

EFEECTO DE *O. BASILICUM* SOBRE *E. COLI*

ANÁLISIS METABÓLICO DE LAS RUTAS BIOSINTÉTICAS AFECTADAS EN
Escherichia coli POR TRATAMIENTO CON ACEITE ESENCIAL DE *Ocimum*
basilicum

Natalia Rocio Centeno Valderrama

Trabajo de grado para optar al título de Químico

Director

William Fernando Hidalgo Bucheli

Ph. D. en Química

Codirector

Marlon Yesid Cáceres Ortiz

Ph. D. en Ciencias Biomédicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2023

Dedicatoria

*A mi madre y mi padre, las personas a las que les debo
absolutamente todo en la vida.*

Agradecimientos

A Dios por la vida, por los planes que tiene para mí, y por permitirme esta oportunidad.

A mi madre Leonor, mi padre Enoc y mi hermana Sofía, mi hermoso núcleo familiar, por ser mi principal motivación, por su esfuerzo, y haber estado y estar siempre para mí. Todos a su manera, con su ayuda inagotable, se han hecho merecedores de disfrutar este título conmigo.

A aquellos integrantes de mi familia y amigos que me han acompañado y apoyado en todo el proceso, quienes me alivianaron la vida en muchas ocasiones, nunca me dejaron caer y han creído siempre en mí.

A mi director, William Hidalgo, y mi codirector, Marlon Cáceres, por la paciencia, ayuda, orientación y acompañamiento durante todo este trabajo, por la experiencia y los conocimientos aportados a mi crecimiento profesional y personal.

Al grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM), por abrirme las puertas y permitir la realización de este proyecto en sus instalaciones, a todos los compañeros asociados que conocí gracias a este, y a las amistades que me dejó.

¡Infinitas gracias!

Tabla de contenido

Resumen	6
Abstract	7
Introducción	8
Marco teórico	13
Marco conceptual	18
<i>Generalidades de E. coli</i>	18
<i>E. coli como patógeno</i>	19
<i>Antibióticos utilizados para tratamiento de infecciones causadas por E. coli</i>	24
<i>Aceites esenciales</i>	27
<i>Ocimum basilicum L.</i>	30
<i>Metabolómica</i>	34
Materiales y métodos	41
Materiales	41
<i>Cepas y condiciones de ensayos</i>	41
<i>Material vegetal y caracterización de aceites esenciales</i>	41
Métodos	42
<i>Determinación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de Ocimum basilicum frente a Escherichia coli.</i>	42
<i>Extracción de metabolitos de células de cultivo</i>	43
<i>Análisis de extractos metabólicos por UHPLC-ESI-Orbitrap-HRMS</i>	44
<i>Análisis de los datos</i>	45
<i>Análisis estadístico</i>	46
Resultados y discusión	47
<i>Determinación de la CMI del aceite esencial de O. basilicum sobre E. coli</i>	47
<i>Análisis metabólico del efecto del AE sobre el crecimiento de E. coli ATCC 11775 con un enfoque no dirigido.</i>	47

Análisis de las vías metabólicas posiblemente alteradas por efecto del AE sobre el crecimiento de <i>E. coli</i> ATCC 11775	53
Conclusiones	58
Bibliografía	59

Índice de tablas

Tabla 1. Estudios realizados con aceites esenciales basados en metabolómica sobre diferentes microorganismos patógenos	16
Tabla 2. Concentraciones mínimas inhibitorias de <i>Ocimum basilicum</i> (AE) reportado por diferentes autores en ensayos experimentales contra <i>Escherichia coli</i>	34
Tabla 3. Composición química del AE de OB y su CMI sobre <i>E. coli</i>	47
Tabla 4. Metabolitos (presuntivamente identificados) significativamente alterados por el efecto del AE sobre el crecimiento de <i>E. coli</i> ATCC 11775	51
Tabla 5. Análisis de enriquecimiento de vías metabólicas afectadas por el AE de OB sobre el crecimiento de <i>E. coli</i> con metabolitos presuntivamente identificados	54

