

Essential Oils: Exploring Their Antimicrobial Potential

RAREȘ - IONUȚ, DRAGOMIR
UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
Facultatea de Biologie
Specializare: Microbiologie Aplicată și Imunologie
Email: rares.dragomir@s.unibuc.ro

Coordonator: Lector dr. Carmen Curuțiu
UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
Departamentul de Botanică și Microbiologie
Email: carmen.curutiu@bio.unibuc.ro

Abstract

Multidrug-resistant bacteria is one of the most concerning health problems all over the world. Uncontrolled use of antibiotics and antifungals drives these phenotypes. Developing new combat strategies is crucial to prevent healthcare and humanitarian crisis. Potential strategies include essential oils, antimicrobial peptides, bacteriophage therapies, and nanoparticles. These strategies could offer an optimized alternative to antibiotics, transforming virulent microorganisms into avirulent ones, without major disruption to the normal microbiota or human body homeostasis.

In this study we focused on the antimicrobial potential activity of the essential oils, that were tested using different methods against Gram-negative, Gram-positive and fungal microorganisms.

Keywords: multidrug-resistant bacteria, essential oils, human health protection, antibiotics alternatives



Introducere

Microorganismele reprezintă cel mai diversificat și răspândit grup de organisme de pe Pământ, fiind prezente în toate tipurile de medii, chiar și în cele care, pentru alte organisme, viața ar fi imposibilă. Acest aspect denotă faptul că au o putere de adaptare remarcabilă, fiind capabile să colonizeze orice suprafață. Microorganismele, prin biodiversitatea lor mare, îndeplinesc funcții extrem de benefice mediului în care trăiesc, având o putere biodegradabilă extraordinară. Sunt folosite intens în industria alimentară, sanitară și în agricultură, iar în organismul uman îndeplinesc numeroase funcții metabolice și de protecție față de agenții patogeni.

Există însă un mic procent de microorganisme care sunt patogene pentru plante, animale și oameni. Cu toate acestea, microorganismele oportuniste care pot fi comensale la om și animale sunt cele care determină cele mai multe infecții cu care se confruntă omenirea și care au devenit din ce în ce mai greu de tratat. Acest aspect este cauzat de capacitatea microorganismelor de a se adapta și de a dezvolta mecanisme de rezistență la antibiotice și antifungice.

Rezistența și multirezistența microorganismelor a devenit o problemă majoră la nivel mondial, care în ultimii ani a fost accentuată de criza sanitară cauzată de pandemia COVID-19. În prezent există bacterii rezistente la toate clasele de antibiotice disponibile. Fenotipul de rezistență și multirezistența este determinat în principal de utilizarea necontrolată, irațională și profilactică în zootehnie sau piscicultura a antibioticelor și antifungicelor. Astfel, pentru a evita o criză în sistemul sanitar sau chiar umanitară, este crucial dezvoltarea unor noi strategii de combatere a acestor microorganisme.



Soluțiile alternative sau complementare utilizării antibioticelor pot fi reprezentate de uleiuri esențiale cu activitate antimicrobiană, de peptide antimicrobiene, terapii cu bacteriofagi, sau nanoparticule. Aceste noi strategii pot reprezenta o soluție alternativă a antibioticelor, a căror acțiune nu determina un dezechilibru major al microorganismelor, nu creează o presiune selectivă asupra lor, ci doar le transforma din virulente în avirulente. Un alt beneficiu pe care l-ar putea aduce noile strategii este reprezentat de posibilitatea eliminării riscului de afectare a microbiotei normale, al celulelor și organelor organismului uman.

