aceites esenciales ricos en monoterpenos fenólicos timol y carvacrol actúan sobre múltiples blancos bacterianos simultáneamente: desestabilizan la membrana celular aumentando su permeabilidad, disipan el gradiente de potencial de membrana necesario para el funcionamiento de las bombas de eflujo y generan estrés oxidativo intracelular (Nazzaro, 2017). Esta multidirigibilidad dificulta el desarrollo de resistencia específica y constituye la base racional para su empleo en combinaciones sinérgicas con antibióticos convencionales. Estudios recientes han documentado que el aceite esencial de *Lippia* organoides puede revertir fenotipos de resistencia frente a *Acinetobacter baumannii* multirresistente mediante la inhibición de bombas de eflujo tipo TetK (Albuquerque et al., 2025), lo que respalda su potencial como adyuvante antimicrobiano.

3.4. *Lippia organoides*: especie vegetal y aceite esencial

Lippia organoides Kunth es una especie vegetal aromática perteneciente a la familia Verbenaceae, de cuyas hojas y tallos se obtiene por destilación con vapor un aceite esencial de amplio interés farmacológico e industrial. La planta es conocida vulgarmente como "orégano de monte" o "mejorana cimarrona" y es nativa de las zonas áridas y semiáridas de Colombia, Venezuela y Brasil (Torres & Rodríguez, 2007). El Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM), adscrito a la Universidad

Industrial de Santander, ha realizado una extensa caracterización de los aceites esenciales de esta especie, identificando variaciones intraespecíficas significativas en su composición química que han motivado su clasificación en quimiotipos (Carreño et al., 2023).

Los quimiotipos de *L. origanoides* se definen por la predominancia de distintos compuestos mayoritarios en el aceite esencial: timol/carvacrol, cariofileno o p-cimeno, γ -terpineno, entre otros (Henrique Moniz et al., 2025). El aceite utilizado en el presente estudio Bio-Reto 0019 corresponde al quimiotipo timol/carvacrol (Lote II), con una composición química caracterizada por la presencia de estos dos monoterpenos fenólicos como componentes principales, los cuales poseen grupos hidroxilo en su estructura que les confieren alta reactividad frente a componentes lipídicos de la membrana bacteriana, capacidad antioxidante y propiedades antimicrobianas documentadas (Cáceres et al., 2023; Mehmood et al., 2022).

La actividad antimicrobiana del aceite esencial de *L. origanoides* quimiotipo timol/carvacrol ha sido evaluada previamente por el grupo GIBIM de la UIS frente a cepas de *E. coli* O157:H7 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, reportando CMI entre 0,37 y 0,75 mg/mL (Cáceres et al., 2020). Adicionalmente, (Monteiro et al., 2023) demostraron que otro aceite de *L. origanoides* y sus constituyentes mayoritarios exhiben efecto bactericida frente a cepas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii*, asociado a la inserción de los monoterpenos fenólicos en la bicapa lipídica y a la pérdida del gradiente de protones, ATP y contenido citoplasmático. En el contexto colombiano, (Gutierrez-Tobar et al., 2024) documentaron sinergia entre el aceite de *Lippia origanoides* y ampicilina frente a *E. coli* productora de BLEE, con reducciones de la CMI de hasta ocho veces, lo que posiciona este aceite como un candidato robusto para formulaciones antimicrobianas combinadas.

No obstante, la aplicación directa del aceite esencial enfrenta limitaciones prácticas importantes: volatilidad elevada, inestabilidad frente a la luz, calor y oxidación, y carácter marcadamente hidrofóbico que dificulta su formulación en sistemas acuosos convencionales (Kaspute et al., 2025). Estas

limitaciones justifican el desarrollo de sistemas de nanoencapsulación que protejan los componentes activos y mejoren su biodisponibilidad en entornos biológicos acuosos.

3.5. Nanoemulsiones como sistema de entrega de agentes antimicrobianos.

Las nanoemulsiones son sistemas dispersos cinéticamente estables y ópticamente transparentes o translúcidos, con tamaño de gota en el rango de 20 a 500 nm, compuestas por una fase oleosa, una fase acuosa y uno o más agentes emulsionantes (tensioactivos) (Alvarado López & Medina Lezama, 2018). A diferencia de las emulsiones convencionales, el tamaño nanométrico de sus gotas confiere características fisicoquímicas ventajosas: mayor área superficial de contacto, mejor dispersión de sustancias lipofílicas, mayor penetración en tejidos biológicos y estabilidad cinética frente a la coalescencia y la separación de fases (Shlosman et al., 2024).

Según la proporción entre las fases y la naturaleza del tensioactivo, las nanoemulsiones pueden clasificarse en aceite en agua (O/W), agua en aceite (W/O) o bicontinuas (W/O/W u O/W/O). Para la encapsulación de aceites esenciales hidrofóbicos como el Bio-Reto 0019, el sistema O/W es el más empleado, pues permite dispersar la fase oleosa activa en una matriz acuosa continua estabilizada por tensioactivos no iónicos como Tween 20 o Tween 80 (polisorbatos), que presentan baja toxicidad, buena compatibilidad con sistemas biológicos y amplio uso aprobado en formulaciones farmacéuticas (Chircov & Grumezescu, 2019; Kyu et al., 2025).

3.6. Nanoemulsiones en combinación con aceites esenciales y antimicrobianos.

El uso de nanoemulsiones como vehículo para aceites esenciales en combinación con antibióticos representa un campo activo de investigación. La nanoencapsulación resuelve las principales limitaciones de los aceites esenciales volatilidad, hidrofobicidad e inestabilidad química y puede potenciar la actividad antimicrobiana por varios mecanismos: Aumento de la concentración local del

activo en la interfase con la membrana bacteriana, facilitación de la penetración de la fase lipídica a través de la bicapa fosfolipídica bacteriana, y liberación sostenida y controlada del principio activo (Jayari et al., 2022; Kyu et al., 2025) demostraron que la nanoencapsulación del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) en nanoemulsiones O/W estabilizadas con Tween 80 incrementó significativamente la actividad antibacteriana frente a *S. aureus* y *E. coli* en comparación con el aceite libre, con reducciones de CMI de hasta cuatro veces. De manera similar, (Soulaimani et al., 2022) evaluaron nanoemulsiones de mezclas de aceites esenciales en combinación con antibióticos de referencia, documentando efectos sinérgicos con valores de CFI $\leq 0,5$ frente a bacterias multirresistentes, con reducciones de hasta ocho veces en la CMI de los antibióticos. (Guimarães et al., 2024) formularon emulsiones a base de Poloxamer 407 con aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) contra *S. aureus* en el contexto de mastitis bovina, obteniendo tamaños de partícula en el rango de 50–200 nm con actividad antimicrobiana conservada.

Sin embargo, la actividad de las nanoemulsiones con aceites esenciales sobre bacterias Gram negativas como *E. coli* es considerablemente más limitada. La membrana externa de estas bacterias, rica en lipopolisacáridos (LPS), actúa como una barrera de permeabilidad adicional que dificulta la penetración de compuestos hidrofóbicos y de sistemas coloidales complejos (Nazzaro, 2017; Tavares et al., 2018). Este diferencial de susceptibilidad entre bacterias Gram positivas y Gram negativas es un desafío central en el diseño de formulaciones nanoestructuradas con aceites esenciales y ha motivado el desarrollo de estrategias complementarias, como el uso de agentes quelantes (EDTA) para desestabilizar la membrana externa o la combinación con antibióticos que actúen sinérgicamente para facilitar la penetración del aceite esencial.

3.7. Sinergia entre aceites esenciales y antibióticos: estado del arte

La sinergia entre aceites esenciales y antibióticos ha sido ampliamente documentada y se evalúa

cuantitativamente mediante el índice de concentración fraccional inhibitoria (CFI), calculado a partir del método del tablero de ajedrez (Bellio et al., 2021). Se define sinergia cuando $CFI \leq 0,5$, efecto aditivo cuando $0,5 < CFI \leq 1$, indiferencia cuando $1 < CFI \leq 4$, y antagonismo cuando $CFI > 4$ (Drioiche et al., 2024; Odds, 2003) reportaron que aceites esenciales de *Origanum compactum* y *Origanum elongatum* taxonómicamente cercanos a *L. origanoides* y con quimiotipos similares ricos en timol y carvacrol, exhibieron sinergia con antibióticos β -lactámicos y fluoroquinolonas frente a bacterias de alta prioridad de la OMS, incluyendo *S. aureus*. Los autores atribuyeron la sinergia a la inhibición de bombas de eflujo y al aumento de la permeabilidad de membrana, que facilita el acceso de los antibióticos a sus dianas intracelulares. En la misma línea, (Özel et al., 2022) documentaron sinergia entre componentes terpénicos de aceites esenciales y antibióticos como gentamicina, tetraciclina y linezolid frente a *S. aureus*, aunque la interacción frente a *E. coli* fue predominantemente indiferente, lo que concuerda con las limitaciones estructurales de las Gram negativas descritas en la sección anterior. (Gutierrez-Tobar et al., 2024) confirmaron, de manera directamente relevante para el presente trabajo, que el aceite de *Lippia origanoides* actúa sinérgicamente con ampicilina frente a *E. coli* BLEE con reducciones de CMI de hasta ocho veces.

En conjunto, la literatura disponible indica que la sinergia entre los componentes del aceite esencial de *L. origanoides* y los antibióticos de referencia está mediada principalmente por: Desestabilización de la membrana bacteriana que facilita la entrada del antibiótico, inhibición de bombas de eflujo, y acción sobre blancos moleculares independientes y complementarios.

Esta selección multitarget, es particularmente valiosa frente a patógenos con mecanismos de resistencia múltiples como el SARM, y justifica la investigación de formulaciones combinadas en sistemas de nanoentrega que puedan potenciar estos efectos mejorando la estabilidad y la biodisponibilidad de los compuestos activos (Soulaimani et al., 2022)

En la siguiente sección se introduce los materiales y el método aplicado en esta investigación.

4. Materiales y métodos

4.1. Materiales

Los antibióticos ampicilina, ofloxacina, vancomicina, trimetoprina, eritromicina, tetraciclina y kanamicina fueron adquiridos de la casa comercial Merck, al igual que el polímero poloxamer 407. Los tensoactivos utilizados fueron Tween 20, Tween 80 y Span 80, todos de grado analítico. El agua utilizada para todos los procedimientos fue de calidad HPLC libre de RNAsa y DNAsa. Todo el material de plástico fue estéril, libre de RNAsa y DNAsa.

4.2. Cepas bacterianas

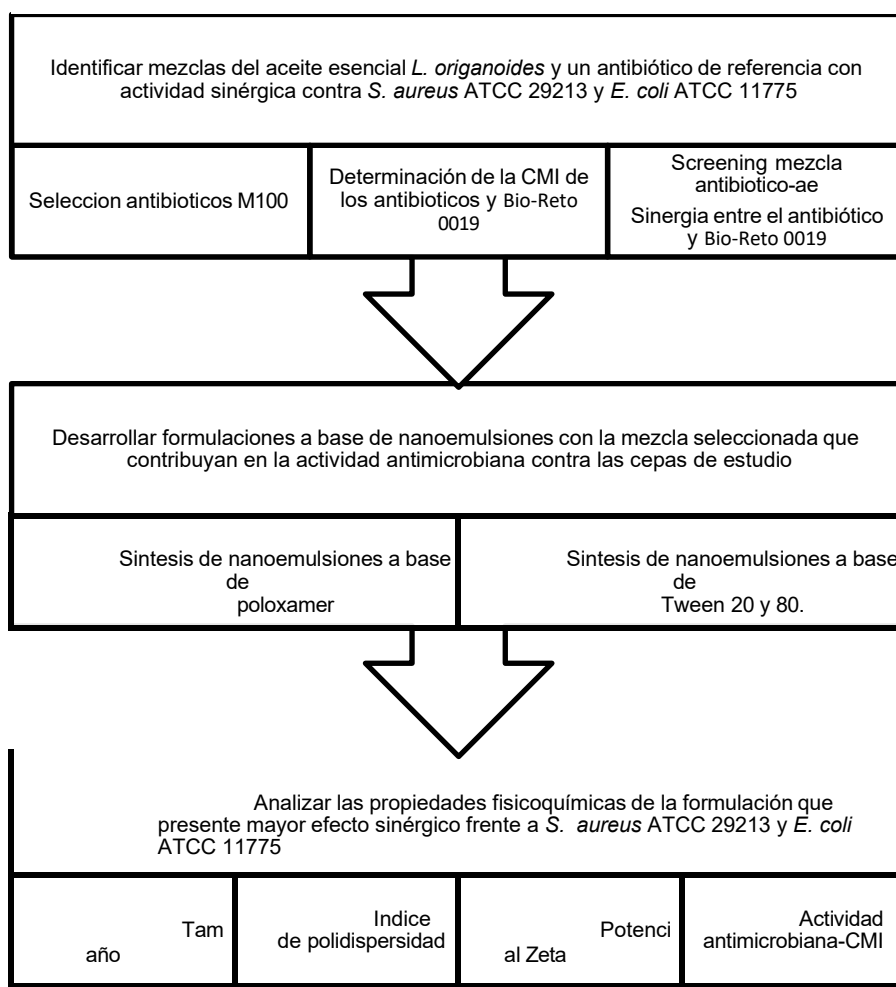
Las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 11775 fueron adquiridas comercialmente de la American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, EE. UU.). Estas se mantuvieron a -70°C en glicerol al 10%. Los medios de cultivo Luria Bertani (LB), Mueller Hinton (MH) e Infusión-Cerebro-Corazón (BHI) fueron adquiridos de Merck Millipore.

4.3. Aceite esencial

El aceite esencial Bio-Reto 0019, fue suministrado, extraído y caracterizado por el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM) (Carreño et al., 2023).

La metodología realizada en este trabajo de investigación se realizó en tres etapas, las cuales se exponen de forma general en la figura 1.

Figura 1. Flujograma de trabajo



4.4. Selección de antibióticos M100

El *screening* preliminar se realizó con el fin de seleccionar antibióticos activos frente a *S. aureus* ATCC 29213 y *E. coli* ATCC 11775. Estos se seleccionaron con base en una revisión exhaustiva de la literatura científica, priorizando aquellos cuyo uso clínico había disminuido en el tratamiento de infecciones de piel, mucosas y vías urinarias debido al incremento de la resistencia bacteriana (CLSI et al., 2025). Se seleccionaron antibióticos representativos de diferentes familias farmacológicas con reportes previos de resistencia en ambas especies bacterianas.

Una vez seleccionados los antibióticos, se procedió a la determinación de la CMI.

4.5. Determinación de la CMI de los Antibióticos, el aceite Bio-Reto 0019 y las Nanoemulsiones

Todos los ensayos se realizaron a partir de un inóculo estandarizado obtenido de una única colonia aislada en agar Infusión Cerebro-Corazón (Brain Heart Infusion, BHI) (Rikken et al., 2023). La colonia se cultivó en medio Luria-Bertani (LB) o Mueller-Hinton (MH), según correspondiera a la especie bacteriana en estudio, durante 12 h a 37°C con agitación orbital constante a 200 rpm, utilizando un shaker Thermo Scientific MaxQ 4000. Posteriormente, el cultivo se diluyó en el medio correspondiente hasta ajustar la suspensión bacteriana a una densidad óptica de 0,08 – 0,10 a 595 nm, según la escala de McFarland, lo que corresponde a aproximadamente 5×10^8 Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL) (CLSI, 2024).

La determinación de la CMI se realizó mediante el método de microdilución en caldo en microplacas de 96 pozos, siguiendo las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2021), con modificaciones menores (Cruz et al., 2017). En cada pozo se adicionaron 100 µL de la suspensión bacteriana y 100 µL del tratamiento correspondiente (antibiótico, Bio-Reto 0019 o nanoemulsión) a diferentes concentraciones. Para el aceite Bio-

Reto 0019 se evaluaron concentraciones entre 0,18 y 1,5 mg/mL, mientras que para las nanoemulsiones se emplearon concentraciones de 1,5% y 3% (v/v). En el caso de los antibióticos ampicilina, ofloxacina, vancomicina, trimetoprina, eritromicina, tetraciclina y kanamicina sus concentraciones se establecieron según los valores de CMI reportados previamente en la literatura (CLSI et al., 2025). Las microplacas se incubaron a 37°C con agitación orbital constante (200 rpm), y el crecimiento bacteriano se monitoreó mediante lecturas de absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro de microplacas Multiskan SkyHigh (Thermo Fisher Scientific) cada hora durante 8 horas. La CMI se definió como la menor concentración capaz de inhibir el 90% del crecimiento bacteriano en comparación con el control positivo.

4.6. Actividad antimicrobiana de nanoemulsiones mediante el método de difusión en disco

La actividad antimicrobiana de las nanoemulsiones formuladas se evaluó mediante el método de difusión en disco (Monteiro et al., 2023). Para ello, se seleccionaron de tres a cinco colonias aisladas de cultivos puros de *S. aureus* ATCC 29213 y *E. coli* ATCC 11775, las cuales se suspendieron en 5 mL de medio de cultivo estéril hasta alcanzar una turbidez equivalente al estándar 0,5 de McFarland. Posteriormente, la suspensión bacteriana se utilizó para inocular la superficie de placas de agar Brain Heart Infusion (BHI) mediante un hisopo estéril. Sobre la superficie inoculada se colocaron discos de papel filtro estériles impregnados con las nanoemulsiones a evaluar. Las placas se incubaron a 37°C durante 18 – 24 h y se midió el diámetro de los halos de inhibición en milímetros alrededor de cada disco.

4.7. Evaluación preliminar (screening) de mezclas sinérgicas entre el aceite Bio-Reto 0019 y los antibióticos seleccionados

Las mezclas se prepararon combinando volúmenes equivalentes de cada antibiótico y del aceite

Bio-Reto 0019, de manera que la concentración final correspondiera a la CMI_{50} de ambos componentes.

Posteriormente, se realizaron los ensayos de actividad antimicrobiana, según lo descrito en el numeral 4.5. Las combinaciones que presentaron porcentajes de inhibición superiores al 50% fueron seleccionadas para su posterior análisis mediante el método del tablero de ajedrez, con el fin de determinar el índice de concentración fraccional inhibitoria (CFI) y establecer el tipo de interacción (sinérgica, aditiva, indiferente o antagónica) (Bellio et al., 2021).