Índice de figuras

Figura 1. Distribución geográfica de algunos marcadores de resistencia de interés en salud pública	23
Figura 2. Cromatograma obtenido por GC/MS de componentes volátiles encontrados en el aceite de albahaca (1000 µg/mL en acetona).....	32
Figura 3. Cromatograma típico de los componentes del AE de <i>O. basilicum</i>	33
Figura 4. Diagrama de niveles de certeza en la identificación de metabolitos propuestos por la Sociedad de metabolómica	40
Figura 5. Análisis de componentes principales (PCA) y de cuadrados mínimos parciales discriminante PLS-DA de los resultados obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS de muestras control versus muestras con tratamiento en el enfoque no dirigido	49
Figura 6. Gráfico de volcano de los datos obtenidos por LC/MS	50
Figura 7. Mapa de calor (Heatmap) de los metabolitos más representativos que se vieron significativamente afectados en <i>E. coli</i> después del tratamiento con OB	53

Figura 8. Posibles rutas metabólicas alteradas en E. coli tras tratamiento con OB 55

Resumen

Las enfermedades ocasionadas por bacterias infecciosas cada vez son de mayor preocupación a nivel global debido al rápido avance que tienen estos microorganismos en sus mecanismos de adaptación, convirtiéndose en patógenos fácilmente resistentes a múltiples antibióticos. La búsqueda de nuevas estrategias antimicrobianas se hace imprescindible en este escenario, para consolidar novedosos tratamientos que logren minimizar el impacto negativo a la salud de manera efectiva. Productos naturales, tales como los aceites esenciales de algunas plantas comunes, han demostrado tener excelentes proyecciones en este campo. En el presente estudio, se evaluaron con estudios metabolómicos no dirigidos las posibles rutas biosintéticas afectadas en células planctónicas de *Escherichia coli* ATCC 11775 mediante un tratamiento con aceite esencial de *Ocimum basilicum*, por medio de, inicialmente, la determinación de la actividad antibacteriana, en la que se estableció una concentración mínima inhibitoria de 0,30 mg/mL, seguido de la extracción de metabolitos de las células de cultivo y posterior análisis de extractos metabólicos mediante la técnica analítica UHPLC-ESI-Orbitrap-MS, y finalizando con un análisis metabólico del efecto del aceite esencial sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 11775, en el que se encontraron afectaciones en diferentes vías metabólicas, principalmente, en el metabolismo de arginina y prolina. Los resultados obtenidos brindan una noción sobre el posible mecanismo de acción del aceite esencial de *Ocimum basilicum* sobre

EFEECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

Escherichia coli y fomentan la continuación del estudio de la actividad de los AE contra microorganismos patógenos como productos antibacterianos de origen natural.

Abstract

Diseases caused by infectious bacteria are increasingly of greater global concern due to the rapid progress of these microorganisms in their adaptation mechanisms, becoming pathogens that are easily resistant to multiple antibiotics. The search for new antimicrobial strategies is essential in this scenario, to consolidate novel treatments that effectively minimize the negative impact on health. Natural products, such as the essential oils of some common plants, have shown to have excellent prospects in this field. In the present study, the possible biosynthetic pathways affected in planktonic cells of *Escherichia coli* ATCC 11775 by treatment with essential oil of *Ocimum basilicum* were evaluated with undirected metabolomic studies using, initially, the determination of the antibacterial activity, in which a minimum inhibitory concentration of 0.30 mg/mL was determined, followed by the extraction of metabolites from cultured cells and subsequent analysis of metabolic extracts using the UHPLC-ESI-Orbitrap-MS analytical technique, and finishing with a metabolic analysis of the effect of essential oil on the growth of *Escherichia coli* ATCC 11775, in which effects on different metabolic pathways were found; mainly, in the metabolism of arginine and proline. The results obtained provide an idea about the possible mechanism of action of the essential oil of *Ocimum basilicum* on *Escherichia*

coli and encourage the continuation of the study of the activity of EOs against pathogenic microorganisms as antibacterial products of natural origin.

Introducción

Las infecciones ocasionadas por bacterias en el cuerpo humano son objeto constante de investigación debido a que sus efectos pueden llegar a ser muy graves para el organismo, lo que adicionalmente incrementa los tiempos de estancia hospitalaria de los pacientes, y se ve reflejado en un mayor gasto económico en salud pública [Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2006].

