

EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *LIPPIA ORIGANOIDES* SOBRE...

Efecto del aceite esencial de *Lippia origanoides* sobre el *biofilm* de *Staphylococcus aureus*:

un abordaje proteómico y fenotípico

Stefania Correa Duarte

Trabajo de Grado para Optar al Título de Magister en Biología

Directora

Stelia Carolina Méndez Sánchez

PhD. en Ciencias Bioquímicas

Codirectora

Jennifer Andrea Ruiz Duran

MSc en Microbiología

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Maestría en Biología

Bucaramanga

2025

Agradecimientos

A mi familia, mis padres Elizabeth Duarte y Amaury Correa, y mis hermanas Nathaly y Maria, por su apoyo y acompañamiento en cada una de mis metas

A Lady por su apoyo incondicional y todos los consejos dados

A la Doctora Stelia, por creer en mí y brindarme esta gran oportunidad en la que pude crecer personal y profesionalmente. Gracias por su apoyo incondicional, confianza y por darme la oportunidad de aprender y forjarme en el camino de la ciencia

A la Doctora Claudia Ortiz por su apoyo y darme la oportunidad de pertenecer al grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología

A mis amigos y compañeros del Grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología por hacer parte de todo este proceso

A los profesores de la escuela de Biología y Química por sus enseñanzas y aportes brindados para enriquecer mi trayectoria como 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, Contrato RC-FP44842-212-2018.

Al Sistema General de Regalías por la financiación del proyecto: “Producción de nucleótidos a partir de biomasa residual de la agroindustria para diagnóstico por biología molecular en el departamento de Santander”, código BPIN 2021000100331.

Tabla de contenido

Introducción-----	12
1 Hipótesis-----	17
2 Objetivos -----	17
2.1 Objetivo general-----	17
3 Marco teórico -----	18
3.1 <i>Staphylococcus aureus</i> -----	18
3.2 Resistencia a los antimicrobianos -----	18
3.3 <i>Biofilm</i> -----	19
3.3.1 Farmacorresistencia generada por el <i>biofilm</i> -----	22
4 Alternativas terapéuticas -----	23
4.1 Aceites esenciales (AE) -----	23
4.2 <i>Lippia origanoides</i> -----	23
4.3 Actividad biológica de los aceites esenciales -----	24
5 Estudio de mecanismo de acción de los AEs-----	26
5.1 Proteómica -----	26
6 Docking molecular-----	27
7 Materiales y métodos -----	28
7.1 Materiales -----	28
7.2 Cepa bacteriana-----	28
7.3 Aceite esencial-----	29

EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *LIPPIA ORIGANOIDES* SOBRE...

7.4	Evaluación de la actividad Biológica -----	32
7.4.1	Evaluación de la actividad antimicrobiana de LOT-II <i>in vitro</i> sobre células planctónicas -----	32
7.4.2	Evaluación de la actividad antimicrobiana de componentes principales del AE LOT-II <i>in vitro</i> sobre células planctónicas -----	33
7.4.3	Cuantificación de la formación del <i>biofilm</i> de <i>S. aureus</i> en el tiempo -----	33
7.4.4	Actividad inhibitoria de la formación del <i>biofilm</i> del AE LOT-II -----	34
7.4.5	Efecto del aceite esencial sobre la viabilidad celular de células eucariotas	35
7.4.6	Actividad antivirulencia-----	36
7.4.7	Análisis del <i>biofilm</i> por microscopía electrónica de barrido (SEM)-----	37
7.5	Análisis proteómico -----	38
7.5.1	Extracción y cuantificación de proteínas del <i>biofilm</i> de <i>S. aureus</i> -----	38
7.5.2	Electroforesis bidimensional -----	39
7.5.3	Análisis de imágenes -----	39
7.5.4	Identificación de proteínas por MALDI-TOF -----	40
7.5.5	Análisis bioinformático -----	41
7.6	Docking molecular-----	41
7.7	Análisis estadístico -----	42
8	Resultados-----	43
8.1	Evaluación de la actividad Biológica -----	43
8.1.1	Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de <i>Lippia origanoides</i> quimiotipo timol (LOT-II-) <i>in vitro</i> sobre células planctónicas -----	43
8.1.2	Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de <i>Lippia origanoides</i> quimiotipo timol (LOT-II-), timol, p- cimeno y carvacrol <i>in vitro</i> sobre células planctónicas-----	44
8.1.3	Cuantificación de la formación del <i>biofilm</i> de <i>S. aureus</i> en el tiempo -----	46
8.1.4	Evaluación de la actividad <i>anti-biofilm</i> del LOT-II y cuantificación de la viabilidad celular de las células plantónicas -----	47
8.1.5	Efecto del aceite esencial sobre la viabilidad celular de células eucariotas	48

EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *LIPPIA ORIGANOIDES* SOBRE...

8.1.6	Actividad antivirulencia-----	49
8.1.7	Análisis del <i>biofilm</i> por microscopía electrónica de barrido (SEM)-----	51
8.2	Análisis proteómico -----	52
8.2.1	Electroforesis bidimensional e Identificación de proteínas por MALDI-TOF 52	
8.2.2	Análisis bioinformático -----	59
8.3	Docking molecular-----	63
9	Discusión -----	67
10	Conclusiones-----	82
11	Recomendaciones -----	85
	Referencias bibliográficas -----	86

Listado de figuras

Figura 1 Ciclo de la formación del biofilm en *Staphylococcus* 22

Figura 2 . Efecto de inhibición del AE LOT-II sobre el crecimiento de *S. aureus* ATCC 43300. La inhibición del crecimiento se presenta como la media \pm DE de la absorbancia medida a 595 nm con respecto al control de crecimiento bacteriano(cc). 43

Figura 3 Efecto de inhibición de Timol sobre el crecimiento de *S. aureus* ATCC 43300la inhibición del crecimiento se presenta como la media \pm DE de la absorbancia medida a 595 nm con respecto al control de crecimiento bacteriano(cc). 44

Figura 4. Efecto de inhibición de P-cimeno sobre el crecimiento de *S. aureus* ATCC 43300. La inhibición del crecimiento se presenta como la media \pm DE de la absorbancia medida a 595 nm con respecto al control de crecimiento bacteriano(cc). 45

Figura 5 . Efecto de inhibición de carvacrol sobre el crecimiento de *S. aureus* ATCC 43300. La inhibición del crecimiento se presenta como la media \pm DE de la absorbancia medida a 595 nm con respecto al control de crecimiento bacteriano(cc). 46

Figura 6 Formación del biofilm de *S. aureus* resistente a la meticilina ATCC 43300 en diferentes tiempos de incubación. La cuantificación de la biomasa se presenta como la media \pm DE de la absorbancia medida a 595 nm con respecto al control de crecimiento bacteriano (* $p < 0.001$). 47

Figura 7 Porcentaje de inhibición de diferentes contracciones sub-CMI de LOT-II sobre la formación del biofilm de *S. aureus* ATCC 43300. El porcentaje de inhibición se presenta como la media \pm DE de la absorbancia medida a 595 nm con respecto al control de crecimiento bacteriano. 48

Figura 8 Citotoxicidad sobre la línea celular VERO. Las células fueron incubadas con AE LOT-II en sub-MIC desde de 50 hasta 100 µg/mL. El control de viabilidad fueron células sin tratamiento. P >0.05 en comparación con el control.	49
Figura 9 Inhibición de la producción de exopolisacárido por AE LOT-II, la cual se analizó utilizando placas de agar rojo Congo.....	51
Figura 10 Micrografías SEM del efecto del LOT-II sobre la morfología y estructura del biofilm después de 24 h de cultivo: (A) Biofilm de <i>S. aureus</i> ATCC 43300 sin tratamiento; (B) Biofilm de <i>S. aureus</i> tratado con LOT-II.	51
Figura 11 Gel de electroforesis en 2D correspondiente al control del biofilm de <i>S. aureus</i> ATCC 43300.	53
Figura 12 . Gel de electroforesis en 2D correspondiente al tratamiento con LOT-II a 75 µg/mL (BIC50) del biofilm de <i>S. aureus</i> ATCC 43300.....	53
Figura 13 Ejemplo de vista representativa de puntos en 3D de las proteínas mulT y purA con expresión diferencial del biofilm de <i>S. aureus</i> antes y después del tratamiento con LOT-II el software PdQuest Advanced v8.0. A.....	54
Figura 14 Interactoma de las proteínas identificadas que se expresaron diferencialmente en el proceso de formación del biofilm de <i>S. aureus</i> al ser tratadas con el AE LOT-II, construido por STRING v10.0. usando como modelo proteínas reportadas para <i>S. aureus</i> , mostrando la relación de acuerdo con el nivel de confianza establecido por STRING. En la red predicha, las proteínas son representadas como nodos y líneas que agrupan las proteínas según su función.	60
Figura 15 Categorías funcionales de las proteínas expresadas diferencialmente por <i>S. aureus</i> al ser tratadas con el AE LOT-II, clasificadas por el software string. El tamaño de	

cada burbuja representa el número de proteínas asociadas a cada término (Gene count) y el color representa el valor de FDR (False Discovery Rate). 61

Figura 16 Ruta general de las proteínas expresadas diferencialmente afectadas por el AE LOT-II sobre la formación del biofilm de *S. aureus*. 62

Listado de tablas

Tabla 1 Caracterización química del aceite esencial de <i>Lippia origanoides</i> quimiotipo timol (LOT-II-).....	29
Tabla 2 Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida del LOT-II-II frente <i>S. aureus</i> . Los valores están expresados en mg/mL y cada experimento fue llevado a cabo por triplicado	43
Tabla 3 Inhibición de la producción de hemolisina de <i>S. aureus</i> ATCC 43300 en tratamiento con el AE LOT-II.....	50
Tabla 4 Proteínas expresadas diferencialmente del biofilm de <i>S. aureus</i> ATCC 43300 antes y después del tratamiento con el AE LOT-II identificadas mediante “MASCOT Peptide Mass Fingerprint” a partir de su huella peptídica obtenida del análisis MALDI- TOF	55
Tabla 5 . Docking score ligandos presentes en LOT-II y proteínas expresadas diferencialmente del biofilm de <i>S. aureus</i> ATCC 43300	65

Resumen

Título: Efecto del aceite esencial de *Lippia origanoides* sobre el *biofilm* de *Staphylococcus aureus*: un abordaje proteómico y fenotípico*

Autor: Stefania Correa Duarte**

Palabras Clave: Aceite esencial de *Lippia origanoides*; *Staphylococcus aureus*; inhibición de *biofilm*; proteómica; antivirulencia; acoplamiento molecular

Descripción: La formación de *biofilm* por *Staphylococcus aureus* desempeña un papel crucial en la resistencia a los antimicrobianos y en el desarrollo de infecciones crónicas, especialmente en cepas resistentes a meticilina. En este estudio, se investigaron los efectos antibiofilm y antivirulentos del aceite esencial de *Lippia origanoides* quimiotipo timol (LOT-II) frente a *S. aureus* ATCC 43300, y se exploró su mecanismo de acción mediante aproximaciones fenotípicas, proteómicas e *in silico*. LOT-II mostró una potente actividad antibacteriana con una CMI₅₀ de 0,09 mg/mL e inhibió la formación de biofilm hasta en un 50% a concentraciones subinhibitorias, sin presentar efectos citotóxicos sobre células eucariotas. Además, LOT-II redujo significativamente la producción de hemolisinas y la síntesis de exopolisacáridos, ambos considerados factores de virulencia críticos en *S. aureus*. El análisis proteómico reveló quince proteínas diferencialmente expresadas, involucradas en el metabolismo de nucleótidos, la biosíntesis de aminoácidos y la reparación del ADN. El análisis bioinformático mediante STRING y la anotación por Ontología Génica evidenciaron un cambio metabólico en respuesta al tratamiento. Los estudios de acoplamiento molecular (docking) demostraron interacciones estables entre los principales componentes del aceite esencial (timol, carvacrol y *p*-cimeno) y proteínas clave asociadas con la formación de *biofilm*. En conjunto, nuestros hallazgos sugieren que el aceite esencial LOT-II interfiere con rutas metabólicas y regulatorias esenciales para el desarrollo de *biofilm* y la virulencia en *S. aureus*, lo que respalda su potencial como estrategia complementaria frente a infecciones estafilocócicas persistentes.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias, Escuela de Biología. Directora: Stelia Carolina Méndez Sánchez. PhD. Codirectora: Jennifer Andrea Ruiz Duran. MSc.

Abstract

Title: Effect of *Lippia origanoides* Essential Oil on *Staphylococcus aureus* Biofilm: A Proteomic and Phenotypic Approach

Autor: Stefania Correa Duarte

Key Words: *Lippia origanoides* essential oil; *Staphylococcus aureus*; *Biofilm* inhibition; Proteomics; Antivirulence; Molecular docking.

Description: *Staphylococcus aureus* biofilm formation plays a crucial role in antimicrobial resistance and chronic infections, especially in methicillin-resistant strains. In this study, we investigated the antibiofilm and antivirulence effects of *Lippia origanoides* essential oil chemotype thymol (LOT-II) against *S. aureus* ATCC 43300 and explored its mechanism of action using phenotypic, proteomic, and in silico approaches. LOT-II demonstrated potent antibacterial activity with a MIC₅₀ of 0.09 mg/mL and inhibited biofilm formation by up to 50% at subinhibitory concentrations without cytotoxic effects on eukaryotic cells. Additionally, LOT-II significantly reduced hemolysin production and exopolysaccharide synthesis, both critical virulence factors in *S. aureus*. Proteomic analysis revealed fifteen differentially expressed proteins involved in nucleotide metabolism, amino acid biosynthesis, and DNA repair. Bioinformatic analysis using STRING and Gene Ontology annotation indicated a metabolic shift in response to treatment. Molecular docking demonstrated stable interactions between major EO components (thymol, carvacrol, and *p*-cymene) and key biofilm-associated proteins. Overall, our findings suggest that LOT-II essential oil disrupts metabolic and regulatory pathways essential for biofilm development and virulence in *S. aureus*, supporting its potential as a complementary strategy against persistent staphylococcal infections.

* Degree Work

**Faculty of Sciences. School of Biology. Master's degree in biology. Director: Stelia Carolina Méndez Sánchez. PhD. Codirector: Jennifer Andrea Ruiz Duran. MSc.

Introducción

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es un proceso natural en los microorganismos que se puede dar a través de diferentes mecanismos como: inactivación enzimática, modificación en la permeabilidad de la membrana, activación de las bombas de flujo, modificación de rutas metabólicas, entre otros (Sultan et al., 2018). La RAM es definida como una amenaza a nivel mundial, porque la infección causada por bacterias resistentes puede tener consecuencias graves, incluyendo enfermedad y hospitalización prolongada, mayores costos médicos y mayor mortalidad (Kumar et al., 2024).

En el año 2014 la Organización Mundial de la Salud (OMS), creó un plan de acción mundial sobre la RAM y emitió un informe, el cual fue actualizado en el 2024 (World Health Organization, 2014). En este informe, publicaron un listado de microorganismos prioritarios para el desarrollo, la investigación de nuevos tratamientos y estrategias para el control de la resistencia antimicrobiana, entre los que se encuentra *Staphylococcus aureus* (World Health Organization, 2014, 2024).

S. aureus es una bacteria patógena que causa diversas infecciones tanto en la comunidad como en entornos hospitalarios. Desde la introducción de los antimicrobianos, ha sido uno de los microorganismos más difíciles de controlar debido a su capacidad para desarrollar resistencia, siendo de los primeros en crear resistencia a la penicilina (McGuinness et al., 2017). Posteriormente, con la llegada de la meticilina, surgieron cepas resistentes a este antibiótico (SARM), cuya presencia se reportó ampliamente en hospitales durante la década de los noventa (Wasserman & Taljaard, 2011). Se estima que más del 60 % de las cepas de *S. aureus* aisladas en unidades de cuidados intensivos, han mostrado resistencia a

EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *LIPPIA ORIGANOIDES* SOBRE...

antimicrobianos existentes como β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas), tetraciclinas, fluoroquinolonas, etc (Rodríguez-Rojas et al., 2013; Rodríguez, F. et al., 2020).

Debido a la escasez de tratamientos efectivos, la OMS ha clasificado a *S. aureus* como una de las bacterias en prioridad alta, en cada uno de sus informes publicados desde el año 2015. Esto se debe a que representa un grave problema de salud tanto en la comunidad como en el ámbito hospitalario, causando infecciones pulmonares y del torrente sanguíneo, sepsis e incluso la muerte si no se trata a tiempo (World Health Organization, 2024).

S. aureus posee diversas estrategias de supervivencia como la producción de toxinas, proteasas y la formación de *biofilm*. Siendo esta última de gran importancia para la resistencia a factores externos (Tong et al., 2015).

El *biofilm* es una aglomeración de bacterias sésiles inmersas en una matriz de exopolisacáridos, proteínas y ADN extracelular (Flemming & Wingender, 2010). Por sus propiedades físicas, químicas y biológicas, confiere resistencia contra factores externos como los antimicrobianos, la desecación y el sistema inmune contribuyendo a la cronicidad de las infecciones y a su recurrencia, convirtiéndolo en uno de los principales desafíos para la terapia antimicrobiana actual (Koo et al., 2017).

Se estima que el *biofilm* se encuentra involucrado aproximadamente en el 65 % al 85 % de las infecciones bacterianas, especialmente en aquellas relacionadas a dispositivos médicos implantables (Kranjec et al., 2021; Guo et al., 2022). Actualmente, estas infecciones son tratadas con terapias antibióticas sistémicas poco eficientes debido a la farmacoresistencia del *biofilm* (Parastan et al., 2020; Kranjec et al., 2021). Esta resistencia, está relacionada a las características intrínsecas como lo son: 1) una baja tasa metabólica que disminuye la

EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *LIPPIA ORIGANOIDES* SOBRE...

efectividad de compuestos relacionados a la replicación celular, 2) una alta concentración de proteasas extracelulares que pueden degradar rápidamente moléculas externas, y 3) un sistema de difusión de nutrientes a través del exopolisacárido que disminuye las concentraciones activas de los antibióticos (Olsen, 2015; Singh et al., 2017).

Debido a lo anterior, se hace indispensable la investigación y desarrollo de nuevos agentes terapéuticos que interfieran con la formación de *biofilm*, permitiendo un impacto directo a la supervivencia del microorganismo. En este contexto, el estudio de los componentes bioactivos de plantas medicinales y aromáticas ha aumentado exponencialmente en la última década (Abers et al., 2021). Los aceites esenciales (AE) son fitoproductos lipófilos y volátiles que se pueden extraer de diferentes partes de las plantas, como hojas, raíces, flores, brotes, frutos, tallos, semillas y maderas. Se caracterizan por ser mezclas complejas de metabolitos secundarios que presentan diferentes propiedades químicas y biológicas (Millezi et al., 2012).

El mecanismo de acción de los AEs depende en su mayoría de su composición química, y su actividad biológica no depende de un único mecanismo, sino que corresponde a un grupo de reacciones que involucran toda la célula bacteriana (Koo et al., 2017). Diversos autores han planteado que los componentes de los AE tienen como diana. La membrana celular, en donde la interacción de sus componentes hidrofóbicos con los lípidos y proteínas presentes provoca daños metabólicos y muerte celular (da Silva et al., 2021), cambios en la producción del ATP, y alteración en la síntesis de aminoácidos e inhibición de procesos metabólicos localizados en la membrana plasmática (Faleiro, 2011.; Nazzaro et al., 2013; Saad et al., 2013).

Sin embargo, debido a la complejidad de su composición se requieren estudios, para evaluar los efectos individuales y sinérgicos de los componentes sobre diferentes metabolismos; tales como metabolismo del nitrógeno o glucólisis. En la actualidad, existen diferentes estudios

EFEECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *LIPPIA ORIGANOIDES* SOBRE...

sobre técnicas basadas en algunas ciencias ómicas que han demostrado hipótesis relacionadas con posibles blancos terapéuticos. No obstante, pocas investigaciones se han centrado en el estudio del mecanismo de acción de los Aes a través de estrategias moleculares como la proteómica (Čabarkapa et al., 2019; Lofa et al., 2019; Barbosa et al., 2020; Tang et al., 2020).

En el presente estudio, se evaluó el efecto *antibiofilm* del aceite esencial *Lippia origanoides* quimiotipo timol (LOT-II-) sobre *S. aureus* resistente a la Meticilina ATCC 43300, y se identificaron posibles proteínas relacionadas con la formación del *biofilm* antes y después del tratamiento y su interacción con los componentes principales(Timol, p-cimeno y carvacrol) del AE de LOT-II, utilizando *docking* molecular.

Resumen

La formación de biofilm por parte de *Staphylococcus aureus* contribuye significativamente a su persistencia y resistencia a los antimicrobianos convencionales, representando un desafío clínico importante, especialmente en cepas resistentes a la meticilina (SARM). En este estudio se evaluó la actividad *antibiofilm* y antivirulencia del aceite esencial de *Lippia origanoides* quimiotipo timol (LOT-II) frente a *S. aureus* ATCC 43300, y se exploró su mecanismo de acción mediante aproximaciones fenotípicas y proteómicas. El aceite esencial mostró actividad antimicrobiana con una CMI₅₀ de 0.09 mg/mL y redujo significativamente la formación de biofilm hasta en un 50% a concentraciones subinhibitorias, sin afectar la viabilidad de células eucariotas. Además, inhibió la producción de hemolisinas y exopolisacáridos, dos factores clave de virulencia. El análisis proteómico del biofilm reveló 15 proteínas diferencialmente expresadas, relacionadas con rutas de biosíntesis de nucleótidos, metabolismo de aminoácidos y reparación del ADN, sugiriendo una reprogramación metabólica tras el tratamiento, según los análisis en STRING y ontología génica. El análisis de docking molecular confirmó interacciones estables entre timol, carvacrol y *p*-cimeno con proteínas blanco-implicadas en la formación de biofilm y la homeostasis celular. Estos hallazgos evidencian que el AE de *L. origanoides* LOT-II interfiere con rutas metabólicas y mecanismos de virulencia esenciales en *S. aureus*, lo que respalda su potencial como terapia coadyuvante frente a infecciones asociadas a *biofilm*.

1 Hipótesis

El aceite esencial de *Lippia origanoides*, afecta la expresión de proteínas relacionadas con la formación del *biofilm* tales como proteínas de adhesión, comunicación celular y de estrés oxidativo de *S. aureus* ATCC 43300.

