

Antimicrobial bioactivity of the phenolic extract assisted by ultrasound from the solid waste post-distillation of essential oil of *Origanum vulgare*

Zilda Marleni Quillca-Lucana¹; Ingrid Ximena Sevilla-Valle¹; Roberto Chuquilín-Goicochea¹
¹Universidad Privada del Norte, Perú, N00234318@upn.pe, N00289454@upn.pe, roberto.chuquilin@upn.edu.pe

Abstract— *The post-distillation residues of essential oil from medicinal and aromatic plants, such as oregano, are potential sources of natural polyphenols. The solid residues from the essential oil industry are produced in significant volumes and can be used as natural sources of bioactive compounds. Therefore, this work was designed to evaluate the effect of three extraction methods on the total polyphenol content and the antimicrobial activity of the phenolic extracts obtained from post-distillation solid residues. The total phenolic content (TPC) and the antimicrobial activity of the extracts obtained by three methods were evaluated: maceration (M), ultrasound and maceration (US+M), and ultrasound (US) against Escherichia coli and Bacillus subtilis at concentrations ranging from 625 to 5000 mg/L. The ultrasound (US) extracts showed the highest total phenolic content (13000 mg/L gallic acid equivalents, GAE), while the minimum inhibitory concentration (MIC) of the rosemary essential oil extract (RPAEO) for E. coli was found to be 5000 mg/L in all three extraction methods, and for B. subtilis it was 5000 mg/L with the US+M and US extracts and 2500 mg/L with the M extract. The experimental findings pointed to the potential use of post-distillation oregano essential oil residue extracts as antimicrobials in the food industry, in addition to being rich sources of phenolic compounds.*

Keywords—*Herbs, solid residues, ethanolic extracts, antibacterial effect, biological activity, valorization.*

Bioactividad antimicrobiana del extracto fenólico asistido por ultrasonido del residuo sólido post-destilación de aceite esencial de *Origanum vulgare*

Zilda Marleni Quillca-Lucana¹; Ingrid Ximena Sevilla-Valle¹; Roberto Chuquilín-Goicochea¹
¹Universidad Privada del Norte, Perú, N00234318@upn.pe, N00234318@upn.pe, roberto.chuquilin@upn.edu.pe

Resumen— Los residuos post-destilación de aceite esencial de plantas medicinales y aromáticas, como el orégano, son fuentes potenciales de polifenoles naturales. Los residuos sólidos de la industria de aceites esenciales se producen en volúmenes significativos y pueden utilizarse como fuentes naturales de compuestos bioactivos. Por lo tanto, este trabajo se diseñó para evaluar el efecto de tres métodos de extracción en el contenido de polifenoles totales y la actividad antimicrobiana de los extractos fenólicos obtenidos de los residuos sólidos post-destilación. Se evaluó el contenido fenólico total (CFT) y la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos con tres métodos: maceración (M), ultrasonido y maceración (US+M) y ultrasonido (US) contra *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* en concentraciones de 625 a 5000 mg/L. Los extractos US mostraron el mayor contenido de polifenoles totales (13000 EAG mg/L), mientras que se encontró que la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto de RPAEO para *E. coli* es de 5000 mg/L, en los tres métodos de extracción y para *B. subtilis* es de 5000 mg/L con los extractos US+M y US, y 2500 mg/L con el extracto M. Los hallazgos experimentales apuntaron al uso potencial de extractos de residuos post-destilación de aceite esencial de orégano como antimicrobianos en la industria alimentaria, además de ser fuentes ricas en compuestos fenólicos.

Palabras clave— Hierbas; residuos sólidos; extractos etanólicos, efecto antibacteriano; actividad biológica; valorización.

I. INTRODUCCIÓN

La creciente resistencia microbiana frente a antibióticos convencionales ha impulsado la búsqueda de alternativas terapéuticas basadas en compuestos naturales, especialmente aquellos derivados de plantas aromáticas con propiedades bioactivas. En este contexto, *Origanum vulgare* L., conocido comúnmente como orégano, ha sido ampliamente estudiado por su aceite esencial rico en carvacrol y timol, compuestos con reconocida actividad antimicrobiana [1]. Sin embargo, los residuos generados tras la destilación del aceite esencial, frecuentemente descartados como subproductos, contienen metabolitos secundarios que podrían conservar o incluso potenciar dicha actividad, representando una oportunidad para la valorización de residuos agroindustriales [2]. Estudios recientes han demostrado que los extractos obtenidos de residuos post-destilación de aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) presentan actividad antimicrobiana significativa frente a cepas resistentes como *Staphylococcus aureus* y *E. coli*, gracias a la presencia residual de compuestos fenólicos y flavonoides que no se eliminan completamente durante la destilación [3]. La extracción hidroetanólica se presenta como una técnica eficiente y sostenible para recuperar compuestos fenólicos y flavonoides de matrices vegetales, favoreciendo la obtención de extractos con potencial