Escherichia coli (*E. coli*), es una bacteria anaerobia facultativa comensal, la cual es abundante en el tracto gastrointestinal humano, pues junto a otros microorganismos se encuentra asociada al correcto funcionamiento de la digestión (Allocati *et al.*, 2013). Este microorganismo, también participa en la producción de vitaminas B y K (Al-Zyoud *et al.*, 2019). Sin embargo, se han descrito diferentes cepas que por procesos de evolución y adaptación se han convertido en bacterias virulentas, con efectos dañinos y negativos para el ser humano, expresándose patogénicamente en distintas cepas que generan enfermedades con síntomas muy variados (Sokurenko *et al.*, 1998). Esto, hace que la sintomatología no sea específica y, por lo tanto, la detección del microorganismo se haga compleja. Existen cepas asociadas a infecciones gastrointestinales, denominadas *E. coli* diarreogénicas o intestinales, mientras que las asociadas a infecciones en otros aparatos y sistemas son denominadas *E. coli* patogénicas

EFECTO DE *O. BASILICUM* SOBRE *E. COLI*

extraintestinales (ExPEC) (Pitout, 2012). La alta morbilidad, prevalencia y variedad en cuadros sintomáticos asociados a *E. coli*, junto con el preocupante y rápido aumento en su resistencia hacia diferentes antibióticos comerciales, hacen de esta bacteria uno de los agentes patógenos de mayor relevancia para el ser humano.

Debido a lo anterior, el mundo se ha enfrentado a una creciente necesidad de encontrar novedosas alternativas que controlen el crecimiento de *E. coli* y demás bacterias patógenas. Entre las nuevas estrategias antibióticas, se encuentran los productos naturales, como los aceites esenciales (AE), los cuales generan efectos secundarios adversos mínimos (López, 2004). Los AE y los extractos orgánicos de plantas son bien conocidos por tener una amplia actividad biológica, menor impacto ambiental y alta aceptación por parte de los consumidores (Hanafi *et al.*, 2014; Jayasena & Jo, 2013; Solórzano-Santos & Miranda-Novales, 2012; Tajkarimi *et al.*, 2010). Estos compuestos se pueden utilizar en varias aplicaciones, incluidos alimentos crudos y procesados, productos farmacéuticos, medicina alternativa y terapias naturales (Solgi & Ghorbanpour, 2014).

Recientemente, se ha incrementado la evidencia que demuestra el potente efecto antibacteriano que poseen diferentes AE y extractos vegetales sobre microorganismos patógenos como *Salmonella*, *E. coli*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, entre otros (Chraibi *et al.*, 2021; El-Zehery *et al.*, 2022; Imane *et al.*, 2020; Leite de Souza, 2021; Soulimani *et al.*, 2021). Estas bacterias pueden asociarse a enfermedades respiratorias, infecciones urinarias y del torrente sanguíneo, etcétera. (Centers for Disease Control

EFECTO DE *O. BASILICUM* SOBRE *E. COLI*

and Prevention (CDC)., 2011). Dicho conocimiento es particularmente importante para determinar el efecto de diferentes alternativas naturales en microorganismos, su funcionamiento en combinación con otros compuestos antimicrobianos y su interacción con los componentes de la matriz celular (Chouhan *et al.*, 2017). Sin embargo, son pocos los estudios metabolómicos reportados que permitan comprender el modo de acción y actividad de estos compuestos sobre las células bacterianas, describiendo el posible mecanismo de acción de los AE y su correlación con las diferentes rutas metabólicas presentes en los microorganismos.

La investigación de las rutas metabólicas activadas o inhibidas en el proceso, resulta muy importante para conocer el efecto del AE sobre las diferentes vías metabólicas del microorganismo, lo cual permite entender el proceso que ocurre dentro de la célula y proporciona nuevas rutas y conocimiento para continuar buscando posibles alternativas antimicrobianas contra *E. coli* y otras bacterias patógenas. En el presente trabajo, se evaluaron las variaciones a nivel metabólico producidos por un AE obtenido de la planta *Ocimum basilicum* (OB) sobre *E. coli* en estado planctónico. Los resultados obtenidos permitieron proponer los posibles mecanismos de acción del AE sobre el microorganismo.