2 Objetivos

2.1 Objetivo general

Identificar los patrones de expresión proteica de la formación del *biofilm* de *S. aureus* ATCC 43300 expuesto al aceite esencial de *Lippia origanoides* quimiotipo timol (LOT-II-).

Objetivos específicos

- ❖ Determinar la expresión diferencial de proteínas de *S. aureus* ATCC 43300 en estado sésil con y sin tratamiento con el aceite esencial de *Lippia origanoides* quimiotipo timol (LOT-II) mediante proteómica 2D.
- ❖ Identificar las proteínas con expresión diferencial relacionadas en la formación de *biofilm* de *S. aureus* ATCC 43300 con y sin tratamiento con el aceite esencial de *Lippia origanoides* quimiotipo timol (LOT-II) mediante espectrometría de masas.
- ❖ Evaluar la interacción de los componentes principales del aceite esencial de *Lippia origanoides* quimiotipo timol (LOT-II-), sobre las proteínas con expresión diferencial, usando *docking* molecular.

3 Marco teórico

3.1 *Staphylococcus aureus*

Es un coco aerobio Gram-positivo perteneciente a la familia *Staphylococcaceae*, ubicuo de la microbiota de la piel y mucosas, agente causal de infecciones de difícil resolución en pacientes inmuno-comprometidos (Vanegas Múnera et al., 2017). Esta bacteria fue inicialmente aislada por Alexander Ogston en 1881, y descrita como parte del género por Antón J. Rosenbach en 1884.

S. aureus se relaciona con infecciones agudas o crónicas de origen nosocomiales o comunitario, las cuales pueden ser superficiales como heridas en piel y tejidos blandos, o sistémicas como la bacteremia, neumonía, endocarditis, meningitis, osteomielitis, síndrome de choque tóxico, entre otras (Klevens et al., 2007; World Health Organization, 2024). Adicionalmente, *S. aureus* tiene la capacidad de formar *biofilm* colonizando superficies bióticas y abióticas como epitelios o dispositivos médicos, contribuyendo a la persistencia bacteriana y a la disminución de la efectividad de las terapias convencionales (Tong et al., 2015; Oliveira et al., 2018).

3.2 Resistencia a los antimicrobianos

Los compuestos antimicrobianos son sustancias, de origen natural o sintético, que impiden el crecimiento de diversos microorganismos. Estos desempeñan un papel esencial en la medicina; sin embargo, su uso excesivo ha favorecido el desarrollo acelerado de resistencia en microorganismos como *S. aureus*, dificultando su control y tratamiento (Singh et al., 2017). Tanto la OMS como el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) han alertado sobre el impacto global de las infecciones causadas por bacterias resistentes,

considerándolas una grave amenaza para la salud pública y una de las principales causas de mortalidad en diversas regiones del mundo. En respuesta a esta problemática, han elaborado listas de microorganismos prioritarios que requieren el desarrollo urgente de nuevas estrategias terapéuticas, entre las que se incluye, pero no se limita, la identificación de nuevas moléculas con actividad antimicrobiana (Woolhouse et al., 2016; CDC, 2024; World Health Organization, 2024).

3.3 Biofilm

El *biofilm* se describe como una o varias comunidades de microorganismos adheridos sobre una superficie y encapsulados en una matriz de exopolisacárido (EPS) que confiere protección contra diferentes factores externos (Flemming & Wingender, 2010; Vasudevan, 2014). Además, permite una distribución controlada de los nutrientes y desechos de la biopelícula, mientras protege a las células individuales de la acción de agentes como biocidas y antimicrobianos (Flemming & Wingender, 2010; Millezi et al., 2012; Del Pozo, 2018).

S. aureus forma *biofilm* mediante mecanismos de comunicación celular, lo que le confiere mayor adherencia y resistencia. Además, es capaz de proliferar en heridas, tejidos y dispositivos médicos; característica que los hace responsables de muchas infecciones persistentes. Sin embargo, la salud humana y animal no son las únicas afectadas por la formación de *biofilm*, en la industria agroalimentaria se reportan importantes pérdidas económicas por la presencia de este en tuberías o alimentos (Rogers et al., 2009; Millezi et al., 2012; Akens et al., 2018).

Su *biofilm* se encuentra compuesto por: Proteínas, ADN extracelular, carbohidratos organizados como el polisacárido adhesina intercelular (PIA) (Bhattacharya et al., 2015; Hao, Z et al., 2021); lo cual le permite a la comunidad bacteriana incrementar su resistencia a

factores ambientales adversos, como la presencia de antibióticos o la respuesta inmune del hospedero, lo que ocasiona tratamientos más extensos, menos efectivos y más costosos (Akens et al., 2018; Parastan et al., 2020).

La formación del *biofilm* se da en varias etapas (figura 1) las cuales se describen a continuación:

- **Unión inicial o fijación a la superficie:** Inicia cuando las células planctónicas que flotan libremente se adhieren a la superficie disponible e inician el proceso de colonización. La adhesión a una superficie depende de factores físicos como la carga superficial, la rugosidad y la temperatura; y de factores químicos como el pH, el sustrato, el oxígeno disuelto y la composición del medio (Asma et al., 2022). La unión está mediada por una serie de proteínas de tipo estructurales, adhesivas, enzimáticas o de defensa ancladas a la pared celular específicas que pueden clasificarse según sus propiedades estructurales y funcionales (Foster, 2019).

En el *biofilm* de *Staphylococcus* se han descrito varios polisacáridos; sin embargo, el primer y principal determinante de las fases de unión y multiplicación es el polisacárido de adhesión intercelular (PIA), es clave en las fases de unión, multiplicación y protección que consiste en N -acetil-glucosamina polimérica (PNAG) (Akhtar et al., 2022).

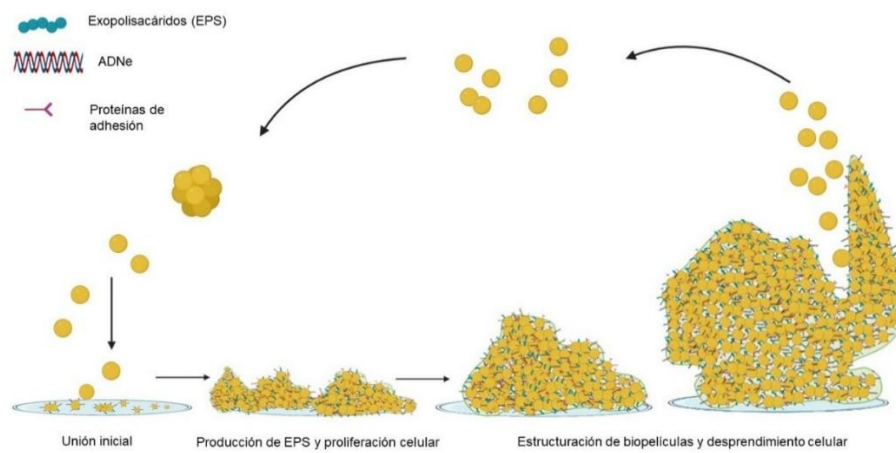
- **Formación de monocapa y producción de exopolisacárido:** Esta etapa esta mediada por el aumento constante sustancias poliméricas extracelulares y formación de microcolonias en diferentes multicapas celulares. Las células presentes en cada multicapa tendrán un metabolismo energético diferente, acorde a sus necesidades nutricionales y estas regulaciones de comunidad estarán mediadas por diferentes mecanismos de comunicación celular como el Quorum sensing (QS), Producción de Fenol-Soluble

Modulins (PSMs) o transferencia de señales químicas (metabolitos, iones) (van Wolferen et al., 2018).

- **Estructuración, maduración y dispersión:** La estructuración, implica la formación de una arquitectura compleja con diferentes canales que permiten la importación y exportación de nutrientes y desechos (Davey & O'toole, 2000). Durante la maduración se presenta una combinación de polímeros polianiónicos, exopolisacaridosos y pegajosos que se excretan al exterior para mantener una adhesión entre células-células y células-superficie, responsables de proteger a las bacterias contra la desecación, la oxidación, la acción de antibióticos, metales y la acción de elementos del sistema inmune (Kaplan, 2010). Finalmente, después de la maduración/proliferación de la biopelícula, las células dentro de la biopelícula pueden reactivarse a un estado planctónico mediante dispersión (Kaplan, 2010).

El principal mecanismo de dispersión del *biofilm* utilizado por *S. aureus* es la producción de varias exoenzimas y tensioactivos para degradar la matriz extracelular formada (Lister & Horswill, 2014). Las células liberadas aun podrían estar agrupadas y envueltas en EPS lo que facilitaría la colonización de nuevas superficies, para formar nuevas biopelículas (Asma et al., 2022; Nguyen et al., 2020; O'toole et al., 2000).

Figura 1 Ciclo de la formación del biofilm en *Staphylococcus*
Adaptado de (Vázquez-Sánchez & Rodríguez-López, 2017)



3.3.1 Farmacorresistencia generada por el *biofilm*

El *biofilm* forma una estructura compacta que otorga a la comunidad microbiana diversas ventajas para su supervivencia, como la generación de interacciones físicas y químicas que inducen cambios en la tasa de crecimiento y en la morfología bacteriana en respuesta al estrés (Flemming et al., 2016).

Además, esta estructura confiere protección a las bacterias frente a los antibióticos convencionales y otros antimicrobianos mediante distintos mecanismos. Entre los más relevantes se encuentran la barrera de difusión creada por la matriz de exopolisacáridos, la transferencia horizontal de genes de resistencia y la regulación a través del sistema de *quorum sensing*, que contribuye a la tolerancia antimicrobiana, porque permite a la población bacteriana actuar como un organismo colectivo, regulando la formación, maduración y dispersión del biofilm. Al inducir respuestas coordinadas como la producción de matriz protectora, modulación del metabolismo y diferenciación celular, dificultando su penetración

y eficacia. Estas características hacen que la producción del *biofilm* represente un desafío significativo para los tratamientos convencionales, lo que ha impulsado la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas (Billings et al., 2015; Fux et al., 2005; Mah, 2012).

4 Alternativas terapéuticas

4.1 Aceites esenciales (AE)

A lo largo de la historia, las plantas han sido una fuente clave de compuestos bioactivos utilizados en el tratamiento de diversas enfermedades, gracias a sus propiedades biológicas. Estas producen una gran variedad de metabolitos secundarios esenciales para la interacción con plagas, patógenos y polinizadores (Anjali et al., 2023; Barberis et al., 2023). En los últimos años, ha resurgido el interés por el estudio de sustancias naturales y metabolitos extraídos de plantas con propiedades biológicas comprobadas. Dichas investigaciones han permitido identificar moléculas con potencial biofarmacéutico, entre las que destacan los polifenoles, terpenos y alcaloides (De Sousa, 2015; Sadgrove et al., 2022). Los AE son líquidos de baja densidad almacenados en glándulas secretoras conocidas como tricomas glandulares y se obtienen principalmente mediante procesos de hidrodestilación (Murbach Teles Andrade et al., 2014). Sus principales componentes son compuestos terpenoides y fenólicos, cuya actividad biológica ha sido ampliamente documentada (Caballero-Gallardo et al., 2023; Pandey et al., 2017; Tariq et al., 2019a).

4.2 *Lippia origanoides*

Lippia origanoides, conocida comúnmente como orégano de monte, es un pequeño arbusto de la familia Verbenaceae que se caracteriza por sus inflorescencias blancas (Orlando & Cadena, 2003). Esta planta puede alcanzar hasta tres metros de altura y posee hojas simples-

opuestas de distintos tamaños. Es nativa de regiones tropicales de Sudamérica y predomina en zonas semiáridas con suelos pobres en nutrientes (Orlando & Cadena, 2003). Su distribución abarca países como Colombia, Venezuela, Trinidad, Guyana y Brasil, y en Colombia se encuentra en regiones biogeográficas como los Andes, la Llanura del Caribe, el Valle del Cauca y el Valle del Magdalena (GBIF, 2021).

El género *Lippia* incluye numerosas especies consideradas plantas medicinales, utilizadas en la medicina tradicional por sus propiedades antimicrobianas, sedantes digestivas, analgésicas y expectorantes. Estas aplicaciones se deben a la diversidad de metabolitos secundarios presentes en la planta, responsables de sus efectos terapéuticos (Parra Torres et al., 2007).

El AE de *L. organoides* presenta variaciones en su composición química, lo que ha permitido clasificarlo en tres quimiotipos según sus principales compuestos: quimiotipo A, rico en *p*-cimeno; quimiotipo B, con predominio de carvacrol; y quimiotipo C, caracterizado por su alto contenido de timol (Stashenko et al., 2010). La bioactividad de estos quimiotipos ha sido evaluada en diversos estudios de tipo repelente, antibacteriano o anticancerígeno, mostrando resultados prometedores contra bacterias como *Escherichia coli* y *Staphylococcus epidermidis* (Cáceres et al., 2020; Guillín et al., 2021), hongos como *Phytophthora infestans* (Acosta et al., 2019) y parásitos como *Trypanosoma evansi* (Baldissera et al., 2017).

4.3 Actividad biológica de los aceites esenciales

La actividad biológica de los AEs está influenciada por la interacción sinérgica o antagónica entre sus diversos metabolitos (Costa et al., 2019; Games et al., 2016). Se ha documentado que los compuestos presentes en los AE, especialmente aquellos derivados de fenoles, cetonas, aldehídos e hidrocarburos están relacionados con una mayor actividad

antimicrobiana, actuando sobre múltiples dianas biológicas (Bassolé & Juliani, 2012; Méndez et al., 2019).

En particular, la eficacia de los terpenos fenólicos depende en gran medida de la posición del grupo hidroxilo libre, el cual interacciona con los compuestos hidrófobos de la membrana bacteriana, como los fosfolípidos, alterando su integridad y funcionalidad (Kauffmann & Castro, 2023; Nazzaro et al., 2013).

Por otro lado, diversos estudios han explorado los mecanismos de acción de los AE mediante el uso de docking molecular, evaluando interacción entre ligando y componentes del AE (da Nóbrega Alves et al., 2020), disciplinas ómicas, como la transcriptómica y metabolómica (Liu et al., 2024; Sivaranjani et al., 2019), así como la proteómica (Du et al., 2020; Tang et al., 2020), las cuales sugieren que los AE pueden reducir la formación de *biofilm* (Feizi et al., 2023), atravesar la pared celular y la membrana citoplasmática, y modificar la estructura de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos, lo que incrementa la permeabilidad celular. Estos efectos provocan la pérdida de iones, la disminución del potencial de membrana, el colapso de la bomba de protones, el agotamiento de ATP, la coagulación del citoplasma, el daño en proteínas y lípidos estructurales, y la fuga de macromoléculas, lo que finalmente conduce a la lisis celular (A. Martínez et al., 2021a; Pai et al., 2023).

5 Estudio de mecanismo de acción de los AEs

5.1 Proteómica

El proteoma representa el conjunto de proteínas totales que se expresan en un compartimiento biológico (célula, tejido u órganos) en un tiempo y condiciones específicas. Las proteínas, son macromoléculas constituidas por una o más cadenas largas de aminoácidos, determinadas por una secuencia de ADN del gen correspondiente (Torrades, 2004).

La proteómica, permite analizar e identificar proteínas provenientes de diferentes matrices biológicas determinando cambios en la expresión, en su ubicación o en su composición (Díaz Martín et al., 2019). Ha sido utilizada para investigar diferencias en los perfiles de expresión de proteínas de bacterias cultivadas y tratadas con posibles agentes terapéuticos, como antibióticos, nanopartículas y AE (Tariq et al., 2019b; Barbosa et al., 2020; Tang et al., 2020; Trevisan et al., 2020; Piras et al., 2021). El desarrollo de nuevas metodologías ha permitido el análisis de muestras complejas como el *biofilm*, en donde la proteómica como ciencia, permite una mayor comprensión de la conformación del este y su respuesta a determinados estímulos (Tang et al., 2020). Entre las metodologías más utilizadas y costo eficientes, se encuentra la electroforesis en gel bidimensional (2DE) junto con la espectrometría de masas (MS), utilizada por diversos autores en la caracterización de proteomas de *S. aureus* en diferentes condiciones de crecimiento (Jenkins et al., 2014; Tang et al., 2020; Valliammai et al., 2020; Xu et al., 2017).

Adicionalmente, los avances en herramientas moleculares, técnicas analíticas y adquisición de imágenes de miniaturización han permitido el análisis del proteoma del *biofilm* de forma dinámica y multidisciplinar permitiendo determinar efectos en el comportamiento proteico

desde una perspectiva macro, hasta una perspectiva individual, con el estudio de una célula a través de proteómica (Trevisan et al., 2020)

Estudios proteómicos en *S. aureus* han llevado a la descripción de múltiples mecanismos que le permiten hacer frente a los antibióticos y péptidos antimicrobianos. Estos mecanismos incluyen adaptaciones en las funciones metabólicas, vías reguladoras y cambios en la biogénesis de la envoltura celular (Cáceres et al., 2020b; Gómez-Sequeda et al., 2020). En el 2020, Tang y colaboradores, determinaron por proteómica bidimensional comparativa que SARM en tratamiento con el AE de *Amomum villosum* afecta la síntesis de proteínas generando alteración en la permeabilidad de membrana, afectando el crecimiento y división celular (Tang et al., 2020)

6 Docking molecular

El docking molecular es un método computacional usado para el estudio del mecanismo de acción de antimicrobianos por simulación de cómo una molécula o ligando interactúa específicamente con una proteína o receptor, permitiendo a los investigadores entender como el compuesto se une e interrumpe diferentes procesos bacterianos ocasionando la muerte de la célula (da Nóbrega Alves et al., 2020).

Esta metodología resulta especialmente útil para estudios de compuestos naturales, ya que proporciona información preliminar sobre sus posibles blancos moleculares y mecanismos de acción. En el contexto de la búsqueda de nuevas terapias antimicrobianas, el docking permite analizar cómo ciertos compuestos fenólicos presentes en aceites esenciales pueden unirse a enzimas bacterianas involucradas en procesos vitales como la síntesis de la pared celular, el metabolismo energético o la formación de biofilm.

7 Materiales y métodos

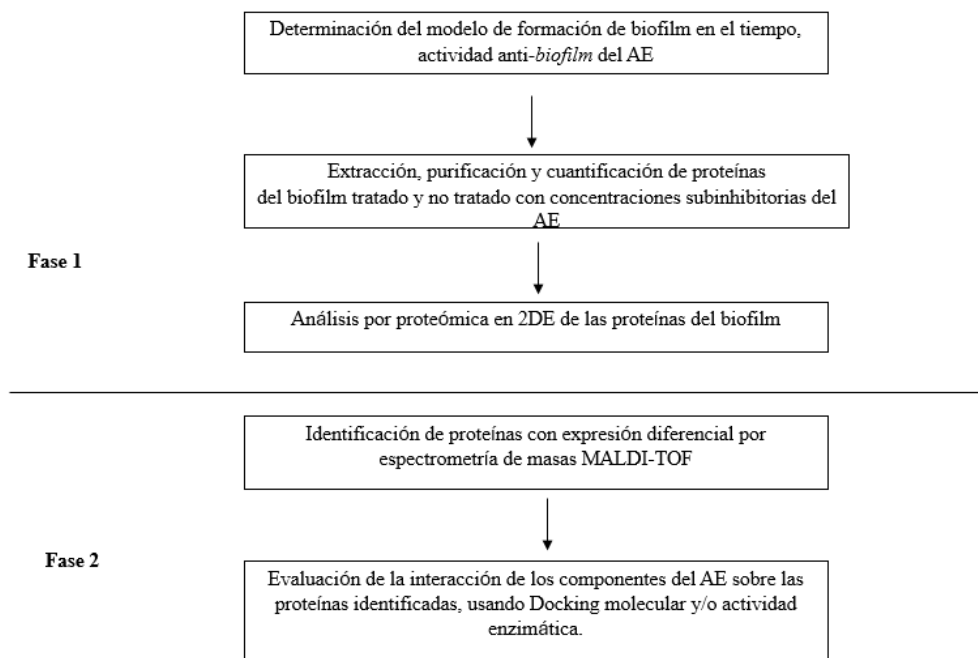
7.1 Materiales

Los solventes acetonitrilo, isopropanol, metanol, ácido orto-fosfórico, entre otros fueron de grado HPLC marca MERCK. El bicarbonato de amonio, urea, glutaraldehído, el THPS, CHAPS TRIS, DTT, Iodoacetamida y Tripsina fueron adquiridos en calidad biología molecular de SigmaAldrich y BIORAD. El agua utilizada para todos los procedimientos fue calidad HPLC libre de RNAsa, DNAsa y proteasas. Todo el material de plástico fue estéril, libre de RNAsa, DNAsa y proteasas. El material de vidrio fue libre de detergentes, exclusivo para la experimentación en proteómica, esterilizado por calor húmedo en una autoclave All American.

7.2 Cepa bacteriana

La cepa de trabajo fue *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 fue adquirida comercialmente de Kwik-stick™ microbiologics® (Minnesota, EEUU) por el Grsobreexpresado de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM). La metodología realizada en este trabajo de investigación se realizó en dos fases y se presenta de forma general en el esquema 1.

Esquema 1. Metodología general realizada



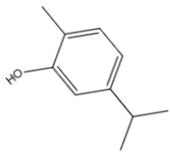

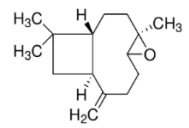
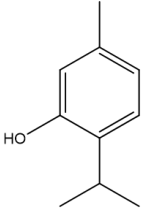
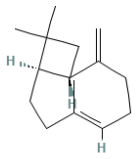
7.3 Aceite esencial

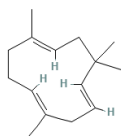
Se evaluó un aceite esencial de *Lippia origanoides* quimiotipo timol (LOT-II).

La extracción y caracterización de la composición química de LOT-II fue realizada por el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM), reportando nueve metabolitos en su composición química, que corresponden a compuestos oxigenados, hidrocarburos monoterpénicos, hidrocarburos sesquiterpénicos entre otros (tabla 1).

Tabla 1 Caracterización química del aceite esencial de *Lippia origanoides* quimiotipo timol (LOT-II-)

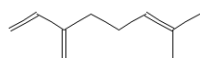
EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *LIPPIA ORIGANOIDES* SOBRE...