antimicrobiano [4]. Se empleó un control negativo con solución hidroetanólica al 50% y se recomienda incorporar controles positivos con antibióticos de referencia para fortalecer la comparación de la actividad antimicrobiana. Evaluar el efecto de estos extractos sobre cepas bacterianas resistentes no solo contribuye al desarrollo de soluciones naturales para el control microbiano, sino que también promueve el aprovechamiento integral de recursos vegetales en línea con los principios de la economía circular y la gestión territorial sostenible. Este estudio tiene como objetivo evaluar el potencial antimicrobiano del extracto del RPAEO obtenido a partir del residuo en contextos rurales donde el acceso a soluciones farmacológicas convencionales es limitado y donde la revalorización de residuos puede generar impactos positivos tanto ambientales como sociales.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Material

El residuo post destilación de aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) (RPAEO) consistió en hojas empobrecidas en aceite esencial, proporcionadas por la empresa Agroensancha S.R.L., que comercializa aceite esencial de orégano con altos estándares de calidad de nivel internacional. Se deshidrataron a 50 °C en una estufa (Memmert, SF160, Alemania) por 24 h y envasadas al vacío.

B. Reactivos

Reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck, Alemania), ácido gálico (Merck, Alemania) como patrón de referencia y carbonato de sodio (Merck, Alemania), todos de grado analítico. Las soluciones se prepararon utilizando agua destilada. Además, se utilizaron Agar agar (Millipore, Alemania) y caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Millipore, Alemania), ambos de grado microbiológico. Los medios de cultivo y reactivos microbiológicos se prepararon conforme a las indicaciones del fabricante y se esterilizaron antes de su uso.

C. Obtención del extracto

Las muestras fueron inspeccionadas manualmente para eliminar impurezas visibles y asegurar la homogeneidad del material. Se preparó una solución extractora de etanol al 50%. Luego, 50 g de RPAEO se diluyeron en 1L de solución extractora. La disolución fue asignada a tres condiciones distintas: RPAEO macerado (M), RPAEO sometido a tratamiento ultrasonido y posterior maceración (US+M), y RPAEO sometido a ultrasonido (US). La extracción con ultrasonido (US) se llevó a cabo con una probeta US (Biobase,

UCD 950, China), a una potencia de 400 w, tiempo de 1 hora, un lapso de 20 s y temperatura de 25° C. La maceración se realizó por 60 días, en ambos casos (M y US+M). Las muestras fueron almacenadas en botellas de esterilización de color ámbar, protegidas de la luz y la humedad, hasta su procesamiento. No se realizó molienda ni fraccionamiento por tamaño de partícula, ya que el objetivo del estudio fue comparar eficiencia extractiva entre métodos de procesamiento y no evaluar efectos granulométricos.

D. Diseño de la curva de calibración

Se prepararon diez soluciones patrón con concentraciones de ácido gálico entre 10 y 100 mg/L, con incrementos de 10 mg/L. El contenido total de fenoles (TPC) de los extractos se determinó mediante el reactivo Folin-Ciocalteu utilizando el método de Singleton et al. [5], empleando un espectrómetro UV-Vis T90+ (T90+, PG Instruments, Leicestershire, Inglaterra). El análisis se realizó por triplicado, aplicando una dilución de 1/150, y se construyó la curva de calibración necesaria (Fig. 1).

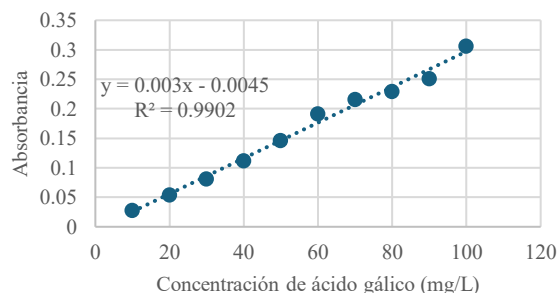


Fig. 1 Curva de calibración de polifenoles totales.

A. Determinación de polifenoles totales

Para cada muestra de extracto RPAEO (diluido 1/150) y solución patrón, se tomó una alícuota de 0,5 mL, a la cual se añadieron 2,5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu al 10% (V/V). La mezcla se dejó reposar durante 5 minutos, tras lo cual se agregaron 2 mL de solución de carbonato de sodio al 10% (P/V). La reacción se desarrolló en baño maría a 45 °C durante 45 minutos. Luego de enfriar, se realizó la lectura de absorbancia a 765 nm. La absorbancia corregida se obtuvo restando el valor del blanco, preparado con los mismos reactivos, pero sin muestra [6].