4.8. Sinergia

4.8.1. Determinación del efecto sinérgico entre el aceite Bio-Reto 0019 y los antibióticos seleccionados

La sinergia entre el aceite Bio-Reto 0019 y los antibióticos seleccionados se evaluó mediante el método de tablero de ajedrez, siguiendo el método de Leber (2016) y CLSI (2018).

A partir de un inóculo estandarizado a $1,5 \times 10^8$ UFC·mL⁻¹, de acuerdo con la escala de McFarland. Se prepararon diluciones de los antibióticos utilizando las CMI previamente determinadas y se realizaron diluciones seriadas correspondientes a $0,75 \times CMI$, $0,50 \times CMI$, $0,25 \times CMI$, $0,125 \times CMI$ y $0 \times CMI$ (Figura 2). En microplacas de 96 pozos, se dispusieron los antibióticos en un eje de concentración y el AE en el eje perpendicular, adicionando en cada pozo el inóculo ajustado. Las placas se incubaron a 37°C durante 18 h bajo agitación constante a 200 rpm y, posteriormente, se registraron las lecturas de densidad óptica a 595 nm en un espectrofotómetro de microplacas.

Figura 2.

Representación de la técnica del tablero de ajedrez

óptico	AE/Antibi	1 × CMI	0,75 × CMI	0,50 × CMI	0,25 × CMI	0,125 × CMI	0 × CMI
1 × CMI							
0,75 × CMI							
0,50 × CMI							
0,25 × CMI							
0,125 × CMI							
0 × CMI							

4.8.2. Determinación de Concentración Fraccional Inhibitoria (CFI)

La Concentración Fraccional Inhibitoria (CFI) es un parámetro que permite evaluar el tipo de interacción entre dos agentes antimicrobianos cuando se emplean de manera conjunta (Granata et al., 2025). El valor del CIF considera la combinación de antibióticos que produce el mayor cambio en la CMI del antibiótico individual. Para cuantificar las interacciones entre los antibióticos la CFI se calculó según la Ecuación 1.

La interpretación de los resultados se estableció conforme a los criterios propuestos por (de la Fuente-Salcido et al., 2015), en donde valores $\leq 0,5$ indican sinergia; $> 0,5-1,0$, efecto aditivo; $> 1-2$, efecto indiferente; y ≥ 2 , efecto antagonista.

Ecuación 1 Cálculo de la concentración fraccional inhibitoria

$$CFI = \frac{CMI A \text{ en combinación}}{CMI A} + \frac{CMI B \text{ en combinación}}{CMI B}$$

4.9. Síntesis de nanoemulsiones

Con el objetivo de potenciar la actividad biológica y mejorar la estabilidad de las formulaciones, se procedió a encapsular en nanoemulsiones aquellos antimicrobianos que presentaron el mejor efecto sinérgico con el aceite Bio-Reto 0019. Para este propósito, se prepararon nanoemulsiones empleando dos tipos de tensioactivos: poloxamer 407 y los surfactantes no iónicos Tween 80 y Tween 20, cuyos procedimientos de síntesis se describen a continuación.

4.9.1. *Nanoemulsiones a base de poloxamer*

Para la preparación de la fase acuosa se empleó poloxamer 407, un tensioactivo no iónico ampliamente utilizado por su biocompatibilidad y capacidad estabilizante. Se pesaron 0,2 g de poloxamer 407 y se disolvieron en 4 mL de agua tipo I, obteniéndose una solución al 5% p/v. La disolución se mantuvo bajo agitación magnética durante 30 min a 37°C. Adicionalmente, se prepararon soluciones con concentraciones del tensioactivo al 5%, 10% y 20% p/v.

La fase oleosa se formuló a partir de la mezcla de aceite Bio-Reto 0019 con los antibióticos ampicilina, ofloxacina, vancomicina, trimetoprina, eritromicina, tetraciclina y kanamicina, empleando las concentraciones equivalentes a las CMI determinadas previamente. Ambas fases se combinaron adicionando lentamente la fase oleosa sobre la fase acuosa bajo agitación constante (800 rpm) durante 30 min. Posteriormente, la suspensión obtenida se agitó mediante ultrasonificación utilizando un procesador ultrasónico C-P, ajustado a una amplitud del 60%, con ciclos de 10 s ON / 30 s OFF durante 1 min (6 ciclos en total), con el fin de reducir el tamaño de partícula y favorecer la homogeneización del sistema (Zhang et al., 2017).

4.9.2. *Nanoemulsiones a base de Tween 80 y Tween 20*

Las nanoemulsiones formuladas con Tween 80 y Tween 20 se prepararon empleando las

CMIs previamente determinadas para el aceite Bio-Reto 0019 y los antibióticos ampicilina, ofloxacina, vancomicina, trimetoprina, eritromicina, tetraciclina y kanamicina. Ambos tensoactivos no iónicos se evaluaron a concentraciones del 1,5% y 3% p/v. Estas concentraciones se seleccionaron para optimizar la estabilidad coloidal y reducir el tamaño de partícula, conforme a reportes previos sobre nanoemulsiones estabilizadas con Tween.

En todos los casos, las condiciones de síntesis se mantuvieron idénticas a las descritas para las nanoemulsiones preparadas con Poloxamer 407, incluyendo la relación fase oleosa/fase acuosa, el tiempo de agitación y el tratamiento por ultrasonido.

4.10. Caracterización fisicoquímica de nanoemulsiones

4.10.1. *Tamaño, índice de polidispersidad y potencial Z*

El tamaño de partícula, el índice de polidispersidad (PDI) y la potencial zeta de las nanoemulsiones se determinaron mediante dispersión dinámica de luz (DLS) utilizando un equipo Zetasizer Nano S90 (Malvern Instruments, Reino Unido). Las mediciones se realizaron en celdas de vidrio transparentes a un ángulo de detección de 90°, bajo temperatura controlada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). Para cada muestra se efectuaron tres mediciones independientes, compuestas por diez corridas (scans) cada una, obteniéndose un total de 30 registros por formulación. Los valores reportados correspondían al diámetro hidrodinámico medio expresado por número y al PDI, empleados para evaluar la distribución del tamaño de partícula y la homogeneidad del sistema.

4.11. Análisis estadístico

Se evaluó el supuesto de normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk y se verificó la homocedasticidad de varianzas de los datos mediante Levene. Todos los experimentos se realizaron

por triplicado (tanto las réplicas técnicas como las réplicas biológicas) y se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) para analizar las diferencias entre los tratamientos. Las barras de error en los gráficos representan la desviación estándar de la media y el nivel de significancia fue de $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1. Selección de antibióticos M100

La selección de los antibióticos ampicilina, ofloxacina, vancomicina, trimetoprima, eritromicina, tetraciclina y kanamicina, se realizó con base en las recomendaciones establecidas por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015) que especifica los antimicrobianos de referencia y la CMI para la evaluación de cepas de *S. aureus* y *E. coli*.

5.2. Determinación de la CMI de los antibióticos y del aceite Bio-Reto 0019

La determinación de la CMI₉₀ evidenció que los diferentes antibióticos evaluados y el aceite Bio-Reto 0019 presentaron un efecto inhibitorio sobre *S. aureus* ATCC 29213 y *E. coli* ATCC 11775. Los resultados evidenciaron diferencias en la sensibilidad de ambas cepas bacterianas (Tabla 1). En

S. aureus ATCC 29213, la eritromicina fue el antibiótico que presentó una menor CMI₉₀ de 0,18 µg/mL, seguida de la ofloxacina (0,36 µg/mL) y la vancomicina (1,00 µg/mL). En contraste, la tetraciclina presentó la mayor CMI₉₀ (4,90 µg/mL).

En *E. coli* ATCC 11775, la ofloxacina exhibió la menor CMI₉₀ (0,13 µg/mL), mientras que la ampicilina presentó una mayor CMI (8,29 µg/mL). La trimetoprima, tetraciclina y kanamicina mostraron una actividad intermedia, con concentraciones de CMI entre 1,36 y 1,43 µg/mL. No se determinaron las CMI₉₀ de vancomicina ni de eritromicina debido a su limitada relevancia frente a bacterias Gram negativas.

Por su parte, la actividad antimicrobiana del aceite Bio-Reto 0019 mostró valores de CMI₉₀ de 220 µg/mL para *S. aureus* y 230 µg/mL para *E. coli*, lo que evidenció una actividad antimicrobiana similar del AE frente a ambas cepas (Tabla 2), coincidiendo con los valores previamente reportados de actividad para este aceite (Portilla, 2024).

El análisis preliminar de susceptibilidad permitió seleccionar antibióticos con actividad frente a *S. aureus* ATCC 29213 y *E. coli* ATCC 11775. Entre los compuestos evaluados, ampicilina, ofloxacina, vancomicina, trimetoprima, eritromicina, tetraciclina y kanamicina se seleccionaron los antibióticos kanamicina y tetraciclina para *S. aureus*, y los antibióticos ofloxacina y tetraciclina para *E. coli*.

Tabla 1.

Concentración Mínima Inhibitoria de antibióticos frente a *S. aureus* ATCC 29213 y *E. coli* ATCC 11775

Antibiótico	Microorganismo/ CMI ₉₀ (µg/mL)	
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. coli</i> ATCC 11775
Ofloxacina	0,36	0,13
Vancomicina	1	No determinado
Trimetropina	1,97	1,41
Tetraciclina	4,9	1,43
Ampicilina	No determinado	8,29
Kanamicina	2,96	1,36
Eritromicina	0,18	No determinado

Tabla 2.

Concentración Mínima Inhibitoria del AE Bio-Reto 0019 para *S. aureus* ATCC 29213 y *E. coli* ATCC 11775

Aceite	Microorganismo/ CMI ₉₀ (µg/mL)	
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. coli</i> ATCC 11775
AE Bio-Reto 0019	220	230

5.2.1. Evaluación preliminar (screening) de mezclas sinérgicas entre el AE Bio-Reto 0019 y los antibióticos seleccionados.

El análisis preliminar de sinergia se realizó empleando concentraciones equivalentes al 50% de la CMI (CMI₅₀) tanto para los antibióticos como Bio-Reto 0019, con el fin de evaluar el comportamiento combinado de ambos agentes. En la (Tabla 3) de las pruebas realizadas frente a *S. aureus*, la combinación AE–kanamicina presentó el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento (92,9%). En *E. coli*, la combinación más efectiva correspondió al AE–tetraciclina, con un 79,9% de inhibición, mientras que otras combinaciones mostraron efectos moderados o limitados. En conjunto, estos resultados sugieren que la combinación del Bio-Reto 0019 con determinados antibióticos puede potenciar la actividad antimicrobiana frente a cepas Gram positivas y Gram negativas, lo que respalda su potencial aplicación en formulaciones con efecto sinérgico.

Una vez identificadas las mezclas de AE-antimicrobiano con el mayor porcentaje de inhibición (Tabla 3), se seleccionaron los antibióticos kanamicina y tetraciclina para *S. aureus* (92,9% - 85,9%), y los antibióticos ofloxacina y tetraciclina para *E. coli* (66% - 79,9%) con el fin de evaluar su actividad sinérgica.

Tabla 3.

Porcentaje de inhibición de las mezclas antibiótico/Bio-Reto 0019 en su CMI_{50} frente a *S. aureus* ATCC 29213 y *E. coli* ATCC 11775. Los valores incluyen la desviación estándar. Las celdas en color azul corresponden a los antibióticos seleccionados

Antibiótico	% inhibición de la mezcla antibiótico/ aceite	
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. coli</i> ATCC 11775
Ofloxacina	65,3 ± 19,5	66,0 ± 16,1
Vancomicina	86,0 ± 12,2	No aplica
Trimetropina	71,5 ± 12,9	42,9 ± 28,0
Tetraciclina	85,9 ± 0,3	79,9 ± 4,1
Ampicilina	No determinado	7,7 ± 18,6
Kanamicina	92,9 ± 7,0	30,0 ± 1,1
Eritromicina	72,1 ± 14,0	No aplica

5.2.2. Determinación del efecto sinérgico entre el aceite Bio-Reto 0019 y los antibióticos seleccionados.

Los resultados del análisis de interacción entre el aceite Bio-Reto 0019 y los antibióticos seleccionados mostraron variaciones en el tipo y magnitud del efecto según la cepa bacteriana evaluada.

En el caso del ensayo realizado para *S. aureus*, la combinación de tetraciclina (2,45 µg/mL) y Bio-Reto 0019 (100 µg/mL) (ambos en su CMI_{50}), alcanzó un 52,4% de inhibición del crecimiento bacteriano, con un valor de FIC de 0,75, correspondiente a un efecto aditivo (Tabla 4).

Tabla 4.

Porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano en la actividad sinérgica de la mezcla de AE LOT II y tetraciclina para *S. aureus* ATCC 29213. La escala de colores indica los porcentajes de inhibición, representando en rojo los porcentajes bajos y en verde los altos

		Concentración de antibiótico ($\mu\text{g/mL}$)					
Concentración de							
aceite ($\mu\text{g/mL}$)		0	0,61	1,22	2,45	3,67	4,9
0		0	2,7	6,2	15,7	24,1	36
50		2,8	11,2	17,8	24,8	30,5	37,8
100		11,9	24,1	42,7	52,4	59,7	65,8
200		44,3	60,4	66,4	80,3	84	84,9
300		68	78,8	86,1	90,1	91,4	91,6
400		98	101,2	104,6	104,3	104,4	103,6

Por su parte, la mezcla con del aceite tal con kanamicina evidenció una interacción sinérgica, con un CFI = 0,5, que permitió reducir la concentración efectiva del antibiótico de 2,45 $\mu\text{g/mL}$ a 0,72 $\mu\text{g/mL}$, manteniendo una inhibición superior al 90% (Tabla 5). Este resultado indica una potenciación significativa de la actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*, asociada a una disminución de hasta cuatro veces en la concentración requerida del antibiótico.

Tabla 5.

Porcentajes de inhibición de la sinergia con el AE LOT II y Kanamicina para *S. aureus* ATCC 29213. La escala de colores indica los porcentajes de inhibición, representando en rojo los porcentajes bajos y en verde los altos

		Concentración de antibiótico ($\mu\text{g/mL}$)					
Concentración de aceite ($\mu\text{g/mL}$)							
	0	0,36	0,72	1,45	2,17	2,9	
0	0	3,2	0	15,7	49,1	60,1	
50	0,9	11,8	21,1	59,3	81,2	85,4	
100	21,7	37,8	48	80,8	89	88,6	
200	37,4	65	72,5	91,9	87,5	86,7	
300	60,8	94	95,8	93,5	92,9	91,5	
400	80	102,5	102,5	100,7	100,9	100,8	

En *E. coli*, la interacción entre Bio-Reto 0019 y tetraciclina mostró un efecto indiferente, con un valor de FIC = 1,43. En esta combinación no se observó un incremento sustancial en la inhibición ni una reducción notable de las concentraciones antibióticas, manteniéndose la CMI₅₀ de tetraciclina en 0,71 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 6). En contraste, la combinación Bio-Reto 0019 /ofloxacina presentó un efecto aditivo (FIC = 0,75), evidenciando una reducción del 50% en la CMI₅₀ de la ofloxacina y del 75% en la del aceite esencial (Tabla 7).

Tabla 6.

Porcentajes de inhibición de la sinergia con el AE LOT II y Tetraciclina para *E. coli* ATCC 11775. La escala de colores indica los porcentajes de inhibición, representando en rojo los porcentajes bajos y en verde los altos

Concentración de aceite ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración de antibiótico ($\mu\text{g/mL}$)					
	0	0,18	0,35	0,71	1,07	1,43
0	4,7	33,8	38,5	54,8	60,9	68,5
29	7,4	42,5	39,5	59,4	65,1	72,0
57	5,8	38,2	37,6	57,2	64,7	72,3
115	7,1	32,2	39,1	55,3	71,9	75,5
172	1,1	42,9	54,6	73,1	88,2	93,9
230	3,4	54,1	85,1	96,5	98,3	100,0

Tabla 7.

Porcentajes de inhibición de la sinergia con el AE LOT II y Ofloxacina para *E. coli* ATCC 11775. La escala de colores indica los porcentajes de inhibición, representando en rojo los porcentajes bajos y en verde los altos

Concentración de aceite ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración de antibiótico ($\mu\text{g/mL}$)					
	0	0,007	0,015	0,03	0,045	0,06
0	-0,3	2,7	6,2	15,7	24,1	36
29	2,8	11,2	17,8	24,8	30,5	37,8
57	11,9	24,1	42,7	52,4	59,7	65,8
115	44,3	60,4	66,4	80,3	84	84,9
172	68	78,8	86,1	90,1	91,4	91,6
230	98	101,2	104,6	104,3	104,4	103,6

En conjunto, los resultados demostraron que las combinaciones Bio-Reto 0019 / kanamicina y Bio-Reto 0019 / tetraciclina presentaron la mayor eficacia frente a *S. aureus*, mientras que Bio-Reto 0019/ ofloxacina y Bio-Reto 0019 / tetraciclina destacaron frente a *E. coli*.

5.3. Síntesis de las nanoemulsiones

5.3.1. Nanoemulsiones a base de poloxamer

Las formulaciones preparadas con poloxámero mostraron una apariencia homogénea, sin separación de fases visibles, evidenciando compatibilidad entre los componentes. Este copolímero tribloque, conformado por unidades de óxido de etileno (PEO) y óxido de propileno (PPO),

permitió la formación de sistemas estables debido a su carácter anfifílico, que favorece tanto las interacciones hidrofílicas con los antibióticos como las hidrofóbicas con los compuestos del aceite esencial (Zarrintaj et al., 2020).

En el caso de *S. aureus*, se empleó la mezcla sinérgica AE–tetraciclina para la formulación de nanoemulsiones con poloxámero a concentraciones de 5, 10 y 20% p/v. Estas formulaciones fueron posteriormente caracterizadas mediante dispersión dinámica de luz (DLS) para determinar tamaño de partícula, distribución y potencial zeta, cuyos resultados se describen a continuación.