Compuestos	Porcentaje en LOT-II
 Carvacrol	4.4
 Metiltoéter	1
 Óxido de cariofileno	1
 timol	72.3
 Trans-β- cariofileno	1



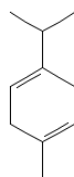
1

α -humuleno



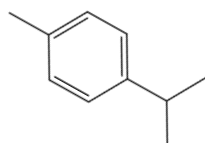
2.1

β -mirceno



2.1

γ -terpineno



10.7

P-cimeno

7.4 Evaluación de la actividad Biológica

7.4.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana de LOT-II *in vitro* sobre células planctónicas

La evaluación de la actividad antimicrobiana del LOT-II se determinó mediante el método de microdilución en caldo, con algunas modificaciones (CLSI, 2015)

En una microplaca de 96 pocillos, se prepararon diluciones seriadas del AE en agua peptonada al 0.1%, con concentraciones que oscilaron entre 0.07 mg/mL y 1.5 mg/mL. Posteriormente, se añadió a cada pozo suspensión bacteriana suficiente para obtener una concentración de inóculo final equivalente a 0.5 en la escala de McFarland, lo que corresponde a 10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). El cultivo *in vitro* se incubó a 37 °C con agitación constante a 200 rpm durante 8 h, y la densidad óptica (DO) se midió a 595 nm en un espectrofotómetro de microplacas Multiskan SkyHigh de Thermo Fisher. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se definió como la menor concentración del AE y de los compuestos capaz de inhibir el crecimiento planctónico de la bacteria.

Tras la cinética de crecimiento, con el fin de evaluar la concentración mínima bactericida (CMB) del AE, se tomó una alícuota de 100 µL de cada pozo con diferentes diluciones del AE y se incubó en 900 µL de medio líquido BHI a 37 °C durante 24 h. Luego, se extrajo una alícuota de 10 µL y se transfirió a placas de agar BHI para confirmar el efecto bactericida mediante el recuento de colonias viables. El valor de la CMB se determinó como la concentración en la que se inhibió el 99% del crecimiento bacteriano en comparación con el control positivo de crecimiento (sin tratamiento con el AE).

Todos los experimentos se realizaron por triplicado, en tres experimentos independientes.

7.4.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana de componentes principales del AE LOT-II *in vitro* sobre células planctónicas

La evaluación de la actividad antimicrobiana de tres de los componentes mayoritarios del AE LOT-II según la tabla 1 (timol, carvacrol y ρ -cimeno) se determinó mediante el método de microdilución en caldo, con algunas modificaciones (CLSI, 2015).

En una microplaca de 96 pocillos, se prepararon diluciones seriadas de los compuestos en agua peptonada al 0.1%, con concentraciones que oscilaron entre 0.07 mg/mL y 1.5 mg/mL. Posteriormente, se añadió a cada pozo suspensión bacteriana suficiente para obtener una concentración de inóculo final equivalente a 0.5 en la escala de McFarland, lo que corresponde a 10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). El cultivo *in vitro* se incubó a 37 °C con agitación constante a 200 rpm durante 8 h, y la densidad óptica (DO) se midió a 595 nm en un espectrofotómetro de microplacas Multiskan SkyHigh de Thermo Fisher. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se definió como la menor concentración del AE y de los compuestos capaz de inhibir el crecimiento planctónico de la bacteria.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado en experimentos independientes.

7.4.3 Cuantificación de la formación del *biofilm* de *S. aureus* en el tiempo

Para evaluar la formación del *biofilm* a lo largo del tiempo, se empleó el método descrito por O'Toole (2011), con algunas modificaciones.

EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *LIPPIA ORIGANOIDES* SOBRE...

Brevemente, se cultivó *S. aureus* en 3 mL de medio líquido TSB durante la noche. Luego, el cultivo se ajustó a una densidad óptica equivalente a 0.5 en la escala de McFarland y se realizaron diluciones seriadas (1:10 y 1:100) en TSB suplementado con glucosa al 2 % para obtener el inóculo.

Para la formación del *biofilm*, se utilizaron microplacas de 96 pocillos de poliestireno de fondo redondo (debido a que este tipo de formato facilita una mejor distribución y recuperación del inóculo), que fueron incubadas a 37 °C sin agitación durante 4, 12 y 24 horas. Tras cada periodo de incubación, las microplacas se lavaron cuidadosamente tres veces con agua peptonada al 0.1 % para eliminar las células planctónicas. Luego, las células adheridas se tiñeron con cristal violeta al 0.4 % (p/v). Finalmente, el colorante retenido se resuspendió con ácido acético al 30 % (v/v) y la absorbancia a 595 nm se midió en un espectrofotómetro de microplacas Multiskan SkyHigh de Thermo Fisher.

7.4.4 Actividad inhibitoria de la formación del *biofilm* del AE LOT-II

Se determinó la capacidad inhibición de la formación del *biofilm* del AE de LOT-II sobre *S. aureus*. La inhibición de la formación del *biofilm* se determinó como lo describió Martínez *et al.*, (2020) con algunas modificaciones. Se usaron microplacas de poliestireno de 96 pocillos fondo redondo para la formación de *biofilm*. Se realizaron cultivos *overnight* de 3 mL de *S. aureus* en medio TSB. Seguidamente, se realizó una dilución 1:10 en medio TSB suplementado con glucosa al 2%. Se transfirieron 100 µL del inóculo bacteriano a cada pozo que contenía concentraciones subinhibitorias de la CMI₅₀ (sub-CMI que iban desde 50 µg/mL a 150µg/mL) de LOTC II. Se utilizaron 100 µL de inóculo bacteriano y 100 µL de agua peptonada como control de formación de *biofilm*. Las microplacas se incubaron a 37 °C por 24 h.

EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *LIPPIA ORIGANOIDES* SOBRE...

Después del periodo de incubación, las microplacas se lavaron tres veces con agua peptonada para eliminar las células planctónicas y el *biofilm* adherido al pozo se tiñó con cristal violeta 0.4%(p/v) según el procedimiento previamente descrito (O'Toole, 2010) como se mencionó anteriormente. Todos los experimentos se realizaron por triplicado en tres replicas biológicas.

El porcentaje de inhibición se calculó utilizando la siguiente ecuación: Ecuación 1

$$PI = 100 - PF$$
$$PF = \frac{ACP - AM}{ACP}$$

En donde:

PI= Porcentaje de inhibición

PF= Porcentaje de formación

ACP= Absorbancia control positivo

AM= Absorbancia de la muestra

7.4.5 Efecto del aceite esencial sobre la viabilidad celular de células eucariotas

El ensayo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) se realizó en la línea celular VERO para verificar el efecto citotóxico de LOT-II. Las células VERO se cultivaron en medio DMEM, suplementado con suero fetal bovino al 7% y 100 µg/mL de gentamicina (pH 7,4). El cultivo celular se mantuvo a 37 °C y 5% de CO₂. La viabilidad celular se determinó mediante el método descrito por Mosmann (Mosmann, 1983). Con este método, las células viables y metabólicamente activas reducen la sal de tetrazolio (MTT) a cristales de formazán, que son solubles en DMSO, y la absorbancia se mide a 570 nm. Para ello, las células se sembraron en placas de 96 pocillos (7500 células/pocillo) y se incubaron durante 24 h, como se describió anteriormente. Luego, las células se trataron con LOT-II a

50, 75, 90 y 100ug/uL durante 48 h. Los valores de viabilidad celular se expresaron como porcentaje del control (sin aceite esencial).

7.4.6 Actividad antivirulencia

El posible efecto inhibitorio de LOT-II sobre factores de virulencia como la producción de hemolisina y producción de exopolisacarido, se evaluó siguiendo el método reportado en la literatura (Lee et al., 2016; Suárez et al., 2021) respectivamente. Se preparó un cultivo *overnight* de *S. aureus* en caldo TSB a 37 °C y agitación orbital a 200 rpm. Posteriormente se diluyó el cultivo cien veces en caldo TSB suplementado con glucosa al 2% y se sembraron 100 µL en microplacas BRAND de 96 pocillos fondo plano que contenían 100 µL del AE LOT-II en concentraciones sub-CMI. Posteriormente, la microplaca se incubó durante 24 h a 37 °C y se mantuvo en agitación constante a 200 rpm. Los controles positivos se prepararon mezclando 100 µL de cultivo con 100 µL agua peptonada al 0.1%.

7.4.6.1 Hemolisina

Se centrifugó sangre sintética adquirida comercialmente a 4000g durante 4 minutos con el fin de preparar una suspensión de glóbulos rojos al 1% en solución salina tamponada en fosfato (PBS). Para evaluar la hemólisis, se mezclaron 100 µL del sobrenadante del cultivo de *S. aureus* (tratado previamente con concentraciones sub-MIC del AE) en una microplaca, junto con 100 µL de la suspensión de glóbulos rojos. La mezcla se incubó a 37 °C durante 1 hora. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 4,400 × g durante 10 minutos, se recuperó el sobrenadante y, finalmente, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 543 nm.

7.4.6.2 Producción de exopolisacárido

La producción de exopolisacárido se analizó cultivando *S. aureus* en agar rojo Congo. Las placas de agar contenían caldo de infusión de cerebro y corazón (BHI), sacarosa y rojo Congo. Esta prueba se basa en los cambios fenotípicos de las colonias, especialmente en su coloración: las cepas productoras de exopolisacárido forman colonias negras, mientras que las cepas no productoras desarrollan colonias rojas o traslucidas debido a la no retención del colorante. Para el análisis, un cultivo de *S. aureus* previamente tratado con AE LOT-II se sembró con un asa en las placas de agar sólido y se incubó durante la noche (overnight) a 37 °C antes de realizar el registro fotográfico.

7.4.7 Análisis del *biofilm* por microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se utilizó microscopía electrónica de barrido (SEM) para visualizar el efecto del AE LOT-II sobre la morfología y estructura del *biofilm* de *S. aureus*, siguiendo el método descrito por Guillin et al. (Guillín et al., 2021b). La formación del *biofilm* se llevó a cabo en cupones de vidrio esmerilado (1 cm × 1 cm), previamente esterilizados. Para ello, se añadió el inóculo bacteriano diluido 1:10 (~10⁶ UFC/mL) a una microplaca de 16 pozos que contenía los cupones, medio de cultivo TSB suplementado con glucosa y AE LOT-II a concentración sub-CMI de 75 µg/mL.

Los cupones se lavaron tres veces con agua peptonada al 0.1 % (p/v) para eliminar las células planctónicas. Posteriormente, se llevó a cabo el proceso de fijación del *biofilm* con glutaraldehído al 2.5 % durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego, se realizó la deshidratación utilizando diferentes concentraciones de alcohol isopropílico (5-100 %) durante 5 minutos cada una, a temperatura ambiente. Finalmente, los cupones se observaron

en un microscopio electrónico Quanta 650 FEG (FEI, Hillsboro, OR, EE. UU.), equipado con un detector de imágenes Everhart-Thornley (ETD).

7.5 Análisis proteómico

7.5.1 Extracción y cuantificación de proteínas del *biofilm* de *S. aureus*

Con base en la metodología previamente descrita, el *biofilm* de *S. aureus* fue recuperado en 1000 μ L de buffer Tris 20 mM (pH 7.2) mediante la remoción mecánica de las células adheridas al fondo de los pocillos de la placa de cultivo celular.

Esta solución se centrifugó a 10 000 g durante 10 minutos a 4 °C, seguido de tres lavados adicionales con buffer Tris. A continuación, al pellet obtenido se le añadieron 200 μ L de buffer de lisis 1 (Tris 40 mM, PMSF 1 mM, EDTA 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM y lisozima 1 mg/mL), incubándose durante 15 minutos a 37 °C.

Posteriormente, se agregaron 100 μ L de buffer de lisis 2 (Urea 9 M, Tiourea 2 M, DTT 100 mM, Tris 40 mM, PMSF 1 mM, EDTA 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, CHAPS 4 %, anfolitos 1 %). Seguido de esto, se realizó ruptura mecánica por sonicación en pulsos de 5 s y amplitud del 40%.

Luego, las proteínas se precipitaron con acetona: TCA overnight. Finalmente, la muestra se centrifugó a 18 000 g durante 10 minutos a 4 °C. El pellet obtenido se resuspendió en buffer de lisis 2 y la concentración de proteínas se cuantificó mediante el método de Bradford (1976), utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar, con buffer de lisis como blanco y medio de dilución.

7.5.2 Electroforesis bidimensional

Se uso la técnica de electroforesis de proteínas en dos dimensiones 2DE descrita por (O'farrells, 1975); para el análisis de proteínas obtenidas del *biofilm* de *S. aureus* tratado con el LOT-II y control.

En la primera dimensión, las proteínas fueron separadas por punto isoeléctrico en tiras de gradiente inmovilizado (IPG) de pH 3 a 7 no lineales de 7 cm. Brevemente, 250mg de proteína fueron cargados en las tiras de IPG en proporción 1:1 con buffer de rehidratación (Urea 8 M, CHAPS 2 %, DTT 50 Mm, Anfólitos 0.2 % y Azul de bromofenol 0.1 %) durante 12 a 14 h. Posteriormente, las tiras fueron colocadas en el equipo PROTEAN® i12™ IEF de Biorad utilizando un voltaje final de 15000 V/h. Seguido a esto, se realizó un paso de equilibración mediante un proceso de reducción-alkilación en un buffer que contiene Urea 6 M, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, SDS 2 %, Glicerol 20 % y DTT 2 %.

Parala segunda dimensión, las proteínas se separaron según su peso molecular. Se realizo un gel SDS-PAGE en una cámara electroforética a 150 V y se usó buffer de corrida (Glicina 1.44 %, Tris-base 0.2 %, SDS 0.1 %) para la migración de las proteínas. Finalmente, los geles se fijaron en una solución de Metanol 50 % y Ácido fosfórico 2 % y se realizó tinción de los geles con azul de Coomassie G-250 en una solución con metanol. Los geles se almacenaron en una solución decolorante débil (Metanol 5 % y Ácido acético 10 %). Cada experimento se realizó por triplicado.

7.5.3 Análisis de imágenes

Los geles obtenidos fueron registrados empleando un Documentador de geles Gel Doc XR+ System (Bio-Rad). Los spots se detectaron utilizando el software PDQuest 2D (Bio-Rad). Se

realizó la exploración de los datos y se aplicó Student test para comparar los spots de cada grupo (tratados y sin tratar) y determinar si existen diferencias significativas.

7.5.4 Identificación de proteínas por MALDI-TOF

Los spots de interés fueron cortados del gel y desteñidos con 50 % de ACN y bicarbonato de amonio 50 mM. Cada pieza seca se rehidrató con tripsina a una concentración de 13 ng/ μ L en bicarbonato de amonio 50 mM y se incubó durante 17 horas.

Los péptidos tripsinizados se extrajeron del gel utilizando un buffer de extracción (50 % de ACN en 1 % de TFA) y se sonicaron en baño ultrasónico durante 15 minutos. Luego, los péptidos se mezclaron con la solución de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (20 mg/mL en buffer: 50 % de ACN en 1 % de TFA, Sigma-Aldrich) y se aplicaron sobre un porta muestras de acero (ground steel target) en proporción 1:1 (muestra: matriz).

Las digestiones trípticas se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF Ultraflextreme (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania), operado con el software FlexControl v.3.3 y equipado con un láser Nd:YAG de 355 nm. Los espectros de masas se adquirieron en modo reflectrón positivo y se promediaron a partir de aproximadamente 1000 disparos de láser.

Como calibrante externo, se utilizó una digestión tríptica carbamidometilada de albúmina de suero bovino (BSA, fracción V, Merck), siguiendo el protocolo del fabricante. Los espectros de masas obtenidos se enviaron al motor de búsqueda Mascot (www.matrixscience.com) y se compararon con la base de datos Swiss-Prot, aplicando el filtro de taxonomía "Firmicutes" para SARM (Dave et al., 2011).

La identificación de proteínas se realizó con base en una puntuación MASCOT estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Este sistema de puntuación se basa en el cálculo de la probabilidad de que el emparejamiento entre los datos experimentales y una entrada en la base de datos ocurra por azar, de manera similar a los algoritmos de búsqueda de secuencias por homología descritos por Perkins et al., 1999.

7.5.5 Análisis bioinformático

Se utilizó el software STRING (<https://string-db.org>) que facilita la construcción de una red de interacciones predictiva (interactoma), lo que permite evaluar las funciones y rutas biológicas altamente representadas asociadas con la lista de proteínas diferenciales. Además, analiza las proteínas diferencialmente expresadas y las clasifica de acuerdo con sus términos de ontología génica (GO). Entre los términos GO más comunes se encuentran: proceso celular, procesos metabólicos, localización y respuesta a estímulos (Smith et al., 2003)

7.6 Docking molecular

La estructura tridimensional de algunas proteínas fue obtenida de las bases de datos PDB (Protein Data Bank- <https://www.rcsb.org/>) y de las que no se encontró su estructura en la base de datos fueron predichas en línea en Alpha Fold 2.0 (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>).

Las estructuras de las proteínas fueron preparadas empleando la herramienta Protein preparation wizard en la interfaz de maestro (Madhavi Sastry et al., 2013) para arreglar los estados de protonación de los residuos aminoacídicos, añadir hidrógenos y también corregir los átomos de las cadenas laterales.

Todas las estructuras químicas de los ligandos o compuestos del LOT-II-II fueron obtenidos de la base de datos PUBCHEM y preparados empleando la función Ligprep (Friesner et al., 2004) para generar su conformación tridimensional, ajustar el estado de protonación a pH fisiológico (7.4), y calcular las cargas atómicas parciales, con un campo de fuerza OPLS3e (Roos et al., 2019)

Los ensayos de docking con los ligandos ya preparados fueron realizados empleando Glide (Friesner et al., 2004; Halgren et al., 2004) (Glide V7.7), seguido de un paso de minimización de la energía de las cadenas laterales usando Prime (Madhavi Sastry et al., 2013). Los ligandos fueron dockeados dentro de una cuadrícula de 20 Å desde el centro del ligando generando 5 poses por ligandos. Luego se realizó un refinamiento de los complejos proteína-ligando, usando Prime mediante su configuración estándar. Dentro de este paso se minimizaron todas las cadenas laterales dentro de 6 Å de cada pose del ligando acoplado.

7.7 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 $p < 0.05$.

8 Resultados

8.1 Evaluación de la actividad Biológica

8.1.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Lippia origanoides* quimiotipo timol (LOT-II-) *in vitro* sobre células planctónicas

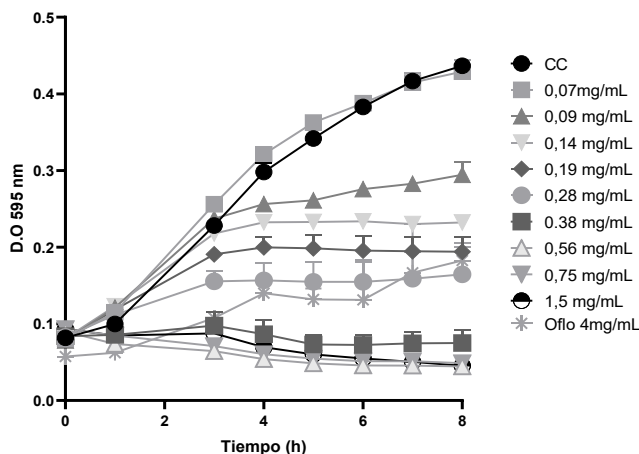
La Concentración Mínima Inhibitoria capaz de inhibir el 50% (CMI₅₀) y 90%(CMI₉₀) de la población bacteriana y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del AE son medidas de referencia para comparar la efectividad de un compuesto antimicrobiano.

La CMI₅₀ de 0.09 mg/mL, CMI₉₀ de 0.56mg/mL y CMB de 1.5mg/mL se pueden observar en la tabla 2. En la figura 2 se puede observar la cinética de crecimiento de *S. aureus* a diferentes concentraciones del AE.

Tabla 2 Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida del LOT-II- II frente *S. aureus*. Los valores están expresados en mg/mL y cada experimento fue llevado a cabo por triplicado

	CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMB
LOT II	0.09	0.56	1.5

Figura 2 . Efecto de inhibición del AE LOT-II sobre el crecimiento de *S. aureus* ATCC 43300. La inhibición del crecimiento se presenta como la media \pm DE de la absorbancia medida a 595 nm con respecto al control de crecimiento bacteriano(cc).



8.1.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Lippia origanoides* quimiotipo timol (LOT-II-), timol, p- cimeno y carvacrol *in vitro* sobre células planctónicas

El aceite esencial de *Lippia origanoides* quimiotipo timol (LOT-II) se caracteriza por una composición química dominada por tres compuestos mayoritarios: timol, *p*-cimeno y carvacrol (Tabla 1).

Con el fin de evaluar el efecto individual de estos tres componentes principales sobre *S. aureus*, se analizó la cinética de crecimiento bacteriano, empleando cada compuesto en la misma concentración en la que se encuentra presente en el aceite esencial.

Se evidencia que el timol (figura 3), el *p*-cimeno (figura 4) y el carvacrol (figura 5) no presentan efecto inhibitorio significativo sobre la curva de crecimiento del microorganismo, lo cual sugiere que su acción individual no es suficiente para afectar el desarrollo de las células planctónicas de *S. aureus* bajo las condiciones evaluadas.

Figura 3 Efecto de inhibición de Timol sobre el crecimiento de *S. aureus* ATCC 43300la inhibición del crecimiento se presenta como la media \pm DE de la absorbancia medida a 595 nm con respecto al control de crecimiento bacteriano(cc).

EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *LIPPIA ORIGANOIDES* SOBRE...

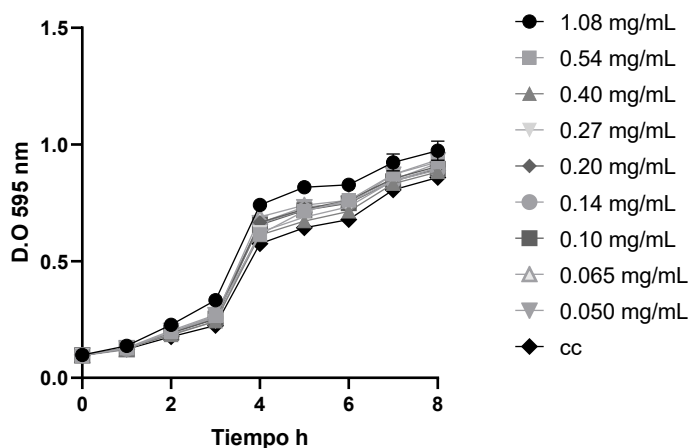


Figura 4. Efecto de inhibición de P-cimeno sobre el crecimiento de *S. aureus* ATCC 43300. La inhibición del crecimiento se presenta como la media \pm DE de la absorbancia medida a 595 nm con respecto al control de crecimiento bacteriano(cc).