B. Preparación del ensayo microbiológico

Para los ensayos antimicrobianos se empleó el extracto de RPAEO; considerando que una concentración mínima inhibitoria (CMI) teórica de 3000 mg/L [7], se elaboraron cinco diluciones sucesivas del extracto utilizando caldo BHI estéril como diluyente partiendo de la dilución original (50, 5, 2,5, 1,25 y 0,625 g/L). Todas las diluciones fueron preparadas bajo condiciones asépticas y se homogeneizaron adecuadamente

antes de su incorporación en los ensayos antimicrobianos en tubos [8].

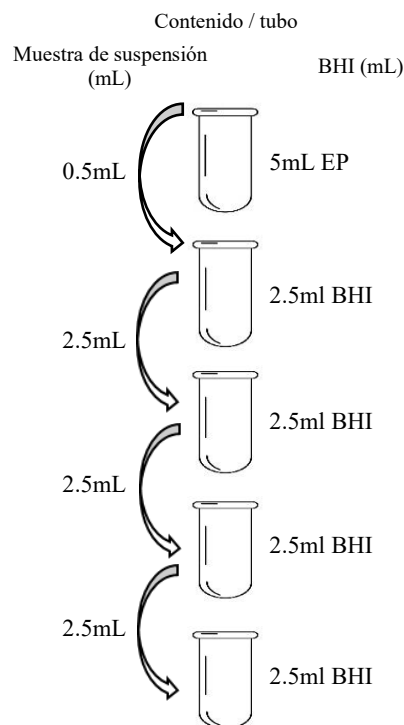


Fig. 2 Diluciones para determinación del CMI

C. Preparación de las cepas bacterianas

Las cepas de *E. coli* y *B. subtilis* utilizadas en este estudio fueron obtenidas del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional de Trujillo, Perú. Cada cepa fue inicialmente sembrada en agar nutritivo en tubos inclinados para su preservación temporal. Los cultivos fueron incubados a 36 °C durante 24 h con el fin de asegurar que ambas bacterias alcanzaran su fase logarítmica de crecimiento. Al término de la incubación, las colonias desarrolladas fueron resuspendidas en 1 mL de caldo BHI estéril y posteriormente homogenizadas en 20 mL de una mezcla 1:1 de solución salina estéril (0,9%), obteniéndose así el inóculo base para los ensayos microbiológicos, estas se mantuvieron constantes para todas las pruebas en condiciones de incubación (36 °C, 24 h, medio BHI), garantizando la comparabilidad entre métodos y microorganismos [9].

D. Ensayo de difusión en discos para la evaluación de la actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana del extracto de RPAEO del residuo fue evaluada mediante el método de difusión en discos en agar. Para ello, se prepararon discos de papel de filtro tipo Whatman utilizando un perforador, los cuales fueron colocados en placas Petri, sellados con papel Kraft y esterilizados en autoclave a 121 °C durante 15 min. Posteriormente se realizaron cinco diluciones del extracto en tubos de ensayo que

contenían caldo Brain Heart Infusion (BHI), impregnándose los discos estériles en cada dilución [10]. Seguidamente, las placas Petri con medio sólido previamente inoculadas con los cultivos bacterianos recientes fueron utilizadas para la colocación de los discos impregnados, los cuales se distribuyeron cuidadosamente sobre la superficie del agar. Las placas se incubaron en condiciones adecuadas para el crecimiento bacteriano, y al finalizar el período de incubación, la actividad antimicrobiana se determinó mediante la medición de los halos de inhibición formados alrededor de cada disco, expresados en milímetros, considerándose la presencia de zonas claras sin crecimiento bacteriano como indicativo de efecto antimicrobiano. Como tratamiento control se empleó una solución de extracción de etanol al 50%, en la misma proporción utilizada para la obtención del extracto; dicha solución, libre de extracto vegetal, fue sometida al mismo procedimiento experimental, impregnándose discos de papel de filtro estériles con el control y colocándolos sobre las placas Petri previamente inoculadas, con la finalidad de descartar cualquier efecto antimicrobiano atribuible al solvente y asegurar que los halos de inhibición observados se debieran exclusivamente a la acción del extracto de RPAEO.

E. Análisis estadístico

Los datos del contenido de polifenoles totales fueron analizados con un Análisis de Varianza (ANOVA) para un diseño completo al azar (DCA) [11]. Además, se utilizó un gráfico boxplot. Se empleó el Software Minitab versión 19.

III. RESULTADOS

A. Contenido de polifenoles totales

Los compuestos fenólicos son una clase importante de metabolitos secundarios de plantas, con potencial bioactivo ligado a sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Los RPAEO son fuentes importantes de compuestos bioactivos [12], entre ellos los compuestos fenólicos. Dado que la destilación se centra en la recuperación de volátiles, la mayoría de los compuestos fenólicos no volátiles presentes quedan retenidos en los tejidos de RPAEO y no son extraíbles durante la destilación. Estos pueden ser extraídos por diversos métodos, y en este trabajo se pensó comparar la extracción asistida por ultrasonido con 2 métodos: macerado (M) y ultrasonido con maceración (US + M).