Acest studiu s-a axat pe testarea activității antimicrobiene a unor uleiuri esențiale, acestea sunt compuși chimici naturali, care pot fi sintetizați de diferite organe ale plantelor (rădăcină, frunze, flori, etc.). Ei sunt produși ai metabolismului secundar al plantelor cu rol de protecție, prezentând proprietăți antifungice, antibacteriene, antioxidante sau de protecție față de specii diferite de insecte invazive. Acești compuși sunt stocați în celule secretoare ale plantelor și pot fi extrași prin diferite tehnici pentru a putea fi utilizați în industria medicală, în industria alimentară și în industria agricolă. Aceste uleiuri au o consistență lichidă, uleioasă, volatilă și prezintă diferite culori și mirosuri parfumate foarte intense. Majoritatea uleiurilor esențiale sunt formate din monoterpene, cu o greutate moleculară mică și cu proprietatea de a genera compuși noi cu grupe funcționale precum alcooli, aldehidele, cetone și esteri [1]. Mecanismele de acțiune al acestor compuși se bazează pe distrugerea sau deteriorarea peretelui celular al bacteriilor și fungilor, pot determina de asemenea distrugerea membranei plasmatică și a proteinelor transmembranare, prezintă proprietăți ce determină coagularea citoplasmei. Au capacitatea de a hidroliza ATP-ul existent în celule și de a perturba sinteza de ATP, ceea ce duce la un declin major al ATP - ului în celule și în final la moartea acestora. Un alt mecanism exercitat este reprezentat prin creșterea permeabilității membranei plasmatică ceea ce duce la pierderea integrității celulare prin pierderea mediului intracelular. Acești compuși s-au dovedit a prezenta o eficiență mult mai mare în cazul bacteriilor Gram – negative față de cele Gram – pozitive. O ipoteză pentru explicarea acestui fapt este reprezentată de structura diferită a bacteriilor, cele Gram – pozitive având un perete celular cu un strat mai gros de peptidoglican care nu permite trecerea compușilor și astfel, nu se pot lega sau difuza prin membrana plasmatică. În schimb, acțiunea asupra fungilor, în special asupra speciilor genului *Candida*, este de o eficiență remarcabilă [2].

Cele mai cunoscute componente ale uleiurilor esențiale care prezintă activitate antimicrobiană eficientă sunt reprezentate de: carvacrol, limonen, timol și cinnamaldehida. Carvacrolul este un compus organic din clasa fenolilor și este compusul activ din uleiul esențial sintetizat de plante ale genurilor *Origanum* și *Thymus*. Acest compus prezintă activitate antibacteriană, antifungice și antioxidantă. În ceea ce privește activitatea antimicrobiană, carvacrolul este un compus lipofil, acționând astfel asupra membranei plasmatică cu perturbarea fracțiilor lipidice și scăderea potențialului de membrană [3]. Limonenul este un compus organic și este constituentul major al uleiurilor esențiale sintetizate de plante ale genului *Citrus*. Acest compus este cunoscut pentru proprietățile antiseptice, antioxidante și antiinflamatorii, având capacitatea de a modula producția de citokine. Efectul determinat este foarte rapid, la consumul fructelor genului *Citrus*, limonenul este absorbit la nivel intestinal și metabolizat foarte rapid [4]. Cinnamaldehida reprezintă compusul major al scorțișoarei, care-i conferă gustul și mirosul specific. Acest compus, pe lângă faptul că este folosit pentru aromatizarea naturală a mâncărurilor, este folosit și în tratarea infecțiilor, având un efect antifungic și antibacterian foarte eficient [1].

Testarea unor compuși cu activitate antimicrobiană

Rezistența microorganismelor la antibiotice și antifungice este în creștere și a devenit o preocupare majoră la nivel mondial, mai ales în ultimii ani și în urma pandemiei cu COVID-19. Astfel, ca și soluție

pentru persoanele care prezintă infecții cu microorganisme multirezistente la antibiotice și antifungice și pentru a se evita o criză sanitară mondială este strict necesar abordarea unor strategii alternative la utilizarea acestora.

❖ Scop și obiective

Scopul acestei lucrări a fost reprezentat de testarea unor uleiuri esențiale comerciale, cunoscute a avea proprietăți antimicrobiene și antifungice, prin evaluarea capacității acestora de a inhiba creșterea microorganismelor și aderarea acestora la un substrat inert.

Obiectivele studiului:

1. Testarea capacității uleiurilor esențiale de a inhiba creșterea microorganismelor, prin evaluarea diametrului zonei de inhibiție rezultat, în urma utilizării metodei disc–difuzimetrice adaptate.
2. Determinarea concentrației minime inhibitorii (CMI) a uleiurilor esențiale prin examinarea activității lor antimicrobiene în concentrații diferite, cu ajutorul metodei microdiluțiilor.
3. Analiza calitativă și cantitativă a acțiunii uleiurilor esențiale asupra biofilmelor monospecifice, prin evaluarea capacității de a inhiba aderența la substrat inert, prin analize spectrofotometrice.