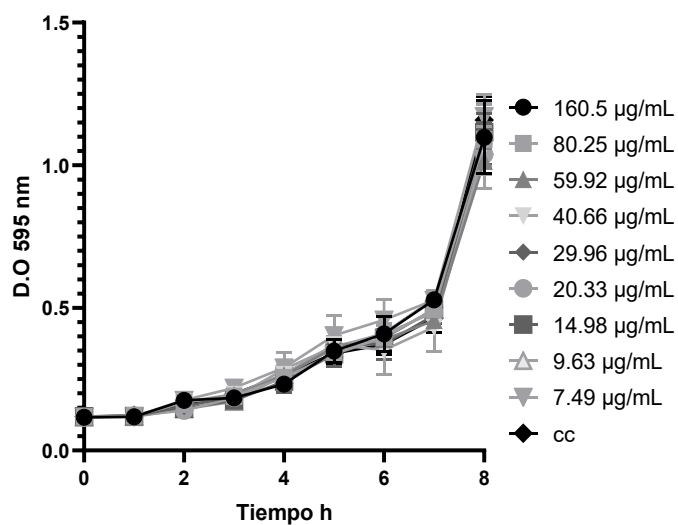
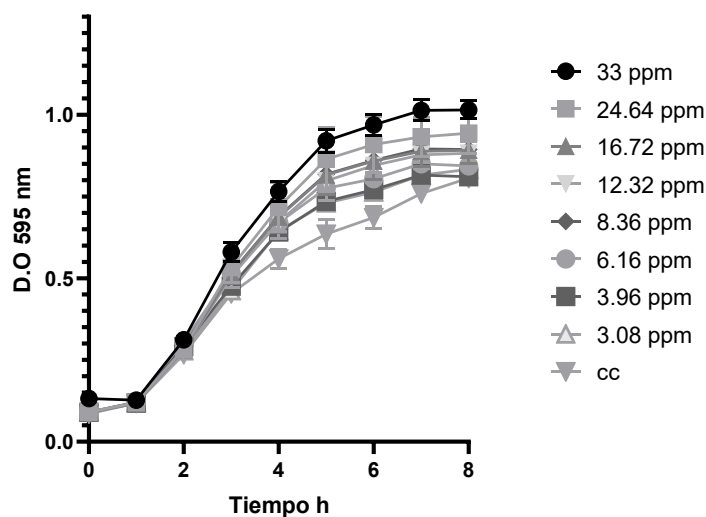


Figura 5. Efecto de inhibición de carvacrol sobre el crecimiento de *S. aureus* ATCC 43300.

La inhibición del crecimiento se presenta como la media \pm DE de la absorbancia medida a 595 nm con respecto al control de crecimiento bacteriano(cc).

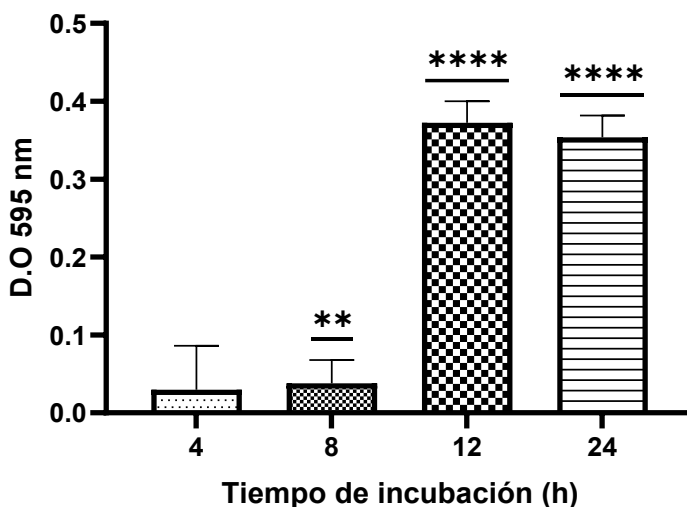


8.1.3 Cuantificación de la formación del *biofilm* de *S. aureus* en el tiempo

Con el objetivo de determinar el tiempo óptimo de incubación para obtener una biomasa significativa de *biofilm* de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, se evaluó su formación en microplacas de poliestireno a las 4, 8, 12 y 24 horas de incubación. Los resultados mostraron un aumento progresivo en la densidad óptica (DO) a medida que se prolongaba el tiempo de incubación. Si bien se evidenció formación inicial de *biofilm* a las 4 y 8 horas, esta fue considerablemente menor en comparación con la observada a las 12 y 24 horas, donde se registraron valores significativamente mayores de biomasa (Figura 6).

No obstante, entre las 12 y 24 horas no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de DO, por lo que se seleccionó el tiempo de 12 horas como condición óptima para los experimentos posteriores de esta investigación.

Figura 6 Formación del biofilm de *S. aureus* resistente a la meticilina ATCC 43300 en diferentes tiempos de incubación. La cuantificación de la biomasa se presenta como la media \pm DE de la absorbancia medida a 595 nm con respecto al control de crecimiento bacteriano (* $p < 0.001$).

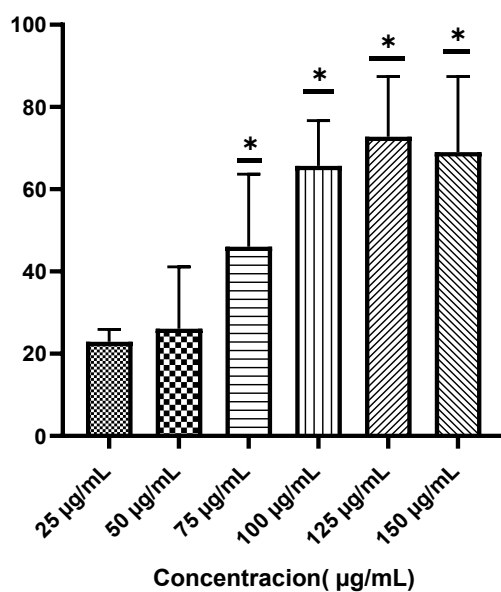


8.1.4 Evaluación de la actividad *anti-biofilm* del LOT-II y cuantificación de la viabilidad celular de las células planctónicas

Se evaluó el efecto del AE LOT-II sobre la formación del *biofilm* por medio de actividad *antibiofilm*. Las concentraciones de AE evaluadas, dependieron de la CMI₅₀ frente a las células planctónicas, encontrada previamente (tabla 2). Concentraciones subinhibitorias (25 μ g/mL – 150 μ g/mL) fueron utilizadas para evaluar el efecto de AE LOT-II en la formación de *biofilm* sin eliminar el crecimiento bacteriano. Se encontró que a una concentración de 50 y 75 μ g/mL de LOT-II se inhibe el 25 y 50% aproximadamente, de la formación del *biofilm* de *S. aureus* (figura 7), lo cual es importante para la búsqueda de cambios a nivel proteómico ya que esta concentración representa el punto en el cual el compuesto inhibe el crecimiento del 50% de la población bacteriana, siendo particularmente

útil ya que permite observar efectos sobre rutas metabólicas y proteínas sin inducir muerte celular masiva.

Figura 7 Porcentaje de inhibición de diferentes contracciones sub-CMI de LOT-II sobre la formación del biofilm de *S. aureus* ATCC 43300. El porcentaje de inhibición se presenta como la media \pm DE de la absorbancia medida a 595 nm con respecto al control de crecimiento bacteriano.



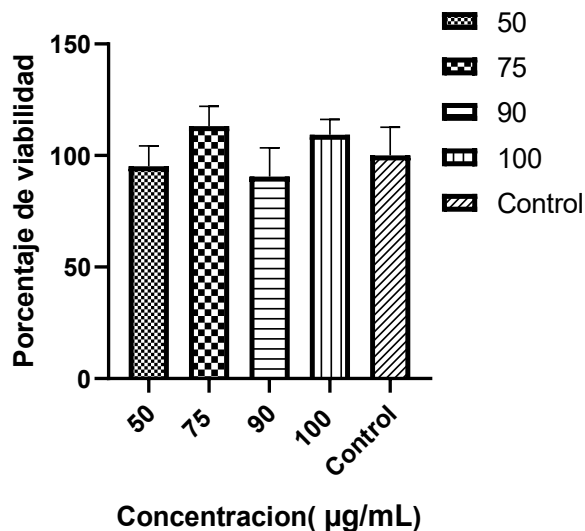
8.1.5 Efecto del aceite esencial sobre la viabilidad celular de células eucariotas

Para evaluar la citotoxicidad *in vitro* del AE LOT-II, se utilizó la línea celular VERO, derivada de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*), la cual es ampliamente empleada en la literatura científica como modelo de células “normales” no tumorales,

permitiendo analizar la toxicidad de compuestos en células no transformadas (Dos Santos Correa et al., 2018; Sangour et al., 2021).

En la figura 8, podemos observar que las concentraciones sub-CMI evaluadas del AE no presentan una diferencia estadística significativa en comparación con el control.

Figura 8 Citotoxicidad sobre la línea celular VERO. Las células fueron incubadas con AE LOT-II en sub-MIC desde de 50 hasta 100 $\mu\text{g/mL}$. El control de viabilidad fueron células sin tratamiento. $P > 0.05$ en comparación con el control.



8.1.6 Actividad antivirulencia

La actividad antivirulencia, definida como la capacidad de suprimir mecanismos específicos que contribuyen a la patogenicidad sin ejercer presión selectiva antimicrobiana, fue evaluada mediante ensayos fenotípicos enfocados en dos factores clave de virulencia: la actividad hemolítica y la producción de exopolisacáridos asociados a *biofilm*.

8.1.6.1 Hemolisina

S. aureus es capaz de producir toxinas causantes de hemolisis denominadas hemolisinas, que contribuye a la formación de *biofilm*. Se evaluó el efecto del AE LOT-II en la producción de hemolisinas por *S. aureus*, evidenciando que el AE LOT-II redujo la producción de hemolisinas libre de *S. aureus* ATCC 43300 en un 29% y un 32 % a concentraciones de 75 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (tabla 3).

Tabla 3 Inhibición de la producción de hemolisina de *S. aureus* ATCC 43300 en tratamiento con el AE LOT-II

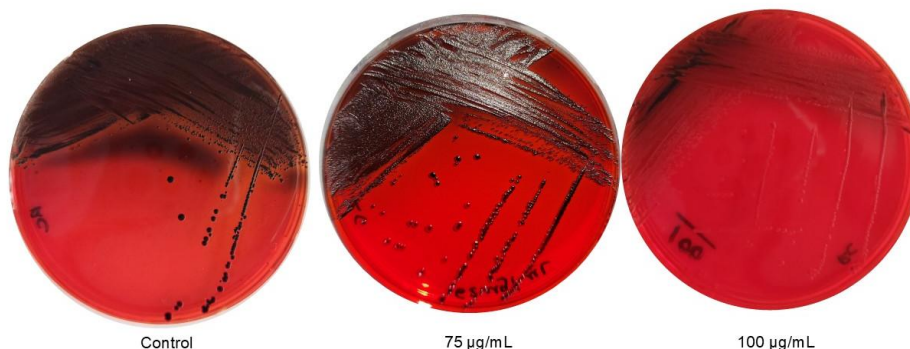
Concentración ($\mu\text{g/ mL}$)	Porcentaje de inhibición producción de la hemolisina
50	21 0.02
75	29 \pm 0.04
90	32 \pm 0.05
100	32 \pm 0.04

\pm Desviación estándar

8.1.6.2 Producción de exopolisacárido

Por otro lado, se evaluó la producción de exopolisacárido en *S. aureus* por medio de la metodología de rojo Congo. En donde las cepas productoras de exopolisacárido forman colonias negras en el agar, mientras que las cepas no productoras desarrollan colonias rojas. En la figura 9 podemos observar, que *S. aureus* ATCC 43300 en tratamiento con el A LOT-II a una concentración de 75 $\mu\text{g/mL}$, sus colonias no son totalmente negras y presentan coloración roja en sus bordes, y a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ son casi en su totalidad rojas en comparación con el control (figura 9).

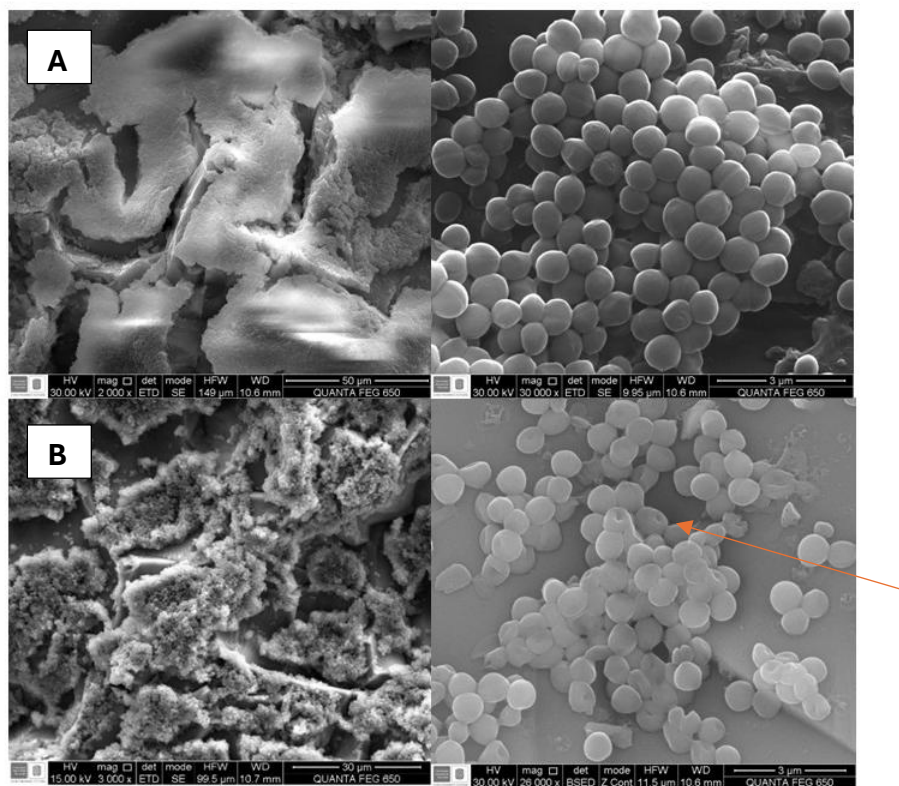
Figura 9 Inhibición de la producción de exopolisacárido por AE LOT-II, la cual se analizó utilizando placas de agar rojo Congo.



8.1.7 Análisis del *biofilm* por microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se evaluó el efecto del AE sobre la morfología de *S. aureus* por SEM. En la figura 10a se pueden observar las micrografías del *biofilm* antes y después del tratamiento con AE LOT-II, en donde podemos observar microorganismos con forma cocoide, estructuras de adhesión, densidad celular y la integridad de la membrana de *S. aureus*. Por otra parte, las bacterias tratadas con AE LOT-II presentaron una disminución de la matriz de exopolisacárido, poca uniformidad y morfología variable (10b).

Figura 10 Micrografías SEM del efecto del LOT-II sobre la morfología y estructura del biofilm después de 24 h de cultivo: (A) Biofilm de *S. aureus* ATCC 43300 sin tratamiento; (B) Biofilm de *S. aureus* tratado con LOT-II.



8.2 Análisis proteómico

8.2.1 Electroforesis bidimensional e Identificación de proteínas por MALDI-TOF

Con el fin de evaluar el efecto que tiene el AE LOT-II, sobre las proteínas involucradas en la formación del *biofilm* de *S. aureus* se extrajo proteína y se analizó la expresión diferencial en presencia y ausencia del AE, a través de electroforesis bidimensional 2D.

A continuación, se presenta el perfil proteico bidimensional obtenido de las proteínas solubles del *biofilm* de *S. aureus*. En la Figura 8 y 9 se presentan dos geles bidimensionales representativos de las proteínas solubles del control y proteínas solubles obtenidos para el tratamiento usando una concentración de 75 μ g/mL del AE LOT-II. Se observa que los “spots” se distribuyen verticalmente en un rango de peso molecular que va desde los 85 kDa hasta el

borde inferior con valores por debajo de los 10 kDa. De forma horizontal se distribuyen en un rango de pI desde 3 hasta 10. Con el software PDQuest se detectaron los spots que posteriormente se analizaron por espectrometría de masas. Se encontró que 15 spots expresados de manera diferencial ($p < 0,05$, cambio de 2x o 0.5x): 6 spots disminuyeron su expresión y 9 spots aumentaron o sobreexpresaron su expresión (figura 11 y 12). Sus posibles identidades se relacionan en la tabla 4.

Adicionalmente, a modo de ejemplo en la figura 13 se presenta la densitometría de las proteínas con código SSP H22 e I8 (que posteriormente fueron identificadas: PurA e mulT), que son representativas de puntos en 3D en el software PdQuest Advanced v8.0. A. Estas presentaron una disminución en su expresión diferencial antes y después del tratamiento con el AE LOT-II.

Figura 11 Gel de electroforesis en 2D correspondiente al control del biofilm de *S. aureus* ATCC 43300.

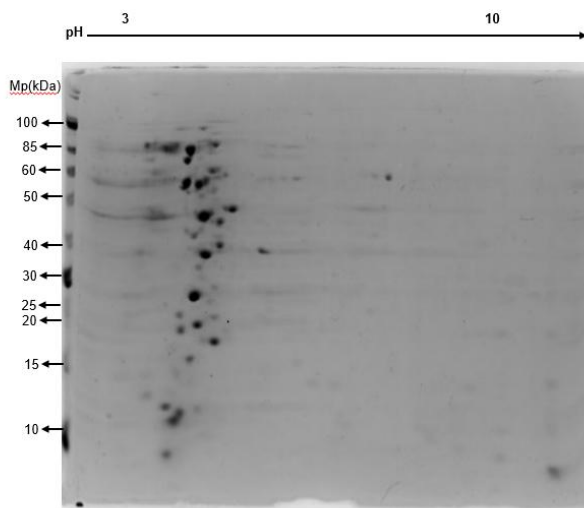


Figura 12 . Gel de electroforesis en 2D correspondiente al tratamiento con LOT-II a 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (BIC50) del biofilm de *S. aureus* ATCC 43300.

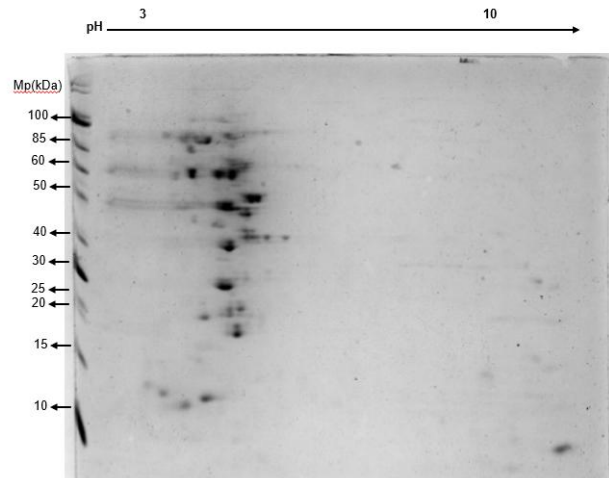


Figura 13 Ejemplo de vista representativa de puntos en 3D de las proteínas *mulT* y *purA* con expresión diferencial del biofilm de *S. aureus* antes y después del tratamiento con LOT-II el software PdQuest Advanced v8.0. A.

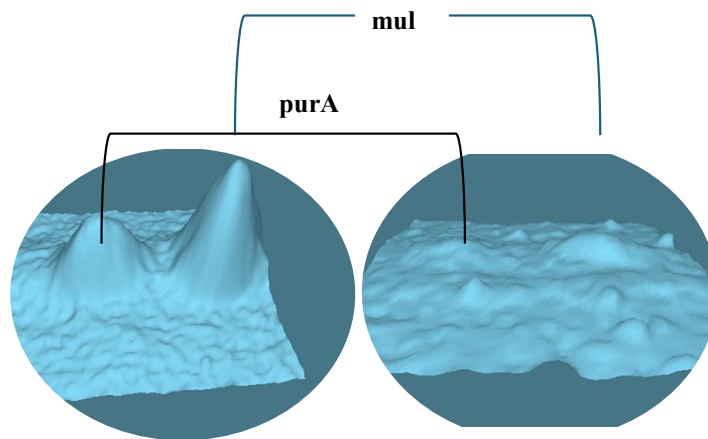


Tabla 4 Proteínas expresadas diferencialmente del biofilm de *S. aureus* ATCC 43300 antes y después del tratamiento con el AE LOT-II identificadas mediante “MASCOT Peptide Mass Fingerprint” a partir de su huella peptídica obtenida del análisis MALDI-TOF

SSP	Proteína	Función	Expresión	Score	Peso molecular (da)	Punto isoeléctrico
H2	argB (Acetilglutamato quinasa)	Biosíntesis de la arginina, catalizando la fosforilación del N-acetilglutamato en el ciclo de la urea y otras rutas relacionadas con el metabolismo del nitrógeno.	Sobreexpresada	42	33778	5.94
H3	thiC (Fosfometilpirimidina sintas)	Participa en la biosíntesis de la tiamina (vitamina B1), catalizando una etapa clave en la formación del anillo de pirimidina fosforilado	Sobreexpresada	38	48976	6.8
H5	pyrF (Orotidina 5'-fosfato descarboxilasa)	Cataliza la conversión de orotidina 5'-fosfato (OMP) en uridina monofosfato (UMP), un paso esencial en la biosíntesis de las pirimidinas, que son componentes fundamentales del ADN y ARN	Sobreexpresada	36	25285	5.85
H7	R16 (Proteína ribosomal de la subunidad 50S, rplF)	Esta proteína forma parte de la subunidad grande (50S) del ribosoma bacteriano y es	Sobreexpresada	42	19727	9.83

EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *LIPPIA ORIGANOIDES* SOBRE...

		esencial para la síntesis de proteínas.				
H15	G6PI (Isomerasa de glucosa-6-fosfato)	Esta enzima cataliza la conversión reversible de glucosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato en la vía glucolítica y en la gluconeogénesis.	Sobreexpresada	28	49816	4.96
H16	PurL (Subunidad PurL de la sintetasa de fosforribosilformilglicinamida)	Forma parte del complejo enzimático involucrado en la biosíntesis de purinas, participando en la formación de intermediarios necesarios para la síntesis del nucleótido inosina monofosfato (IMP).	Disminuida	33	79912	4.78
H18	mnhG2 (Subunidad putativa de antiportador)	Proteína de membrana Na ⁺ /H ⁺ antiporter Mnh2 subunit G	Sobreexpresada	30	16336	9.79
H19	pstB (Proteína de unión a ATP para la importación de fosfato)	Parte del complejo transportador ABC, involucrado acoplamiento energético. Permite la entrada de fosfato al interior celular utilizando energía derivada de la hidrólisis de ATP	Sobreexpresada	40	28183	6.85
H20	glyA (Hidroximetiltransferasa de serina)	Cataliza la conversión reversible de serina y tetrahidrofolato en glicina y 5,10-	Sobreexpresada	33	45460	5.83

EFEECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *LIPPIA ORIGANOIDES* SOBRE...

		metilentetrahidrofolato, siendo importante en el metabolismo de un carbono y la biosíntesis de nucleótidos y aminoácidos.				
H21	mnhG (Enzima MnmG de modificación de la uridina 5-carboximetilaminometilo del ARNt)	Esta enzima está involucrada en la modificación química de nucleótidos específicos en el ARN de transferencia (ARNt), lo cual es crucial para la precisión y eficiencia en la traducción genética.	Sobreexpresada	33	69933	5.25
H22	mulT (Proteína de reparación de desajustes del ADN)	Interviene en la reparación de desajustes en el ADN.	Disminuida	39	71033	6.03
I3	deoC (Aldolasa de desoxirribosa-fosfato)	Cataliza una reacción aldólica reversible entre acetaldehído CC y D-gliceraldehído 3-fosfato para generar 2-desoxi-D-ribosa 5-fosfato	Disminuida	40	23173	5.17
I6	gtlA (Cadena grande del glutamato sintasa [NADPH] (gltB)	Biosíntesis de aminoácidos; Esta enzima participa en la síntesis de glutamato a partir de glutamina y α -cetoglutarato, utilizando NADPH como cofactor reductor. La subunidad grande (gltB) forma parte del complejo enzimático	Disminuida	36	169237	5.55

EFEECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *LIPPIA ORIGANOIDES* SOBRE...

		junto con la subunidad pequeña (gltD).				
I7	CobT(Fosforribosiltransferasa de nicotinato-nucleótido-dimetilbenzimidazol)	Participa en la biosíntesis de la coenzima B12 (cobalamina), catalizando la transferencia de un grupo fosforribosilo desde el nicotinato-nucleótido al dimetilbenzimidazol	Disminuida	37	37729	5.33
I8	purA (Sintetasa de adenilosuccinato)	Cataliza un paso clave en la biosíntesis de purinas, específicamente la conversión de inosina monofosfato (IMP) en adenilosuccinato, que luego se transforma en adenosina monofosfato (AMP), un nucleótido esencial para la síntesis de ADN y ARN.	Disminuida	36	47692	5.70
I9	pdxT (Subunidad de la sintasa de fosfato de piridoxal 5')	Biosíntesis de aminoácidos Cataliza la hidrólisis de glutamina a glutamato y amoníaco como parte de la biosíntesis de piridoxal 5'-fosfato.	Disminuida	36	21264	5.10

SC= Score; PM= Peso Molecular; PI= Punto Isoeléctrico

8.2.2 Análisis bioinformático

Con el objetivo de explorar las funciones y relaciones biológicas entre las proteínas expresadas diferencialmente en el biofilm de *S. aureus* tras el tratamiento con el AE LOT-II (75 µg/mL durante 12 horas), se realizó un análisis bioinformático utilizando la herramienta en línea STRING (<https://string-db.org/>).