El contenido de polifenoles totales (CPT) de los tres extractos de RPAEO se muestra en la Tabla I, expresado en μg de ácido gálico equivalente por mL de extracto (μg EAG/mL). Como se puede observar, el método US presentó mayor promedio de CPT (13000 ± 577 mg EAG/L de extracto de RPAEO). Con esto, se demuestra que se puede lograr 18% más de extracción que con el método de maceración y que con el ultrasonido más maceración. Es decir, con un tratamiento de ultrasonido de una hora, se pueden lograr mejores resultados que con tratamientos que toman hasta 2 meses.

La Tabla II revela de manera estadística la existencia de diferencias significativas entre los métodos de extracción ($p < 0,05$), siendo el método US el que superó a los otros 2 métodos.

TABLA I
CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES EN LOS EXTRACTOS OBTENIDOS
CON LOS TRES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Réplica	Método de extracción		
	US	US+M	M
1	13550	11500	11700
2	13050	10750	10050
3	12400	10850	11150
Promedio (EAG mg/L)	13000 ^a	11033 ^b	10966 ^b
Desviación estándar (EAG mg/L)	576.63	407.23	840.14
Coefficiente de Variación (%)	4%	4%	8%

TABLA II
ANÁLISIS DE VARIANZA DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES EN
LOS EXTRACTOS DE RPAEO

Fuente	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P
Factor	2	8006667	4003333	9,97	0,012*
Error	6	2408333	401389		
Total	8	10415000			

*Significativo a $p < 0,05$

La Fig. 3 reafirma lo encontrado en el ANOVA. Esto coincide con lo reportado por Skendi et al. [1] y Irakli et al. [12], quienes identificaron altos niveles de compuestos fenólicos en residuos sólidos de la industria de aceites esenciales. La cavitación acústica generada por el ultrasonido facilita la ruptura de paredes celulares y la liberación de metabolitos secundarios, lo que explica el incremento observado en el contenido fenólico [13].

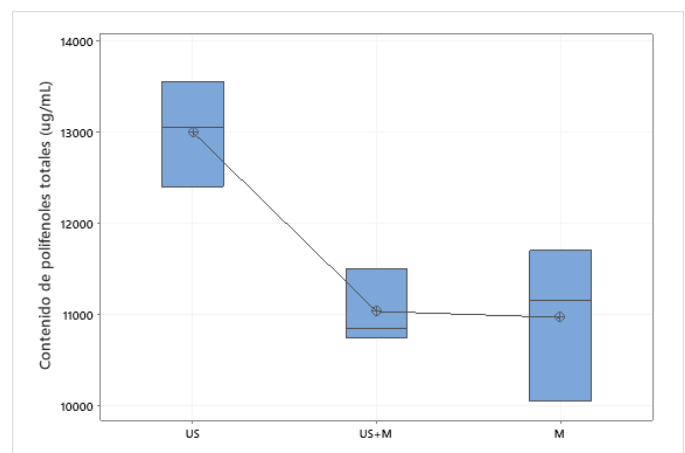


Fig. 3 Boxplot de contenido de polifenoles totales.

En comparación con otros sistemas vegetales, los valores de CPT obtenidos en este trabajo son consistentes con los reportados en residuos de té, donde la extracción ultrasónica mostró mayor eficiencia frente a métodos convencionales [14], [15]. Esto sugiere que la tecnología US no solo optimiza el rendimiento, sino que también preserva la integridad de moléculas sensibles, aumentando su potencial bioactivo [16], [17].

B. Efecto antimicrobiano: Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI)

La Tabla III y Fig. 4 muestran la actividad antimicrobiana del extracto de RPAEO frente a *E. coli* en sistema líquido. Se observó inhibición total del crecimiento bacteriano en los tubos con mayor concentración de extracto (5 y 50 g/L), evidenciada por la ausencia de turbidez. Luego, a partir de la concentración de 2,5 g/L se observó una inhibición parcial, que indica que hasta 5 g/L se obtiene inhibición del *E. coli*.

TABLA III
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE RPAEO FRENTE A *E. COLI* (ENSAYO EN CALDO BHI)

Método	Concentración (g/L)	Observación	Interpretación
M	50	Ausencia de turbidez	Inhibición total
	5	Ausencia de turbidez	Inhibición total
	2,5	Ligera turbidez	Inhibición parcial
	1,25	Ligera turbidez	Inhibición parcial
	0,625	Turbidez completa	Sin inhibición
US + M	50	Ausencia de turbidez	Inhibición total
	5	Ausencia de turbidez	Inhibición total
	2,5	Ligera turbidez	Inhibición parcial
	1,25	Ligera turbidez	Inhibición parcial
	0,625	Turbidez	Sin inhibición
US	50	Ausencia de turbidez	Inhibición total
	5	Ausencia de turbidez	Inhibición total
	2,5	Turbidez mínima	Inhibición parcial
	1,25	Turbidez mínima	Inhibición parcial
	0,625	Turbidez completa y capa superficial	Sin inhibición
Control (BHI + <i>E. coli</i>)	—	Turbidez y capa superficial	Sin inhibición

M: macerado, US+M: ultrasonido y posterior maceración, US: ultrasonido

Las concentraciones seleccionadas (50 a 0,625 g/L) se definieron en función de la CMI teórica reportada en estudios previos (~3000 mg/L), permitiendo evaluar tanto niveles superiores como inferiores para identificar el rango de inhibición.