5.3.2. Características fisicoquímicas de la mezcla tetraciclina-AE con diferentes métodos de agitación.

Se compararon las propiedades fisicoquímicas de las mezclas obtenidas mediante ultrasonido y agitación magnética, utilizando la CMI₅₀ de Bio-Reto 0019 (110 µg/mL) y la CMI₅₀ (2,45 µg/mL) y CMI₂₅ (1,22 µg/mL) de tetraciclina. Los parámetros analizados incluyeron tamaño de partícula, índice de polidispersidad (PDI) y *count rate* (Tabla 8).

En las mezclas con 2,45 µg/mL de tetraciclina, ambos métodos produjeron tamaños de partícula similares (7,4 nm por ultrasonido y 6,8 nm por agitación magnética), sin diferencias notables en el PDI. No obstante, el ultrasonido presentó un *count rate* superior (~18,7), lo que sugiere una mayor dispersión de las partículas y, por tanto, una menor estabilidad coloidal.

A una concentración de 1,22 µg/mL de tetraciclina, la agitación magnética generó partículas ligeramente mayores (10,97 nm), pero con un PDI más bajo (~0,32), indicando una distribución más homogénea y mayor estabilidad del sistema.

En conjunto, los resultados evidencian que la agitación magnética permitió obtener nanoemulsiones con baja polidispersidad y adecuada uniformidad, sin requerir equipos de alta energía, por lo que se seleccionó este método para las formulaciones posteriores.

Tabla 8.

Características fisicoquímicas de la mezcla AE-Tetraciclina variando el método de agitación

Muestra	Agitación	Medición	Tamaño	% población	PDI	Count rate
Mezcla: 110 µg/mL aceite	Ultrasonido	1	6,629	40	0,441	17,4
		2	7,495	45,7	0,448	17,2
		3	8,163	43	0,369	21,7
2,45 µg/mL Tetraciclina	Agitación	1	6,742	82,3	0,588	10,1
		2	6,102	68,6	0,256	8,1
		3	7,580	67,2	0,466	7,8
Mezcla: 110 µg/mL aceite	Ultrasonido	1	6,960	58,9	0,533	9,6
		2	7,438	70,6	0,449	9,7
		3	7,456	67,4	0,494	10,2
1,22 µg/mL Tetraciclina	Agitación	1	10,97	89,6	0,321	6,5

Con base en la caracterización fisicoquímica de la mezcla (Tabla 8), las formulaciones fueron sometidas a ensayos de inhibición bacteriana. La alta densidad de las nanoemulsiones impidió la determinación de la actividad mediante microdilución en caldo, por lo que los resultados se obtuvieron a través del método de difusión en disco. En este ensayo, la formación de halos de inhibición evidenció la capacidad de las formulaciones para difundir en el medio sólido y ejercer actividad antimicrobiana.

5.3.3. *Evaluación de la actividad antimicrobiana de la emulsión tetraciclina + Bio-Reto 0019 frente a S. aureus por el método de difusión en disco en agar.*

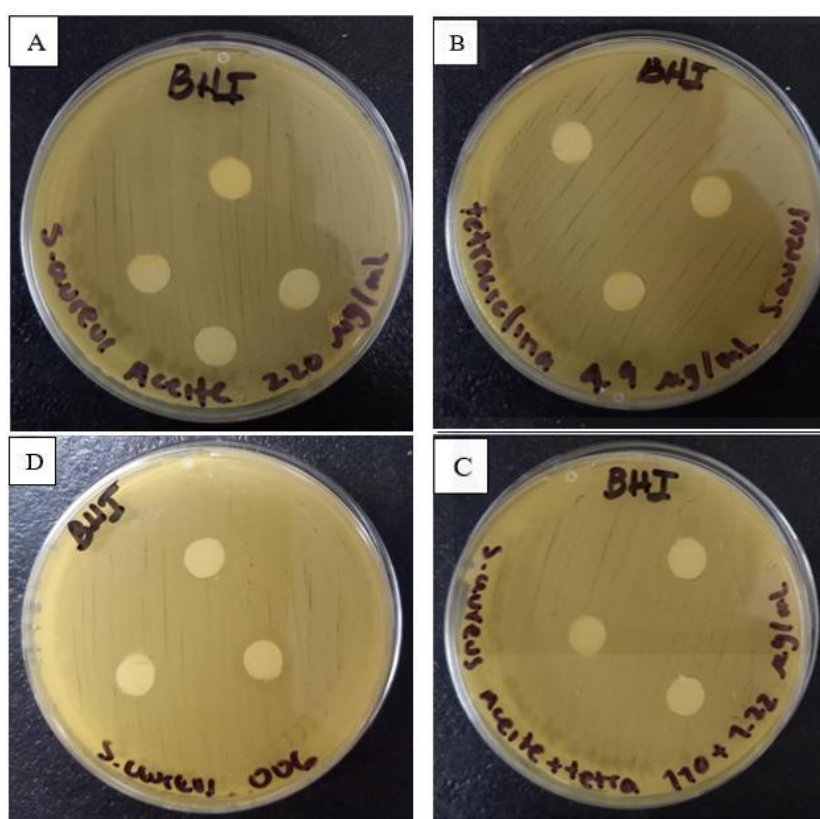
Las emulsiones obtenidas a partir de la combinación de tetraciclina y Bio-Reto 0019 fueron evaluadas frente a *S. aureus* ATCC 29213, con el objetivo de determinar su capacidad inhibitoria en medio sólido. Se analizaron diferentes concentraciones de ambos componentes y se compararon los resultados obtenidos con los métodos de emulsificación por sonicación y agitación magnética.

En ninguna de las formulaciones evaluadas se observaron halos de inhibición definidos (Figura 3), lo que sugiere una difusión limitada de las nanoemulsiones a través del agar. Este comportamiento se asocia principalmente con las propiedades fisicoquímicas del sistema, como su alta densidad y viscosidad, que restringen la migración radial y la liberación del principio activo.

A diferencia de las soluciones acuosas convencionales, las nanoemulsiones presentan una liberación más controlada de los compuestos activos, lo que podría reducir la formación visible de zonas de inhibición, sin que ello implique necesariamente ausencia de actividad antimicrobiana. En comparación con los controles Bio-Reto 0019 libre (110 µg/mL), tetraciclina (4,9 µg/mL) y la mezcla sinérgica Bio-Reto 0019 tetraciclina (2,45 y 1,22 µg/mL), las nanoemulsiones no mostraron halos evidentes, lo que refuerza la hipótesis de una difusión limitada en el medio sólido más que de una falta de efecto bactericida o bacteriostático.

Figura 3.

Evaluación de la actividad antimicrobiana de la emulsión Tetraciclina + Bio-Reto 0019 por el método de difusión en disco en agar. A. Bio-Reto 0019 libre (110 $\mu\text{g/mL}$), B. Tetraciclina (4,9 $\mu\text{g/mL}$), C. Mezcla sinérgica Bio-Reto 0019 (110 $\mu\text{g/mL}$) - Tetraciclina (2,45 $\mu\text{g/mL}$ y 1,22 $\mu\text{g/mL}$), D. Nanoemulsiones de la mezcla sinérgica con ultrasonido de punto, E. Nanoemulsión de la mezcla sinérgica con agitación magnética



La formulación con poloxámero presentó una viscosidad elevada, lo que dificultó su manipulación y limitó la aplicación de los ensayos antimicrobianos. Este comportamiento sugiere que la densidad del sistema podría interferir con la adecuada difusión y liberación del principio activo. En consecuencia, se consideró pertinente explorar alternativas con tensoactivos de menor

viscosidad, como Tween 20 y Tween 80, ampliamente utilizados como agentes solubilizantes y emulsificantes. Estos compuestos podrían mejorar la estabilidad y la liberación del compuesto activo sin afectar su actividad biológica, además de ofrecer una mejor compatibilidad con el método de microdilución en caldo (Dudek-Wicher et al., 2021).

5.4. Nanoemulsiones a base de Tween 80 y Tween 20

Considerando las limitaciones observadas con las formulaciones a base de poloxámero, se evaluó el desempeño de tensoactivos no iónicos de menor viscosidad, específicamente Tween 20 y Tween 80, como alternativas para la obtención de nanoemulsiones más estables y manipulables.

5.4.1. Evaluación del efecto inhibitorio de los tensoactivos Tween 80 y Tween 20

Se analizó el efecto de diferentes concentraciones de estos tensoactivos sobre el crecimiento de *S. aureus* ATCC 29213 y *E. coli* ATCC 11775, con el fin de determinar su posible interferencia biológica y establecer las condiciones adecuadas para su uso en formulaciones posteriores. Las concentraciones evaluadas oscilaron entre 0,1% y 5% p/v.

Los resultados obtenidos (Tablas 9 y 10) mostraron que concentraciones superiores al 3% p/v provocaron una inhibición significativa del crecimiento bacteriano en ambas cepas, especialmente con Tween 20. En *S. aureus*, el porcentaje de inhibición alcanzó el $99,27\% \pm 0,02\%$ a 5% p/v, mientras que en *E. coli* se observó un $97,36\% \pm 0,01\%$ a 3% p/v. A concentraciones inferiores ($\leq 1,5\%$), la inhibición disminuyó de forma considerable, situándose por debajo del 40%.

Las Figuras 4 y 5 representan las cinéticas de crecimiento de las cepas en presencia de cada tensoactivo, donde se evidencia una recuperación progresiva de la tasa de crecimiento bacteriano a medida que disminuye la concentración del agente. A partir de estos resultados, se seleccionaron concentraciones del 1,5% de Tween 20 y Tween 80 para *S. aureus*, y del 1% y 1,5% respectivamente

para *E. coli*, por presentar inhibiciones menores al 40% y mantener una buena capacidad emulsificante.

Figura 4.

Cinética de crecimiento para *S. aureus* ATCC 29213 con tensoactivo Tween 20 y Tween 80 durante 8 horas de crecimiento a 37°C

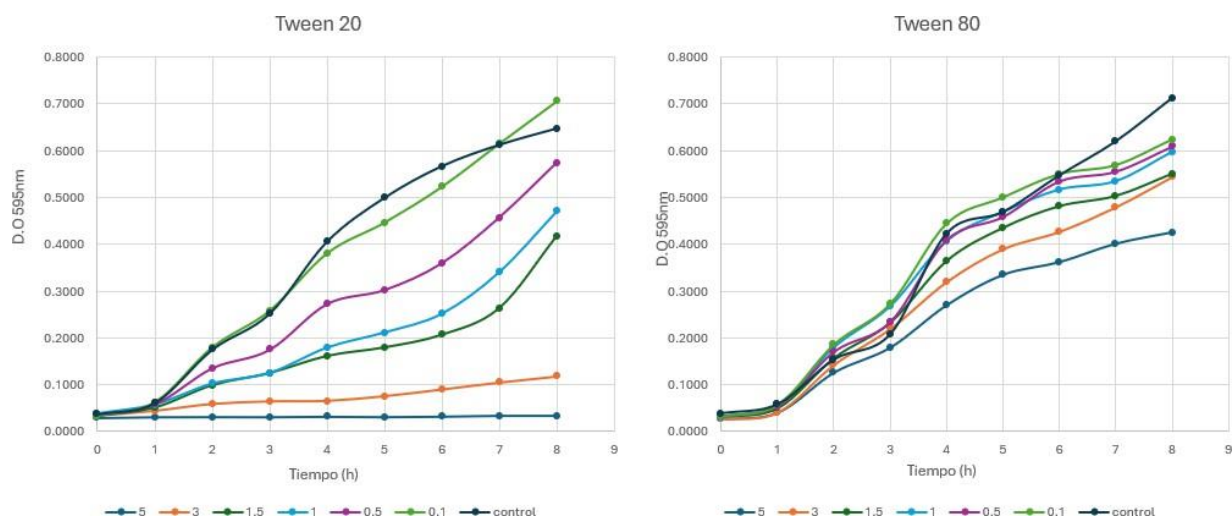


Figura 5.

Cinética de crecimiento para *E.coli* ATCC 29213 con tensoactivo Tween 20 y Tween 80 durante 8 horas de crecimiento a 37°C

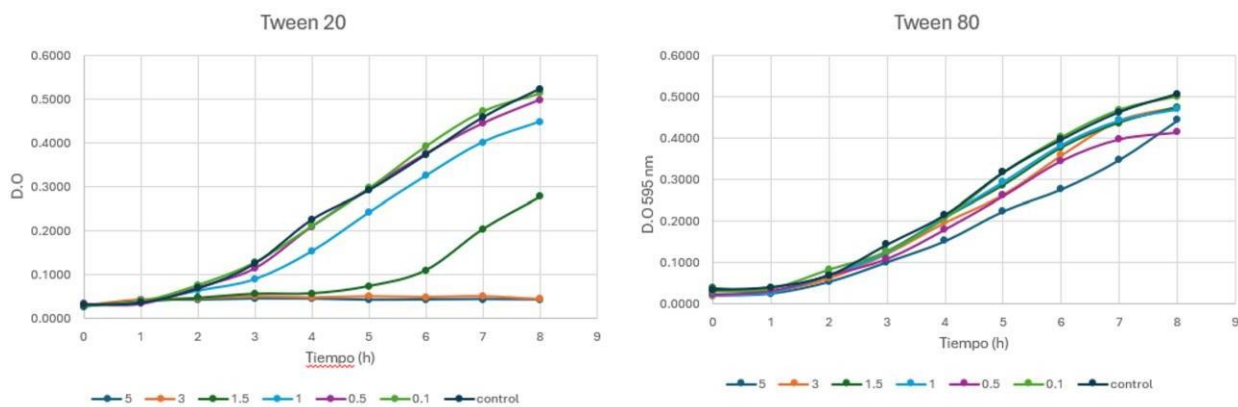


Tabla 9.

Porcentaje de inhibición a diferentes concentraciones de Tween 20 y Tween 80 para *S. aureus* ATCC 29213

Concentración %	% de inhibición	
	Tween 20	Tween 80
5	99,27 ± 0,02	40,76 ± 0,28
3	86,12 ± 0,06	23,31 ± 0,36
1,5	36,99 ± 0,27	22,86 ± 0,37
1	29,03 ± 0,31	16,03 ± 0,40
0,5	11,61 ± 0,38	14,35 ± 0,41
0,1	0	12,46 ± 0,42

Tabla 10.

Porcentaje de inhibición a diferentes concentraciones de Tween 20 y Tween 80 para *E. coli* ATCC 11775

Concentración %	% de inhibición	
	Tween 20	Tween 80
5	96,68 ± 0,01	10,68 ± 0,30
3	97,36 ± 0,01	3,95 ± 0,32
1,5	49,48 ± 0,17	7,98 ± 0,31
1	14,84 ± 0,29	5,16 ± 0,32
0,5	5,14 ± 0,33	17,48 ± 0,28
0,1	1,45 ± 0,34	0,74 ± 0,33

Con base en los resultados obtenidos, se seleccionaron los tensoactivos Tween 20 y Tween 80 en concentraciones del 1,5%, que presentaron porcentajes de inhibición de 36,99% y 22,86%, respectivamente, frente a *S. aureus*. Para *E. coli*, se seleccionaron concentraciones de 1% de Tween 20 (14,84% de inhibición) y 1,5% de Tween 80 (7,98% de inhibición). La elección de estas concentraciones se fundamentó no solo en la baja interferencia con el crecimiento bacteriano, sino también en el equilibrio entre una adecuada capacidad emulsificante y una mínima afectación de la actividad antimicrobiana de las formulaciones.

5.5. Síntesis de nanoemulsiones para *S. aureus* ATCC 29213 a base de Tween 20 y Tween 80

Una vez seleccionada la concentración de los tensoactivos (Tween 20 y Tween 80 al 1,5%), se procedió a realizar las nanoemulsiones con las mezclas sinérgicas previamente identificadas en su CMI₅₀ para *S. aureus* (Bio-Reto 0019 110 µg/mL+ tetraciclina 2,45 µg/mL y AE 110 µg/mL + kanamicina 2,46 µg/mL, Tabla 2 y 3, respectivamente) y posteriormente evaluar su actividad antimicrobiana, con el fin de seleccionar la nanoemulsión con mejor actividad biológica para realizar su caracterización fisicoquímica.

5.5.1. Síntesis de nanoemulsiones de la mezcla Bio-Reto 0019 + tetraciclina para *S. aureus* ATCC 29213

Se analizó la actividad antimicrobiana de la combinación sinérgica del Bio-Reto 0019 (110 µg/mL) con tetraciclina (2,45 µg/mL), formulada con los tensoactivos Tween 20 y Tween 80 al 1,5%.

La cinética de crecimiento (Figura 6) muestra que el tratamiento con Bio-Reto 0019 (110 µg/mL) + tetraciclina (2,45 µg/mL) produjo una inhibición significativa del crecimiento bacteriano durante las ocho horas de incubación, manteniendo la densidad óptica por debajo de 0,2. La

nanoemulsión preparada con Tween 20 al 1,5% no alteró significativamente la eficacia de la mezcla libre, mientras que la formulación con Tween 80 al 1,5% mostró una menor inhibición, evidenciada por un aumento progresivo del crecimiento a partir de la cuarta hora.

En cuanto a los porcentajes de inhibición (Tabla 11), la combinación de Bio-Reto 0019 (110 $\mu\text{g/mL}$) + tetraciclina (2,45 $\mu\text{g/mL}$) alcanzó un $82,41 \pm 0,07\%$ de inhibición. La incorporación de Tween 20 al 1,5% mantuvo una eficacia comparable ($77,01 \pm 0,09\%$), mientras que el uso de Tween 80 al 1,5% redujo considerablemente la actividad, con una inhibición de solo $35,10 \pm 0,27\%$. Estos resultados indican que la presencia de Tween 80 interfiere negativamente con la acción antimicrobiana de la mezcla Bio-Reto 0019 + tetraciclina. En contraste, el Tween 20 demostró una mejor compatibilidad, permitiendo conservar la efectividad de la formulación sin comprometer su actividad biológica.

Figura 6.