La importancia del estudio de *E. coli* como patógeno capaz de ocasionar casos aislados de diarrea o gastroenteritis, especialmente en países en desarrollo (Troeger *et al.*, 2017), se ve acrecentada con los datos que muestran que, anualmente, ocurren aproximadamente dos millones de muertes debido a *E. coli* enteropatógena, de las

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

cuales el 90 % se encuentran asociadas a niños menores de cinco años (Jang *et al.*, 2017). La importancia epidemiológica de *E. coli* varía según la región geográfica (Croxen *et al.*, 2013). Los estudios también han demostrado que factores como el estado de salud del huésped, así como las condiciones ambientales, geográficas y sociales, podrían influir en la distribución de grupos filogenéticos de *E. coli* patógena en humanos y animales (Derakhshandeh *et al.*, 2013; Gordon & Cowling, 2003). Aunque es una bacteria con menor impacto en la salud en países desarrollados, es frecuente en todo el mundo. Colombia, como varias otras naciones latinoamericanas, al seguir en desarrollo poseen especialmente un mayor riesgo de propagación de infecciones bacterianas como la causada por *E. coli* (World Health Organization, 1999), esto debido a la falta de acceso a agua potable debidamente tratada y al saneamiento deficiente de diferentes alimentos, sobre todo en lugares donde se lleva un estilo de vida con escasos recursos, y en zonas de pobreza extrema en la región.

Aunque puede haber una falsa impresión de que las infecciones bacterianas son un tema resuelto en la medicina moderna, la realidad es que siguen siendo causas importantes de enfermedad y muerte (Rubey & Brenner, 2021). La terapia antimicrobiana resulta primordial y, sin embargo, durante décadas, no se han evidenciado avances significativos en el desarrollo de nuevos tratamientos avanzados para enfermedades infecciosas (O'Neil, 2021). De acuerdo con este precedente, resulta importante dilucidar la manera de interrumpir el crecimiento de microorganismos patógenos abordando a su vez el problema creciente de la resistencia a los antimicrobianos, pues esto puede dar paso a encontrar novedosas estrategias

EFECTO DE *O. BASILICUM* SOBRE *E. COLI*

terapéuticas que contribuyan a erradicar los efectos negativos que tienen las bacterias como *E. coli* patógena en el ser humano.

La presente investigación se enfocó en estudiar los posibles mecanismos de acción antibacteriana del AE de OB sobre cepas del microorganismo patógeno *E. coli* ATCC 11775 mediante metabolómica no dirigida, teniendo en cuenta que los AE contienen una amplia variedad de metabolitos secundarios que son capaces de inhibir o retardar el crecimiento de bacterias, levaduras y mohos. Los AE y sus constituyentes tienen actividad contra una variedad de dianas bacterianas, particularmente, la membrana y el citoplasma, y en algunos casos, cambian por completo la morfología celular (Nazzaro *et al.*, 2013). De esta manera, es indispensable la comprensión del funcionamiento de los AE y sus posibles aplicaciones futuras con el fin de encontrar nuevas alternativas naturales que conduzcan a la formulación y diseño de un tratamiento para las infecciones ocasionadas por estos microorganismos; dado el incremento en la prevalencia de cepas resistentes a antibióticos. Lo anterior, representa un reto para la comunidad médica y científica, considerando que la mayor parte de análisis realizados hasta el momento sobre estas potenciales estrategias no profundizan lo suficiente como para entender el funcionamiento y actuación específicos de los AE en los procesos metabólicos de la bacteria.

Marco teórico

Estado del arte

Los inicios del uso de plantas de forma medicinal por el ser humano fueron instintivos, como en el caso de los animales. Existe gran cantidad de evidencias en monumentos preservados y documentos escritos de que el hombre utilizaba diversas plantas en la búsqueda de curas para las enfermedades o dolencias que presentaban. La era de la experimentación y las curaciones de forma empírica termina con la llegada de la iatroquímica en el siglo XVI, promovida por Paracelso. Esta, es conocida como la rama precursora de la química farmacológica y la bioquímica, en la que se buscaba explicar químicamente patologías y proporcionar tratamientos con compuestos y sustancias químicas (Szabadváry, 1966).