❖ Materiale și metode

▪ **Materiale**

• **Uleiuri esențiale**

Uleiurile esențiale folosite pentru acest studiu au fost alese pe baza informațiilor obținute din literatura de specialitate. S-au utilizat uleiuri esențiale care sunt extrase din: *Citrus limon* (lămâie), *Melaleuca alternifolia* (arbore de ceai), *Eucalyptus sp.* (eucalipt), *Origanum vulgare* (oregano) (SC SOLARIS PLANT SRL).

Din uleiurile respective s-a realizat o soluție de lucru, soluție care a fost formată din amestecul de ulei esențial și dimetilsulfoxid (DMSO), într-un raport v/v (diluția rezultată – 1/2).

• **Microorganisme utilizate**

Speciile de microorganisme utilizate au provenit din colecția departamentului de Botanică-Microbiologie din cadrul Universității din București, Facultatea de Biologie. S-au utilizat următoarele tulpini de referință (tulpini ATCC – *American Type Culture Collection*): *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 și *Enterococcus (Ent.) faecalis* ATCC 29212 ca și model experimental pentru bacterii Gram – pozitive, *Escherichia coli* ATCC 25922 și *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ca și model experimental pentru bacteriile Gram – negative și, de asemenea, *Candida albicans* ATCC 10231 ca model pentru infecțiile cu levuri.

▪ **Metode**

• **Metoda disc – difuzimetrică adaptată**

Pentru evidențierea activității antimicrobiene ale acestor uleiuri esențiale, au fost parcurse mai multe etape:

În prima etapă, s-a efectuat însămânțarea tulpinilor microbiene din colecție în plăci Petri cu mediu de cultură astfel: speciile bacteriene au fost inoculate pe mediul geloză, iar *Candida albicans* pe mediu *Sabouraud*. Plăcile au fost incubate ulterior timp de 24h la o temperatură 37°C. Această etapă a fost necesară pentru a putea testa activitatea antimicrobiană pe culturi proaspete de 24 ore (culturi tinere, aflate în faza de creștere).

În următoarea etapă, din coloniile izolate rezultate s-au efectuat suspensii microbiene în apă fiziologică sterilă de densitate corespunzătoare standardului 0.5 McFarland pentru bacterii și 1 McFarland pentru levuri. Suspensia obținută a fost apoi însămânțată în pânză cu tamponul pe medii de cultură cu aceeași specificitate ca cele anterioare.

Ultima etapă a fost reprezentată de dispunerea a câte 5 μl din fiecare soluție de lucru pe fiecare placă însămânțată în pânză. Pentru a evita rezultatele fals pozitive, în centrul fiecărei plăci s-a adăugat un volum de 5 μl dimetilsulfoxid (martor). Plăcile au fost puse la incubat pentru 24h la o temperatură de 37°C. După incubare, s-a măsurat cu ajutorul riglei diametrul zonei de inhibiție a creșterii (în mm) observat în jurul fiecărui compus, pentru fiecare tulpina în parte. Apariția unei zone de inhibiție în jurul DMSO a fost măsurată și scăzută din diametrul înregistrat în prezenta uleiurilor diluate în DMSO.

❖ **Metoda microdiluțiilor pentru determinarea concentrației minime inhibitorii (CMI) și acțiunea uleiurilor esențiale împotriva formării biofilmelor (CMIB – concentrația minimă de inhibare a biofilmelor)**

Această metodă a fost realizată de asemenea în mai multe etape. Experimentul s-a realizat în plăci de microtitrare cu 96 de godeuri.

În prima etapă s-a adăugat 270 μl de mediu lichid, bulion simplu/*Sabouraud* lichid, în primul godeu al fiecărui rând, pe care s-au notat speciile de interes. În celelalte godeuri a fost adăugat un volum de 150 μl de mediu.