Cinética de crecimiento para S. aureus ATCC 29213 con las nanoemulsiones con los tensoactivos Tween 20 y 80 al 1,5% a base de la mezcla sinérgica de Bio-Reto 0019 (110 $\mu\text{g/mL}$) + Tetraciclina (2,45 $\mu\text{g/mL}$) durante 8 horas de crecimiento a 37°C

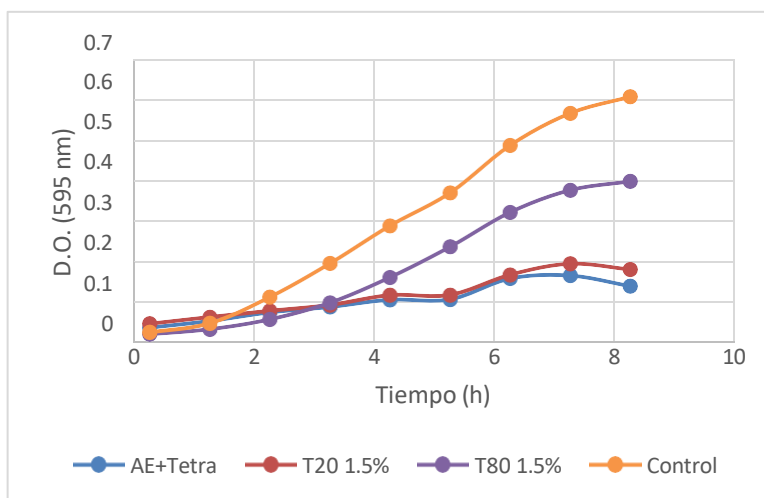


Tabla 11.

Porcentaje de inhibición de la mezcla sinérgica AE (110 µg/mL) + Tetraciclina (2,45 µg/mL) y tensoactivos Tween 20 y 80 al 1,5% para *S. aureus* ATCC 29213

Concentración	% de inhibición
Bio-Reto 0019 (110 µg/mL) + tetraciclina (2,45 µg/mL)	82,41 ± 0,07
T20 1,5%+ Bio-Reto 0019 (110 µg/mL) + tetraciclina (2,45 µg/mL)	77,01± 0,09
T80 1,5%+ Bio-Reto 0019 (110 µg/mL) + tetraciclina (2,45 µg/mL)	35,10 ± 0,27

5.5.2. Caracterización fisicoquímica de la nanoemulsión Bio-Reto 0019 + tetraciclina

Una vez seleccionada la nanoemulsión con mayor porcentaje de inhibición, se procedió a su caracterización fisicoquímica mediante dispersión dinámica de luz (DLS). Se determinaron el tamaño de partícula, el índice de polidispersidad (PDI) y el *count rate*. El análisis reveló una distribución bimodal en las tres mediciones realizadas. En la primera, el tamaño principal fue de 10,03 nm, con un predominio del 95,8% de las partículas, mientras que una fracción minoritaria (4,2%) presentó tamaños mayores (4440 nm), posiblemente asociados a agregados o gotas no completamente emulsionadas. En las mediciones posteriores, los tamaños dominantes se mantuvieron por debajo de 10 nm (9,541 y 9,761 nm), con porcentajes superiores al 83%, lo que indica buena reproducibilidad. El índice de polidispersidad (0,186 – 0,338) se encuentra dentro del rango aceptable para nanoemulsiones con estabilidad moderada, y los valores de *count rate* (52,8 – 59,6) confirman una adecuada dispersión del sistema (Tabla 12).

Tabla 12.

Características fisicoquímicas de la nanoemulsión con el tensoactivo Tween 20 + Mezcla Bio-Reto 0019 + Tetraciclina

Muestra	Tween 20	Medición	Tamaño	%	PDI	Count rate	% inhibición
Mezcla:		1	10,03	95,8	0,18	52,8	
			4440	4,2	6		
110 µg/mL Bio-Reto	1,5%	2	9,541	83,3	0,33	59,6	77,01
0019			480,1	10,5	8		
2,45 µg/mL		3	9,761	87,5	0,30	58,3	
Tetraciclina			628,5	8,0	4		

Estos resultados demuestran que la formulación con Tween 20 al 1,5% + Bio-Reto 0019 (110 µg/mL) + tetraciclina (2,45 µg/mL) genera partículas estables de tamaño nanométrico, con buena dispersión y elevada actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*, lo que la posiciona como una candidata prometedora para aplicaciones terapéuticas.

5.5.3. Síntesis de nanoemulsiones de la mezcla Bio-Reto 0019 + kanamicina para *S. aureus* ATCC 29213

La evaluación del efecto sinérgico del Bio-Reto 0019 (110 µg/mL) en combinación con kanamicina (1,48 µg/mL), junto con los tensoactivos Tween 20 y Tween 80 al 1,5%, evidenció diferencias significativas en la inhibición del crecimiento bacteriano.

En el gráfico que representa la cinética de crecimiento de *S. aureus* (Figura 7), se observa que el grupo control presentó un incremento progresivo en la densidad óptica (D.O. 595 nm),

alcanzando un valor cercano a 0,55 a las 8 horas. En contraste, el tratamiento con Bio-Reto 0019 (110 μ g/mL) + kanamicina (1,48 μ g/mL), mostró una inhibición clara del crecimiento, manteniéndose por debajo de 0,2 durante todo el periodo de incubación. La combinación con los tensoactivos también redujo el crecimiento en comparación con el control, aunque en menor medida que el tratamiento base.

La Tabla 13 resume los porcentajes de inhibición observados para las diferentes combinaciones. El tratamiento con Bio-Reto 0019 (110 μ g/mL) + kanamicina (1,48 μ g/mL) logró un $84,12 \pm 0,07\%$ de inhibición. Al adicionar Tween 20 al 1,5% a esta mezcla y crear la nanoemulsión, se puede observar que la inhibición descendió a $58,3 \pm 0,09\%$, mientras que con la nanoemulsión con Tween 80 al 1,5% se obtuvo la mayor inhibición, alcanzando un $89,32 \pm 0,27\%$.

Estos resultados indican que el tensoactivo Tween 80 potencia la acción antimicrobiana de la mezcla Bio-Reto 0019 (110 μ g/mL) + kanamicina (1,48 μ g/mL), mientras que Tween 20 parece interferir negativamente con su eficacia. Por tanto, la formulación con Tween 80 (T80 1,5% + Bio-Reto 0019 (110 μ g/mL) + kanamicina (1,48 μ g/mL)) representa una alternativa promisoriosa para mejorar la actividad antibacteriana frente a *S. aureus*.

Figura 7.

Cinética de crecimiento para *S. aureus* ATCC 29213 con las nanoemulsiones con los tensoactivos Tween 20 y 80 al 1,5% a base de la mezcla sinérgica de Bio-Reto 0019 (110 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + Kanamicina (1,48 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 8 horas de crecimiento a 37°C

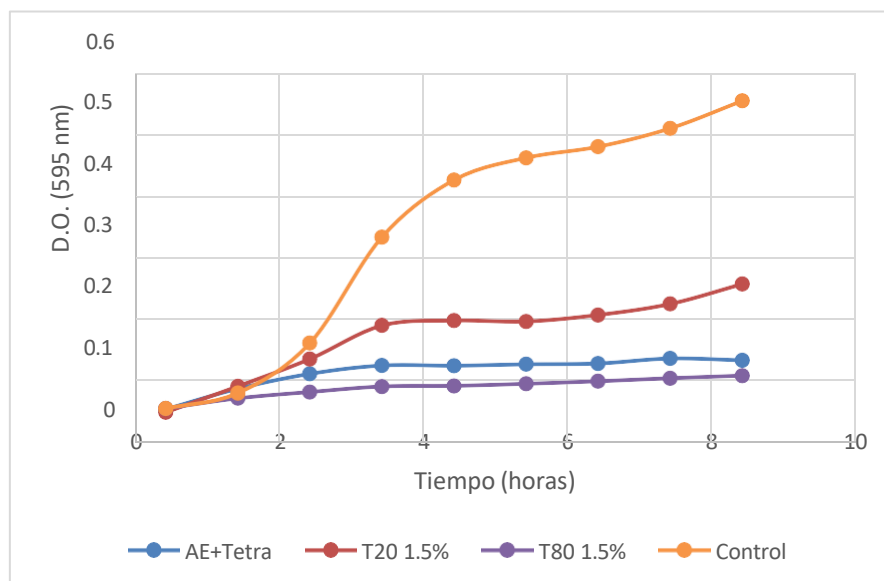


Tabla 13.

Porcentaje de inhibición de la mezcla sinérgica de AE (110 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + Kanamicina (1,48 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y tensoactivos Tween 20 y 80 al 1,5% para *S. aureus* ATCC 29213

Concentración %	% de inhibición
Bio-Reto 0019 (110 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + kanamicina (1,48 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	84,12 \pm 0,07
T20 1,5% + Bio-Reto 0019 (110 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + kanamicina (1,48 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	58,3 \pm 0,09
T80 1,5% + Bio-Reto 0019 (110 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + kanamicina (1,48 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	89,32 \pm 0,27

5.5.4. Caracterización fisicoquímica de la nanoemulsión Bio-Reto 0019 + Kanamicina

Con el objetivo de evaluar las propiedades fisicoquímicas de la formulación antimicrobiana, se realizó un análisis por dispersión dinámica de luz (DLS) tanto de la mezcla base Bio-Reto 0019 (110 µg/mL) + kanamicina (1,48 µg/mL) como de la nanoemulsión formulada con Tween 80 al 1,5%.

La caracterización de la mezcla sin tensoactivo mostró una distribución heterogénea del tamaño de partícula. En las tres mediciones realizadas (Tabla 14), se observaron múltiples poblaciones, con tamaños que oscilaron entre 75,47 nm y 7334,1 nm. Los valores del índice de polidispersidad (PDI) fueron relativamente altos (0,587 – 0,758), lo cual indica una dispersión no homogénea y potencialmente inestable. Además, el conteo de dispersión de luz (*count rate*) fue bajo (28,4 – 34,4), lo que refleja una baja intensidad de señal, posiblemente asociada a una menor densidad de partículas o aglomeración.

Tabla 14.

Características fisicoquímicas de la mezcla sinérgica Bio-Reto 0019 (110µg/mL) + Kanamicina (1,48 µg/mL)

	Medición	Tamaño	%	PDI	Count rate	% inhibición
Mezcla: 110 µg/mL Bio-Reto 0019 1,48 µg/mL kanamicina	1	286,6	60,3	0,758	34,4	84,12
		75,47	39,7			
	2	85,71	51,5	0,608	29,3	
7334,1		48,5				
3	119,3	72,2	0,587	28,4		
	991,7	24,7				
		5400	3,1			

Por otro lado, la nanoemulsión que incorporó Tween 80 al 1,5% mostró una mejora significativa en la uniformidad del sistema. Se observaron tamaños promedio de partícula predominantemente por debajo de 600 nm, con una distribución más estrecha (PDI entre 0,358 y 0,417), lo que sugiere una emulsión más monodispersa y estable (Tabla 15). Los valores de *count rate* fueron notablemente mayores (103 – 121), lo que evidencia una mayor dispersión de partículas y mejor formación de nanoestructuras. Además, esta formulación coincidió con un porcentaje de inhibición del 89,32%, el más alto reportado para las combinaciones evaluadas.

Estos resultados indican que la incorporación del tensoactivo Tween 80 no solo mejora la estabilidad coloidal del sistema, sino que también potencia la actividad antimicrobiana de la formulación Bio-Reto 0019 (110 $\mu\text{g/mL}$) + kanamicina (1,48 $\mu\text{g/mL}$), probablemente al facilitar una mayor interacción con la membrana bacteriana.

Tabla 15.

Características fisicoquímicas de la nanoemulsión sintetizada mezcla Bio-Reto 0019 (110 $\mu\text{g/mL}$) + Kanamicina (1,48 $\mu\text{g/mL}$) y Tween 80 al 1,5 %

Muestra	Tween 80	Medición	Tamaño	%	PDI	Count rate	% inhibición
Mezcla:		1	8,826	60,8	0,412	121,4	
			383,1	31,5			
110 $\mu\text{g/mL}$			<hr/>				
Bio-Reto 0019	1,5%	2	8,993	57,0	0,417	113,7	89,32
			599,6	34,3			
1,48 $\mu\text{g/mL}$			<hr/>				
kanamicina		3	9,395	63,0	0,358	103,2	
			376,8	31,8			

5.6. Síntesis de las nanoemulsiones para *E. coli* ATCC 11775 a base de Tween 20 y Tween 80

Una vez seleccionada la concentración de los tensoactivos (Tween 20 al 1% y Tween 80 al 1,5%), se procedió a realizar las nanoemulsiones con las mezclas sinérgicas identificadas previamente en su CMI₅₀ para *E. coli* (AE 110 µg/mL+ tetraciclina 0,71 µg/mL y AE 110 µg/mL + ofloxacina 0,065 µg/mL (Tabla 2 y 3) y posteriormente evaluar su actividad antimicrobiana, con el fin de seleccionar la nanoemulsión con mejor actividad biológica para realizar su caracterización fisicoquímica.

5.6.1. Síntesis de nanoemulsiones de la mezcla Bio-Reto 0019 + Ofloxacina para *E. coli* ATCC 11775

La Figura 8 muestra la cinética de crecimiento de *E. coli* ATCC 11775 frente a las nanoemulsiones formuladas con la mezcla sinérgica de Bio-Reto 0019 (110µg/mL) + ofloxacina (0,065 µg/mL) incorporando los tensoactivos Tween 20 al 1% y Tween 80 al 1,5%.

Contrario a lo observado con *S. aureus*, en este caso el control presentó una menor densidad óptica en comparación con las formulaciones con tensoactivos, especialmente durante las últimas horas del ensayo. Tanto la nanoemulsión con Tween 20 como la formulada con Tween 80 evidenciaron un crecimiento bacteriano superior al control (Tabla 16), lo cual indica que la presencia de estos tensoactivos no favoreció la acción antibacteriana de la mezcla Bio-Reto 0019 (110 µg/mL) + ofloxacina (0,065 µg/mL) frente a *E. coli* ATCC 11775, es decir no presentaron inhibición bacteriana. Por el contrario, su incorporación podría haber interferido con la actividad del antibiótico, posiblemente por interacciones con los componentes activos o por la formación de estructuras coloidales que limitaron su disponibilidad.

Figura 8.

Cinética de crecimiento para *E. coli* ATCC 11775 con las nanoemulsiones con los tensoactivos Tween 20 (1%) y Tween 80 (1,5%) a base de la mezcla sinérgica de AE (110 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + Ofloxacina (0,065 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 8 horas de crecimiento a 37°C

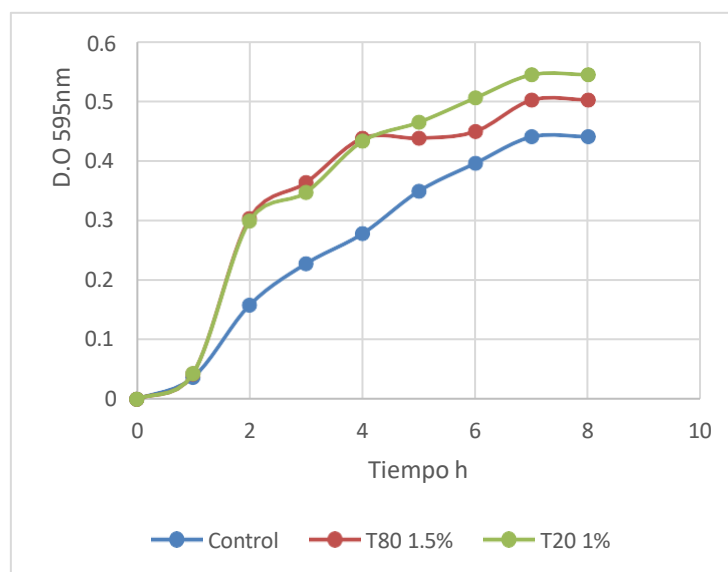


Tabla 16.

Porcentaje de inhibición de la mezcla sinérgica de AE (110 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + Ofloxacina (0,065 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y tensoactivos Tween 20 al 1% y 80 al 1,5% para *E. coli* ATCC 11775

Concentración %	% de inhibición
Bio-Reto 0019 (110 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + ofloxacina (0,065 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	66,0 \pm 16,1
T20 1% + Bio-Reto 0019 (110 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + ofloxacina (0,065 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	0 \pm 0,38
T80 1,5% + Bio-Reto 0019 (110 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + ofloxacina (0,065 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	0 \pm 0,34

5.6.2. Caracterización fisicoquímica de la nanoemulsión Bio-Reto 0019 + Ofloxacina

Los resultados obtenidos en la Tabla 17 muestran que la mezcla sinérgica de Bio-Reto 0019 (110 µg/mL) con ofloxacina (0,065 µg/mL) forma estructuras con tamaños heterogéneos, predominando poblaciones de 216,1 y 207,7 nm con un PDI relativamente elevado (0,767 y 0,293), respectivamente, lo que indica cierta polidispersidad en el sistema. A pesar de la heterogeneidad, esta mezcla presenta una inhibición significativa del crecimiento de *E. coli* ATCC 11775 (66% - ver Tabla 16), lo cual sugiere que la combinación conserva actividad antimicrobiana efectiva.

Tabla 17.

Características fisicoquímicas de la mezcla sinérgica Bio-Reto 0019 (110 µg/mL) + Ofloxacina 0,065 µg/mL

Muestra	Medición	Tamaño	%	PDI	Count rate	% inhibición
Mezcla:	1	216,1	56,0	0,767	9,7	66
		67,85	44,0			
110 µg/mL Bio-Reto 0019	2	207,7	78,9	0,293	7,1	
		55,7	21,1			
0,065 µg/mL ofloxacina	3	88,15	77,7	0,581	7,6	
		941,9	22,3			

Al incorporar tensoactivos para formar nanoemulsiones (Tablas 18 y 19), se observa un cambio sustancial en la distribución del tamaño de partícula. En presencia de Tween 20 al 1%, se forman partículas significativamente más pequeñas (predominio de tamaños de 11,31 y 12,14 nm) con un PDI moderado (0,320 – 0,221), lo que sugiere una nanoemulsión más homogénea y estable

(Tabla 18). De igual forma, con Tween 80 al 1,5%, el tamaño de partícula se reduce aún más (7,73 – 10,39 nm), acompañado de un bajo PDI (< 0,3), lo cual indica una nanoestructura muy monodispersa (Tabla 19). Pese a esta aparente mejora fisicoquímica en términos de estabilidad y homogeneidad, la actividad antimicrobiana de las nanoemulsiones disminuye notablemente, tal como se muestra en la Figura 8, donde las formulaciones con tensoactivos (T20 1% y T80 1,5%) no logran superar la actividad de la mezcla sin tensoactivo. Este contraste sugiere que la incorporación de surfactantes, aunque beneficiosa para la formación de nanoestructuras, podría estar interfiriendo en la biodisponibilidad o el mecanismo de acción sinérgico entre el AE y la ofloxacina, posiblemente por encapsulación excesiva, reducción de la interacción con la membrana bacteriana o cambios en la distribución del antibiótico.