Primero, se ingresó el listado de proteínas diferencialmente expresadas en STRING, lo que permitió construir un interactoma (Figura 14). Este interactoma representa posibles asociaciones funcionales entre las proteínas, basadas en distintas fuentes de evidencia como coexpresión, interacción física, anotaciones funcionales compartidas, entre otras.

El interactoma generado revela una red de interacciones funcionales entre las proteínas diferencialmente expresadas durante la formación del biofilm de *S. aureus* tratadas con el AE LOT-II. Se pueden distinguir al menos dos grupos funcionales relevantes:

Grupo 1 (destacado en azul) agrupa proteínas como DeoC, Pgi, RplF, PstB, PurA, PurL, GlyA, entre otras, que están asociadas a procesos de metabolismo central y biosíntesis de nucleótidos, rutas cruciales para la proliferación y mantenimiento estructural del *biofilm*. La conectividad entre estas proteínas sugiere una activación coordinada de rutas biosintéticas y energéticas ante el estrés inducido por el tratamiento.

Por otro lado, en el Grupo 2 (marcado en naranja), se encuentran proteínas como MnmG y mutL, asociadas con procesos de reparación del ADN y modificación de ARN de transferencia (tRNA). La expresión diferencial de estas proteínas podría indicar la activación de mecanismos de respuesta al daño genético o estrés oxidativo como consecuencia del tratamiento con el AE.

Asimismo, se realizó un análisis de enriquecimiento de ontología génica (Gene Ontology, GO), cuyos resultados se presentan en la Figura 15.

Cada burbuja representa un término GO significativamente enriquecido. En los resultados, se observa que un 60–65% de las proteínas están asociadas con procesos de biosíntesis de nucleótidos, lo cual sugiere un posible aumento en la demanda de síntesis de ADN/ARN como mecanismo de adaptación. Por otro lado, un menor porcentaje (cerca del 40%) se asocia con el metabolismo del nitrógeno, lo que podría indicar una represión relativa de estas rutas bajo las condiciones de estrés inducidas por el tratamiento con AE LOT-II. Esta redistribución funcional puede reflejar una estrategia de la bacteria para conservar recursos o redirigir su metabolismo hacia rutas más esenciales para su supervivencia.

Figura 14 Interactoma de las proteínas identificadas que se expresaron diferencialmente en el proceso de formación del biofilm de *S. aureus* al ser tratadas con el AE LOT-II, construido por STRING v10.0. usando como modelo proteínas reportadas para *S. aureus*, mostrando la relación de acuerdo con el nivel de confianza establecido por STRING. En la red predicha, las proteínas son representadas como nodos y líneas que agrupan las proteínas según su función.

EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *LIPPIA ORIGANOIDES* SOBRE...

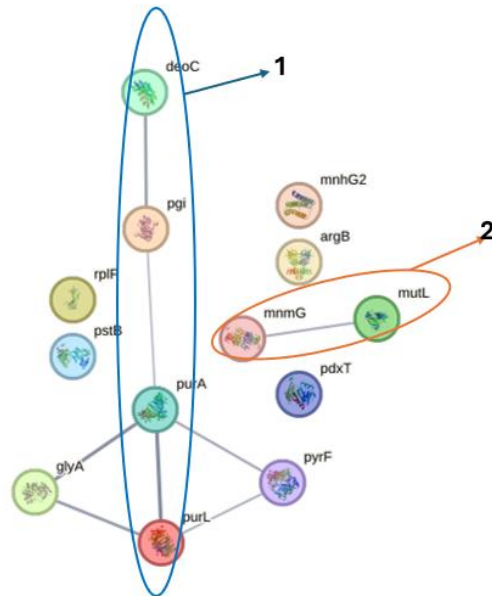
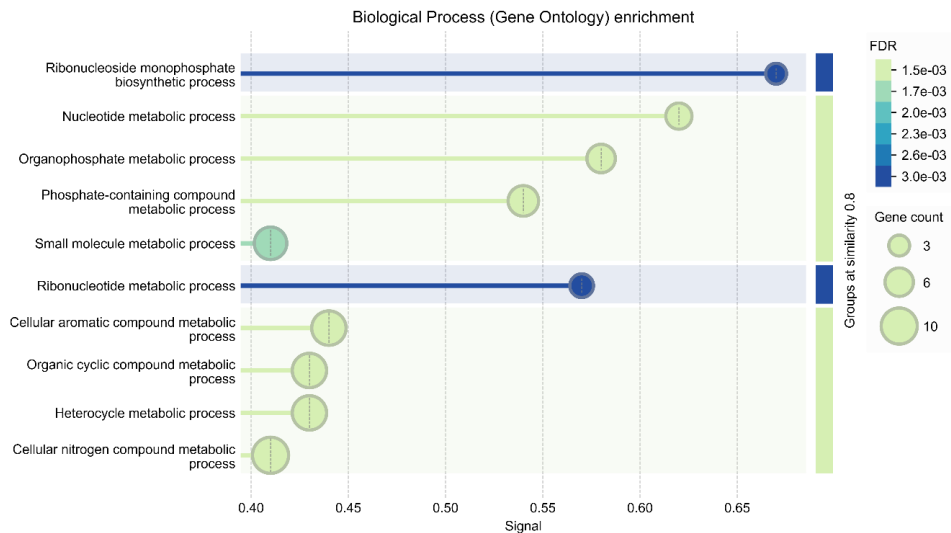


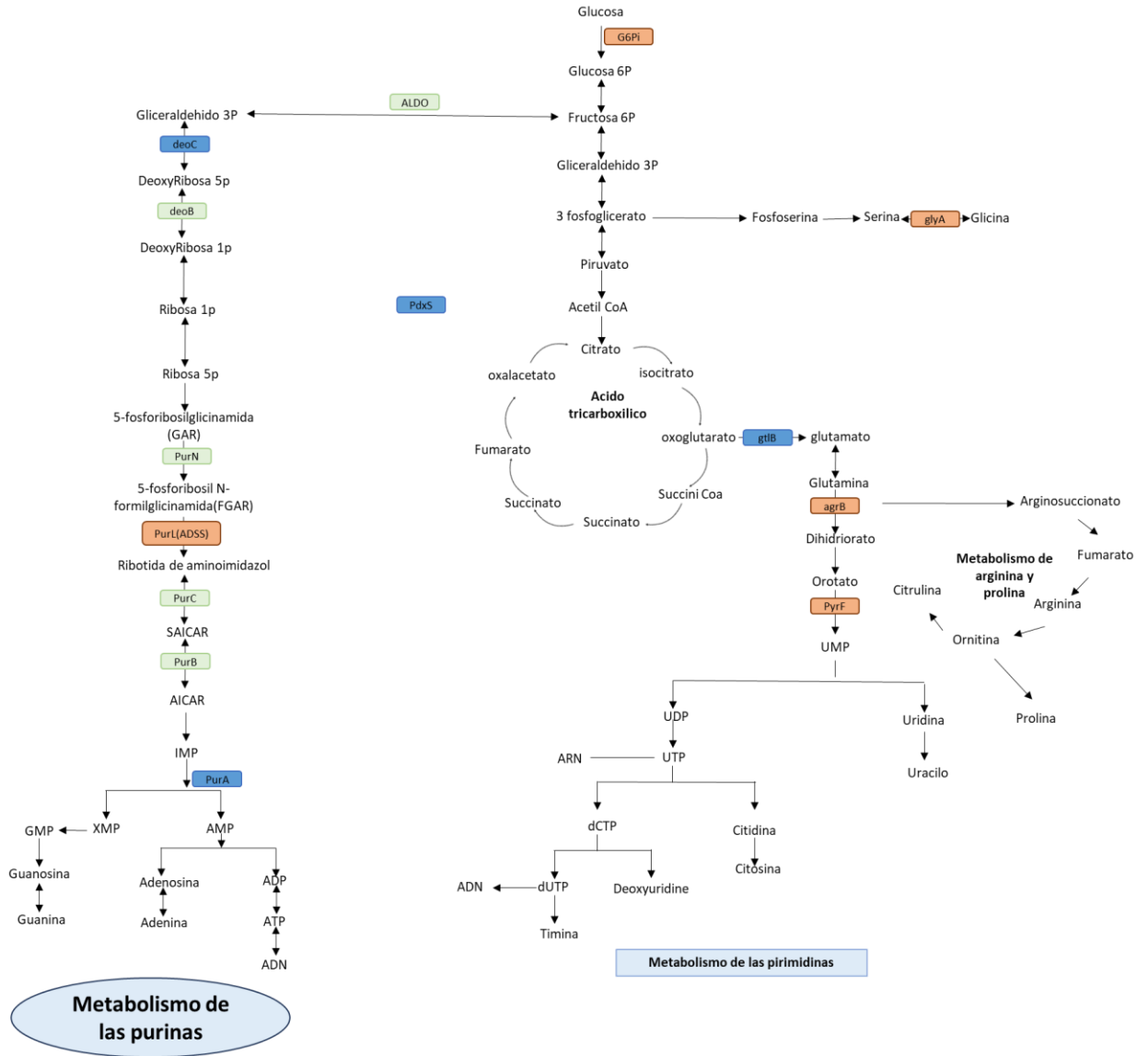
Figura 15 Categorías funcionales de las proteínas expresadas diferencialmente por *S. aureus* al ser tratadas con el AE LOT-II, clasificadas por el software string. El tamaño de cada burbuja representa el número de proteínas asociadas a cada término (Gene count) y el el color representa el valor de FDR (False Discovery Rate).



Finalmente, con base en la información obtenida del análisis de ontología génica y del interactoma, se reconstruyó una ruta metabólica integrada que agrupa las proteínas diferencialmente expresadas durante el tratamiento con el AE LOT-II (Figura 14). En esta representación se destacan rutas clave del metabolismo de las purinas y las pirimidinas, evidenciando una posible reprogramación metabólica como respuesta adaptativa de *S. aureus* al tratamiento. Las proteínas marcadas en naranja corresponden a aquellas que mostraron un aumento en su expresión, mientras que las señaladas en azul se encuentran disminuida su expresión. En particular, se observa una sobreexpresión de proteínas clave como *glyA*, *agrB* y *pyrF*, asociadas al metabolismo de nucleótidos y posiblemente involucradas en procesos de replicación y respuesta al estrés. En contraste, proteínas como *deoC*, *purA* y *gtfB* presentan una disminución en su expresión, lo que sugiere una inhibición parcial de rutas de síntesis de purinas y funciones reguladoras asociadas. Esta reorganización metabólica podría reflejar un intento de la bacteria por mantener la homeostasis energética bajo condiciones adversas, reforzando la hipótesis de que el AE LOT-II interfiere con rutas metabólicas esenciales para la formación del *biofilm*.

Figura 16 Ruta general de las proteínas expresadas diferencialmente afectadas por el AE LOT-II sobre la formación del biofilm de *S. aureus*.

EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *LIPPIA ORIGANOIDES* SOBRE...



8.3 Docking molecular

Para explorar las posibles interacciones moleculares entre los principales compuestos del AE LOT-II y las proteínas diferencialmente expresadas en *S. aureus*, se realizó un análisis de acoplamiento molecular (docking). En la Tabla 5 se presentan los valores de docking score para cada interacción proteína-compuesto, donde valores más negativos indican una mayor afinidad de unión. Se destaca que Carvacrol, el tercer componente mayoritario (4.4%) del

EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *LIPPIA ORIGANOIDES* SOBRE...

AE, mostró una alta afinidad por proteínas clave como PurA (-6.129) y glutamato sintetasa (-5.008), ambas implicadas en rutas esenciales del metabolismo de nucleótidos. Otros compuestos como Timol, componente mayoritario (72.3%) y el Óxido de cariofileno(1%) también presentaron interacciones relevantes, aunque con valores de docking score ligeramente menores. Estos resultados sugieren que los componentes del AE LOT-II podrían interferir directamente en procesos esenciales como la síntesis de purinas y pirimidinas, la respuesta al estrés oxidativo y el metabolismo del nitrógeno, lo cual concuerda con las vías identificadas en el análisis ontológico (Figura 12) y en la ruta metabólica integrada (Figura 13)

Tabla 5 . Docking score ligandos presentes en LOT-II y proteínas expresadas diferencialmente del biofilm de *S. aureus* ATCC 43300

proteína	Compuesto	Docking score
purA (Sintetasa de adenilosuccinato)	Carvacrol	-6.129
	timol	-5.762
argB (Acetilglutamato quinasa)	Carvacrol	-4.099
	oxideariofileno	-3.321
R16 (Proteína ribosomal de la subunidad 50S, rplF)	Carvacrol	-3.298
	timol	-2.817
deoC (Aldolasa de desoxirribosa-fosfato)	Carvacrol	-4.546
	timol	-3.8
G6PI (Isomerasa de glucosa-6-fosfato)	timol	-3.462
	oxideariofileno	-3.288
gtlA (Cadena grande del glutamato sintasa [NADPH] (gltB))	Carvacrol	-5.008
	timol	-3.246
glyA	Carvacrol	-4.231

EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *LIPPIA ORIGANOIDES* SOBRE...

(Hidroximetiltransferasa de serina)	timol	-4.005
mnhG2 (Subunidad putativa de antiportador mnhG2)	timol	-4.008
	Carvacrol	-3.951
mulT (Proteína de reparación de desajustes del ADN)	timol	-4.143
	cariofileno	-3.829
pdxT (Subunidad de la sintasa de fosfato de piridoxal 5')	Carvacrol	-3.174
	timol	-2.997
pstB (Proteína de unión a ATP para la importación de fosfato)	Carvacrol	-4.285
	timol	-4.154
PurL (Subunidad PurL de la sintetasa de fosforribosilformilglicinamidaimina)	Carvacrol	-3.856
	oxideariofileno	-3.558
pyrF (Orotidina 5'-fosfato descarboxilasa)	timol	-4.112
	gamma-terpineno	-3.471

9 Discusión

Este estudio evaluó el efecto *antibiofilm* en *S. aureus* ATCC 43300 y el posible mecanismo de acción del AE LOT-II mediante proteómica. Sin embargo, es necesario mencionar unos aspectos relevantes estudiados durante la realización de este trabajo.

Inicialmente, la evaluación de la actividad antimicrobiana sobre células planctónicas mostró que el AE LOT-II a 0.09 mg/mL posee 50% de disminución de la viabilidad de *S aureus*, evidenciando el potencial inhibitorio de este.

Posteriormente, la evaluación de la formación del *biofilm* en el tiempo de 4 h hasta 24h, se realizó con el fin de encontrar el tiempo en el cual se produce mayor cantidad de biomasa, y se observó que no existe una diferencia en la cantidad de biomasa formada a las 12 y 24 h; lo que permitió tomar 12h como el tiempo ideal para obtener la cantidad de biomasa necesaria para posteriores experimentos (figura 3). Por otra parte, el tratamiento con el AE LOT-II, inhibió significativamente este proceso, sugiriendo un efecto directo sobre los mecanismos de adherencia y producción de matriz extracelular. Esta inhibición se observó a sub-CMI del AE (50-100 μ g/mL), lo que indica que el AE tiene un efecto antivirulento incluso sin comprometer completamente el crecimiento bacteriano; lo cual es una estrategia útil para evaluar los efectos de un compuesto sin alcanzar una inhibición total, lo que permite un mejor análisis de respuestas adaptativas, donde podrían modularse procesos fisiológicos claves en la virulencia y mecanismos de acción (Caixeta Magalhães Tibúrcio et al., 2022; Omar et al., 2024). A una concentración de 75 μ g/mL el AE LOT-II, inhibe aproximadamente el 50% de la formación del *biofilm* (figura 4); Por lo tanto, se empleó esta concentración para evaluar

su impacto en la producción de exopolisacárido y la inhibición de la producción de la hemolisina, los cuales hacen parte de los factores de virulencia o la capacidad que tiene este microorganismo para ser resistente a factores externos (Lee et al., 2016; Parai et al., 2020; Martínez et al., 2021).

Para evaluar el efecto del tratamiento sobre la capacidad de producción de exopolisacárido, se empleó la técnica del Rojo Congo, un método ampliamente utilizado para detectar la formación de exopolisacárido en *S. aureus* (Freeman et al., 1989; Arciola et al., 2002). En esta técnica, la intensidad de la coloración de las colonias refleja la cantidad de exopolisacárido producido: Una coloración más oscura, especialmente negra, indica una mayor producción de matriz de *biofilm* (Arciola et al., 2002; Ferreira et al., 2015).

A partir de una concentración de 75 µg/mL del AE LOT-II, se observó una leve reducción en la intensidad de la coloración de las colonias en comparación con el control y con los resultados previamente reportados por Arciola et al. No obstante, a una concentración de 100 µg/mL se evidenció una disminución notable en la coloración, lo que sugiere una menor capacidad de producción de exopolisacárido. Esto indica que el AE LOT-II probablemente no solo afecta la adherencia celular, sino también la síntesis de la matriz extracelular, como se muestra en la Figura 6. Estos resultados coinciden con estudios previos, en los cuales Ferreira et al., 2015 y Alabbosh et al., 2023; reportaron que cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *S. aureus*, respectivamente, producen colonias intensamente negras cuando son altamente productoras de exopolisacárido (Ferreira et al., 2015; Alabbosh et al., 2023). Asimismo, Ghasemi, et al., 2018 evaluaron la producción de exopolisacárido en *Acinetobacter baumannii* utilizando Rojo Congo, encontrando una correlación entre la producción de matriz, la formación de *biofilm* y la resistencia antibiótica (Ghasemi et al., 2018). En conjunto, estos y otros estudios han demostrado que diversos compuestos con

actividad anti-*biofilm* pueden reducir la retención del colorante Rojo Congo, lo que respalda la hipótesis de que la disminución en la producción de matriz extracelular representa un mecanismo clave en la desestructuración del *biofilm* (Blanco-Romero et al., 2024; Roy et al., 2018; Samrot et al., 2021)

Por otra parte, las hemolisinas son toxinas producidas por *S. aureus* y otras bacterias patógenas que tienen la capacidad de lisar los eritrocitos. Este mecanismo constituye un importante factor de virulencia, ya que permite a los microorganismos obtener hierro del hospedero, evadir el sistema inmune y facilitar su diseminación en los tejidos (Divyakolu et al., 2019; Vandenesch et al., 2012).

En este contexto, se observó que el AE LOT-II también ejerce un efecto inhibitor sobre la producción de hemolisinas de manera dosis-dependiente en donde a una concentración de 50 µg/mL se registró una reducción del 22 %, que aumentó a 29 % con 75 µg/mL y alcanzó el 32 % a 100 µg/mL (Tabla 3). Estos resultados sugieren que el AE LOT-II podría interferir con la expresión o actividad de estas toxinas, modulando la virulencia bacteriana sin inhibir completamente el crecimiento, un enfoque que ha sido propuesto previamente como estrategia para disminuir la patogenicidad sin generar presión selectiva hacia la resistencia. Resultados similares han sido reportados por Martínez et al., 2021 quienes demostraron que los aceites esenciales de *Lippia origanoides* (LTC II) y *Thymus vulgaris* (TV) reducen significativamente la hemólisis inducida por *S. aureus* ATCC 29213, con inhibiciones del 54 % y 35 %, respectivamente. De igual forma, Khadijetou et al, mostraron que los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* (EO1), *Myrtus communis* (EO2) y su combinación, presentan un efecto inhibitor sobre la hemólisis mediada por *S. aureus*. Este efecto se ha vinculado con la interferencia del sistema de comunicación bacteriano por *quorum sensing* (QS), el cual regula la expresión de múltiples factores de virulencia, incluida la alfa-

hemolisina, y que también está asociado con la formación de *biofilm* (Martínez et al., 2021; Bowbe et al., 2023).