În următoarea etapă s-a adăugat în primul godeu din fiecare rând 30 μl de compus (diluat 1/2), obținând astfel o diluție în primul godeu de 1/20. În următoarea etapă s-au realizat microdiluțiile, pornind de la primul godeu care avea un volum de 300 μl. Din acesta a fost transferat un volum de 150 μl în următorul godeu, realizând în continuare diluții binare, de la 1/40- 1/640).

Etapa finală a acestei metode a fost reprezentată de adăugarea unui volum de 15 μl de suspensie microbiană, de densitate 0.5/1 McFarland. Ultimele două godeuri au rolul de martori, unul de creștere (fără compus) și unul de sterilitate (doar mediu). Plăcile de microtitrare au fost lăsate la incubat timp de 24h la o temperatură de 37°C.

Concentrația minimă inhibitorie a fost determinată macroscopic după terminarea timpului de incubare, drept godeul cu concentrația cea mai mică de compus în care nu s-a mai observat creștere microbiană.

• **Cuantificarea biofilmului**

Măsurarea cantitativă a biofilmului format în fiecare placă a fost efectuată prin testarea absorbției la spectrofotometru. Pentru ca această măsurătoare să fie posibilă, suspensia microbiană a fost îndepărtată, plăcile au fost spălate, apoi fixate cu metanol. După colorare 20 min. cu cristal violet, acesta a fost îndepărtat

și după uscarea plăcilor s-a adăugat 150 μl de acid acetic glacial în fiecare godeu, și s-a citit absorbanta la o lungime de undă de 492 nm.

❖ Rezultate

• Evaluare diametrului zonei de inhibiție a creșterii celulelor bacteriene în prezența compușilor testați

Testul de difuzie a fost utilizat pentru a putea observa și determina activitatea antimicrobiană a uleiurilor esențiale utilizate, prin măsurarea zonei de inhibare a creșterii microorganismelor (mm). Rezultatele au arătat faptul că uleiul esențial de *Origanum vulgare* are un spectru larg de inhibare pentru toate tulpinile folosite, diametrul fiind cuprins între 8 și 30 mm, fiind astfel cel mai eficient compus testat. Cea mai sensibilă tulpină la acțiunea compușilor testați a fost reprezentată de *Candida albicans*, iar cea mai rezistentă tulpină la acțiunea compușilor testați a fost *Pseudomonas aeruginosa* (Fig. 1).