En conjunto, estos hallazgos evidencian que, si bien las propiedades fisicoquímicas mejoran con la emulsificación, ello no siempre se traduce en una mayor eficacia biológica. De hecho, la formulación simple (sin tensoactivos) demostró una mayor efectividad frente a *E. coli*, resaltando la importancia de balancear la estabilidad coloidal con la actividad antimicrobiana en el diseño de sistemas de liberación.

Tabla 18.

Características fisicoquímicas de la emulsión AE (110 μ g/mL) + Ofloxacina 0,065 μ g/mL + T20 1%

Muestra	Medición	Tamaño	%	PDI	Count rate	% inhibición
Nanoemulsión: 110 μ g/mL aceite + 0,065 μ g/mL ofloxacina + T20 1%	1	11,31	90,0	0,320	64,0	2,2
		258,5	7,0			
		5206	3,0			
	2	12,14	93,0	0,278	63,1	
		522,7	3,8			
		4982	3,3			
3	13,31	95,2	0,221	63,0		
	3754	4,8				

Tabla 19.

Características fisicoquímicas de la emulsión Bio-Reto 0019 (110 μ g/mL) + Ofloxacina 0,065 μ g/mL + T80 1,5%

Muestra	Medición	Tamaño	%	PDI	Count rate	% de inhibición
Nanoemulsión: 110 μ g/mL Bio-Reto 0019	1	7,732	92,0	0,289	94,9	1,6
		211,2	8,0			
		8,603	98,4			
0,065 μ g/mL ofloxacina	2	5491	1,6	0,122	88,3	
		10,39	100			
T80 1,5%	3	10,39	100	0,121	83,2	

5.6.3. *Síntesis de nanoemulsiones de la mezcla Bio-Reto 0019 + Tetraciclina*

En la Figura 9 se muestra la cinética de crecimiento de *E. coli* ATCC 11775 en presencia de la mezcla sinérgica de Bio-Reto 0019 (110 µg/mL) con tetraciclina (0,71 µg/mL), tanto sola como formulada con tensoactivos (Tween 20 al 1% y Tween 80 al 1,5%).

De acuerdo con la Tabla 20, la combinación Bio-Reto 0019 + tetraciclina sin tensoactivos muestra una inhibición del crecimiento bacteriano del $79,9 \pm 4,1\%$, lo que confirma una alta actividad antimicrobiana de la mezcla. No obstante, al incorporar tensoactivos para formular nanoemulsiones, la actividad antibacteriana disminuye drásticamente. En el caso de Tween 20 al 1%, la inhibición fue prácticamente nula ($0 \pm 0,34\%$), mientras que con Tween 80 al 1,5% se observó una leve reducción del crecimiento bacteriano ($7,5 \pm 0,31\%$), pero aún muy por debajo de la mezcla sin emulsificar. Esta pérdida de efectividad se refleja también en la gráfica de crecimiento (Figura 9), donde las curvas correspondientes a T20 1% y T80 1,5% muestran un crecimiento bacteriano comparable o incluso superior al del control, a diferencia de la mezcla libre que demostró un efecto inhibitorio significativo. Estos resultados sugieren que la incorporación de tensoactivos altera de forma importante la biodisponibilidad o el mecanismo de acción de la mezcla antimicrobiana. Es posible que los componentes activos queden encapsulados o inmovilizados dentro de la nanoestructura, dificultando su interacción con la membrana bacteriana. También podría existir una interacción desfavorable entre los tensoactivos y los principios activos, que disminuye la sinérgica observada en la mezcla sin formular.

En conjunto, los datos indican que la formulación en nanoemulsión, aunque útil desde el punto de vista fisicoquímico, no garantiza una mejora en la actividad antimicrobiana, y en este caso incluso la compromete. Esto resalta la necesidad de optimizar cuidadosamente la composición y concentración de los tensoactivos en función del tipo de antibiótico y aceite esencial utilizados, para

no interferir negativamente con su acción combinada.

Figura 9.

Cinética de crecimiento para E.coli ATCC 11775 con las nanoemulsiones con los tensoactivos Tween 20 (1%) y Tween 80 (1,5%) a base de la mezcla sinérgica de Bio-Reto 0019 (110 µg/mL) + Tetraciclina (0,71 µg/mL) durante 8 horas de crecimiento a 37°C

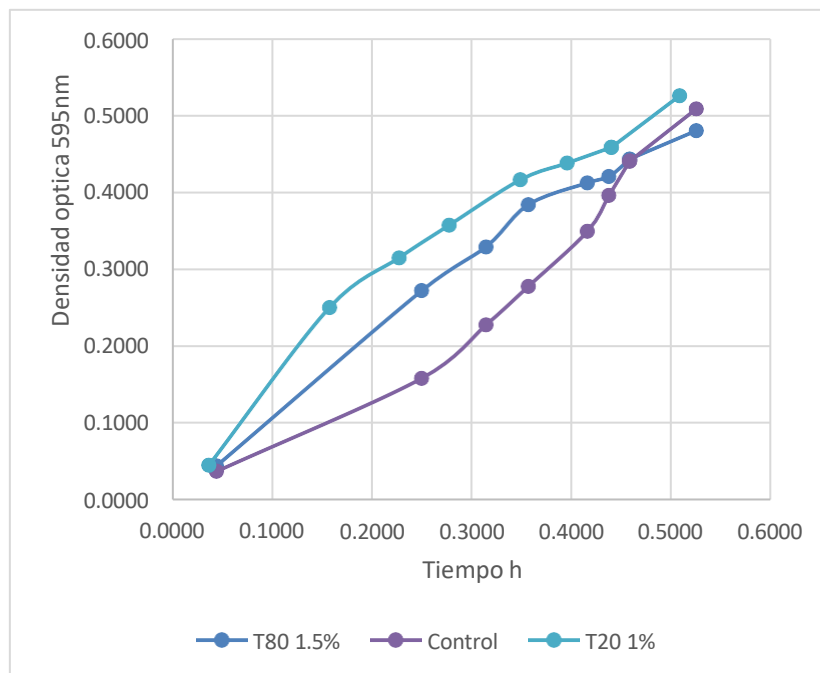


Tabla 20.

Porcentaje de inhibición de la mezcla sinérgica de Bio-Reto 0019 (110 $\mu\text{g/mL}$) + Tetraciclina (0,71 $\mu\text{g/mL}$) y tensoactivos Tween 20 al 1% y 80 al 1,5% para *E. coli* ATCC 11775

Concentración %	% de inhibición
Bio-Reto 0019 (110 $\mu\text{g/mL}$) + tetraciclina (0,71 $\mu\text{g/mL}$)	79,9 \pm 4,1
T20 1% + Bio-Reto 0019 (110 $\mu\text{g/mL}$) + tetraciclina (0,71 $\mu\text{g/mL}$)	0 \pm 0,34
T80 1,5% + Bio-Reto 0019 (110 $\mu\text{g/mL}$) + tetraciclina (0,71 $\mu\text{g/mL}$)	7,5 \pm 0,31

5.6.4. Caracterización fisicoquímica de la nanoemulsión Bio-Reto 0019 + Tetraciclina

En la Tabla 21 se presentan los resultados obtenidos del análisis de tamaño de partícula, polidispersidad (PDI) y tasa de conteo (*count rate*) de la mezcla sinérgica compuesta por Bio-Reto 0019 a una concentración de 110 $\mu\text{g/mL}$ y tetraciclina a 0,71 $\mu\text{g/mL}$. Se realizaron tres mediciones independientes para garantizar la reproducibilidad de los datos.

En la primera medición, se identificaron tres poblaciones de tamaño con diámetros de 80,83 nm (73,7%), 375.9 nm (15%) y 4967 nm (10,5%), con un índice de polidispersidad (PDI) de 0,556 y un *count rate* de 7,2. La segunda medición mostró dos poblaciones principales de 79,91 nm (78,2%) y 263,6 nm (21,8%), con un PDI de 0.476 y un *count rate* de 6,6. En la tercera medición se detectaron partículas de 132,1 nm (75,6%), 42.02 nm (17,0%) y 4754 nm (7,5%), con un PDI de 0,379 y un *count rate* de 7,1.

Los resultados evidencian una alta proporción de nanopartículas con tamaños menores a 150 nm en todas las mediciones, lo cual sugiere una buena capacidad de formación de estructuras en el rango nanométrico. Asimismo, los valores de PDI inferiores a 0,6 indican una distribución de

tamaño moderadamente homogénea, especialmente en las mediciones 2 y 3, lo que sugiere una mayor estabilidad coloidal de la mezcla. La tasa de conteo se mantuvo constante en torno a los 7, reflejando una buena dispersión de las partículas en el medio

Tabla 21.

Características fisicoquímicas de la mezcla sinérgica AE (110 µg/mL) + Tetraciclina (0,71 µg/mL)

Muestra	Medición	Tamaño	%	PDI	Count rate	% inhibición
Mezcla: 110 µg/mL Bio-Reto 0019 0,71 µg/mL Tetraciclina	1	80,83	73,7	0,556	7,2	79,9
		375,9	15,8			
		4967	10,5			
	2	79,91	78,2	0,476	6,6	
		263,6	21,8			
		132,1	75,6			
3	42,02	17,0	0,379	7,1		
	4754	7,5				

Finalmente, las características fisicoquímicas de las nanoemulsiones obtenidas a partir de la mezcla sinérgica de AE (110 µg/mL) y tetraciclina (0,71 µg/mL), formuladas con dos diferentes tensoactivos no iónicos: T20 al 1% y T80 al 1,5% se pueden observar en la Tabla 22 y 23; en donde se evaluaron el tamaño de partícula, el índice de polidispersidad (PDI) y el *count rate* como en los experimentos anteriores.

Tabla 22.

Características fisicoquímicas de la emulsión Bio-Reto 0019 (110 µg/mL) + Tetraciclina (0,71 µg/mL) +T20 1%

Muestra	Medición	Tamaño	%	PDI	Count rate	% inhibición
Nanoemulsión: 110 µg/mL Bio-Reto 0019 0,71 µg/mL Tetraciclina + T20 1%	1	11,31	90,0	0,320	64,0	0
		258,5	7,0			
		5206	3,0			
	2	12,14	93,0	0,278	63,1	
		522,7	3,8			
		4982	3,3			
3	13,31	95,2	0,221	63,0		
	3754	4,8				

Para la formulación con T20 al 1%, se observaron tamaños de partícula predominantemente pequeños, entre 11,31 y 13,31 nm, con distribuciones mayoritarias por encima del 90%. El PDI se mantuvo por debajo de 0,33 en todas las mediciones, lo que sugiere una alta homogeneidad en la distribución de tamaños. Sin embargo, la actividad antimicrobiana fue nula, con un 0% de inhibición del crecimiento bacteriano, a pesar de presentar buenos parámetros fisicoquímicos como estabilidad coloidal y baja polidispersidad (Tabla 22).

Tabla 23.

Características fisicoquímicas de la nanoemulsión Bio-Reto 0019 (110 µg/mL) + Tetraciclina (0,71 µg/mL) + T80 1,5%

Muestra	Medición	Tamaño	%	PDI	Count rate	% inhibición
Bio-Reto 0019 (110 µg/mL) + Tetraciclina (0,71 µg/mL) + T80 1,5%	1	8,118	58,5	0,578	139,3	7,5
		207,0	41,5			
	2	8,597	54,9	0,435	127,8	
		230,4	30,4			
		813,4	14,7			
		9,345	63,9			
3	236,0	32,5	0,343	111,6		
	5364	3,6				

En la nanoemulsión con T80 al 1,5%, las mediciones revelaron una mayor heterogeneidad en el tamaño de partícula, con diámetros que oscilaron entre 8,1 nm y 813,4 nm. El PDI fue mayor que en la emulsión con T20, alcanzando hasta 0,578, lo que indica una dispersión más heterogénea. Aun así, esta formulación mostró un porcentaje de inhibición del 7,5%, ligeramente superior al de la formulación con T20, pero considerablemente inferior al 79,9% obtenido con la mezcla Bio-Reto 0019 + Tetraciclina sin emulsionantes (Tabla 23).

Estos resultados sugieren que, aunque la incorporación de tensoactivos mejoró algunas propiedades fisicoquímicas como el tamaño y la dispersión de las partículas, podría haber interferido negativamente con la actividad antimicrobiana sinérgica observada en la formulación base. Es posible que la presencia de T20 o T80 haya afectado la disponibilidad del principio activo o su interacción con la membrana bacteriana.

6. Discusión

La CMI constituye un parámetro clave para evaluar la actividad antimicrobiana de compuestos como antibióticos y AEs. En este estudio se determinó la CMI₉₀ de varios antibióticos de referencia (ofloxacina, vancomicina, trimetoprima, tetraciclina, ampicilina, kanamicina y eritromicina) y AE Bio-Reto 0019 frente a *S. aureus* y *E. coli*, con el fin de establecer las concentraciones mínimas efectivas de cada agente, según lo reportado en la literatura (CLSI, 2015). Estos experimentos preliminares permitieron identificar la potencia relativa de cada agente y constituyeron la base para evaluar posibles efectos sinérgicos, con el propósito de potenciar la actividad antimicrobiana de las combinaciones.

Inicialmente se evaluó la CMI₉₀ de los antibióticos frente a *S. aureus* ATCC 29213 y *E. coli* ATCC 11775. Se observó que la eritromicina presentó la menor CMI₉₀ frente a *S. aureus* (0,18 µg/mL), mientras que la ofloxacina resultó más activa frente a *E. coli* (0,13 µg/mL) (Tabla 1). Estos valores concuerdan con lo reportado por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015), que establece que *S. aureus* es susceptible a eritromicina con concentraciones $\leq 0,5$ µg/mL, y que *E. coli* es susceptible a ofloxacina en rangos de 0,03 – 0,12 µg/mL. Por otra parte, la CMI₉₀ del Bio-Reto 0019 fue de 200 µg/mL para *S. aureus* y de 230 µg/mL para *E. coli*, en concordancia con lo descrito en estudios previos sobre extractos vegetales y este mismo aceite (Cáceres et al., 2020).

Una vez determinadas las CMI₉₀, se realizó un *screening* preliminar de las mezclas el Bio-Reto 0019 y antibióticos. Los resultados evidenciaron que la asociación de Bio-Reto 0019 con antibióticos de referencia mostró una marcada actividad antimicrobiana sinérgica frente a ambas cepas. En particular, se registraron porcentajes de inhibición del 66% en *E. coli* utilizando Bio-Reto 0019 (110 µg/mL) + ofloxacina (0,36 µg/mL); y del 79,9 % con Bio-Reto 0019 + tetraciclina (4,9 µg/mL).

Frente a *S. aureus*, con Bio-Reto 0019 (220 µg/mL) + kanamicina (1,36 µg/mL) se alcanzó

un 92,9% y con Bio-Reto 0019 (220 $\mu\text{g/mL}$) + tetraciclina (1,43 $\mu\text{g/mL}$) un 85,9% (Tabla 3). Estos hallazgos

sugieren que la combinación de antibióticos con el Bio-Reto 0019 podría potenciar su actividad antimicrobiana y reducir la concentración requerida de cada agente para lograr una inhibición efectiva y respaldan lo descrito en la literatura sobre el efecto positivo de las combinaciones entre compuestos naturales y antibióticos clínicamente relevantes (Nazzaro, 2017; Gaizirene et al., 2023).

La capacidad del aceite esencial de *L. origanoides* para potenciar la actividad de antibióticos fue evaluada previamente por Da Silva et al. (2024), quienes demostraron que su acción se asocia principalmente a la presencia de monoterpenos fenólicos como timol y carvacrol, capaces de insertarse en la bicapa lipídica, alterar la permeabilidad de membrana y provocar la pérdida del gradiente de protones, ATP y contenido citoplasmático, generando un efecto bactericida que facilita la acción de antibióticos convencionales. De manera similar, Driouiche et al. (2024) evidenciaron que aceites esenciales ricos en timol, carvacrol y p-cimeno ejercen sinergia con betalactámicos y fluoroquinolonas, explicada por la inhibición de bombas de eflujo y el aumento de la accesibilidad de los antibióticos a sus dianas intracelulares. Estos resultados coinciden con los mecanismos descritos para otros aceites esenciales de la familia Lamiaceae, en los que la interacción con proteínas de membrana y la desestabilización de estructuras celulares son determinantes en la potenciación de la actividad antibacteriana. En conjunto, estas evidencias apoyan la hipótesis de que el Bio-Reto 0019 actúa como un adyuvante que optimiza la eficacia de antibióticos clínicamente relevantes frente a bacterias multirresistentes.

Por otra parte, el efecto sinérgico fue evaluado mediante el índice de concentración inhibitoria fraccionada (FIC), una herramienta ampliamente utilizada para clasificar el tipo de efecto combinado entre dos agentes antimicrobianos. Según los valores obtenidos, las interacciones pueden categorizarse como sinérgicas ($FIC \leq 0,5$), aditivas ($0,5 < FIC \leq 1$), indiferentes ($1 < FIC \leq$

4) o antagonistas ($FIC > 4$) (Odds, 2003). Esta clasificación permite una comprensión más clara de cómo

los diferentes compuestos interactúan entre sí y su potencial para mejorar la eficacia antimicrobiana. La metodología de titulación en tablero de ajedrez, utilizando el Bio-Reto 0019 en combinación con los antibióticos seleccionados, no solo consideró las CMI individuales previamente determinadas (Tabla 4), sino que también incluyó diluciones seriadas correspondientes a $0,75 \times \text{CMI}$, $0,5 \times \text{CMI}$, $0,25 \times \text{CMI}$ y $0,125 \times \text{CMI}$ para cada compuesto. A través de esta estrategia, fue posible calcular el valor del FIC para cada combinación, permitiendo identificar con precisión el tipo de interacción y su potencial sinérgico frente a las bacterias de estudio (Leber, 2016; CLSI, 2018). Los resultados obtenidos muestran que la mezcla de tetraciclina ($2,45 \mu\text{g/mL}$) + Bio-Reto 0019 ($100 \mu\text{g/mL}$) inhibió el 50% del crecimiento bacteriano y exhibió un efecto aditivo, con valores de FIC de 0,75. Este hallazgo es significativo, ya que la CMI de este antibiótico es de $4,9 \mu\text{g/mL}$, lo que se redujo a $2,45 \mu\text{g/mL}$.