Además, se han propuesto que la inhibición parcial de factores de virulencia, en lugar de su bloqueo total, puede ser una estrategia eficaz para reducir la agresividad del patógeno sin generar una fuerte presión evolutiva que favorezca la aparición de resistencia (O. F. Martínez et al., 2019).

En cuanto a la citotoxicidad en células eucariotas, los resultados mostraron que las concentraciones efectivas (75µg/mL- 100µg/mL) del AE LOT-II no presentaron efectos tóxicos sobre VERO (figura 5), lo cual es relevante para considerar su potencial uso terapéuticos.

En el mismo orden de ideas, el mecanismo de acción de los AEs, según diversos estudios, ha sido atribuido a su capacidad de interactuar con la membrana celular debido a sus propiedades hidrofóbicas. Esto les permite acumularse, desestabilizar las estructuras celulares y, en consecuencia, aumentar la permeabilidad, lo que provoca la fuga de moléculas esenciales para distintos procesos celulares, la inhibición y disminución de la formación del *biofilm* y, finalmente, la muerte celular (Kaplan, 2010; Tang et al., 2020; da Silva et al., 2021; Angane et al., 2022).

En este estudio, los resultados obtenidos mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) permitieron capturar imágenes del biofilm de *S. aureus* antes y después del tratamiento con AE LOT-II a una concentración de 75 µg/mL, como se reportó previamente. Estas imágenes muestran una estructura de biofilm desorganizada y una menor densidad celular en las muestras tratadas con el AE LOT-II. Además, se observó una morfología celular heterogénea en el grupo tratado, así como la presencia de orificios que se asemejan a poros en la superficie celular, en comparación con el control.

Estas alteraciones podrían estar relacionadas con lo reportado por Guillín et al., quienes observaron diferencias en la densidad celular y en la morfología del *biofilm* de *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium* tras el tratamiento con aceite esencial de *Lippia origanoides* LTC-II, en comparación con controles no tratados (Guillín et al., 2021).

Con el fin de profundizar y dilucidar los posibles mecanismos de acción del AE LOT-II, se recurrió a la proteómica, una herramienta clave para identificar cambios en la expresión de proteínas en respuesta al tratamiento. La identificación de moléculas capaces de interferir, reducir o incluso inhibir la formación de *biofilm* ha sido abordada por diversos autores mediante aproximaciones ómicas, lo cual ha permitido avanzar en la comprensión de las rutas moleculares implicadas en este proceso (Du et al., 2020; Tang et al., 2020; Zhang et al., 2023; Liu et al., 2024).

La proteómica ha demostrado ser una estrategia eficaz para investigar la regulación de factores de virulencia, la formación de *biofilm* y la resistencia antimicrobiana en distintas bacterias patógenas. Estudios previos han empleado esta aproximación para identificar proteínas diferencialmente expresadas en bacterias tratadas con agentes antimicrobianos y compuestos antivirulencia, proporcionando información valiosa sobre sus posibles dianas moleculares y las vías metabólicas alteradas (Barbosa et al., 2020; Piras et al., 2021; Trevisan et al., 2020; Weston et al., 2013).

En este estudio, el análisis proteómico evidenció cambios significativos en la expresión de proteínas, permitiendo la identificación de 12 spots con diferencias relevantes. Los geles representativos obtenidos mediante electroforesis bidimensional (2D) se presentan en las figuras 11 y 12. A partir de estos spots, se llevó a cabo la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas y posteriormente utilizando la base de datos MASCOT. Los resultados se resumen en la tabla 5, la cual incluye el peso molecular, el punto isoeléctrico y

la función biológica de cada proteína identificada. En donde las proteínas MnhG, GlyA, PstB, PurL, RplF, PyrF, ThiC, ArgB aumentaron su expresión; y Mult, DeoC, GtlA, CobT, PurA, PdxT disminuyeron su expresión significativamente.

Es importante resaltar que las proteínas expresadas diferencialmente durante el proceso de formación del biofilm ofrecen una visión preliminar de las proteínas activas en este contexto. No obstante, estos perfiles pueden variar dependiendo de las condiciones ambientales y del estado fisiológico del biofilm, lo que sugiere que la expresión proteica es altamente dinámica y está influenciada por el entorno (Trösemeier et al., 2019).

Adicionalmente, las proteínas identificadas fueron analizadas mediante la construcción de una red de interacción conocida como *interactoma*, la cual permite visualizar cómo podrían agruparse funcionalmente dentro de procesos biológicos específicos. Esta red reveló que las proteínas diferencialmente expresadas están relacionadas principalmente con rutas metabólicas esenciales, tales como la biosíntesis de nucleótidos, la síntesis de proteínas, la traducción, la reparación del ADN y el transporte celular.

A partir del análisis, se identificaron dos grupos principales de interacción funcional entre las proteínas: Grupo 1: Proteínas involucradas en la biosíntesis de nucleótidos y la vía glucolítica (PurA, DeoC, PurL, Pgi, PyrF y GlyA) y Grupo 2: Proteínas no agrupadas funcionalmente entre sí, pero relacionadas con procesos clave como la traducción (RplF) y el mantenimiento de la homeostasis celular (Mult y MnmG).

Para profundizar en la función específica de algunas proteínas identificadas, es importante destacar el papel de Desoxirribosa-fosfato aldolasa (DeoC) y Adenilosuccinato sintetasa (PurA) en procesos clave para la supervivencia y formación del *biofilm*. La enzima deoC

EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *LIPPIA ORIGANOIDES* SOBRE...

participa en la degradación de desoxirribonucleótidos, esenciales para la síntesis de ADN, por lo que una disminución en su expresión podría afectar el proceso de replicación, crítico para la reproducción bacteriana en condiciones adversas. Lo cual fue reportado por Evertts et al., quienes señalan que la optimización del crecimiento celular está coordinada por altos niveles de replicación y transcripción simultáneas (Evertts & Collier, 2012).

Por otra parte, *purA* interviene en la síntesis de adenilosuccinato a partir de IMP en la vía de síntesis de purinas de novo. El adenilosuccinato se convierte posteriormente en AMP, que se fosforila para generar ADP, precursor del ATP, principal fuente energética celular. La reducción en la expresión de *purA*, implica una menor producción de adenina, afectando tanto el proceso de replicación como la disponibilidad energética necesaria para la formación y mantenimiento del *biofilm*. Esto se traduce en una menor señalización celular, disminución de proteínas adhesivas y una mayor susceptibilidad a factores externos, como el tratamiento con AE LOT-II.

La eliminación de la expresión de *purA* en cepas mutantes ha evidenciado un incremento en la sensibilidad bacteriana frente a diversos antibióticos y péptidos novedosos, acompañado de una reducción significativa en la síntesis de AMP. Este desequilibrio metabólico condujo al agotamiento de los niveles intracelulares de ADP y ATP, lo que resalta el papel esencial de esta proteína en los mecanismos de resistencia y en la viabilidad bacteriana (Kano et al., 2024). De manera concordante, Li et al., observaron que cepas de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM), con alteraciones en las rutas de biosíntesis de purinas, presentaron niveles reducidos de ADP, ATP y c-di-AMP, así como una disminución en la formación de *biofilm* (Li et al., 2021).

La representación gráfica en 3D del spot correspondiente a la proteína MutL, obtenida del gel bidimensional (2D), se muestra en la figura 10. Esta proteína participa en el sistema de reparación de errores de apareamiento de bases que se producen durante la replicación del ADN. Aunque MutL no está directamente involucrada en la formación del *biofilm*, una disminución en su expresión podría comprometer la integridad genómica, favoreciendo la acumulación de mutaciones espontáneas. Esto, a su vez, podría afectar negativamente la capacidad adaptativa de la bacteria frente al estrés ambiental inducido por agentes externos como el AE LOT-II, y con ello disminuir su habilidad para formar *biofilm* (Harris et al., 1997; Ryan T Cirz et al., 2005).

La enzima Piridoxal 5'-fosfato sintasa (pdxT) es un cofactor esencial para múltiples enzimas involucradas en diversos procesos celulares fundamentales. Aunque la información específica sobre su relación con la patogenicidad en *Staphylococcus aureus* es limitada, existen estudios en otras especies bacterianas que evidencian su importancia. Por ejemplo, un estudio realizado en *Mycobacterium tuberculosis* demostró que la presencia de pdxT en la biosíntesis de vitamina B6 es crucial para la supervivencia y virulencia del patógeno (Dick et al., 2010). Asimismo, Xie et al. reportaron que la expresión de pdxT disminuye tras la inactivación de clpP, una proteína implicada en la tolerancia al estrés en *Actinobacillus pleuropneumoniae* (F. Xie et al., 2017).

Diversos estudios han evaluado la formación de *biofilm* en cepas mutantes con o sin la expresión de clpP en bacterias como *Pseudomonas fluorescens*, *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus epidermidis*, observando un incremento en la formación de *biofilm* cuando clpP está activa, y una reducción cuando su función es suprimida (Wang et al., 2022). En este contexto, se puede inferir que la disminución en la expresión de pdxT inducida por el

tratamiento con AE LOT-II podría repercutir negativamente sobre la proteína clpP, lo que a su vez afectaría la producción de factores de virulencia, incluidas toxinas y la formación de *biofilm*. Estos hallazgos son coherentes con los resultados obtenidos en este estudio, como se muestra en las figuras 6 y 7, así como en la tabla 3.

De manera complementaria, otra proteína de interés identificada fue glutamato sintasa (*gltA*), la cual es esencial para el desarrollo y la supervivencia del biofilm en especies como *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa* (Kimura & Kobayashi, 2020). La disminución en la expresión de *gltA* afecta directamente la homeostasis bacteriana y el desarrollo del *biofilm*. Además, el glutamato participa en rutas metabólicas clave, como la biosíntesis de ornitina y arginina, así como en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), todos procesos fundamentales para la síntesis de poliaminas y el metabolismo bioenergético, especialmente durante las etapas iniciales de formación del biofilm (Nassar et al., 2021). Por otra parte, Shibamura-Fujiogi et al. demostraron, mediante el uso de cepas mutantes, que los cambios metabólicos inducidos por el glutamato pueden afectar significativamente la formación del biofilm en cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM). Estos hallazgos se relacionan con los resultados obtenidos en este estudio, en los que se observó una disminución en la expresión de esta proteína, lo que sugiere una posible alteración del metabolismo bioenergético y, por ende, una interferencia directa en la formación del *biofilm* (Shibamura-Fujiogi et al., 2022)

Asimismo, se observó una regulación significativa en la proteína nicotinato-nucleótido-dimetilbencimidazol fosforribosiltransferasa (CobT). Aunque no se han reportado estudios específicos sobre esta enzima en *Staphylococcus aureus*, su función ha sido descrita en otras

especies bacterianas, como *Salmonella enterica*, donde participa en una etapa clave de la biosíntesis de cobalamina (vitamina B12) (Claas et al., 2010). En *S. entérica* y *S. typhimurium*, CobT cataliza la transferencia de fosforribosa al dimetilbencimidazol, un paso esencial para la formación de nucleótidos de base. Cuando la adenina actúa como base, el producto resultante es una cobamida conocida como pseudo-B12 (Keck & Renz, 2000). Aunque las razones fisiológicas detrás de la producción de diferentes formas de cobamidas aún no se comprenden completamente, se ha sugerido que esta diversidad podría estar relacionada con la adaptación metabólica de la bacteria frente a distintas condiciones ambientales (Chan et al., 2014).

Ahora, el aumento de expresión de Acetilglutamato quinasa (*argB*) que participa en la biosíntesis de arginina la cual pueden interactuar con sistemas de señalización de *quorum sensing* (QS), que regulan la expresión de genes relacionados con la formación del *biofilm*. Un aumento de la expresión de esta proteína se ve reflejado en una mayor resistencia a condiciones adversas dentro del *biofilm* (Nüse et al., 2023). Además, la arginina está implicada en la formación de adhesinas y es de los aminoácidos más representativos en la formación del *biofilm*, siendo al mismo tiempo fuentes potenciales de nitrógeno, carbono y energía (Snell et al., 2024)

Otro hallazgo relevante en el perfil proteómico fue la modulación de Serina hidroximetiltransferasa (*glyA*), la cual es una enzima dependiente del piridoxal 5'-fosfato, cataliza la escisión retroaldólica de la serina a glicina (Florio et al., 2011). La glicina es esencial para la síntesis de pirimidinas, y aminoácidos (Anderson et al., 2012; Giardina et al., 2018). Mientras que la fosforribosil formil glicinamida sintasa II (*purL*) y la orotidina 5'-

fosfato son responsables del metabolismo de purinas y pirimidinas, respectivamente (Goncheva et al., 2020; Ren et al., 2022).

El aumento en la expresión de las proteínas *mnhG*, *glyA*, *pstB*, *PurL*, *rplF*, *pyrF*, *thiC* y *argB* observado en este estudio, inducido por LOT-II, probablemente está relacionado con un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno, lo que genera estrés oxidativo. Esta condición requiere una mayor producción de glutatión para contrarrestar el daño celular (Gusarov & Nudler, 2005; Van Acker & Coenye, 2017). Por otro lado, la síntesis de pirimidinas y purinas se vuelve necesaria para la reparación del ADN y la generación de ATP (Ren et al., 2022).

La proteína ribosomal L6 (*rplF*), involucrada en la síntesis de proteínas, podría presentar un aumento en su expresión debido al daño ocasionado en otras proteínas ribosomales por el efecto del aceite esencial LOT-II. Esto se relaciona con lo reportado en la literatura, donde se explica que el ARN y las proteínas ribosómicas pueden sufrir modificaciones químicas por la acción de especies reactivas de oxígeno, lo que puede alterar la función del ribosoma o incluso causar su pérdida (Seixas et al., 2022; Shcherbik & Pestov, 2019).

Asimismo, otro posible efecto del estrés inducido por el AE LOT-II se refleja en la disminución de la expresión de la proteína transportadora de fosfato (*pstB*). Esta proteína desempeña un papel clave en la homeostasis del fosfato, siendo un componente de la permeasa dependiente de ATP que libera la energía necesaria para el transporte de fosfato inorgánico periplásmico (Lamarche et al., 2008). Diversos estudios vinculan el sistema Pst con la virulencia, debido a su relación directa con el regulón Pho, el cual regula componentes de la superficie celular como el ácido teicurónico, lípidos libres de fosfato, fosfolípidos, exopolisacárido y adhesinas (Agrawal et al., 2003). Con base en lo anterior, el aumento en la

expresión de esta proteína puede estar relacionado directamente con el estrés generado por el AE LOT-II, ya que este podría inducir alteraciones en la morfología bacteriana al interactuar con lípidos y proteínas, provocando una deficiencia de fosfato intracelular y, en consecuencia, una mayor demanda de transporte de este (Lamarche et al., 2005).

Finalmente, la Proteína de membrana (mnhG2) es un transportador activo de membrana que utiliza la fuerza motriz de protones para efluir iones de sodio intracelulares; son importantes en la homeostasis del pH intracelular y el eflujo de Na^+ dentro y fuera de la célula (Ito et al., 2017). Un aumento de la expresión de esta proteína se podría relacionar con que la célula está respondiendo a un desequilibrio iónico o de pH, protegiéndose contra la toxicidad del Na^+ y manteniendo condiciones que le permitan mantener su metabolismo activo (Ito et al., 2017; Padan et al., 2005).

Como complemento al análisis experimental, se realizó estudio de docking molecular entre las proteínas que presentaron una expresión diferencial durante el tratamiento con el AE LOT-II (MnhG, GlyA, PstB, PurL, RplF, PyrF, ThiC, ArgB, MulT, DeoC, GtlA, CobT, PurA y PdxT) y los componentes del AE LOT-II (Carvacrol, Metiltioéter, Óxido de cariofileno, Timol, Trans- β - cariofileno, α -humuleno, β -mirceno, γ -terpineno, P-cimeno).

Los resultados, presentados en la Tabla 6, reflejan los valores de docking score (expresados en kcal/mol), donde valores más negativos indican una mayor afinidad. Se evidenciaron interacciones multitarget entre los compuestos del AE LOT-II y diversas proteínas bacterianas diferencialmente expresadas, lo cual coincide con lo reportado por Cristani et al., en donde los autores demostraron que los aceites esenciales contienen una amplia variedad de metabolitos secundarios capaces de inhibir el de microorganismos mediante la acción sobre múltiples blancos celulares. Estos compuestos pueden afectar tanto la membrana como

el citoplasma bacteriano, e incluso inducir alteraciones morfológicas profundas en ciertas condiciones(Cristani et al., 2007)

Por otra parte, entre las interacciones más relevantes del presente estudio, se destaca la que ocurre entre la proteína PurA (adenilosuccinato sintetasa) y el carvacrol, con un docking score de -6.129, el más bajo observado. Esta interacción sugiere un fuerte potencial de unión, lo que podría interferir con la síntesis de purinas, un proceso esencial para la replicación del ADN y la síntesis de ATP. Dado que PurA desempeña un papel central en el metabolismo de nucleótidos, su inhibición podría comprometer significativamente la viabilidad bacteriana, lo que se alinea con el efecto antimicrobiano observado *in vitro*(Gélinas et al., 2021; Li et al., 2021; Kano et al., 2024).

Otras interacciones relevantes incluyeron la proteína GltA (glutamato sintasa) con carvacrol (-5.008), la DeoC (aldolasa de desoxirribosa-fosfato) con carvacrol (-4.546), y PstB (componente del sistema Pst de transporte de fosfato) con carvacrol (-4.285). Como se mencionó anteriormente, estas proteínas están involucradas en rutas metabólicas esenciales como la biosíntesis de aminoácidos, la utilización de carbohidratos y el transporte de fosfato, respectivamente, lo cual sugiere que los componentes del AE podrían afectar múltiples funciones celulares mediante interacciones directas con blancos moleculares críticos(Lamarche et al., 2005; Kimura & Kobayashi, 2020).

Además, tanto carvacrol como timol, dos de los tres componentes mayoritarios del AE LOT-II, mostraron interacciones consistentes con varias de las proteínas analizadas. Esto refuerza la hipótesis de que su actividad antimicrobiana puede estar mediada, al menos en parte, por la inhibición directa de funciones enzimáticas y estructurales clave. En particular, timol

mostró una buena afinidad hacia PyrF (-4.112) y Mult (-4.143), asociadas con la biosíntesis de nucleótidos y la reparación del ADN, respectivamente.

Es importante mencionar, que estos análisis *in silico* revelaron que carvacrol presentó los valores de docking score más bajos frente a varias proteínas clave. Por lo tanto, es importante considerar la composición química del AE LOT-II.

De acuerdo con el perfil químico, los tres componentes mayoritarios son timol (72.3%), p-cimeno (10.7%) y carvacrol (4.4%) (tabla 1). Esta información sugiere que, a pesar de la alta afinidad de carvacrol en los modelos de acoplamiento molecular, su baja concentración relativa en el AE podría limitar su efecto individual. Por ello, surgió la necesidad de realizar ensayos de actividad antimicrobiana adicionales utilizando cada uno de estos compuestos en las concentraciones correspondientes a las que se encuentran en el AE. Esto permitió determinar si su efecto antimicrobiano es atribuible a una acción individual o si, por el contrario, depende de una interacción sinérgica entre los compuestos. Tal abordaje fue fundamental para comprender con mayor precisión el posible mecanismo de acción del AE LOT-II. Los ensayos de actividad antimicrobiana se llevaron a cabo sobre células planctónicas de la cepa en estudio (*S. aureus* ATCC 43300). Los resultados indicaron que, a estas concentraciones, ninguno de los compuestos mostró una actividad antimicrobiana significativa por sí solo (figura 3, 4 y 5) lo que sugiere que su efecto inhibitorio observado en el AE LOT-II, podría deberse a una acción sinérgica con los otros componentes presentes en el. Esta falta de efecto individual ya ha sido reportada en estudios previos, donde se ha señalado que ciertos terpenos, como el p-cimeno, poseen escasa actividad antimicrobiana directa, pero pueden potenciar el efecto de otros compuestos más activos como el carvacrol

o el timol, al facilitar su penetración en la membrana bacteriana o alterar su fluidez (Pyo & Jung, 2024; Q. H. Xie et al., 2023).

De esta manera, los resultados obtenidos refuerzan la hipótesis de que la eficacia del AE LOT-II frente a *S. aureus* ATCC 43300 no se debe únicamente a la acción de un componente aislado, sino a la interacción sinérgica entre varios de sus constituyentes, siendo esta combinación clave para su actividad biológica. Estos hallazgos sugieren que el efecto del AE LOT-II podría estar asociado no solo a alteraciones de la membrana o generación de estrés oxidativo, como se evidenció experimentalmente, sino también a la inhibición directa de rutas metabólicas esenciales mediante interacciones moleculares específicas. No obstante, en experimentos *in vitro* estos efectos pueden no manifestarse sin la presencia de otros compuestos que modulan la actividad general; como quedo evidenciado en el estudio de Pourkhosravani et al., en donde se evaluó las propiedades antimicrobianas y antibiofilm de los aceites esenciales de *Cinnamomum verum* y *Elettaria cardamomum*. Los resultados mostraron que individualmente no lograron inhibir significativamente el crecimiento de *Escherichia coli* como lo hacían en sinergia, lo cual fue respaldado por los análisis de docking molecular, indicando que los metabolitos activos de los aceites esenciales pueden interactuar con diferentes blancos bacterianos, lo que sugiere un modo de acción sinérgico(Pourkhosravani et al., 2021).

Finalmente, con base en los resultados obtenidos en este estudio, se propone que el posible mecanismo de acción del AE LOT-II sobre *S. aureus* ATCC 43300 multifactorial, que involucra la inhibición de la formación de *biofilm* a través de dos vías complementarias: (i) la alteración en la expresión de proteínas clave y (ii) la posible inhibición directa de su actividad, como lo sugieren los análisis *in silico*. Las proteínas cuya expresión fue modulada

por el AE LOT-II están directamente relacionadas con procesos esenciales como la replicación y reparación del ADN, la comunicación por *quorum sensing* (QS), la formación y mantenimiento del *biofilm*, así como con factores de colonización y patogenicidad. Por lo tanto, el AE LOT-II tendría la capacidad no solo de interferir en las etapas iniciales de formación del *biofilm*, sino también de favorecer el desprendimiento de *biofilm* ya establecido. Este efecto parece estar mediado por una combinación de estrés oxidativo, interferencia en la maquinaria de replicación, alteración en la expresión de proteínas reguladoras del exopolisacárido y reducción en la producción de hemolisinas, todos ellos elementos críticos para la virulencia de *S. aureus*.