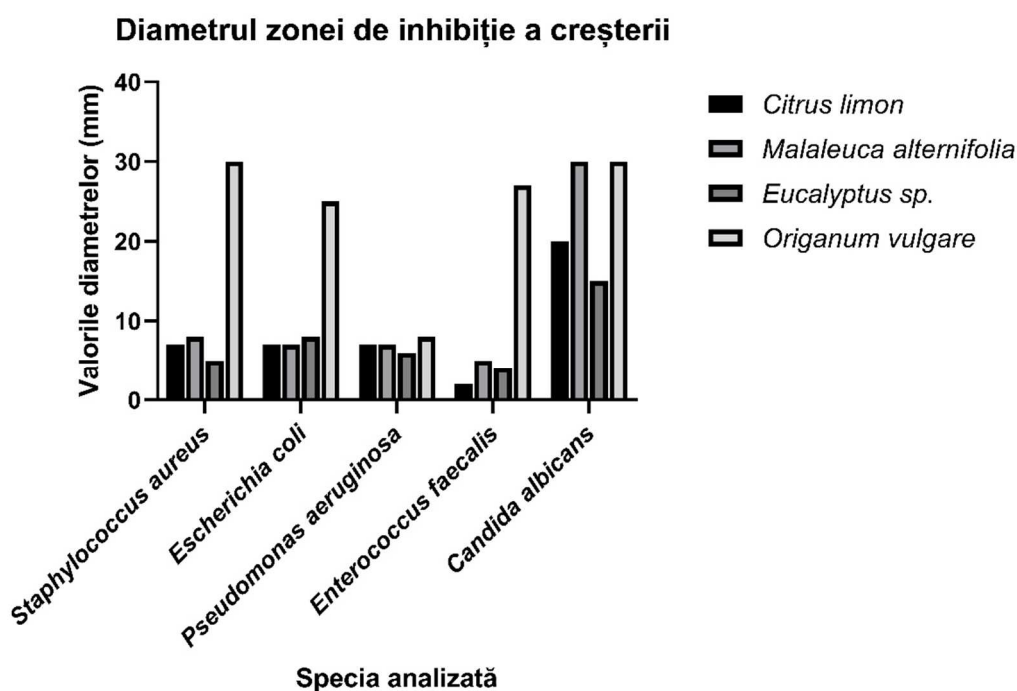


Fig. 1. Valorile diametrelor zonelor de inhibiție a creșterii.
Autor: Dragomir Rareș.

Nu a fost detectată activitate antimicrobiană pentru martorul reprezentat de DMSO, în niciunul din testele efectuate, ceea ce demonstrează că zonele de inhibare sunt datorate doar uleiurilor esențiale prin acțiunea antimicrobiană pe care acestea o prezintă.

• Valorile CMI obținute

Concentrația minimă inhibitorie (CMI) reprezintă cea mai mică concentrație de ulei esențial care inhibă creșterea vizibilă a microorganismelor și este exprimată în mg/ml. Astfel, este luat în considerare godeul corespunzător celei mai mari diluții, respectiv cea mai mică concentrație de ulei esențial în care nu se observă creștere bacteriană, respectiv fungică. CMI a fost determinată prin efectuarea metodei microdiluțiilor,

în plăci de microtitrare de 96 de godeuri. Concentrațiile de ulei testate în urma realizării diluțiilor au fost: 0.05 mg/ml, 0.025 mg/ml, 0.0125 mg/ml, 0.0063 mg/ml, 0.0031 mg/ml, 0.0016 mg/ml.

O activitate antimicrobiană foarte bună a fost observată la uleiul esențial de *Origanum vulgare*, pentru toate speciile testate, acesta prezentând activitate antimicrobiană la concentrații cuprinse între 0.025 și 0.0016 mg/ml și confirmând astfel rezultatele obținute în urma utilizării metodei disc – difuzimetrică adaptată. Valorile CMI au variat în funcție de microorganismul testat, *Candida albicans* fiind în continuare cea mai sensibilă specie analizată în acest studiu, compuși naturali având efect la concentrații cuprinse între 0.125 și 0.0016 mg/ml. *Pseudomonas aeruginosa* prezintă de asemenea caracterul cel mai rezistent, CMI având valorile cele mai mari, 0.05 mg/ml fiind concentrația la care au fost active uleiurile esențiale de *Citrus limon*, *Melaleuca alternifolia* și *Eucalyptus sp.*, iar *Origanum vulgare* a fost eficient la o concentrație de 0.025 mg/ml (Fig. 2).

În urma efectuării acestor două metode, s-a putut observa eficiența acestor uleiuri esențiale, în special al celui de *Origanum vulgare*, care a prezentat cea mai mare activitate împotriva creșterii și multiplicării microorganismelor, chiar la concentrații foarte mici.