Por otra parte, la mezcla de kanamicina ($0,72 \mu\text{g/mL}$) + Bio-Reto 0019 ($100 \mu\text{g/mL}$) inhibió aproximadamente el 48% del crecimiento y mostró un efecto sinérgico, con valores de FIC de 0,5, disminuyendo a la cuarta parte la CMI del Bio-Reto 0019, lo que corresponde a un 70% aproximadamente. Este efecto sinérgico puede atribuirse a la capacidad de los componentes fenólicos del AE Bio-Reto 0019, como el carvacrol y el timol, para alterar la permeabilidad de la membrana celular, facilitando la entrada del antibiótico al interior bacteriano (Haroun et al., 2016).

Frente a *E. coli*, los resultados obtenidos para las mezclas Bio-Reto 0019 ($57 \mu\text{g/mL}$) + tetraciclina ($0,42 \mu\text{g/mL}$) y Bio-Reto 0019 ($57 \mu\text{g/mL}$) + ofloxacina ($0,03 \mu\text{g/mL}$), con un FIC de 1,43 y 0,75 respectivamente, evidencian un efecto aditivo en las combinaciones, lo que se tradujo en una reducción del 50% en la CMI de los antibióticos y de aproximadamente un 75% en la CMI del Bio-Reto 0019. De manera concordante con estos hallazgos, Özel et al. (2022) reportaron actividad sinérgica de antibióticos de uso clínico como gentamicina, tetraciclina, tigeciclina y linezolid en combinación con diferentes componentes mayoritarios de aceites esenciales frente a *S. aureus*

resistente a la meticilina (SARM), *E. coli* y cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, lo que permitió una disminución significativa en la concentración de los antibióticos requeridos (Özel et al., 2022). En particular, en el trabajo de Özel se observó que la interacción fue sinérgica o parcialmente sinérgica contra cepas de *S. aureus*, mientras que frente a *E. coli* predominó una interacción indiferente. En contraste, en nuestro estudio, la mayoría de las interacciones determinadas mediante el cálculo del FIC fueron sinérgicas y aditivas.

Este hallazgo cobra especial relevancia, ya que este tipo de sinergia constituye una estrategia prometedora para el control de bacterias resistentes, pues permite reducir las concentraciones efectivas de antibióticos y, en consecuencia, minimizar tanto los efectos adversos como la presión selectiva sobre el microbiota (Jeong et al., 2023). Asimismo, la identificación de combinaciones con valores de $FIC \leq 0,5$ respalda el desarrollo de formulaciones innovadoras como nanoemulsiones, debido a que estas mejoran tanto la estabilidad como la biodisponibilidad de los compuestos activos (Guchhait et al., 2024).

A partir de estos resultados y considerando simultáneamente la actividad sinérgica obtenida y el carácter hidrofóbico de los metabolitos presentes en el Bio-Reto 0019, se diseñaron nanoemulsiones para encapsular una mezcla del Bio-Reto 0019 (110 $\mu\text{g/mL}$) en combinación con los antibióticos de referencia seleccionados. En términos específicos, para *S. aureus* se emplearon tetraciclina (2,45 $\mu\text{g/mL}$) y kanamicina (2,46 $\mu\text{g/mL}$), mientras que para *E. coli* se utilizaron tetraciclina (0,71 $\mu\text{g/mL}$) y ofloxacina (0,065 $\mu\text{g/mL}$).

En una primera etapa de formulación, se utilizó poloxámero como copolímero, que facilita la formación de micelas y las interacciones necesarias para estabilizar la emulsión. De este modo, se favorece la solubilización del antibiótico en la fase dispersa y, en consecuencia, se mejora su biodisponibilidad. Este comportamiento podría reflejarse en una mayor actividad antimicrobiana,

generando emulsiones estables, lo cual ha sido previamente reportado en la literatura (Guimarães et al., 2024).

Posteriormente, en esta formulación, las interacciones del poloxámero con la tetraciclina y los componentes del AE propiciaron una emulsificación eficiente que, de manera teórica, podría incrementar la biodisponibilidad de los activos. Este resultado es coherente con lo señalado por Lucia et al., 2017 y Guimarães et al. 2024, quienes reportaron que las emulsiones de compuestos bioactivos monoterpénicos, preparadas en diferentes proporciones de poloxámero, presentaron distribuciones a escala nanométrica y una biodisponibilidad variable según el compuesto bioactivo incluido (Lucia et al., 2017; Guimarães et al., 2024).

Con el fin de optimizar la preparación de las nanoemulsiones, se evaluaron dos métodos de emulsificación: ultrasonido y agitación magnética. Ambos permitieron la obtención de nanoemulsiones con tamaños promedio de partícula inferiores a 11 nm. No obstante, se observaron diferencias importantes en la estabilidad coloidal y la homogeneidad de las formulaciones. En las emulsiones con mayor concentración de tetraciclina (2,45 $\mu\text{g/mL}$), el ultrasonido generó partículas con un tamaño promedio de 6,6 – 8,1 nm y un índice de polidispersidad (PDI) cercano a 0,44, mientras que la agitación magnética produjo tamaños similares (6,1 – 7,6 nm) pero con valores de PDI más variables, lo que indica una distribución menos homogénea.

En contraste, al reducir la concentración de tetraciclina a 1,22 $\mu\text{g/mL}$, la agitación magnética permitió obtener una emulsión más homogénea (PDI de 0,32), aunque con un mayor tamaño de partícula (~10,97 nm). Este hallazgo sugiere que, a menores concentraciones del antibiótico, la agitación magnética promueve una mejor organización de las partículas, posiblemente debido a una menor competencia entre moléculas para ser incorporadas en la fase dispersa. Por lo tanto, la

elección del

método de emulsificación resulta clave para asegurar la estabilidad y funcionalidad del sistema. En este sentido, la agitación magnética se destacó por ser más accesible y capaz de producir formulaciones con baja polidispersidad, sin necesidad de equipos especializados, en concordancia con lo reportado por otras investigaciones en el campo de nanoemulsiones farmacéuticas (Wilson et al., 2022).

Sin embargo, al evaluar la actividad antimicrobiana de las formulaciones con poloxámero mediante el método de difusión en disco, no se observaron halos de inhibición significativos en ninguna de ellas. Esta falta de actividad aparente podría explicarse por la elevada viscosidad del sistema basado en poloxámero, que habría limitado la difusión de los compuestos activos en el medio sólido. En conjunto, estos hallazgos evidencian que, si bien el poloxámero permite una formulación eficiente desde el punto de vista fisicoquímico, su empleo podría no ser el más adecuado para pruebas de susceptibilidad que dependan de la difusión de los compuestos en medios sólidos. Por lo anterior, se exploró la formulación con tensoactivos alternativos como Tween 20 y Tween 80, ampliamente utilizados en aplicaciones farmacéuticas debido a su baja viscosidad y buena compatibilidad con diferentes métodos de evaluación biológica (Singh et al., 2017; Jacob et al., 2024). Al integrar estos tensoactivos, se buscó no solo mejorar la estabilidad de las nanoemulsiones, sino también potenciar la eficacia antimicrobiana mediante un entorno coloidal más favorable para la dispersión de los compuestos activos.

En el caso de *S. aureus*, las formulaciones que combinaron Bio-Reto 0019 con kanamicina (89,31%). Este comportamiento sugiere que la naturaleza del tensoactivo influye en la eficiencia de vehiculización y, en consecuencia, en la actividad antimicrobiana observada, lo que resulta coherente con reportes previos donde la composición del surfactante condiciona la liberación del fármaco y la interacción con la membrana bacteriana (Pokhrel et al., 2023).

En contraste, para *E. coli*, ninguna de las combinaciones evaluadas alcanzó actividad antimicrobiana detectable. Este hallazgo pone de manifiesto la diferencia en la susceptibilidad intrínseca entre bacterias Gram positivas y Gram negativas, atribuible a la mayor complejidad estructural de la envoltura celular de estas últimas, que actúa como una barrera de permeabilidad frente a compuestos hidrofóbicos presentes en el AE (Zgurskaya, 2020). Aun así, se seleccionaron formulaciones basadas en tetraciclina y ofloxacina para *E. coli*, con el fin de explorar si la nanoestructuración puede mejorar la estabilidad y el perfil de liberación de los antibióticos, más allá de la ausencia de inhibición inmediata en las pruebas iniciales.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran el alto potencial del Bio-Reto 0019 en combinación con antibióticos de referencia para formular nanoemulsiones con propiedades antimicrobianas frente a *S. aureus* ATCC 29213, mientras que en el caso de *E. coli* ATCC 11775 no se evidenció actividad. Este comportamiento diferencial puede explicarse por las diferencias estructurales entre bacterias Gram positivas y Gram negativas, que influyen en la penetración y acción de compuestos antimicrobianos encapsulados. En particular, las Gram negativas presentan una barrera lipopolisacáridica que dificulta la penetración de compuestos hidrofóbicos o de sistemas coloidales complejos (Tavares et al., 2020; Trombetta et al., 2005).

En relación con *S. aureus*, se observó un efecto inhibitorio significativo en las curvas de crecimiento cuando se aplicaron nanoemulsiones que contenían Bio-Reto 0019 en combinación con kanamicina o tetraciclina. De hecho, las formulaciones con Tween 80 al 1,5% + kanamicina + Bio-Reto 0019 mostraron un efecto más marcado en la reducción del crecimiento bacteriano que aquellas con Tween

20 al 1%, lo cual puede asociarse con sus propiedades fisicoquímicas. Específicamente, las emulsiones con Tween 80 presentaron tamaños de partícula promedio inferiores a 20 nm y valores de

PDI menores a 0,2 en algunos casos, lo que indica una buena homogeneidad del sistema. Estos

parámetros resultan relevantes, puesto que nanoemulsiones más pequeñas y homogéneas pueden favorecer una mejor dispersión y una liberación más controlada de los activos antimicrobianos (Kumar et al., 2019; 2025).

Por el contrario, en *E. coli* ninguna de las formulaciones desarrolladas a base de Bio-Reto 0019 y tetraciclina u ofloxacina en presencia de Tween 20 o Tween 80 mostró un efecto antimicrobiano detectable. Cabe destacar que, a pesar de que estas nanoemulsiones presentaron tamaños de gota inferiores a 15 nm y valores de PDI aceptables ($< 0,3$), lo cual confirma la estabilidad física de los sistemas, su desempeño biológico fue nulo. Una posible explicación es que los tensoactivos limitaran la liberación de los fármacos en el entorno extracelular y, en consecuencia, su interacción con la estructura bacteriana. Asimismo, la encapsulación del antibiótico dentro de las micelas o gotas de la nanoemulsión podría haber reducido su biodisponibilidad en el medio, afectando su eficacia. En consonancia con estos hallazgos, otros estudios han reportado que los aceites esenciales muestran una acción más limitada sobre bacterias Gram negativas debido a la barrera lipopolisacáridica de su membrana externa (Nazzaro et al., 2013).

Es relevante destacar que, aunque las nanoemulsiones para *E. coli* no mostraron efecto antibacteriano, sí presentaron características fisicoquímicas adecuadas, como tamaños en el rango nanométrico, baja polidispersidad y tasas de conteo estables. Estos hallazgos confirman que el método de formulación empleado fue eficiente, lo cual resulta importante porque garantiza la reproducibilidad del sistema y, al mismo tiempo, abre la posibilidad de explorar ajustes en la composición o concentración con el fin de potenciar la bioactividad.

Por otra parte, el análisis sinérgico realizado previamente a las formulaciones reveló

interacciones significativas ($FIC \leq 0,5$) entre Bio-Reto 0019 y los antibióticos seleccionados, principalmente en *S*.

aureus. Este resultado respalda la hipótesis de que la incorporación de Bio-Reto 0019 en sistemas nanoestructurados puede potenciar la actividad antimicrobiana de antibióticos tradicionales (García et al., 2022; Soulimani et al., 2022). No obstante, dicha sinergia no se tradujo en eficacia contra *E. coli* cuando se incorporó en nanoemulsiones, lo que pone de manifiesto que la actividad antimicrobiana depende no solo de la interacción fármaco–compuesto natural, sino también de las características del sistema de liberación. En consecuencia, estos resultados resaltan la necesidad de diseñar nanoemulsiones específicas para bacterias Gram negativas, en las que se optimice la interacción entre el sistema coloidal y las propiedades de la membrana bacteriana.

7. Conclusiones

El aceite esencial Bio-Reto 0019 presenta un efecto sinérgico con los antibióticos tetraciclina y kanamicina contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Esta sinergia se cuantificó mediante una reducción del 75% en la CMI₉₀ de ambos antibióticos y una disminución del 70% en la CMI₅₀ del propio aceite, demostrando una potenciación significativa y recíproca de la actividad antimicrobiana. Frente a *Escherichia coli* ATCC 11775, la interacción del aceite Bio-Reto 0019 fue aditiva con tetraciclina e indiferente con ofloxacina. La mejora en la actividad fue moderada en comparación con

S. aureus, observándose únicamente una reducción en la CMI₅₀ de los antibióticos, sin un efecto potenciador sobre la CMI del aceite.

Las propiedades fisicoquímicas de las nanoemulsiones, evaluadas mediante el tamaño de partícula, el índice de polidispersidad y el *count rate*, evidenciaron formulaciones con tamaños inferiores a 15 nm, especialmente aquellas elaboradas con Tween 20. Sin embargo, la elevada heterogeneidad observada en algunas formulaciones (PDI > 0,2) se asoció con una disminución de la actividad biológica, observándose que las formulaciones base sin tensoactivo presentaron mayor eficacia antimicrobiana.

El hallazgo clave es que las formulaciones libres de tensoactivo exhibieron una mayor eficacia antimicrobiana, evidenciando que la optimización de parámetros fisicoquímicos como el tamaño puede, en este caso, antagonizar la funcionalidad terapéutica del principio activo.

Referencias bibliográficas

- Ahmed, A. D., Hiko, A., Belina, D., Gebremeskel, H. F., & Kebede, I. A. (2024). Identification and antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus* species isolated from raw cow milk, and swabs in smallholder dairy farms in Meta district, Eastern Ethiopia. *BMC Microbiology*, 24(1), 284. <https://doi.org/10.1186/s12866-024-03439-6>
- Angarita-Merchán, M., Di Filippo-Iriarte, G., Mora-Moreno, D. P., & Ferrebuz-Cardozo, A. J. (2024). Efecto del bloqueo de bombas de eflujo en el tratamiento antimicrobiano en cepas con multirresistencia tipo BLEE de origen clínico en Boyacá, Colombia. *Revista Médicas UIS*, 37(1). <https://doi.org/10.18273/revmed.v37n1-2024001>
- Bellio, P., Fagnani, L., Nazzicone, L., & Celenza, G. (2021). New and simplified method for drug combination studies by checkerboard assay. *MethodsX*, 8, 101543. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101543>
- Busmann, E. F., Martínez, D. G., Lucas, H., & Mäder, K. (2020). Phase inversion-based nanoemulsions of medium chain triglyceride as potential drug delivery system for parenteral applications. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 11, 213–224. <https://doi.org/10.3762/bjnano.11.16>
- Cáceres, M., Hidalgo, W., Stashenko, E. E., Torres, R., & Ortiz, C. (2023). Metabolomic Analysis of the Effect of *Lippia organoides* Essential Oil on the Inhibition of Quorum Sensing in *Chromobacterium violaceum*. *Antibiotics*, 12(5), 814. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12050814>
- Cáceres, M., Hidalgo, W., Stashenko, E., Torres, R., & Ortiz, C. (2020). Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Anti-Biofilm and Anti-Quorum Sensing Activities against

- Pathogenic Bacteria. *Antibiotics*, 9(4), 147. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040147>
- Carcione, D., Siracusa, C., Sulejmani, A., Leoni, V., & Intra, J. (2021). Old and New Beta-Lactamase Inhibitors: Molecular Structure, Mechanism of Action, and Clinical Use. *Antibiotics*, 10(8), 995. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080995>
- Carreño, H., Stashenko, E. E., & Escobar, P. (2023). *Essential Oils Distilled from Colombian Aromatic Plants and Their Constituents as Penetration Enhancers for Transdermal Drug Delivery*.
- Cheng, Y.-Y., Tsai, Y.-M., Chuang, Y.-C., Fan, Y.-H., Wang, M.-C., Chen, Y.-C., Teng, C.-H., Kuo, P.-Y., Thuy, T. T. D., Bregente, C. J. B., Zhang, Y.-Z., Lee, Y.-H., Ho, D.-Z., & Kao, C.-Y. (2025). Tracing the evolutionary dynamics of carbapenem-resistant *Escherichia coli* in recurrent and multi-site infections. *Gut Pathogens*, 17(1), 67. <https://doi.org/10.1186/s13099-025-00746-9>
- CLSI. (2015). Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement. CLSI Document M100-S25. In *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 25th ed. CLSI supplement M100*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015. (Vol. 32, Issue 1).
- CLSI. (2024). The Modified Hodge Test for Suspected Carbapenemase Production in Enterobacteriaceae. *Clsi*, January 2009, 2–4. https://clsi.org/media/1899/_m100_archived_methods_table.pdf
- CLSI, Lewis II, J. S., Amy Mathers, F. J., April Bobenchik, D. M., Alexandra Lynn Bryson, D., Shelley Campeau, D., Sharon Cullen, D. K., Tanis Dingle, R., German Esparza, F., Humphries, R. M., Thomas Kirn, F. J., Lutgring, J., Narayanan, N., Elizabeth Palavecino, M.,