10 Conclusiones

El AE LOT-II tiene efecto antimicrobiano, antihemolítico y antibiofilm sobre *S. aureus* ATCC 43300 en concentraciones sub-MIC desde 50µg/mL hasta 150µg/mL.

El AE LOT-II genera cambios significativos en la expresión de proteínas de *S. aureus* ATCC 43300 en estado sétil a 75µg/mL. Estas proteínas están involucradas en funciones esenciales como adhesión celular, replicación del ADN, síntesis de proteínas, producción de exopolisacárido, respuesta al estrés oxidativo y mantenimiento de la membrana celular, lo cual sugiere que el AE LOT-II ejerce un efecto modulador sobre la fisiología bacteriana.

El AE LOT-II produjo cambios significativos en las proteínas involucradas en la formación y estabilidad del biofilm. Se identificaron 15 proteínas con cambios en su expresión: nueve de ellas aumentaron su expresión (MnhG, GlyA, PstB, PurL, RplF, PyrF, ThiC, ArgB) y seis proteínas claves en la adhesión celular y la síntesis de componentes estructurales del biofilm

presentaron disminución de su expresión (MulT, DeoC, GtlA, CobT, PurA, PdxT), en comparación con la condición control.

Mediante la correlación de los cambios en la expresión diferencial de proteínas con las rutas metabólicas relacionadas, se determinó que el posible mecanismo de acción del AE LOT-II sobre *S. aureus* ATCC 43300 induce inhibición en la formación de biofilm usando dos vías: afectando la expresión de proteínas claves y posiblemente inhibiendo su actividad afectando procesos relacionados con estrés oxidativo, la inhibición de proceso de replicación y de reparación del ADN , inhibición de proteínas reguladoras del exopolisacárido y producción de hemolisina.

Adicionalmente, las micrografías obtenidas por SEM del *biofilm* de *S. aureus* tratadas con una concentración sub-CMI de 75µg/mL, evidenciaron una reducción en la producción de estructuras de adhesión, correlacionándose con las alteraciones detectadas a nivel proteómico.

El análisis mediante docking molecular demostró que los componentes del AE LOT-II tienen interacción con varias de las proteínas cuya expresión se vio alterada por el tratamiento, es decir tienen un comportamiento multitarget. Estas interacciones se localizaron principalmente en regiones funcionales, como sitios catalíticos o dominios de unión al sustrato. Teniendo en cuenta que los componentes mayoritarios del AE (timol 72.3 %, p-cimeno 10.7% y carvarol 4.4%) no presentan actividad antimicrobiana, se sugiere que el AE LOT- II ejerce su efecto inhibitor mediante interacción sinérgica de sus componentes generando una interferencia directa en la función de las proteínas.

EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *LIPPIA ORIGANOIDES* SOBRE...

Los resultados obtenidos en este estudio permitieron identificar posibles mecanismos de acción del AE LOT-II sobre la formación del *biofilm* a través de un enfoque proteómico y fenotípico que proporcionan nuevas perspectivas sobre el potencial del AE LOT-II como agente antibiofilm y sientan las bases para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas basadas en compuestos naturales.

11 Recomendaciones

Es importante contar con un equipo de espectrometría de masas de alta resolución permitiría identificar con mayor precisión la huella peptídica de los spots detectados, proporcionando información clave para optimizar el procesamiento de datos y mejorar su anotación a través de las bases de datos disponibles. Además, se sugiere la incorporación de otros enfoques "ómicos", como transcriptómica o metabolómica, que permitan una visión más integral del mecanismo de acción de LOT-II sobre la formación del *biofilm*. Esta estrategia facilitaría la validación de las rutas metabólicas en las que participan las proteínas identificadas como posibles dianas terapéuticas para reducir la formación de *biofilm* en la cepa de *S. aureus* resistente a meticilina ATCC 43300.

Como continuidad de este trabajo, se propone realizar el análisis de los transcritos correspondientes a algunas de las proteínas con expresión diferencial, con el fin de confirmar los resultados obtenidos a nivel proteómico.

Referencias bibliográficas

- Abers, M., Schroeder, S., Goelz, L., Sulser, A., St. Rose, T., Puchalski, K., & Langland, J. (2021). Antimicrobial activity of the volatile substances from essential oils. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-021-03285-3>
- Acosta, J. M., Arango, O., Álvarez, D. E., & Hurtado, A. M. (2019). Actividad biocida del aceite esencial de lippia origanoides H.B.K sobre *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Informacion Tecnologica*, 30(6), 45–54. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642019000600045>
- Agrawal, N., Dasaradhi, P. V. N., Mohmmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K., & Mukherjee, S. K. (2003). RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 657–685. <https://doi.org/10.1128/membr.67.4.657-685.2003>
- Akens, M. K., Chien, C., Katchky, R. N., Kreder, H. J., Finkelstein, J., & Whyne, C. M. (2018). The impact of thermal cycling on *Staphylococcus aureus* biofilm growth on stainless steel and titanium orthopaedic plates. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12891-018-2199-z>
- Akhtar, N., Singh Prerna, K. S., Prerna, P., & Goyal, D. (2022). Emerging Modalities in Mitigation of Antimicrobial Resistance. In *Emerging Modalities in Mitigation of Antimicrobial Resistance*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-84126-3>
- Alabbosh, K. F., Zmantar, T., Bazaid, A. S., Snoussi, M., & Noumi, E. (2023). Antibiotics Resistance and Adhesive Properties of Clinical *Staphylococcus aureus* Isolated from Wound Infections. *Microorganisms*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051353>
- Anderson, D. D., Woeller, C. F., Chiang, E. P., Shane, B., & Stover, P. J. (2012). Serine hydroxymethyltransferase anchors de Novo thymidylate synthesis pathway to nuclear lamina for DNA synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 287(10), 7051–7062. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.333120>
- Angane, M., Swift, S., Huang, K., Butts, C. A., & Quek, S. Y. (2022). Essential Oils and Their Major Components: An Updated Review on Antimicrobial Activities, Mechanism of Action and Their Potential Application in the Food Industry. In *Foods* (Vol. 11, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/foods11030464>
- Anjali, Kumar, S., Korra, T., Thakur, R., Arutselvan, R., Kashyap, A. S., Nehela, Y., Chaplygin, V., Minkina, T., & Keswani, C. (2023). Role of plant secondary

- metabolites in defence and transcriptional regulation in response to biotic stress. In *Plant Stress* (Vol. 8). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100154>
- Arciola, C., Campoccia, D., & Montanaro, L. (2002). Detection of biofilm-forming strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus*. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2, 1–7. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12271819/>
- Asma, S. T., Imre, K., Morar, A., Herman, V., Acaroz, U., Mukhtar, H., Arslan-Acaroz, D., Shah, S. R. A., & Gerlach, R. (2022). An Overview of Biofilm Formation–Combating Strategies and Mechanisms of Action of Antibiofilm Agents. In *Life* (Vol. 12, Issue 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/life12081110>
- Baldissera, M. D., de Freitas Souza, C., Mourão, R. H. V., da Silva, L. V. F., & Monteiro, S. G. (2017). Trypanocidal action of *Lippia alba* and *Lippia origanoides* essential oils against *Trypanosoma evansi* in vitro and in vivo used mice as experimental model. *Journal of Parasitic Diseases*, 41(2), 345–351. <https://doi.org/10.1007/s12639-016-0800-7>
- Barberis, M., Calabrese, D., Galloni, M., & Nepi, M. (2023). Secondary Metabolites in Nectar-Mediated Plant-Pollinator Relationships. In *Plants* (Vol. 12, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/plants12030550>
- Barbosa, L. N., Alves, F. C. B., Andrade, B. F. M. T., Albano, M., Rall, V. L. M., Fernandes, A. A. H., Buzalaf, M. A. R., Leite, A. de L., de Pontes, L. G., dos Santos, L. D., & Fernandes Junior, A. (2020). Proteomic analysis and antibacterial resistance mechanisms of *Salmonella* Enteritidis submitted to the inhibitory effect of *Origanum vulgare* essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Proteomics*, 214. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103625>
- Bassolé, I. H. N., & Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. In *Molecules* (Vol. 17, Issue 4, pp. 3989–4006). <https://doi.org/10.3390/molecules17043989>
- Bhattacharya, M., Wozniak, D. J., Stoodley, P., & Hall-Stoodley, L. (2015). Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. In *Expert Review of Anti-Infective Therapy* (Vol. 13, Issue 12, pp. 1499–1516). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1100533>
- Billings, N., Birjiniuk, A., Samad, T. S., Doyle, P. S., & Ribbeck, K. (2015). Material properties of biofilms - A review of methods for understanding permeability and mechanics. *Reports on Progress in Physics*, 78(3). <https://doi.org/10.1088/0034-4885/78/3/036601>
- Blanco-Romero, E., Garrido-Sanz, D., Durán, D., Rybtke, M., Tolker-Nielsen, T., Redondo-Nieto, M., Rivilla, R., & Martín, M. (2024). Role of extracellular matrix components

- in biofilm formation and adaptation of *Pseudomonas ogarae* F113 to the rhizosphere environment. *Frontiers in Microbiology*, 15.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1341728>
- Bowbe, K. H., Salah, K. B. H., Moumni, S., Ashkan, M. F., & Merghni, A. (2023). Anti-Staphylococcal Activities of *Rosmarinus officinalis* and *Myrtus communis* Essential Oils through ROS-Mediated Oxidative Stress. *Antibiotics*, 12(2).
<https://doi.org/10.3390/antibiotics12020266>
- Caballero-Gallardo, K., Fuentes-Lopez, K., Stashenko, E. E., & Olivero-Verbel, J. (2023). Chemical Composition, Repellent Action, and Toxicity of Essential Oils from *Lippia origanoide*, *Lippia alba* Chemotypes, and *Pogostemon cablin* on Adults of *Ulomoides dermestoides* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Insects*, 14(1).
<https://doi.org/10.3390/insects14010041>
- Čabarkapa, I., Čolović, R., Đuragić, O., Popović, S., Kokić, B., Milanov, D., & Pezo, L. (2019). Anti-biofilm activities of essential oils rich in carvacrol and thymol against *Salmonella Enteritidis*. *Biofouling*, 35(3), 361–375.
<https://doi.org/10.1080/08927014.2019.1610169>
- Cáceres, M., Hidalgo, W., Stashenko, E., Torres, R., & Ortiz, C. (2020a). Essential oils of aromatic plants with antibacterial, anti-biofilm and anti-quorum sensing activities against pathogenic bacteria. *Antibiotics*, 9(4).
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9040147>
- Cáceres, M., Hidalgo, W., Stashenko, E., Torres, R., & Ortiz, C. (2020b). Essential oils of aromatic plants with antibacterial, anti-biofilm and anti-quorum sensing activities against pathogenic bacteria. *Antibiotics*, 9(4).
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9040147>
- Caixeta Magalhães Tibúrcio, A. A., Paiva, A. D., Pedrosa, A. L., Rodrigues, W. F., Bernardes da Silva, R., & Oliveira, A. G. (2022). Effect of sub-inhibitory concentrations of antibiotics on biofilm formation and expression of virulence genes in penicillin-resistant, ampicillin-susceptible *Enterococcus faecalis*. *Heliyon*, 8(10).
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11154>
- Chan, C. H., Newmister, S. A., Talyor, K., Claas, K. R., Rayment, I., & Escalante-Semerena, J. C. (2014). Dissecting cobamide diversity through structural and functional analyses of the base-activating CobT enzyme of *Salmonella enterica*. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1840(1), 464–475.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.09.038>
- Claas, K. R., Parrish, J. R., Maggio-Hall, L. A., & Escalante-Semerena, J. C. (2010). Functional analysis of the nicotinate mononucleotide: 5,6- Dimethylbenzimidazole

phosphoribosyltransferase (CobT) enzyme, involved in the late steps of coenzyme B12 biosynthesis in *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology*, 192(1), 145–154.
<https://doi.org/10.1128/JB.01159-09>

CLSI. (2015). *Clinical and Laboratory Standards Institute consensus process*. www.clsi.org

Costa, M. F., Durço, A. O., Rabelo, T. K., Barreto, R. de S. S., & Guimarães, A. G. (2019). Effects of Carvacrol, Thymol and essential oils containing such monoterpenes on wound healing: a systematic review. In *Journal of Pharmacy and Pharmacology* (Vol. 71, Issue 2, pp. 141–155). Blackwell Publishing Ltd.
<https://doi.org/10.1111/jphp.13054>

Cristani, M., D'Arrigo, M., Mandalari, G., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Micieli, D., Venuti, V., Bisignano, G., Saija, A., & Trombetta, D. (2007). Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(15), 6300–6308.
<https://doi.org/10.1021/jf070094x>

da Nóbrega Alves, D., Monteiro, A. F. M., Andrade, P. N., Lazarini, J. G., Abílio, G. M. F., Guerra, F. Q. S., Scotti, M. T., Scotti, L., Rosalen, P. L., & Castro, R. D. de. (2020). Docking Prediction, Antifungal Activity, Anti-Biofilm Effects on *Candida* spp., and Toxicity against Human Cells of Cinnamaldehyde. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(24). <https://doi.org/10.3390/molecules25245969>

da Silva, B. D., Bernardes, P. C., Pinheiro, P. F., Fantuzzi, E., & Roberto, C. D. (2021). Chemical composition, extraction sources and action mechanisms of essential oils: Natural preservative and limitations of use in meat products. *Meat Science*, 176, 108463.

Dave, K. A., Headlam, M. J., Wallis, T. P., & Gorman, J. J. (2011). Preparation and analysis of proteins and peptides using MALDI TOF/TOF mass spectrometry. *Current Protocols in Protein Science*, SUPPL.63.
<https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1613s63>

Davey, M. E., & O'toole, G. A. (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. In *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS* (Vol. 64, Issue 4). <https://journals.asm.org/journal/membr>

De Sousa, D. P. (2015). Bioactive Essential Oils and Cancer. In *Bioactive Essential Oils and Cancer*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-19144-7>

Del Pozo, J. L. (2018). Biofilm-related disease. In *Expert Review of Anti-Infective Therapy* (Vol. 16, Issue 1, pp. 51–65). Taylor and Francis Ltd.
<https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1417036>

- Díaz Martín, R. D., Camacho-Martínez, Z., Ambrosio Hernández, J. R., & Valencia-Caballero, L. (2019). Proteomics as a new tool in forensic sciences. In *Revista Espanola de Medicina Legal* (Vol. 45, Issue 3, pp. 114–122). Ediciones Doyma, S.L. <https://doi.org/10.1016/j.reml.2018.06.002>
- Dick, T., Manjunatha, U., Kappes, B., & Gengenbacher, M. (2010). Vitamin B6 biosynthesis is essential for survival and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology*, 78(4), 980–988. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07381.x>
- Divyakolu, S., Chikkala, R., Ratnakar, K. S., & Sritharan, V. (2019). Hemolysins of *Staphylococcus aureus*—An Update on Their Biology, Role in Pathogenesis and as Targets for Anti-Virulence Therapy. *Advances in Infectious Diseases*, 09(02), 80–104. <https://doi.org/10.4236/aid.2019.92007>
- Dos Santos Correa, R. M., Mota, T. C., Guimarães, A. C., Bonfim, L. S. T., Burbano, R. R., & De Oliveira Bahia, M. (2018). Cytotoxic and genotoxic effects of fluconazole on African green monkey kidney (Vero) cell line. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6271547>
- Du, H., Zhou, L., Lu, Z., Bie, X., Zhao, H., Niu, Y. D., & Lu, F. (2020). Transcriptomic and proteomic profiling response of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) to a novel bacteriocin, plantaricin GZ1-27 and its inhibition of biofilm formation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(18), 7957–7970. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10589-w>
- Evertts, A. G., & Collier, H. A. (2012). Back to the origin: Reconsidering replication, transcription, epigenetics, and cell cycle control. *Genes and Cancer*, 3(11–12), 678–696. <https://doi.org/10.1177/1947601912474891>
- Faleiro, M. L. (n.d.). *The mode of antibacterial action of essential oils*.
- Feizi, H., Tahan, V., & Kariman, K. (2023). In vitro antibacterial activity of essential oils from *Carum copticum* and *Ziziphora clinopodioides* plants against the phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Biosystems*, 157(2), 487–492. <https://doi.org/10.1080/11263504.2023.2165564>
- Fernandez Rodríguez, Ronield Elias, Bolivar-Anillo, Hernando, Hoyos Turcios, Carlos, Carrillo Garcia, Laura, Serrano Hernandez, Maria, & Abdellah, Ezzanad. (2020). Resistencia antibiótica: el papel del hombre, los animales y el medio ambiente. *Revista Salud Uninorte*, 36(1), 298-324. <https://doi.org/10.14482/sun.36.1.615>

- Ferreira, A. A., Souza Tette, P. A., Santos Mendonça, R. C., De Souza Soares, A., & De Carvalho, M. M. (2015). Detection of exopolysaccharide production and biofilm-related genes in staphylococcus spp. Isolated from a poultry processing plant. *Food Science and Technology (Brazil)*, 34(4), 710–716. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6446>
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 8, Issue 9, pp. 623–633). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: An emergent form of bacterial life. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 14, Issue 9, pp. 563–575). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Florio, R., Di Salvo, M. L., Vivoli, M., & Contestabile, R. (2011). Serine hydroxymethyltransferase: A model enzyme for mechanistic, structural, and evolutionary studies. In *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* (Vol. 1814, Issue 11, pp. 1489–1496). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.10.010>
- Foster, T. J. (2019). Surface Proteins of Staphylococcus aureus . *Microbiology Spectrum*, 7(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0046-2018>
- Freeman, D. J., Falkiner, F. R., & Keane, C. T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. In *J Clin Pathol* (Vol. 42).
- Friesner, R. A., Banks, J. L., Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T., Repasky, M. P., Knoll, E. H., Shelley, M., Perry, J. K., Shaw, D. E., Francis, P., & Shenkin, P. S. (2004). Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(7), 1739–1749. <https://doi.org/10.1021/jm0306430>
- Fux, C. A., Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Stoodley, P. (2005). Survival strategies of infectious biofilms. In *Trends in Microbiology* (Vol. 13, Issue 1, pp. 34–40). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.010>
- Games, E., Guerreiro, M., Santana, F. R., Pinheiro, N. M., De Oliveira, E. A., Lopes, F. D. T. Q. S., Olivo, C. R., Tibério, I. F. L. C., Martins, M. A., Lago, J. H. G., & Prado, C. M. (2016). Structurally Related Monoterpenes p-Cymene, Carvacrol and Thymol Isolated from Essential Oil from Leaves of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) Protect Mice against Elastase-Induced Emphysema. *Molecules*, 21(10). <https://doi.org/10.3390/molecules21101390>
- Gélinas, M., Museau, L., Milot, A., & Beauregard, P. B. (2021). *The de novo Purine Biosynthesis Pathway Is the Only Commonly Regulated Cellular Pathway during*

Biofilm Formation in TSB-Based Medium in Staphylococcus aureus and Enterococcus faecalis.