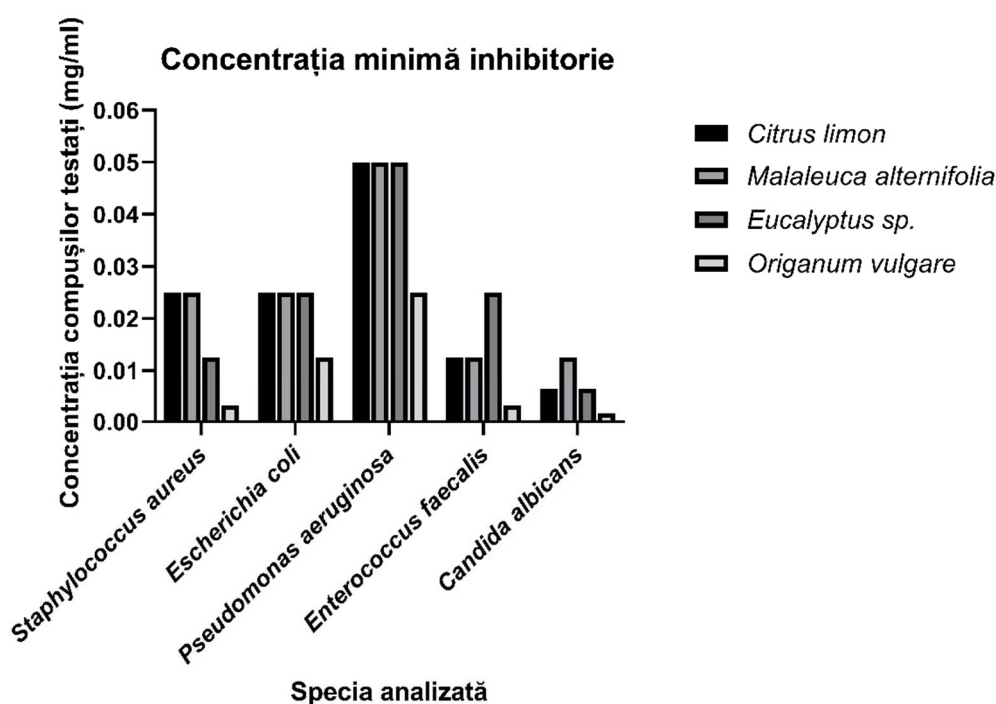


Fig. 2. Valorile concentrațiilor minime inhibitorii.

Autor: Dragomir Rareș.

• Formarea biofilmului și CMIB

Rezultatele obținute au demonstrat acțiunea uleiurilor esențiale, utilizate la concentrații diferite (0.05 mg/ml, 0.025 mg/ml, 0.0125 mg/ml, 0.0063 mg/ml, 0.0031 mg/ml, 0.0016 mg/ml), împotriva formării biofilmelor monospecifice, pe un substrat inert. Prin intermediul datelor obținute a fost calculată concentrația minimă de inhibare a biofilmului (CMIB). Aceasta a fost stabilită în funcție de valorile martorului, mai exact, cea mai mică concentrație de ulei esențial la care absorbanta a avut valorile cele mai apropiate de cele ale godeului martor. Prin urmare, specia care a prezentat cea mai mare sensibilitate la acțiunea antimicrobiană a compușilor testați a fost reprezentată *Candida albicans*, având valori ale CMIB cuprinse între 0.0125 și 0.0016 mg/ml. Cel mai eficient compus testat a fost reprezentat de uleiul esențial de *Origanum vulgare*, care a

avut activitate inhibitorie la concentrații cuprinse între 0.025 și 0.0016 mg/ml. A fost observată o activitate eficientă a compusului reprezentat de uleiul esențial de *Citrus limon*. Acest compus a prezentat o activitate foarte bună asupra speciei bacteriene *S. aureus*, unde valoarea CMIB a fost reprezentată de concentrația de 0.0031 mg/ml. Speciile *P. aeruginosa* și *Ent. faecalis*, au prezentat sensibilitatea cea mai mare pentru compuși reprezentați de uleiurile esențiale de *Melaleuca alternifolia* și *Origanum vulgare*, valorile CMIB fiind cuprinse între concentrațiile de 0.025 și 0.0063 mg/ml. Compușii naturali testați au avut efect și asupra speciei bacteriene *E. coli*, aceasta prezentând sensibilitate pentru toți compușii testați, cei mai eficienți fiind reprezentați de uleiurile esențiale de *Eucalyptus sp.* și *Origanum vulgare*, care au avut efect la concentrație de 0.0125 mg/ml (Fig. 3).