- Pierce, V. M., Audrey Schuetz, F. N., Susan Sharp, D., Patricia Simner, F. J., Pranita Tamma, D. D., & Melvin Weinstein, M. P. (2025). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 1*, 1–22.
www.clsi.org:+1.610.688.0100F:+1.610.688.0700E:customerservice@clsi.orgW:www.clsi.org
- Cruz, J., Flórez, J., Torres, R., Urquiza, M., Gutiérrez, J. A., Guzmán, F., & Ortiz, C. C. (2017). Antimicrobial activity of a new synthetic peptide loaded in polylactic acid or poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Nanotechnology*, 28(13).
<https://doi.org/10.1088/1361-6528/aa5f63>
- De La Cadena, E., Pallares, C. J., García-Betancur, J. C., Porrás, J. A., & Villegas, M. V. (2023). Actualización sobre la resistencia antimicrobiana en instituciones de salud de nivel III y IV en Colombia entre enero del 2018 y diciembre del 2021. *Biomédica*, 43(4), 457–473.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.7065>
- de la Fuente-Salcido, N. M., Villarreal-Prieto, J. M., Díaz León, M. Á., & García Pérez, A. P. (2015). Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 46(2), 7–16.
- Dudek-Wicher, R., Paleczny, J., Kowalska-Krochmal, B., Szymczyk-Ziółkowska, P., Pachura, N., Szumny, A., & Brożyna, M. (2021). Activity of Liquid and Volatile Fractions of Essential Oils against Biofilm Formed by Selected Reference Strains on Polystyrene and Hydroxyapatite Surfaces. *Pathogens*, 10(5), 515. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050515>
- El-hack, M. E. A., El-saadony, M. T., Saad, A. M., Salem, H. M., Ashry, N. M., Ghanima, M. M. A., Shukry, M., Swelum, A. A., Taha, A. E., El-tahan, A. M., Abuqamar, S. F., & El-tarabily,

- K. A. (2021). *IMMUNOLOGY, HEALTH AND DISEASE Essential oils and their nanoemulsions as green alternatives to antibiotics in poultry nutrition : a comprehensive review*. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101584>
- Evangelista, A. G., Audrey, J., Corrêa, F., Caroline, A., Pinto, S. M., Luciano, F. B., Gonçalves, A., Audrey, J., Corrêa, F., & Luciano, F. B. (2022). The impact of essential oils on antibiotic use in animal production regarding antimicrobial resistance – a review antimicrobial resistance – a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(19), 5267–5283. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1883548>
- Freedman, S. B., Xie, J., Neufeld, M. S., Hamilton, W. L., Hartling, L., & Tarr, P. I. (2016). Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* Infection, Antibiotics, and Risk of Developing Hemolytic Uremic Syndrome: A Meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*, 62(10), 1251–1258. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw099>
- Gaizirene, F. E., Aurelie, K. G., Cedric, T. F., Armelle, D., Ndedi, M., Del, E., Sonia, M. G., & A, A. G. (2023). *Journal of Drug Delivery and Therapeutics Synergistic Effects of Essential Oils and Antibiotics Against Some Bacterial Strains*. 13(6), 73–82.
- Garzoli, S. (2023). *Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils*. 1–5.
- Granata, G., Venditti, C., Rotondo, C., Dimartino, V., Arezzo, S. D., Gallo, A., Parisi, G., Capone, A., Fontana, C., & Cicalini, S. (2025). *Combating Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* : The Fractional Inhibitory Concentration Index as a Tool to Evaluate Antibiotic Synergy*. 1–10.
- Grijalvo, S., & Rodriguez-Abreu, C. (2023). Polymer nanoparticles from low-energy nanoemulsions for biomedical applications. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 14, 339–350.

<https://doi.org/10.3762/bjnano.14.29>

Gutierrez-Tobar, I., Carvajal, C., Vasquez-Hoyos, P., Díaz-Díaz, A., Londono Ruiz, J. P., Andrade, J., Camacho-Cruz, J., Restrepo-Gouzy, A., Trujillo-Honeysberg, M., Mesa-Monsalve, J. G., Perez, I., Von Moltke, R., Beltran-Echeverry, M., Toro, J. F., Niño, A. P., Camacho-Moreno, G., Calle-Giraldo, J. P., Cabeza, N. Y., Sandoval-Calle, L. M., ... López-Medina, E. (2024). Epidemiological and microbiological characteristics of *S. aureus* pediatric infections in Colombia 2018–2021, a national multicenter study (Staphylored Colombia). *Frontiers in Pediatrics*, 12. <https://doi.org/10.3389/fped.2024.1386310>

Henrique Moniz, A. M., Xavier Junior, F. H., Melo Martins Silva, G., Reis de Melo, A. C. G., Silva, M. M. C. L., Paiva, W. S., Rocha, H. A. O., da Costa, L. A. M. A., Melo Filho, A. A. de, & Oliveira, R. de P. (2025). Lippia organoides essential oil increases longevity and ameliorates β -amyloid peptide-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Natural Product Research*, 39(4), 695–703. <https://doi.org/10.1080/14786419.2023.2287183>

Hilal, B., Khan, M. M., & Fariduddin, Q. (2024). Recent advancements in deciphering the therapeutic properties of plant secondary metabolites: phenolics, terpenes, and alkaloids. *Plant Physiology and Biochemistry*, 211, 108674. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2024.108674>

INS. (2022). *Resistencia antimicrobiana*. <https://doi.org/10.33610/infoeventos.70>

Jayari, A., Donsì, F., Ferrari, G., & Maaroufi, A. (2022). Nanoencapsulation of Thyme Essential Oils: Formulation, Characterization, Storage Stability, and Biological Activity. *Foods*, 11(13), 1858. <https://doi.org/10.3390/foods11131858>

Jeong, J.-Y., Jung, I.-G., Yum, S.-H., & Hwang, Y.-J. (2023). In Vitro Synergistic Inhibitory Effects of Plant Extract Combinations on Bacterial Growth of Methicillin-Resistant

- Staphylococcus aureus*. *Pharmaceuticals*, *16*(10), 1491. <https://doi.org/10.3390/ph16101491>
- Kaspate, G., Ivaskiene, T., Ramanavicius, A., Ramanavicius, S., & Prentice, U. (2025). Terpenes and Essential Oils in Pharmaceuticals: Applications as Therapeutic Agents and Penetration Enhancers with Advanced Delivery Systems for Improved Stability and Bioavailability. *Pharmaceuticals*, *17*(6), 793. <https://doi.org/10.3390/pharmaceuticals17060793>
- Khwaza, V., & Aderibigbe, B. A. (2025). Antibacterial Activity of Selected Essential Oil Components and Their Derivatives: A Review. *Antibiotics*, *14*(1), 68. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14010068>
- Kyu, H. H., Vongpradith, A., Dominguez, R.-M. V., Ma, J., Albertson, S. B., Novotney, A., Khalil, I. A., Troeger, C. E., Doxey, M. C., Ledesma, J. R., Sirota, S. B., Bender, R. G., Swetschinski, L. R., Cunningham, M., Spearman, S., Abate, Y. H., Abd Al Magied, A. H. A., Abd ElHafeez, S., Abdoun, M., ... Murray, C. J. L. (2025). Global, regional, and national age-sex-specific burden of diarrhoeal diseases, their risk factors, and aetiologies, 1990–2021, for 204 countries and territories: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet Infectious Diseases*, *25*(5), 519–536. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(24\)00691-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(24)00691-1)
- Lepe, J. A., & Martínez-Martínez, L. (2022). Mecanismos de resistencia en bacterias gramnegativas. *Medicina Intensiva*, *46*(7), 392–402. <https://doi.org/10.1016/j.medin.2022.02.004>
- Lim, D. Y., Lee, J.-S., & Lee, H. G. (2023). Nano-encapsulation of a combination of clove oil and thymol and their application in fresh-cut apples and raw minced beef. *Food Control*, *148*, 109683. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109683>
- Liu, F., Rajabi, S., Shi, C., Afifirad, G., Omid, N., Kouhsari, E., Khoshnood, S., & Azizian, K.

- (2022). Antibacterial activity of recently approved antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains: A systematic review and meta-analysis. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *21*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12941-022-00529-z>
- Makabenta, J. M. V., Nabawy, A., Li, C.-H., Schmidt-Malan, S., Patel, R., & Rotello, V. M. (2021). Nanomaterial-based therapeutics for antibiotic-resistant bacterial infections. *Nature Reviews Microbiology*, *19*(1), 23–36. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0420-1>
- Matera, R., Lucchi, E., & Valgimigli, L. (2023). *Plant Essential Oils as Healthy Functional Ingredients of Nutraceuticals and Diet Supplements : A Review*. 1–34.
- Mehmood, A., Javid, S., Khan, M. F., Ahmad, K. S., & Mustafa, A. (2022). In vitro total phenolics , total flavonoids , antioxidant and antibacterial activities of selected medicinal plants using different solvent systems. *BMC Chemistry*, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13065-022-00858-2>
- Monteiro, E. da S., da Silva, F. S., Gomes, K. O., do Prado, B. A., dos Santos, R. D., Gomes da Camara, C. A., de Moraes, M. M., Silva, I. C. R. da, de Macêdo, V. T., Gelfuso, G. M., Sá Barreto, L. C. L. de, & Orsi, D. C. (2023). Characterization and Determination of the Antibacterial Activity of *Baccharis dracunculifolia* Essential-Oil Nanoemulsions. *Antibiotics*, *12*(12), 1677. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12121677>
- Muhammad, I., Wan Ismail, W. N. I., Samsuddin, N., & Alias, N. (2023). Pathogens from fomites in clinical setting: A scoping review. *IIUM Journal of Orofacial and Health Sciences*, *4*(1), 59–79. <https://doi.org/10.31436/ijohs.v4i1.144>
- Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F.,

- Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, *399*(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Muteeb, G., Rehman, M. T., Shahwan, M., & Aatif, M. (2023). Origin of Antibiotics and Antibiotic Resistance, and Their Impacts on Drug Development: A Narrative Review. *Pharmaceuticals*, *16*(11), 1615. <https://doi.org/10.3390/ph16111615>
- Nabi, H. Bin, Ahmed, M., Mia, S., Islam, S., & Zzaman, W. (2025). Essential oils : Advances in extraction techniques , chemical composition , bioactivities , and emerging applications. *Food Chemistry Advances*, *8*(July), 101048. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2025.101048>
- Nasrollahian, S., Graham, J. P., & Halaji, M. (2024). A review of the mechanisms that confer antibiotic resistance in pathotypes of *E. coli*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1387497>
- Nazzaro, F. (2017). *Essential Oils and Antifungal Activity*. 1–20. <https://doi.org/10.3390/ph10040086>
- Neupane, R., Bhathena, M., Das, G., Long, E., Beard, J., Solomon, H., Simon, J. L., Nisar, Y. B., MacLeod, W. B., & Hamer, D. H. (2023). Antibiotic resistance trends for common bacterial aetiologies of childhood diarrhoea in low- and middle-income countries: A systematic review. *Journal of Global Health*, *13*, 04060. <https://doi.org/10.7189/jogh.13.04060>
- Nguyen, T. T. T., Le, T. V. A., Dang, N. N., Nguyen, D. C., Nguyen, P. T. N., Tran, T. T., Nguyen, Q. V., Bach, L. G., & Thuy Nguyen Pham, D. (2021). Microencapsulation of Essential Oils by Spray-Drying and Influencing Factors. *Journal of Food Quality*, *2021*, 1–15.

<https://doi.org/10.1155/2021/5525879>

OMS. (2025). Global antibiotic resistance surveillance report 2025. In *Global antibiotic resistance surveillance report 2025*. <https://doi.org/10.2471/b09585>

Orike, E. L., Olajugbagbe, T. E., Animasahun, T. O., & Abdulraheem, M. (2024). The Prevalence and Antibiotic-resistant Profile of *Staphylococcus aureus* from Fomites in a Tertiary Institution in Ibadan, Oyo State, Nigeria. *Asian Journal of Research in Infectious Diseases*, 15(12), 81–88. <https://doi.org/10.9734/ajrid/2024/v15i12402>

Paredes, R., Damme, M., Mantilla, J., Castellanos, L. R., Clavijo, V., Celis, Y., Mehta, K., Kumar, A., Patiño, A., & Jeyashree, K. (2023). Prevalence and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in animal feed in Colombia. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 47, 1. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2023.57>

Pires, P. C., Fernandes, M., Nina, F., Gama, F., Gomes, M. F., Rodrigues, L. E., Meirinho, S., Silvestre, S., Alves, G., & Santos, A. O. (2023). Innovative Aqueous Nanoemulsion Prepared by Phase Inversion Emulsification with Exceptional Homogeneity. *Pharmaceutics*, 15(7), 1878. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071878>

Pokhrel, D. R., Sah, M. K., Gautam, B., Basak, H. K., Bhattarai, A., & Chatterjee, A. (2023). A recent overview of surfactant–drug interactions and their importance. *RSC Advances*, 13(26), 17685–17704. <https://doi.org/10.1039/D3RA02883F>

Portilla, R. (2024). *Estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial de Lippia origanoides quimiotipo timol-carvacrol nanoencapsulado en polímeros biodegradables*.

Rasquel-Oliveira, F. S., Ribeiro, J. M., Martelossi-Cebinelli, G., Costa, F. B., Nakazato, G., Casagrande, R., & Verri, W. A. (2025). *Staphylococcus aureus* in Inflammation and Pain:

Update on Pathogenic Mechanisms. *Pathogens*, *14*(2), 185.

<https://doi.org/10.3390/pathogens14020185>

Rayess, Y. El, Nehme, L., Ghanem, C., Beyrouthy, M. El, Sadaka, C., Azzi-achkouty, S., Nehme, N., Gürer, E. S., & Sharifi-rad, J. (2023). *Phenolic content , antioxidant and antimicrobial activities evaluation and relationship of commercial spices in the lebanese market*. 1–9.

Rikken, G., Meesters, L. D., Jansen, P. A. M., Rodijk-Olthuis, D., van Vlijmen-Willems, I. M. J. J., Niehues, H., Smits, J. P. H., Oláh, P., Homey, B., Schalkwijk, J., Zeeuwen, P. L. J. M., & van den Bogaard, E. H. (2023). Novel methodologies for host-microbe interactions and microbiome-targeted therapeutics in 3D organotypic skin models. *Microbiome*, *11*(1), 227.

<https://doi.org/10.1186/s40168-023-01668-x>

Rodilla, J. M., Rosado, T., & Gallardo, E. (2024). Essential Oils: Chemistry and Food Applications. *Foods*, *13*(7), 1074. <https://doi.org/10.3390/foods13071074>

Shlosman, K., Rein, D. M., Shemesh, R., & Cohen, Y. (2024). Lyophilized Emulsions of Thymol and Eugenol Essential Oils Encapsulated in Cellulose. *Polymers*, *16*(10), 1422.

<https://doi.org/10.3390/polym16101422>

Sukwa, N., Bosomprah, S., Somwe, P., Muyoyeta, M., Mwape, K., Chibesa, K., Luchen, C. C., Silwamba, S., Mulenga, B., Munyinda, M., Muzazu, S., Chirwa, M., Chibuye, M., Simuyandi, M., Chilengi, R., & Svennerholm, A.-M. (2024). The Incidence and Risk Factors for Enterotoxigenic *E. coli* Diarrheal Disease in Children under Three Years Old in Lusaka, Zambia. *Microorganisms*, *12*(4), 698. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12040698>

Visan, A. I., & Negut, I. (2024). Coatings Based on Essential Oils for Combating Antibiotic Resistance. *Antibiotics*, *13*(7), 625. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13070625>

Yavuz, M., Kilit, A. C., & Korkut, A. (2024). *Astragalus gymnolobus Methanolic Extracts*.

Zahari, N. I. N., Engku Abd Rahman, E. N. S., Irekeola, A. A., Ahmed, N., Rabaan, A. A., Alotaibi, J., Alqahtani, S. A., Halawi, M. Y., Alamri, I. A., Almogbel, M. S., Alfaraj, A. H., Ibrahim, F. Al, Almaghaslah, M., Alissa, M., & Yean, C. Y. (2023). A Review of the Resistance Mechanisms for β -Lactams, Macrolides and Fluoroquinolones among *Streptococcus pneumoniae*. *Medicina*, 59(11), 1927. <https://doi.org/10.3390/medicina59111927>

Zarrintaj, P., Ramsey, J. D., Samadi, A., Atoufi, Z., Khodadadi, M., Reza, M., Mohammadi, L., Zangene, E., Farokhi, M., Formela, K., Reza, M., Mozafari, M., & Thomas, S. (2020). Acta Biomaterialia Poloxamer : A versatile tri-block copolymer for biomedical applications. *Acta Biomaterialia*, 110, 37–67. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.04.028>

Zhang, M., Yang, B., Liu, W., & Li, S. (2017). Influence of hydroxypropyl methylcellulose , methylcellulose , gelatin , poloxamer 407 and poloxamer 188 on the formation and stability of soybean oil-in-water emulsions. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(6), 521–531. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.05.009>

Abd El-Kalek, H. H., & Mohamed, E. A. (2012). Synergistic effect of certain medicinal plants and amoxicillin against some clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *International Journal of Pharmaceutical Applications*, 3(3), 387–398. <http://www.bipublication.com>

Alvarado López, G., & Medina Lezama, E. (2018). Nanoemulsiones O/W De Aceite Esencial De Naranja Y Tween 80. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 85(2), 189–205. <https://doi.org/10.37761/rsqp.v85i2.77>

Anaya, P. A. F., Medina, L. M. R., Ugarriza, M. E. O., & Gutiérrez, L. A. L. (2013).

Determinación de *Escherichia coli* e identificación del serotipo O157: H7 en carne de cerdo

comercializada en los principales supermercados de la ciudad de Cartagena. *Revista Lasallista de Investigacion*, 10(1), 91–100.