Fig. 4 Determinación del CMI de RPAEO contra *E. coli*

Los tubos fueron organizados en una gradilla plástica blanca para su análisis comparativo (Fig. 4). Se puede deducir que la concentración media inhibitoria en *E. coli* es 5000 mg/L. En otro estudio se observó un porcentaje de inhibición de 10% con 3000 mg/L de extracto de residuo post-distilación de aceite esencial de orégano griego [7].

TABLA IV
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE RPAEO FRENTE A *B. SUBTILIS* (ENSAYO EN CALDO BHI)

Método	Concentración (g/L)	Observación	Interpretación
M	50	Ausencia de turbidez	Inhibición total
	5	Ausencia de turbidez	Inhibición total
	2,5	Ligera turbidez y capa superficial	Inhibición parcial
	1,25	Turbia	Sin inhibición
	0,625	Turbia con capa superficial	Sin inhibición
US + M	50	Ausencia de turbidez	Inhibición total
	5	Ausencia de turbidez	Inhibición total
	2,5	Ausencia de turbidez	Inhibición total
	1,25	Ligera turbidez	Inhibición parcial
	0,625	Turbia con capa superficial	Sin inhibición
US	50	Ausencia de turbidez	Inhibición total
	5	Ausencia de turbidez	Inhibición total
	2,5	Turbidez mínima	Inhibición parcial
	1,25	Medio ligeramente nublado	Inhibición parcial
	0,625	Turbidez completa	Sin inhibición
Control (BHI + <i>E. coli</i>)	—	Turbidez	Sin inhibición

M: macerado, US+M: ultrasonido y posterior maceración, US: ultrasonido

La Tabla IV y la Fig. 5 presentan los resultados del ensayo antimicrobiano del extracto de RPAEO frente a *B. subtilis*. Los

resultados evidencian una mayor sensibilidad de esta bacteria al extracto, especialmente en las muestras tratadas con ultrasonido combinado con maceración, donde se observó inhibición total hasta una concentración de 2,5 g/L, seguido del extracto US que presentó una CMI de 50 g/L, mientras que el extracto M no mostró una inhibición total. La presencia de turbidez progresiva indica una disminución del efecto antimicrobiano a menores concentraciones del extracto.

Se puede concluir que la concentración mínima inhibitoria (CMI) en *B. subtilis* fue de 2500 mg/L en el método M y de 5000 mg/L en los métodos US y US+M, en concordancia con lo observado en las tablas. En un estudio similar, con extracto obtenido en baño de ultrasonido se observó un porcentaje de inhibición de hasta 78% con 3000 mg/L de extracto de residuo post-distilación de aceite esencial de orégano griego [7]. La mayor sensibilidad de *B. subtilis* puede explicarse por la estructura más simple de su pared celular, característica de bacterias grampositivas, que facilita la penetración de polifenoles.



Fig. 5 Determinación del CMI de RPAEO contra *B. subtilis*

En contraste, las bacterias gramnegativas como *E. coli* poseen una membrana externa rica en lipopolisacáridos que actúa como barrera, reduciendo la eficacia de los compuestos fenólicos [18]. También, se ha descrito que los polifenoles ejercen su acción antimicrobiana mediante la desestabilización de membranas, la generación de estrés oxidativo y la inhibición de enzimas esenciales para la replicación bacteriana, lo que explica la inhibición parcial observada en concentraciones intermedias y la ausencia de efecto en las más bajas [19], [20], [21].

C. Actividad antimicrobiana: Ensayo de difusión en discos

Se evaluó la actividad antimicrobiana mediante microplacas de los extractos fenólicos derivados de RPAEO con etanol al 50 % frente a microorganismos seleccionados como *E. coli* (Tabla V) y *B. subtilis* (Tabla VI). Se examinó la actividad antibacteriana de los extractos RPAEO a cuatro concentraciones diferentes (50, 5, 2,5 y 1,25 g/L) y un control con solución extractora de etanol al 50%. En los pocillos de inoculación de control (sin extracto), cada cepa alcanzó su máximo crecimiento.