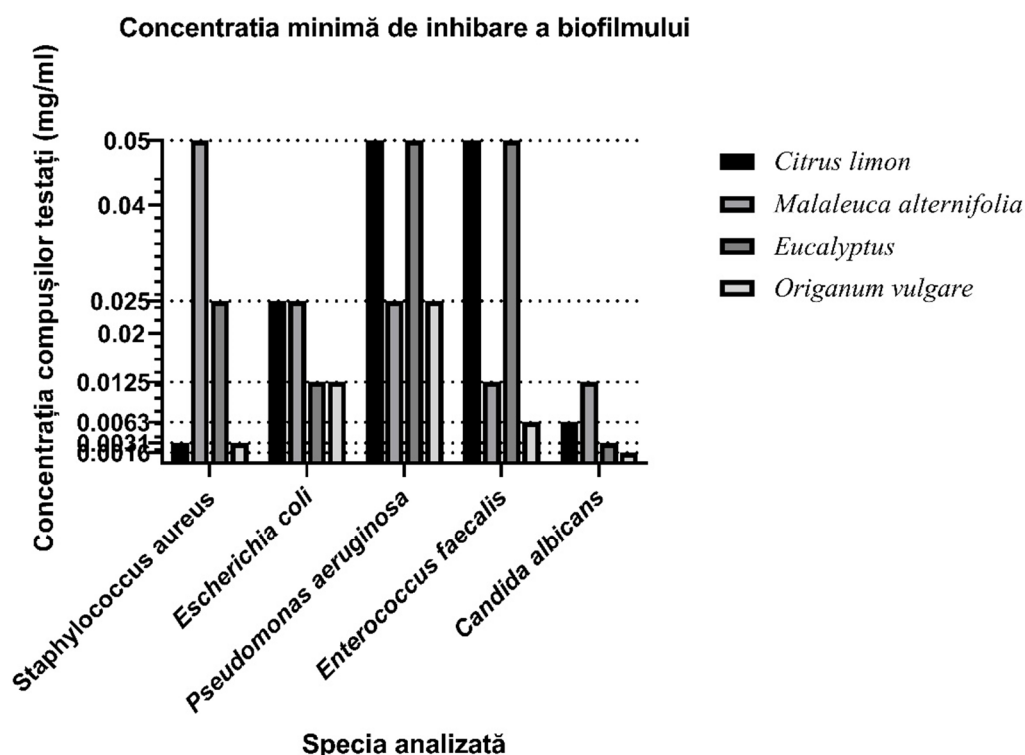


Fig. 3. Valorile concentrațiilor minime de inhibare a biofilmelor.
Autor: Dragomir Rareș.

• 2.4 Discuții

Origanum vulgare a fost cel mai eficient ulei esențial testat, având un efect antibacterian foarte bun, acest lucru fiind dovedit prin diametrul rezultat în urma utilizării metodei disc – difuzimetrică dar, și prin valori mici ale CMI și CMIB. Cele mai bune rezultate au fost reprezentate de valorile obținute în urma utilizării acestui ulei pe *Candida albicans*, activitatea sa antifungică fiind recunoscută datorita produsului său principal, mai exact carvacrol care este un fenol prezent în uleiurile esențiale de la mai multe specii de plante aromatice [5]. Studiile din literatura au mai arătat o bună acțiune a uleiului esențial de *Citrus limon*, împotriva formării biofilmului monospecific de *S. aureus* și *E. coli*, acest lucru fiind observat și în acest studiu, prin determinarea CMIB la cele două specii bacteriene [6]. Acțiunea citricelor este bine cunoscută ca având un efect antibacterian prin componentele prezente în uleiurile esențiale extrase, limonenul fiind componenta principală [7]. Rezultatele obținute în urma analizării diametrelor de inhibare rezultate în urma utilizării uleiului esențial de *Melaleuca alternifolia*, au fost similare cu datele observate în literatura de specialitate,

diametrele regăsite fiind cuprinse între 20 și 30 mm [8]. Proprietățile uleiului esențial extras din *Melaleuca alternifolia* sunt bine cunoscute ca având un efect antibacterian și antifungic, acest lucru fiind dovedit chiar și prin intermediul unor studii clinice [9]. Rezultate similare, pentru acțiunea compușilor prezenți în uleiul esențial de *Eucalyptus sp.*, au fost regăsite în literatura de specialitate, cu mențiunea unei mai bune acțiuni asupra culturilor de *S. aureus*, potrivit unui studiu realizat în 2021 [6].

O abordare regăsită în literatura de specialitate privind alternative de combatere a bacteriilor rezistente la antibiotice, se referă la asocieri între diferite tipuri de uleiuri esențiale. Potrivit unui studiu realizat în anul 2021, o sinergie formată din uleiurile esențiale extrase din *Melaleuca alternifolia* și *Citrus sp.* a fost mai eficientă la diluții de până la trei ori mai mici, comparativ cu rezultate obținute în urma testării acestor compuși în mod separat. Potrivit studiului, cele mai bune efecte au fost observate pe tulpinile de *Staphylococcus aureus* rezistent la meticilină și *Escherichia coli* producătoare de β -lactamaze de spectru extins [6].