No obstante, en la actualidad, debido a algunas disminuciones en la eficacia de las drogas sintéticas y el aumento en los efectos adversos y contraindicaciones que estas presentan, el estudio de nuevas y posibles drogas naturales y/o basadas en plantas vuelve a ser un tema de mucho interés en la comunidad médica y científica. Esto también se debe a la dificultad para encontrar nuevos tratamientos o terapias para infecciones y el desarrollo lento de nuevas drogas en el mercado, al ser un proceso

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

laborioso que requiere una gran inversión de capital, recursos, y tiempo (Bess *et al.*, 2022).

Como compuestos principales o candidatos, los productos naturales históricamente han proporcionado puntos de partida cruciales en el desarrollo de fármacos (Wencewicz, 2016). Las plantas producen una gran variedad de metabolitos secundarios, muchos de los cuales tienen función protectora contra predadores y patógenos microbianos, gracias a sus características biocidas y de repelencia a herbívoros (Bassolé & Juliani, 2012). Dentro de estos metabolitos secundarios se conocen actualmente miles de AE distintos, de estos, aproximadamente 300 son importantes a nivel comercial e industrial, debido a su sabor y fragancia, siendo utilizados principalmente en la industria de alimentos y la perfumería (Bassolé & Juliani, 2012). La actividad antimicrobiana de los AE se atribuye principalmente a la presencia de fenilpropanoides, que componen una parte importante en muchos AE extraídos de plantas medicinales (Imane *et al.*, 2020).

Hoy en día, existe amplia variedad de evidencia científica, en la que se expone la actividad antibacteriana tan eficaz que tienen los AE extraídos de plantas sobre diversas bacterias patógenas diferentes (Aleksic Sabo & Knezevic, 2019a; Atif *et al.*, 2020; Bouyahya *et al.*, 2019; Esmael *et al.*, 2020; Houdkova *et al.*, 2018; Larrazabal-Fuentes *et al.*, 2019; Snene *et al.*, 2020). La ventaja de los AE sobre otros antimicrobianos radica en el hecho de que ofrecen una amplia capacidad antibacteriana sin inducir la producción de mecanismos de resistencia en la bacteria (Sienkiewicz *et*

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

al., 2017; Yang *et al.*, 2015). Además, los estudios sobre una serie de líneas celulares de cáncer humano han demostrado que también tienen efectos antiinflamatorios e inmunoestimuladores, así como actividad supresora del cáncer (Cavanagh & Wilkinson, 2005; Edris, 2007; Reichling *et al.*, 2009; Serafino *et al.*, 2008; Trombetta *et al.*, 2005). Así mismo, se ha encontrado actividad antidepresiva y ansiolítica (Benites *et al.*, 2013), antiasmática (Hernández *et al.*, 2018), anticonvulsiva (Randrianarivo *et al.*, 2016), antiparasitaria (Bandeira *et al.*, 2017), mosquitocida y efecto pesticida y repelente (Chellappandian *et al.*, 2018).

En los últimos años, un número creciente de estudios muestran que algunos compuestos de fuentes naturales poseen propiedades antibacterianas (Hajji *et al.*, 2019; Jiang *et al.*, 2020). Los AE son promisorios para convertirse en pilares químicos antibacterianos, que podrían utilizarse estratégicamente en el diseño y desarrollo de nuevos antibióticos. Sin embargo, aunque la evidencia de la actividad antimicrobiana de los AE es extensa, actualmente existen limitados avances en investigaciones metabolómicas relacionadas concretamente con el efecto puntual de los AE sobre microorganismos patógenos como *E. coli*, en los que se logre verdaderamente dilucidar las posibles afectaciones que se dan al interior de la célula en el proceso, remarcando la necesidad que existe de llenar el vacío en este campo del conocimiento mediante investigación orientada específicamente al análisis metabólico de las rutas biosintéticas posiblemente afectadas en microorganismos patógenos por tratamiento con AE. Algunos de los estudios metabolómicos relacionados con el efecto antibacteriano de diferentes AE, muestran resultados como afectaciones a la membrana celular y perturbaciones en el

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

metabolismo de aminoácidos (Chen *et al.*, 2020), inhibición de motilidad celular e intercambio de material transmembrana (Chen *et al.*, 2022), inhibición del metabolismo respiratorio correspondiente con alteraciones encontradas en el metabolismo central de carbono (He *et al.*, 2022), entre otros.