Los resultados muestran que *E. coli* (Tabla V) presentó inhibición del crecimiento únicamente en el disco 1 (50 g/L). El

tratamiento US+M evidenció los halos de inhibición más notorios, alcanzando hasta 0,9 mm en promedio, lo que sugiere una mayor eficacia antimicrobiana frente a esta bacteria. que el tratamiento US presentó actividad limitada de 0,50 mm, mientras que el extracto M mostró una inhibición reducida de 0,35 mm en promedio.

TABLA V
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE RPAEO FRENTE A *E. COLI* MEDIANTE DIFUSIÓN EN AGAR

Placa	Disco 1	Disco 2	Disco 3	Disco 4	Disco 5
E1 US	1 mm	(-)	(-)	(-)	(-)
E2 US	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
E1 US+M	0,8 mm	(-)	(-)	(-)	(-)
E2 US+M	1 mm	(-)	(-)	(-)	(-)
E1 M	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
E2 M	0,7 mm	(-)	(-)	(-)	(-)

Discos: 1 (50 g/L), 2 (5 g/L), 3 (2,5 g/L), 4 (1,25 g/L) y 5 (0,625 g/L).

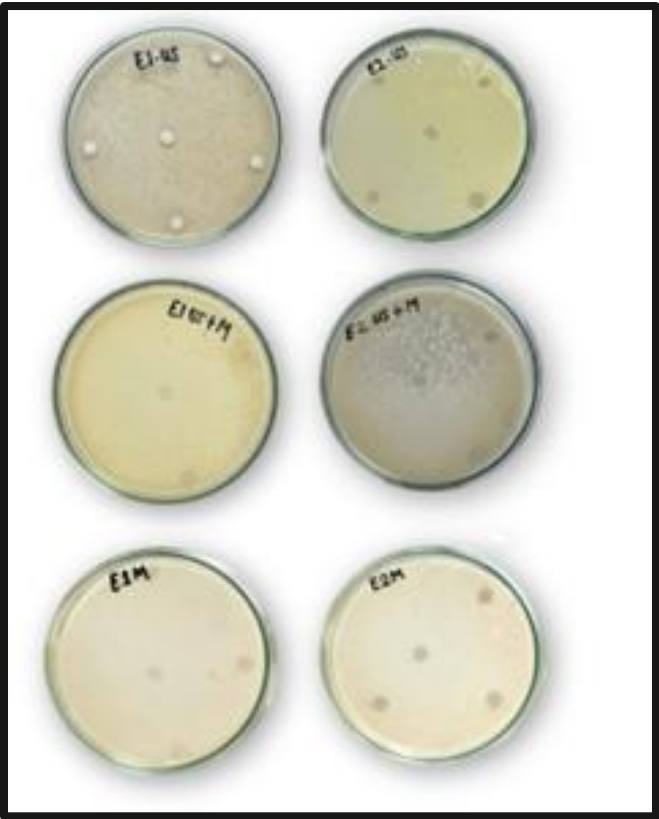


Fig. 6. Ensayo de difusión en discos para la evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de RPAEO contra *E. coli*

En cuanto a *B. subtilis* (Tabla VI), se observó una mayor sensibilidad al extracto de RPAEO, especialmente al extracto M, donde se registraron halos de inhibición en más de un disco por placa hasta 0,65 mm en promedio a una concentración de 5 g/L. El método US y US + M presentaron inhibición moderada

y localizada, con diámetros promedio de 0,75 y 0,45 mm, respectivamente; a una concentración de 50 g/L.

TABLA VI
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE RPAEO FRENTE A
DIFUSIÓN EN AGAR

Placa	Disco 1	Disco 2	Disco 3	Disco 4	Disco 5
E1 US	0,7 mm	(-)	(-)	(-)	(-)
E2 US	0,8 mm	(-)	(-)	(-)	(-)
E1 US+M	0,9 mm	(-)	(-)	(-)	(-)
E2 US+M	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
E1 M	0,7 mm	0,6 mm	(-)	(-)	(-)
E2 M	0,7 mm	0,7 mm	(-)	(-)	(-)

Discos: 1 (50 g/L), 2 (5 g/L), 3 (2,5 g/L), 4 (1,25 g/L) y 5 (0,625 g/L).

Durante este estudio se confirmó la capacidad antimicrobiana de los extractos fenólicos RPAEO contra *B. subtilis* para su análisis, con el fin de utilizar los extractos en productos de panadería, donde los bacilos son un grupo responsable del deterioro de los alimentos, causando consistencia viscosa en los productos de panadería [22].