Concluzii

În acest studiu au fost testate uleiuri esențiale care sunt recunoscute pentru proprietățile lor antibacteriene și antifungice, acestea reprezentând o posibilă alternativă pentru combaterea multirezistenței microorganismelor, care a devenit o problemă majoră la nivel mondial. Rezultatele obținute în urma efectuării unor metode calitative și cantitative, au arată că:

- Toți compușii naturali testați au prezentat activitate antimicrobiană, însă aceasta a variat în funcție de tulpina testată.
- Eficiența cea mai mare a tuturor compușilor testate a fost fata de *Candida albicans*, iar cea mai scăzută așa cum era de așteptat, în cazul tulpinii de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Cel mai eficient compus a fost reprezentat de uleiul esențial de *Origanum vulgare*, observându-se cele mai mari diametre ale zonelor de inhibiție și cele mai mici valori CMI pentru majoritatea tulpinilor testate.
- Mai mul decât atât, compușii naturali testați au avut capacitatea de a inhiba formarea biofilmelor monospecifice pe un substrat inert, în cazul tuturor tulpinilor analizate, la concentrații diferite ale acestora.

Având în vedere toate aceste lucruri, uleiurile esențiale, prin produșii lor principali, pot reprezenta o alternativă eficientă pentru tratarea infecțiilor cu microorganisme multirezistente la antibiotice sau antifungice.

Bibliografie

- [1] I. H. N. Bassolé and H. R. Juliani, "Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties," *Molecules*, vol. 17, no. 4, pp. 3989–4006, 2012, doi: 10.3390/molecules17043989.

- [2] M. Alam *et al.*, “Synergistic Role of Plant Extracts and Essential Oils against Multidrug Resistance and Gram-Negative Bacterial Strains Producing Extended-Spectrum β -Lactamases,” *Antibiotics*, vol. 11, no. 7, 2022, doi: 10.3390/antibiotics11070855.
- [3] I. Cacciatore *et al.*, “Carvacrol codrugs: A new approach in the antimicrobial plan,” *PLoS One*, vol. 10, no. 4, Apr. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0120937.
- [4] A. J. Vieira, F. P. Beserra, M. C. Souza, B. M. Totti, and A. L. Rozza, “Limonene: Aroma of innovation in health and disease,” *Chem Biol Interact*, vol. 283, pp. 97–106, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.02.007>.
- [5] Cacciatore Ivana and Di Giulio, “Carvacrol Codrugs: A New Approach in the Antimicrobial Plan,” *PLoS One*, vol. 10, no. 4, pp. 1–20, May 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0120937.
- [6] R. Iseppi, M. Mariani, C. Condò, C. Sabia, and P. Messi, “Essential Oils: A Natural Weapon against Antibiotic-Resistant Bacteria Responsible for Nosocomial Infections,” *Antibiotics*, vol. 10, no. 4, 2021, doi: 10.3390/antibiotics10040417.
- [7] M. K. Okla *et al.*, “Yield, Phytochemical Constituents, and Antibacterial Activity of Essential Oils from the Leaves/Twigs, Branches, Branch Wood, and Branch Bark of Sour Orange (*Citrus aurantium* L.),” *Processes*, vol. 7, no. 6, 2019, doi: 10.3390/pr7060363.
- [8] R. Iseppi *et al.*, “In Vitro Activity of Essential Oils Against Planktonic and Biofilm Cells of Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL)/Carbapenamase-Producing Gram-Negative Bacteria Involved in Human Nosocomial Infections,” *Antibiotics*, vol. 9, no. 5, 2020, doi: 10.3390/antibiotics9050272.
- [9] C. F. Carson, K. A. Hammer, and T. V. Riley, “*Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: A review of antimicrobial and other medicinal properties,” *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 19, no. 1, pp. 50–62, Jan. 2006. doi: 10.1128/CMR.19.1.50-62.2006.