- Ghasemi, E., Ghalavand, Z., Goudarzi, H., Yeganeh, F., Hashemi, A., Dabiri, H., Mirsamadi, E. S., & Foroumand, M. (2018). Phenotypic and genotypic investigation of biofilm formation in clinical and environmental isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Archives of Clinical Infectious Diseases*, *13*(4). <https://doi.org/10.5812/archcid.12914>
- Giardina, G., Paone, A., Tramonti, A., Lucchi, R., Marani, M., Magnifico, M. C., Bouzidi, A., Pontecorvi, V., Guiducci, G., Zamparelli, C., Rinaldo, S., Paiardini, A., Contestabile, R., & Cutruzzolà, F. (2018). The catalytic activity of serine hydroxymethyltransferase is essential for de novo nuclear dTMP synthesis in lung cancer cells. *FEBS Journal*, *285*(17), 3238–3253. <https://doi.org/10.1111/febs.14610>
- Gómez-Sequeda, N., Cáceres, M., Stashenko, E. E., Hidalgo, W., & Ortiz, C. (2020). Antimicrobial and antibiofilm activities of essential oils against *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA). *Antibiotics*, *9*(11), 1–18. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110730>
- Goncheva, M. I., Flannagan, R. S., & Heinrichs, D. E. (2020). *De Novo Purine Biosynthesis Is Required for Intracellular Growth of Staphylococcus aureus and for the Hypervirulence Phenotype of a purR Mutant*. <https://doi.org/10>
- Guillín, Y., Cáceres, M., Torres, R., Stashenko, E., & Ortiz, C. (2021a). Effect of essential oils on the inhibition of biofilm and quorum sensing in salmonella enteritidis 13076 and salmonella typhimurium 14028. *Antibiotics*, *10*(10). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10101191>
- Guillín, Y., Cáceres, M., Torres, R., Stashenko, E., & Ortiz, C. (2021b). Effect of essential oils on the inhibition of biofilm and quorum sensing in salmonella enteritidis 13076 and salmonella typhimurium 14028. *Antibiotics*, *10*(10). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10101191>
- Guo, H., Tong, Y., Cheng, J., Abbas, Z., Li, Z., Wang, J., Zhou, Y., Si, D., & Zhang, R. (2022). Biofilm and Small Colony Variants—An Update on *Staphylococcus aureus* Strategies toward Drug Resistance. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23031241>
- Gusarov, I., & Nudler, E. (2005). *NO-mediated cytoprotection: Instant adaptation to oxidative stress in bacteria*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0504307102
- Halgren, T. A., Murphy, R. B., Friesner, R. A., Beard, H. S., Frye, L. L., Pollard, W. T., & Banks, J. L. (2004). Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening. *Journal of Medicinal Chemistry*, *47*(7), 1750–1759. <https://doi.org/10.1021/jm030644s>

- Harris, R. S., Feng, G., Ross, K. J., Sidhu, R., Thulin, C., Longerich, S., Szigety, S. K., Winkler, M. E., & Rosenberg, S. M. (1997). *Mismatch repair protein MutL becomes limiting during stationary-phase mutation*.
- Ito, M., Morino, M., & Krulwich, T. A. (2017). Mrp antiporters have important roles in diverse bacteria and archaea. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 8, Issue NOV). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02325>
- Jenkins, R., Burton, N., & Cooper, R. (2014). Proteomic and genomic analysis of methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) exposed to manuka honey in vitro demonstrated down-regulation of virulence markers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(3), 603–615. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt430>
- Kano, T., Ishikawa, K., Furuta, K., & Kaito, C. (2024). Knockout of adenylosuccinate synthase purA increases susceptibility to colistin in Escherichia coli. *FEMS Microbiology Letters*, 371. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnae007>
- Kaplan, J. B. (2010). Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses. In *Journal of Dental Research* (Vol. 89, Issue 3, pp. 205–218). <https://doi.org/10.1177/0022034509359403>
- Kauffmann, A. C., & Castro, V. S. (2023). Phenolic Compounds in Bacterial Inactivation: A Perspective from Brazil. In *Antibiotics* (Vol. 12, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040645>
- Keck, B., & Renz, P. (2000). Salmonella typhimurium forms adenylobamide and 2-methyladenylobamide, but no detectable cobalamin during strictly anaerobic growth. *Arch Microbiol*. <https://link.springer.com/article/10.1007/s002030050011>
- Kimura, T., & Kobayashi, K. (2020). Role of glutamate synthase in biofilm formation by bacillus subtilis. *Journal of Bacteriology*, 202(14). <https://doi.org/10.1128/JB.00120-20>
- Klevens, R. M., Morrison, M. A., Nadle, J., Petit, S., Gershman, K., Ray, S., Harrison, L. H., Lynfield, R., Dumyati, G., Townes, J. M., Craig, A. S., Zell, E. R., Fosheim, G. E., Mcdougal, L. K., Carey, R. B., & Fridkin, S. K. (n.d.). *Invasive Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infections in the United States*. www.jama.com
- Koo, H., Allan, R. N., Howlin, R. P., Stoodley, P., & Hall-Stoodley, L. (2017). Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nature Reviews. Microbiology*, 15(12), 740–755.
- Kranjec, C., Morales Angeles, D., Torrissen Mårli, M., Fernández, L., García, P., Kjos, M., & Diep, D. B. (2021). *antibiotics Staphylococcal Biofilms: Challenges and Novel Therapeutic Perspectives*. <https://doi.org/10.3390/antibiotics>

- Kumar, N. R., Balraj, T. A., Kempegowda, S. N., & Prashant, A. (2024). Multidrug-Resistant Sepsis: A Critical Healthcare Challenge. In *Antibiotics* (Vol. 13, Issue 1). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).
<https://doi.org/10.3390/antibiotics13010046>
- Lamarche, M. G., Dozois, C. M., Daigle, F., Caza, M., Curtiss, R., Dubreuil, J. D., & Harel, J. (2005). Inactivation of the Pst system reduces the virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain. *Infection and Immunity*, *73*(7), 4138–4145.
<https://doi.org/10.1128/IAI.73.7.4138-4145.2005>
- Lamarche, M. G., Wanner, B. L., Crépin, S., & Harel, J. (2008). The phosphate regulon and bacterial virulence: A regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 32, Issue 3, pp. 461–473).
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00101.x>
- Lee, J. H., Kim, Y. G., Yong Ryu, S., & Lee, J. (2016). Calcium-chelating alizarin and other anthraquinones inhibit biofilm formation and the hemolytic activity of *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*, *6*. <https://doi.org/10.1038/srep19267>
- Li, L., Li, Y., Zhu, F., Cheung, A. L., Wang, G., Bai, G., Proctor, R. A., Yeaman, M. R., Bayer, A. S., & Xiong, Y. Q. (2021). New Mechanistic Insights into Purine Biosynthesis with Second Messenger c-di-AMP in Relation to Biofilm-Related Persistent Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. *MBio*, *12*(6).
<https://doi.org/10.1128/mBio.02081-21>
- Lister, J. L., & Horswill, A. R. (2014). *Staphylococcus aureus* biofilms: Recent developments in biofilm dispersal. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *4*(DEC). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00178>
- Liu, Y., Liu, Y., Hao, L., Cao, J., Jiang, L., & Yi, H. (2024). Metabolomic Approaches to Study the Potential Inhibitory Effects of Plantaricin Q7 against *Listeria monocytogenes* Biofilm. *Foods*, *13*(16). <https://doi.org/10.3390/foods13162573>
- Lofa, A., Velasco, V., Gerding, M., López, M. D., Vallejos, D., Bonilla, A. M., & Logue, C. M. (2019). Antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* strains of swine origin: molecular typing and susceptibility to oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil and maqui (*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz) extract. *Journal of Applied Microbiology*, *127*(4), 1048–1056. <https://doi.org/10.1111/jam.14393>
- Madhavi Sastry, G., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R., & Sherman, W. (2013). Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, *27*(3), 221–234. <https://doi.org/10.1007/s10822-013-9644-8>

- Mah, T.-F. (2012). Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiology*, 7(9), 1061–1072.
- Martínez, A., Manrique-Moreno, M., Klaiss-Luna, M. C., Stashenko, E., Zafra, G., & Ortiz, C. (2021a). Effect of essential oils on growth inhibition, biofilm formation and membrane integrity of escherichia coli and staphylococcus aureus. *Antibiotics*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121474>
- Martínez, A., Manrique-Moreno, M., Klaiss-Luna, M. C., Stashenko, E., Zafra, G., & Ortiz, C. (2021b). Effect of essential oils on growth inhibition, biofilm formation and membrane integrity of escherichia coli and staphylococcus aureus. *Antibiotics*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121474>
- Martínez, O. F., Cardoso, M. H., Ribeiro, S. M., & Franco, O. L. (2019). Recent advances in anti-virulence therapeutic strategies with a focus on dismantling bacterial membrane microdomains, toxin neutralization, quorum-sensing interference and biofilm inhibition. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9(APR). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00074>
- Mcguinness, W. A., Malachowa, N., & Deleo, F. R. (2017). Vancomycin Resistance in Staphylococcus aureus. In *YALE JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE* (Vol. 90).
- Meenu, M., Padhan, B., Patel, M., Patel, R., & Xu, B. (2023). Antibacterial activity of essential oils from different parts of plants against Salmonella and Listeria spp. In *Food Chemistry* (Vol. 404). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134723>
- Méndez, G. L., Castro, N. P., Castro, E. P., Alarcón, M. T., & Barros, A. H. (2019). Essential oils as a source of bioactive molecules. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas(Colombia)*, 48(1), 80–93. <https://doi.org/10.15446/rcciQUIFA.v48n1.80067>
- Millezi, A. F., Caixeta, D. S., Rossoni, D. F., das Graças Cardoso, M., & Piccoli, R. H. (2012). Propriedades antibacterianas in vitro de óleos essenciais de thymus vulgaris, cymbopogon citratus e laurus nobilis contra cinco importantes bactérias patogênicas veiculadas por alimentos. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 32(1), 167–172. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612012005000021>
- Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. In *Journal of Immunological Methods* (Vol. 65).

- Murbach Teles Andrade, B. F., Nunes Barbosa, L., Da Silva Probst, I., & Fernandes Júnior, A. (2014). Antimicrobial activity of essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 26(1), 34–40. <https://doi.org/10.1080/10412905.2013.860409>
- Nassar, R., Hachim, M., Nassar, M., Kaklamanos, E. G., Jamal, M., Williams, D., & Senok, A. (2021). Microbial Metabolic Genes Crucial for *S. aureus* Biofilms: An Insight From Re-analysis of Publicly Available Microarray Datasets. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.607002>
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. In *Pharmaceuticals* (Vol. 6, Issue 12, pp. 1451–1474). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>
- Nguyen, H. T. T., Nguyen, T. H., & Otto, M. (2020). The staphylococcal exopolysaccharide PIA – Biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection. In *Computational and Structural Biotechnology Journal* (Vol. 18, pp. 3324–3334). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.10.027>
- Nüse, B., Holland, T., Rauh, M., Gerlach, R. G., & Mattner, J. (2023). L-arginine metabolism as pivotal interface of mutual host–microbe interactions in the gut. In *Gut Microbes* (Vol. 15, Issue 1). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2222961>
- O'farrells, P. H. (1975). High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins*. In *DF BIO~QKAL CHEMISTRY* (Vol. 250, Issue 10).
- Oliveira, D., Borges, A., & Simões, M. (2018). Staphylococcus aureus toxins and their molecular activity in infectious diseases. In *Toxins* (Vol. 10, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/toxins10060252>
- Olsen, I. (2015). Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34(5), 877–886.
- Omar, A., Elsaeed Elbanna, T., Sonbol, F., & El-Bouseary, M. M. (2024). Evaluation of the effect of sub-inhibitory concentrations of ceftriaxone on combating multidrug-resistant Staphylococcus aureus. *Journal of Advanced Medical and Pharmaceutical Research*, 0(0), 92–104. <https://doi.org/10.21608/jampr.2024.283820.1066>
- Orlando, J., & Cadena, R.-C. A. (2003). LA VEGETACIÓN DEL CAÑÓN DEL RÍO CHICAMOCHA (SANTANDER, COLOMBIA) ECOLOGÍA. In *Caldasia* (Vol. 25, Issue 1).
- O'Toole, G. A. (2010). Microtiter dish Biofilm formation assay. *Journal of Visualized Experiments*, 47. <https://doi.org/10.3791/2437>

- O'toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). *BIOFILM FORMATION AS MICROBIAL DEVELOPMENT*. www.annualreviews.org
- Padan, E., Bibi, E., Ito, M., & Krulwich, T. A. (2005). Alkaline pH homeostasis in bacteria: New insights. In *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (Vol. 1717, Issue 2, pp. 67–88). <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.09.010>
- Pai, L., Patil, S., Liu, S., & Wen, F. (2023). A growing battlefield in the war against biofilm-induced antimicrobial resistance: insights from reviews on antibiotic resistance. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 13). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1327069>
- Pandey, A. K., Kumar, P., Singh, P., Tripathi, N. N., & Bajpai, V. K. (2017). Essential oils: Sources of antimicrobials and food preservatives. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7, Issue JAN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02161>
- Parai, D., Banerjee, M., Dey, P., & Mukherjee, S. K. (2020). Reserpine attenuates biofilm formation and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Microbial Pathogenesis*, 138. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103790>
- Parastan, R., Kargar, M., Solhjoo, K., & Kafilzadeh, F. (2020). *Staphylococcus aureus* biofilms: Structures, antibiotic resistance, inhibition, and vaccines. In *Gene Reports* (Vol. 20). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100739>
- Parra Torres, E., Nelson, B. ;, & López, R. (2007). Phenotypic Plasticity of *Lippia alba* and *Lippia organoides* (Vervaceae) in Response to Availability of Light. In *Acta biol. Colomb* (Vol. 12).
- Piras, C., Di Ciccio, P. A., Soggiu, A., Greco, V., Tilocca, B., Costanzo, N., Ceniti, C., Urbani, A., Bonizzi, L., Ianieri, A., & Roncada, P. (2021). *S. Aureus* biofilm protein expression linked to antimicrobial resistance: A` proteomic study. *Animals*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/ani11040966>
- Pourkhosravani, E., Dehghan Nayeri, F., & Mohammadi Bazargani, M. (2021). Decoding antibacterial and antibiofilm properties of cinnamon and cardamom essential oils: a combined molecular docking and experimental study. *AMB Express*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01305-6>
- Pyo, Y., & Jung, Y. J. (2024). Microbial Fermentation and Therapeutic Potential of p-Cymene: Insights into Biosynthesis and Antimicrobial Bioactivity. In *Fermentation* (Vol. 10, Issue 9). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/fermentation10090488>

- Rashtchi, P., van der Linden, E., Habibi, M., & Abee, T. (2024). Biofilm formation of *Lactiplantibacillus plantarum* food isolates under flow and resistance to disinfectant agents. *Heliyon*, *10*(19), e38502. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e38502>
- Ren, Z., Yu, J., Du, J., Zhang, Y., Hamushan, M., Jiang, F., Zhang, F., Wang, B., Tang, J., Shen, H., & Han, P. (2022). A General Map of Transcriptional Expression of Virulence, Metabolism, and Biofilm Formation Adaptive Changes of *Staphylococcus aureus* When Exposed to Different Antimicrobials. *Frontiers in Microbiology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.825041>
- Rodríguez-Rojas, A., Rodríguez-Beltrán, J., Couce, A., & Blázquez, J. (2013). Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. In *International Journal of Medical Microbiology* (Vol. 303, Issues 6–7, pp. 293–297). <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.004>
- Rogers, K. L., Fey, P. D., & Rupp, M. E. (2009). Coagulase-Negative Staphylococcal Infections. In *Infectious Disease Clinics of North America* (Vol. 23, Issue 1, pp. 73–98). <https://doi.org/10.1016/j.idc.2008.10.001>
- Roos, K., Wu, C., Damm, W., Reboul, M., Stevenson, J. M., Lu, C., Dahlgren, M. K., Mondal, S., Chen, W., Wang, L., Abel, R., Friesner, R. A., & Harder, E. D. (2019). OPLS3e: Extending Force Field Coverage for Drug-Like Small Molecules. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *15*(3), 1863–1874.
- Roy, R., Tiwari, M., Donelli, G., & Tiwari, V. (2018). Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. In *Virulence* (Vol. 9, Issue 1, pp. 522–554). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1313372>
- Saad, N. Y., Muller, C. D., & Lobstein, A. (2013). Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. In *Flavour and Fragrance Journal* (Vol. 28, Issue 5, pp. 269–279). <https://doi.org/10.1002/ffj.3165>
- Sadgrove, N. J., Padilla-González, G. F., & Phumthum, M. (2022). Fundamental Chemistry of Essential Oils and Volatile Organic Compounds, Methods of Analysis and Authentication. In *Plants* (Vol. 11, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/plants11060789>
- Samrot, A. V., Mohamed, A. A., Faradjeva, E., Jie, L. S., Sze, C. H., Arif, A., Sean, T. C., Michael, E. N., Mun, C. Y., Qi, N. X., Mok, P. L., & Kumar, S. S. (2021). Mechanisms and impact of biofilms and targeting of biofilms using bioactive compounds—a review. In *Medicina (Lithuania)* (Vol. 57, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/medicina57080839>

- Sangour, M. H., Ali, I. M., Atwan, Z. W., & Al Ali, A. A. A. L. A. (2021). Effect of Ag nanoparticles on viability of MCF-7 and Vero cell lines and gene expression of apoptotic genes. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s43042-020-00120-1>
- Seixas, A. F., Quendera, A. P., Sousa, J. P., Silva, A. F. Q., Arraiano, C. M., & Andrade, J. M. (2022). Bacterial Response to Oxidative Stress and RNA Oxidation. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.821535>
- Shcherbik, N., & Pestov, D. G. (2019). The impact of oxidative stress on ribosomes: From injury to regulation. In *Cells* (Vol. 8, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells8111379>
- Shibamura-Fujiogi, M., Wang, X., Maisat, W., Koutsogiannaki, S., Li, Y., Chen, Y., Lee, J. C., & Yuki, K. (2022). GltS regulates biofilm formation in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Communications Biology*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-022-04239-2>
- Singh, S. B., Young, K., & Silver, L. L. (2017). What is an “ideal” antibiotic? Discovery challenges and path forward. In *Biochemical Pharmacology* (Vol. 133, pp. 63–73). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.01.003>
- Singh, S., Singh, S. K., Chowdhury, I., & Singh, R. (2017). Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. *The Open Microbiology Journal*, 11(1), 53–62. <https://doi.org/10.2174/1874285801711010053>
- Sivaranjani, M., Leskinen, K., Aravindraja, C., Saavalainen, P., Pandian, S. K., Skurnik, M., & Ravi, A. V. (2019). Deciphering the antibacterial mode of action of alpha-mangostin on *Staphylococcus epidermidis* RP62A through an integrated transcriptomic and proteomic approach. *Frontiers in Microbiology*, 10(FEB). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00150>
- Smith, B., Williams, J., & Schulze -Kremer, S. (2003). *The Ontology of the Gene Ontology*. chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1480173/pdf/amia2003_0609.pdf
- Snell, A. P., Manias, D. A., Elbeherly, R. R., Dunny, G. M., & Willett, J. L. E. (2024). Arginine impacts aggregation, biofilm formation, and antibiotic susceptibility in *Enterococcus faecalis*. *FEMS Microbes*, 5. <https://doi.org/10.1093/femsmc/xtae030>
- Stashenko, E. E., Martínez, J. R., Ruíz, C. A., Arias, G., Durán, C., Salgar, W., & Cala, M. (2010). *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. *Journal of Separation Science*, 33(1), 93–103. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900452>

- Suárez, L., Pereira, A., Hidalgo, W., & Uribe, N. (2021). Antibacterial, antibiofilm and anti-virulence activity of bioactive fractions from mucus secretion of giant african snail *Achatina fulica* against *Staphylococcus aureus* strains. *Antibiotics*, *10*(12). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121548>
- Sultan, I., Rahman, S., Jan, A. T., Siddiqui, M. T., Mondal, A. H., & Haq, Q. M. R. (2018). Antibiotics, resistance and resistance mechanisms: A bacterial perspective. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 9, Issue SEP). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02066>
- Tang, C., Chen, J., Zhang, L., Zhang, R., Zhang, S., Ye, S., Zhao, Z., & Yang, D. (2020). Exploring the antibacterial mechanism of essential oils by membrane permeability, apoptosis and biofilm formation combination with proteomics analysis against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, *310*(5). <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2020.151435>
- Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Shafi, K., Bhat, M. A., Prabhakar, A., Shalla, A. H., & Rather, M. A. (2019a). A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. In *Microbial Pathogenesis* (Vol. 134). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103580>
- Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Shafi, K., Bhat, M. A., Prabhakar, A., Shalla, A. H., & Rather, M. A. (2019b). A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. In *Microbial Pathogenesis* (Vol. 134). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103580>
- Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, *28*(3), 603–661. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>
- Trevisan, D. A. C., Campanerut-Sá, P. A. Z., da Silva, A. F., Batista, A. F. P., Seixas, F. A. V., Peralta, R. M., de Sá-Nakanishi, A. B., de Abreu Filho, B. A., Junior, M. M., & Mikcha, J. M. G. (2020). Action of carvacrol in *Salmonella typhimurium* biofilm: A proteomic study. *Journal of Applied Biomedicine*, *18*(4), 106–114. <https://doi.org/10.32725/jab.2020.014>
- Trösemeyer, J. H., Rudolf, S., Loessner, H., Hofner, B., Reuter, A., Schulenburg, T., Koch, I., Bekeredjian-Ding, I., Lipowsky, R., & Kamp, C. (2019). Optimizing the dynamics of protein expression. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43857-5>

- Valliammai, A., Sethupathy, S., Ananthi, S., Priya, A., Selvaraj, A., Nivetha, V., Aravindraja, C., Mahalingam, S., & Pandian, S. K. (2020). Proteomic profiling unveils citral modulating expression of IsaA, CodY and SaeS to inhibit biofilm and virulence in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, *158*, 208–221. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.231>
- Van Acker, H., & Coenye, T. (2017). The Role of Reactive Oxygen Species in Antibiotic-Mediated Killing of Bacteria. In *Trends in Microbiology* (Vol. 25, Issue 6, pp. 456–466). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.008>
- van Wolferen, M., Orell, A., & Albers, S. V. (2018). Archaeal biofilm formation. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 16, Issue 11, pp. 699–713). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0058-4>
- Vandenesch, F., Lina, G., & Henry, T. (2012). *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? In *Frontiers in cellular and infection microbiology* (Vol. 2, p. 12). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00012>
- Vanegas Múnera, J. M., Ocampo Ríos, A. M., Urrego, D. M., & Jiménez Quiceno, J. N. (2017). In vitro susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from skin and soft tissue infections to vancomycin, daptomycin, linezolid and tedizolid. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, *21*(5), 493–499. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2017.03.010>
- Vasudevan, R. (2014). Biofilms: Microbial Cities of Scientific Significance. *Journal of Microbiology & Experimentation*, *1*(3). <https://doi.org/10.15406/jmen.2014.01.00014>
- Vázquez-Sánchez, D., & Rodríguez-López, P. (2017). Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus*. In *Staphylococcus Aureus* (pp. 87–103). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809671-0.00005-X>
- Wang, C., Lu, H., Li, X., Zhu, Y., Ji, Y., Lu, W., Wang, G., Dong, W., Liu, M., Wang, X., Chen, H., & Tan, C. (2022). Identification of an anti-virulence drug that reverses antibiotic resistance in multidrug resistant bacteria. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *153*. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113334>
- Wasserman, E., & Taljaard, J. (2011). Update on infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Southern African Journal of Epidemiology and Infection*, *26*(2), 60–64. <https://doi.org/10.1080/10158782.2011.11441426>
- Weston, L. A., Bauer, K. M., & Hummon, A. B. (2013). Comparison of bottom-up proteomic approaches for LC-MS analysis of complex proteomes. *Analytical Methods*, *5*(18), 4615–4621. <https://doi.org/10.1039/c3ay40853a>

World Health Organization. (2014). *WHO_HSE_PED_AIP_2014.2_eng*.

World Health Organization. (2024). *WHO Bacterial Priority Pathogens List*.
<https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>

Xie, F., Li, G., Wang, Y., Zhang, Y., Zhou, L., Wang, C., Liu, S., Liu, S., & Wang, C. (2017). Pyridoxal phosphate synthases PdxS/PdxT are required for *Actinobacillus pleuropneumoniae* viability, stress tolerance and virulence. *PLoS ONE*, *12*(4).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176374>

Xie, Q. H., Tian-Liang, Li, B. Y., Yu, J. N., Zheng, Y., Du, S. S., & Borjigidai, A. (2023). Bioactivities of thymol and p-cymene from the essential oil of *Adenosma buchneroides* against three stored-product insects. *Environmental Science and Pollution Research*, *30*(51), 110841–110850. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-30068-9>

Xu, C. G., Yang, Y. B., Zhou, Y. H., Hao, M. Q., Ren, Y. Z., Wang, X. T., Chen, J. Q., Muhammad, I., Wang, S., Liu, D., Li, X. B., & Li, Y. H. (2017). Comparative proteomic analysis provides insight into the key proteins as possible targets involved in aspirin inhibiting biofilm formation of *Staphylococcus xylosus*. *Frontiers in Pharmacology*, *8*(AUG). <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00543>

Zhang, T., Liu, Z., Wang, H., Zhang, H., Li, H., Lu, W., & Zhu, J. (2023). Multi-omics analysis reveals genes and metabolites involved in *Bifidobacterium pseudocatenulatum* biofilm formation. *Frontiers in Microbiology*, *14*.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1287680>