Fig. 7 Ensayo de difusión en discos para la evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de RPAEO contra *B. subtilis*

En general, las bacterias grampositivas (+) son más susceptibles que las gramnegativas (*E. coli*); se ha informado previamente que las bacterias grampositivas son más sensibles a los extractos de plantas que las gramnegativas [7]. Este

hallazgo se explica por la estructura más simple de la pared celular de bacterias grampositivas [7,15]. La inhibición total a concentraciones de 5 g/L confirma que los extractos fenólicos del RPAEO poseen actividad antimicrobiana contra ambos microorganismos evaluados, en concordancia con lo señalado por Luca et al. [23], quienes reportaron actividad significativa de extractos fenólicos obtenidos de residuos post-destilación de especies de Lamiaceae mediante baño ultrasonido y fluidos supercríticos frente a bacterias patógenas.

Por otro lado, la extracción US+M tuvo un mejor efecto antimicrobiano. Lo que indica que, a pesar de no tener el mayor rendimiento, se extrajeron compuestos fenólicos con mayor calidad antimicrobiana [24].

Finalmente, los resultados de este estudio tienen implicaciones prácticas importantes. El uso de extractos fenólicos derivados de residuos post-destilación de orégano podría contribuir al desarrollo de conservantes naturales en alimentos, especialmente en productos de panadería, donde *B. subtilis* son responsables de deterioro y textura viscosa [15]. Además, la valorización de estos residuos se alinea con estrategias de economía circular y sostenibilidad, promoviendo el aprovechamiento integral de subproductos agroindustriales [1,3].

Una limitación del estudio es que los resultados obtenidos no permiten establecer con precisión cuáles factores específicos explican la variabilidad en la actividad antimicrobiana observada. Esta restricción dificulta la correlación directa entre los valores reportados y la eficacia práctica de los extractos, por lo que los hallazgos deben interpretarse con cautela y considerados como un punto de partida para investigaciones posteriores [25, 26].

IV. CONCLUSIONES

Este estudio ha demostrado que es posible utilizar ultrasonidos (US) solo o en combinación con la extracción por maceración (M) RPAEO para una extracción de polifenoles ecológica, rápida y eficaz. Además, es recomendable realizar un perfil de polifenoles que permita determinar la calidad de los extractos para fines antimicrobianos. Finalmente, se encontró que la CMI del extracto de RPAEO para *E. coli* es de 5000 mg/L, en los tres métodos de extracción y para *B. subtilis* es de 5000 mg/L con los extractos US+M y US, y 2500 mg/L con el extracto M.

AGRADECIMIENTO

Las autoras agradecen el patrocinio de la Universidad Privada del Norte por hacer posible esta publicación. Asimismo, al Dr. Pedro Pablo Arteaga Llacza por su apoyo incondicional en el desarrollo de este trabajo de investigación.

REFERENCIAS

- [1] A. Skendi, M. Irakli, P. Chatzopoulou, E. Bouloumpasi, and C. G. Biliaderis, "Phenolic extracts from solid wastes of the aromatic plant essential oil industry: Potential uses in food applications," *Food Chemistry Advances*, vol. 1, p. 100065, Oct. 2022, doi: 10.1016/j.focha.2022.100065.