Bachir, R. G., & Benali, M. (2012). Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(9), 739–742. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60220-2](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60220-2)

Bastida-Ramírez, L. J., Buendía-González, L., Mejía-Argueta, E. L., Sandoval-Cabrera, A., García-Fabila, M. M., Pavón-Romero, S. H., Padua-Ahumada, M., & Santillán-Benítez, J. G. (2024). *Lippia origanoides* and *Thymus vulgaris* Essential Oils Synergize with Ampicillin against Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli*. *Microorganisms*, 12(8), 1702. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12081702>

Betoni, J. E., Mantovani, R. P., Barbosa, L. N., Di Stasi, L. C., & Fernandes Junior, A. (2006). Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(4), 387–390. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762006000400007>

Black, R. E., Cousens, S., Johnson, H. L., Lawn, J. E., Rudan, I., Bassani, D. G., Jha, P., Campbell, H., Walker, C. F., Cibulskis, R., Eisele, T., Liu, L., & Mathers, C. (2010). Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *TheLancet*, 375(9730), 1969–1987. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60549-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60549-1)

Cabrera, E. C. M. S., Gomez, F. R. B. S., & Zúñiga, E. A. (2007). La resistència de bacterias a antibioticos, antisepticos y desinfectantes. *Colombia Medica*, vol.38(2), 149–158. <http://www.redalyc.org/pdf/283/28338208.pdf>

- Cáceres, M., Hidalgo, W., Stashenko, E., Torres, R., & Ortiz, C. (2020). Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Anti-Biofilm and Anti-Quorum Sensing Activities against Pathogenic Bacteria. *Antibiotics*, 9(4), 147.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9040147>
- Campistol, J. M., Arias, M., Ariceta, G., Blasco, M., Espinosa, L., Espinosa, M., Grinyó, J. M., Macía, M., Mendizábal, S., Praga, M., Román, E., Torra, R., Valdés, F., Vilalta, R., & Rodríguez de Córdoba, S. (2015). Actualización en síndrome hemolítico urémico atípico: diagnóstico y tratamiento. Documento de consenso. *Nefrología*, 35(5), 421–447.
<https://doi.org/10.1016/j.nefro.2015.07.005>
- Chircov, C., & Grumezescu, A. M. (2019). Nanoemulsion preparation, characterization, and application in the field of biomedicine. In *Nanoarchitectonics in Biomedicine*. Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816200-2.00019-0>
- CLSI. (2012). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard — Ninth Edition* (Vol. 32, Issue 2).
- CLSI. (2018). Clinical and Laboratory Standards Institute Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically Standard,, Approval CDM-A.; *M07 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically.*, 91.
- Cruz, J., Flórez, J., Torres, R., Urquiza, M., Gutiérrez, J. A., Guzmán, F., & Ortiz, C. C. (2017). Antimicrobial activity of a new synthetic peptide loaded in polylactic acid or poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Nanotechnology*, 28(13).
<https://doi.org/10.1088/1361-6528/aa5f63>

- Daza Pérez, R. M. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Inf Ormación Terapeutica Del Sistema Nacional de Salud*, 22(3), 57–67. <http://www.msc.es/fr/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf>
- de Carvalho, S. Y. B., Almeida, R. R., Pinto, N. A. R., de Mayrinck, C., Vieira, S. S., Haddad, J. F., Leitão, A. A., & Guimarães, L. G. de L. (2021). Encapsulation of essential oils using cinnamic acid grafted chitosan nanogel: Preparation, characterization and antifungal activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 166, 902–912. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.247>
- da Silva, A. T., Cândido, A. E. C. M., Júnior, E. D. C. M., do É, G. N., Moura, M. P. S., Souza, R. F. S., Guimarães, M. L., Peixoto, R. M., de Oliveira, H. P., & da Costa, M. M. (2024). Bactericidal and Synergistic Effects of *Lippia origanoides* Essential Oil and Its Main Constituents against Multidrug-Resistant Strains of *Acinetobacter baumannii*. *ACS omega*, 9(43), 43927–43939. <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c07565>
- Drioiche, A., Baammi, S., Zibouh, K., Al Kamaly, O., Alnakhli, A. M., Remok, F., Saidi, S., Amaich, R., El Makhoukhi, F., Elomri, A., & Zair, T. (2024). A Study of the Synergistic Effects of Essential Oils from *Origanum compactum* and *Origanum elongatum* with Commercial Antibiotics against Highly Prioritized Multidrug-Resistant Bacteria for the World Health Organization. *Metabolites*, 14(4), 210. <https://doi.org/10.3390/metabo14040210>
- Dudek-Wicher, R., Paleczny, J., Kowalska-Krochmal, B., Szymczyk-Ziółkowska, P., Pachura, N., Szumny, A., & Brożyna, M. (2021). Activity of Liquid and Volatile Fractions of Essential Oils against Biofilm Formed by Selected Reference Strains on Polystyrene and Hydroxyapatite Surfaces. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(5), 515.

<https://doi.org/10.3390/pathogens10050515>

Economou, V., & Gousia, P. (2015). Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infection and Drug Resistance*, 8, 49–61.

<https://doi.org/10.2147/IDR.S55778>

Feudjieu, E. G., Kemege, G., Tchinda, F. C., & Agbor, G. A. (2023). Synergistic effects of essential oils and antibiotics against some bacterial strains. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 13(6), 73–82. <https://doi.org/10.22270/jddt.v13i6.5860>

Fuentes, K., Matamala, C., Martínez, N., Zúñiga, R. N., & Troncoso, E. (2021). Comparative study of physicochemical properties of nanoemulsions fabricated with natural and synthetic surfactants. *Processes*, 9(11), 2002.

Garcia, C. R., Malik, M. H., Biswas, S., Tam, V. H., Rumbaugh, K. P., Li, W., & Liu, X. (2022). Nanoemulsion delivery systems for enhanced efficacy of antimicrobials and essential oils. *Biomaterials Science*, 10(3), 633-653.

Gómez-Duarte, O. G. (2014). Enfermedad diarreica aguda por *Escherichia coli* enteropatógenas en Colombia. *Revista Chilena de Infectología*, 31(5), 577–586.

<https://doi.org/10.4067/S0716-10182014000500010>

Gómez Vega, A. G. (2014). *Formulación y caracterización de nano_emulsiones de aceite de parafina tipo agua_en_aceite*. 84.

Grimwood, K., & Forbes, D. A. (2009). Acute and Persistent Diarrhea. *Pediatric Clinics of North America*, 56(6), 1343–1361. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2009.09.004>

Guchhait, S. K., & Sarma, A. K. (2024). Application of nanoemulsion in food and packaging industry. En *Industrial Applications of Nanoemulsion* (cap. 2).

<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90047-8.00002-9>

Guimarães, N. M., Ferreira, N. S., Menezes, K. V., Neto, C. S., Cunha, G. M., Menini, L., Resende, J. A., & Villanova, J. C. O. (2024). Formulating an innovative emulsion based on Poloxamer 407 containing oregano and thyme essential oils as alternatives for the control of mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *Processes*, 12(12), 2640.

<https://doi.org/10.3390/pr12122640>

Haroun, M. F., & Al-Kayali, R. S. (2016). Synergistic effect of *Thymbra spicata* L. extracts with antibiotics against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Iranian journal of basic medical sciences*, 19(11), 1193–1200.

Herrera, F., & Santos, J. (2015). Presencia de *Staphylococcus aureus* metilinaresistentes en queso doble crema artesanal. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 18(1), 29–37. <https://doi.org/10.31910/rudca.v18.n1.2015.451>

Ileana, D., Lam, Á., Ponce, I. J., & Ii, B. (2012). *Staphylococcus aureus*, evolución de un viejo patógeno *The evolution of an old pathogen called Staphylococcus aureus*. 84(2), 383–391.

Jacob, S., Kather, F. S., Boddu, S. H. S., Shah, J., & Nair, A. B. (2024). Innovations in Nanoemulsion Technology: Enhancing Drug Delivery for Oral, Parenteral, and Ophthalmic Applications. *Pharmaceutics*, 16(10), 1333.

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16101333>

Jain, A., Ranjan, S., Dasgupta, N., & Ramalingam, C. (2018). Nanomaterials in food and agriculture: An overview on their safety concerns and regulatory issues. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(2), 297–317.

<https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1160363>

- Kant, V., Gopal, A., Kumar, D., Gopalkrishnan, A., Pathak, N. N., Kurade, N. P., Tandan, S. K., & Kumar, D. (2014). Topical pluronic F-127 gel application enhances cutaneous wound healing in rats. *Acta Histochemica*, *116*(1), 5–13.
<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2013.04.010>
- Kerwin B. A. (2008). Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: structure and degradation pathways. *Journal of pharmaceutical sciences*, *97*(8), 2924–2935. <https://doi.org/10.1002/jps.21190>
- Khameneh, B., Iranshahy, M., Soheili, V. et al. Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. *Antimicrob Resist Infect Control* *8*, 118 (2019).
<https://doi.org/10.1186/s13756-019-0559-6>
- Kumar, A., Kanwar, R., & Mehta, S. K. (2025). Nanoemulsion as an effective delivery vehicle for essential oils: Properties, formulation methods, destabilizing mechanisms and applications in agri-food sector. *Next Nanotechnology*, *7*, 100096.
- Kumar, M., Bishnoi, R. S., Shukla, A. K., & Jain, C. P. (2019). Techniques for Formulation of Nanoemulsion Drug Delivery System: A Review. *Preventive nutrition and food science*, *24*(3), 225–234.
- Leber, A. L. (2016). Synergism Testing: Broth Microdilution Checkerboard and Broth Macrodilution Methods. In *Clinical Microbiology Procedures Handbook* (pp. 5.16.1-5.16.23). ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555818814.ch5.16>
- Limaverde, P. W., Campina, F. F., da Cunha, F. A. B., Crispim, F. D., Figueredo, F. G., Lima, L. F., Datiane de M. Oliveira-Tintino, C., de Matos, Y. M. L. S., Morais-Braga, M. F. B., Menezes, I. R. A., Balbino, V. Q., Coutinho, H. D. M., Siqueira-Júnior, J. P., Almeida, J. R. G. S., & Tintino, S. R. (2017). Inhibition of the TetK efflux-pump by the essential oil of

- Chenopodium ambrosioides L. and α -terpinene against *Staphylococcus aureus* IS-58. *Food and Chemical Toxicology*, 109, 957–961. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.02.031>
- Liu, L., Oza, S., Hogan, D., Perin, J., Rudan, I., Lawn, J. E., Cousens, S., Mathers, C., & Black, R. E. (2015). Global, regional, and national causes of child mortality in 2000-13, with projections to inform post-2015 priorities: An updated systematic analysis. *The Lancet*, 385(9966), 430–440. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61698-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61698-6)
- López, L., Castaño, H., & Mejía, C. (2013). Efecto Antimicrobiano Del Aceite Esencial. *Actualidades Biológicas*, 35(98), 77–83.
- Lucia A, Toloza AC, Guzmán E, Ortega F, Rubio RG. 2017. Novel polymeric micelles for insect pest control: encapsulation of essential oil monoterpenes inside a triblock copolymer shell for head lice control. *PeerJ* 5:e3171 <https://doi.org/10.7717/peerj.3171>
- Mandujano, N. (2020). *BIOPOLÍMEROS MICROBIANOS: APLICACIONES EN BIOMEDICINA Y FARMACIA*. UNIVERSIDAD DE SEVILLA.
- Matiz Melo, G. E., Fuentes López, K., & León Méndez, G. (2015). Microencapsulación de aceitesesencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) en matrices poliméricas de almidón de ñame (*Dioscorea rotundata*) modificado. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, 44(2), 189–207. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v44n2.56293>
- Máttar, S., Mora, A., & Bernal, N. (1997). [Prevalence of *E. coli* O157:H7 in a pediatric population in Bogotá, D.C. with acute gastroenteritis]. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 15(7), 364–368. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9410049>
- Mattar, S., Visbal, J., & Arrieta, G. (2001a). De Diarrea Y Zoonosis En Colombia Subestimado .

Parte I. *Journal of Infectious Diseases, The, 1*, 15–23.

Mattar, S., Visbal, J., & Arrieta, G. (2001b). E. coli 0157 : H7 ENTEROHEMORRÁGICO : UN AGENTE ETIOLÓGICO DE DIARREA EN COLOMBIA. *Mvz-Córdoba 2001*, 6(2), 81–86.

Milenković, M., Stošović, J., & Slavkovska, V. (2018). Synergy between Essential Oils of Calamintha Species (Lamiaceae) and Antibiotics. *Natural Product Communications*, 13(3), 1934578X1801300. <https://doi.org/10.1177/1934578X1801300325>

Millezi, A. F., Caixeta, D. S., Rossoni, D. F., Cardoso, M. das G., & Piccoli, R. H. (2012). In vitro antimicrobial properties of plant essential oils thymus vulgaris, cymbopogon citratus and laurus nobilis against five important foodborne pathogens. *Food Science and Technology*, 32(1), 167–172. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612012005000021>

Moreno, C., González, R., & Beltrán, C. (2009). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Revista de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*, 69(2), 185–192. <https://doi.org/10.4067/s0718-48162009000200014>

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

Muthaiyan, A., Martin, E. M., Natesan, S., Crandall, P. G., Wilkinson, B. J., & Ricke, S. C. (2012). Antimicrobial effect and mode of action of terpeneless cold-pressed Valencia orange essential oil on methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Journal of Applied Microbiology*, 112(5), 1020–1033. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05270.x>

Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., & Feo, V. (2017). Essential Oils and Antifungal

Activity. *Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland), 10(4), 86.

<https://doi.org/10.3390/ph10040086>

Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland), 6(12), 1451–1474. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>

Odds, F. C. (2003). Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(1), 1–1. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg301>

OMS. (2017). *La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos*. <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

OMS. (2020). *Resistencia a los antimicrobianos*. <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/antimicrobial-resistance>

Özel, Y., Yılmaz, U., Ünlü, M., & Vardar Ünlü, G. (2022). Antibacterial activity and synergistic interaction of various essential oil components and antibiotics [Article in Turkish]. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 56(1), 95–102. <https://doi.org/10.5578/mb.20229908>

Pinto, I. C., Cerqueira-Coutinho, C. S., Santos, E. P., Carmo, F. A., & Ricci-Junior, E. (2017). Development and characterization of repellent formulations based on nanostructured hydrogels. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 43(1), 67–73. <https://doi.org/10.1080/03639045.2016.1220564>

Salvadori, M. (2013). Update on hemolytic uremic syndrome: Diagnostic and therapeutic recommendations. *World Journal of Nephrology*, 2(3), 56. <https://doi.org/10.5527/wjn.v2.i3.56>

Sánchez, P. H. (2011). *Encapsulación de Aceite Esencial de Clavo para su Aplicación en la Industria Alimentaria*.

Santos, N. K. A., Coutinho, H. D. M., Viana, G. S. B., Rodrigues, F. F. G., & Costa, J. G. M. (2011). Chemical characterization and synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Vanillosmopsis arborea*. *Medicinal Chemistry Research*, 20(5), 637–641. <https://doi.org/10.1007/s00044-010-9372-8>

Shetta, A., Kegere, J., & Mamdouh, W. (2019). Comparative study of encapsulated peppermint and green tea essential oils in chitosan nanoparticles: Encapsulation, thermal stability, in-vitro release, antioxidant and antibacterial activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 731–742. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.161>

Singh, S. M., Bandi, S., Jones, D. N. M., & Mallela, K. M. G. (2017). Effect of Polysorbate 20 and Polysorbate 80 on the Higher-Order Structure of a Monoclonal Antibody and Its Fab and Fc Fragments Probed Using 2D Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Journal of pharmaceutical sciences*, 106(12), 3486–3498. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.08.011>

Soulaimani, B., Abbad, I., Varoni, E., Iriti, M., Mezrioui, N.-E., Hassani, L., & Abbad, A. (2022). Optimization of antibacterial activity of essential oil mixture obtained from three medicinal plants: Evaluation of synergism with conventional antibiotics and nanoemulsion effectiveness. *South African Journal of Botany*, 151(Part A), 900–908. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.11.010>

Sousa, F. L., Santos, M., Rocha, S. M., & Trindade, T. (2014). Encapsulation of essential oils in SiO₂ microcapsules and release behaviour of volatile compounds. *Journal of Microencapsulation*, 31(7), 627–635. <https://doi.org/10.3109/02652048.2014.911376>

- Tavares, T. D., Antunes, J. C., Padrão, J., Ribeiro, A. I., Zille, A., Amorim, M. T. P., Ferreira, F., & Felgueiras, H. P. (2020). Activity of Specialized Biomolecules against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 9(6), 314. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060314>
- Togneri, A. M., Podestá, L. B., & Pérez, M. P. (2017). *Estudio de las infecciones por Staphylococcus aureus en un hospital general de agudos (2002-2013)*. 49(1), 24–31.
- Torres, E., & Rodríguez, N. (2007). PLASTICIDAD FENOTÍPICA DE *Lippia alba* Y *Lippia origanoides* (VERBENACEAE) EN RESPUESTA A LA DISPONIBILIDAD DE LUZ
Phenotypic Plasticity of *Lippia alba* and *Lippia origanoides* (*Vervenaceae*) in Response to Availability of Light. *Acta Biológica Colombiana*, 12, 91–102.
- Trombetta D., Castelli F., Sarpietro M.G., Venuti V., Cristani M., Daniele C., Saija A., Mazzanti G., Bisignano G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005;49:2474–2478. doi: 10.1128/AAC.49.6.2474-2478.2005
- Vasquez, A., Ibarra, A., Sá madariaga, J., Martinez, S., & Saéz, R. (2000). *Diccionario de ciencias*. completense.
- Wilson, R. J., Li, Y., Yang, G., & Zhao, C.-X. (2022). Nanoemulsions for drug delivery. *Particuology*, 64, 85–97. <https://doi.org/10.1016/j.partic.2021.05.009>
- Xu, J.-G., Liu, T., Hu, Q.-P., & Cao, X.-M. (2016). Chemical Composition, Antibacterial Properties and Mechanism of Action of Essential Oil from Clove Buds against *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 21(9), 1194. <https://doi.org/10.3390/molecules21091194>
- Zapata, B., Duran, C., Stashenko, E., Correa Royero, J., & Betancur Galvis, L. (2009). Actividad

citotóxica de aceites esenciales de *Lippia organoides* H.B.K. y componentes mayoritarios.

Revista de La Universidad Industrial de Santander. Salud, 41(3), 215–222.

Zgurskaya, H. I., & Rybenkov, V. V. (2020). Permeability barriers of Gram-negative pathogens. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1459(1), 5–18.

<https://doi.org/10.1111/nyas.14134>

Zhang, Y., Liu, X., Wang, Y., Jiang, P., & Quek, S. (2016). Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

Food Control, 59, 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.05.032>