- [2] M. Alagawany *et al.*, "The usefulness of oregano and its derivatives in poultry nutrition," *Worlds Poultr. Sci. J.*, vol. 74, no. 3, pp. 463–474, Sep. 2018, doi: 10.1017/S0043933918000454.
- [3] H. Ait Bouzid *et al.*, "Comparative evaluation of chemical composition, antioxidant capacity, and some contaminants in six Moroccan medicinal and aromatic plants," *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, vol. 47, p. 102569, Jan. 2023, doi: 10.1016/j.bcab.2022.102569.
- [4] A. Kubiliene *et al.*, "A Comparative Evaluation of Antioxidant Activity of Extract and Essential Oil of *Origanum onites* L. In Vivo," *Molecules*, vol. 28, no. 14, p. 5302, Jul. 2023, doi: 10.3390/molecules28145302.
- [5] V. L. Singleton and J. A. Rossi, "Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents," *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 16, no. 3, pp. 144–158, 1965, Accessed: Jan. 16, 2020. [Online]. Available: <https://www.ajevonline.org/content/16/3/144>
- [6] J. Aguayo Rojas, "Compuestos fenólicos, minerales, capacidad antioxidante y antihipertensiva de pingüica (*Arctostaphylos pungens*)," *Acta Univ.*, vol. 32, pp. 1–15, Feb. 2022, doi: 10.15174/au.2022.3231.
- [7] E. Bouloumpasi *et al.*, "Assessment of Antioxidant and Antibacterial Potential of Phenolic Extracts from Post-Distillation Solid Residues of Oregano, Rosemary, Sage, Lemon Balm, and Spearmint," *Processes*, vol. 12, no. 1, p. 140, Jan. 2024, doi: 10.3390/pr12010140.
- [8] F. Valerio, G. N. Mezzapesa, A. Ghannouchi, D. Mondelli, A. F. Logrieco, and E. V. Perrino, "Characterization and Antimicrobial Properties of Essential Oils from Four Wild Taxa of Lamiaceae Family Growing in Apulia," *Agronomy*, vol. 11, no. 7, p. 1431, Jul. 2021, doi: 10.3390/agronomy11071431.
- [9] A. Aydin, A. A. Suleymanoglu, A. Abdramanov, P. Paulsen, and E. Dumen, "Detection of Extended Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* with Biofilm Formation from Chicken Meat in Istanbul," *Foods*, vol. 13, no. 7, p. 1122, Apr. 2024, doi: 10.3390/foods13071122.
- [10] E. Avila-Castro, O. Vargas-Ponce, L. Díaz-Pérez, F. A. Rodríguez-Zaragoza, J. Hernández-Zulueta, and R. N. Aguila-Ramírez, "Evaluación de la actividad antimicrobiana de *Bacillus australimaris* y *Pseudoalteromonas* sp. asociadas al octocoral *Leptogorgia alba*," *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, vol. 26, Jun. 2023, doi: 10.22201/fesz.23958723e.2023.557.
- [11] R. H. Myers, D. C. Montgomery, and C. M. Anderson-Cook, *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*. John Wiley & Sons, 2016.
- [12] M. Irakli, A. Skendi, E. Bouloumpasi, P. Chatzopoulou, and C. G. Biliaderis, "LC-MS Identification and Quantification of Phenolic Compounds in Solid Residues from the Essential Oil Industry," *Antioxidants*, vol. 10, no. 12, p. 2016, Dec. 2021, doi: 10.3390/antiox10122016.
- [13] F. Chemat, N. Rombaut, A.-G. Sicaire, A. Meullemiestre, A.-S. Fabiano-Tixier, and M. Abert-Vian, "Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 34, pp. 540–560, 2017.
- [14] I. C. Ozsefil and A. Ziyilan-Yavas, "Green approach for polyphenol extraction from waste tea biomass: Single and hybrid application of conventional and ultrasound-assisted extraction," *Environ. Res.*, vol. 235, p. 116703, Oct. 2023, doi: 10.1016/j.envres.2023.116703.
- [15] H. Huo, H. Bao, J. Li, and H. Li, "Optimization and antioxidant evaluation of clean and efficient recovery of polyphenols from *Phellodendron amurense* waste leaves via ultrasound-assisted extraction," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 120, p. 107512, Sep. 2025, doi: 10.1016/j.ultsonch.2025.107512.
- [16] F. Chemat and M. K. Khan, "Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 18, no. 4, pp. 813–835, 2011.
- [17] F. Chemat *et al.*, "Review of green food processing techniques. Preservation, transformation, and extraction," *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 41, pp. 357–377, 2017.
- [18] M. S. Kabir, Y.-H. Hsieh, S. Simpson, K. Kerdahi, and I. M. Sulaiman, "Evaluation of Two Standard and Two Chromogenic Selective Media for Optimal Growth and Enumeration of Isolates of 16 Unique *Bacillus* Species," *J. Food Prot.*, vol. 80, no. 6, pp. 952–962, Jun. 2017, doi: 10.4315/0362-028X.JFP-16-441.
- [19] S. Moreno, T. Scheyer, C. S. Romano, and A. A. Vojnov, "Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition," *Free Radic. Res.*, vol. 40, no. 2, pp. 223–231, Jan. 2006, doi: 10.1080/10715760500473834.
- [20] K. Hcini, A. A. Lozano-Pérez, J. Luis Cenís, M. Quílez, and M. José Jordán, "Extraction and Encapsulation of Phenolic Compounds of Tunisian Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Extracts in Silk Fibroin Nanoparticles," *Plants*, vol. 10, no. 11, p. 2312, Oct. 2021, doi: 10.3390/plants10112312.
- [21] F. M. Vella and B. Laratta, "Rosemary Essential Oil Extraction and Residue Valorization by Means of Polyphenol Recovery," in *Foods 2023*, Basel Switzerland: MDPI, Oct. 2023, p. 8. doi: 10.3390/Foods2023-15024.
- [22] J. M. Thompson, C. E. R. Dodd, and W. M. Waites, "Spoilage of bread by bacillus," *Int. Biodeterior. Biodegradation*, vol. 32, no. 1–3, pp. 55–66, 1993, doi: 10.1016/0964-8305(93)90039-5.
- [23] S. V. Luca *et al.*, "Value-Added Compounds with Antimicrobial, Antioxidant, and Enzyme-Inhibitory Effects from Post-Distillation and Post-Supercritical CO₂ Extraction By-Products of Rosemary," *Antioxidants*, vol. 12, no. 2, p. 244, Jan. 2023, doi: 10.3390/antiox12020244.
- [24] M. C. Diwathe, A. J., and B. Mazumdar, "Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolics from *Cordia dichotoma* leaves using response surface methodology," *Chemical Engineering Research and Design*, vol. 208, pp. 572–587, Aug. 2024, doi: 10.1016/j.cherd.2024.07.016.