Lo anterior, enmarca una importante recopilación de datos que proveen información valiosa y relevante para seguir investigando el campo de la metabolómica para, en este sentido, prevenir el continuo desarrollo de la resistencia de bacterias a los agentes antimicrobianos.

Algunos estudios realizados con AE en materia de metabolómica sobre diferentes microorganismos patógenos se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 1. Estudios realizados con aceites esenciales basados en metabolómica sobre diferentes microorganismos patógenos.

Metodología utilizada	Aceite esencial extraído	Patógeno estudiado	Resultado obtenido	Referencia
Metabolómica no dirigida/SEM	Aceite esencial de <i>Guatteria citriodora</i> Ducke	Bacterias Gram Positivas: <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> . Bacterias Gram Negativas: <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Salmonellae enterica</i> . Fungi: <i>Alternaria alternata</i>	Inhibición del crecimiento de las bacterias. Actividad antifúngica inhibiendo crecimiento del hongo patógeno.	(de Souza <i>et al.</i> , 2022)

EFEECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

Metabolómica no dirigida/GC/MS	158 aceites esenciales comercialmente disponibles utilizados de varios proveedores	Bacterias Gram Positivas: <i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Enterococcus faecalis</i> . Bacterias Gram Negativas: <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Levaduras: <i>Candida albicans</i> y <i>Cryptococcus neoformans</i>	El eugenol contribuyó a la actividad antibacteriana de los aceites frente a todos los microorganismos analizados. El α -pineno, el limoneno y el sabineno se identificaron como compuestos que propiciaron poca actividad antibacteriana.	(Maree et al., 2014)
Metabolómica no dirigida/GC/MS	Aceite esencial de <i>Amomum villosum</i> Lour	<i>Staphylococcus Aureus</i> resistente a metilicina	Inducción de muerte celular al provocar una disfunción metabólica energética en la bacteria.	(Tang et al., 2021)
Metabolómica no dirigida/SEM/TEM/GC/MS	Aceite esencial de <i>Cinnamomum camphora</i> L. Presl.	<i>Staphylococcus Aureus</i> resistente a metilicina, <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Salmonella gallinarum</i> y <i>Escherichia coli</i>	Daño a la morfología celular. Inducción de muerte celular. La tasa de apoptosis de <i>Staphylococcus Aureus</i> aumenta de manera dependiente con la concentración del aceite esencial.	(Chen et al., 2020)
Metabolómica no dirigida/SEM/GC/MS	Aceite esencial de rizomas de <i>Zingiber officinale</i>	Fungi: <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Pyricularia oryzae</i> , <i>Colletotrichum falcatum</i> , <i>Ganoderma boninense</i> y <i>Rigidoporus microporus</i> . Bacterias: <i>Xanthomonas oryzae pv.</i> , <i>Ralstonia solanacearum</i> , <i>Bacillus sp.</i> y <i>Klebsiella sp.</i>	Inhibición del crecimiento de los fitopatógenos.	(Abdullahi et al., 2020)

Metabolómica no dirigida/UPLC -QTOF-MS	Aceite esencial de tomillo y canela	<i>Salmonella enterica</i> serovar Thyphimurium	Usando dosis subletales se encontró un desarrollo de resistencia en la bacteria con distintos mecanismos. (Chen <i>et al.</i> , 2022)
---	--	--	---

Marco conceptual

Generalidades de E. coli

E. coli es una bacteria gramnegativa de la familia Enterobacteriaceae. El análisis de 16rRNA muestra que pertenece a la subclase de proteobacterias γ , misma que se encuentra muy relacionada con las otras proteobacterias (α , β , δ) y con las cianobacterias (Logan, 1994). La subclase de proteobacterias γ , incluye además a organismos patógenos de humanos, como son Shigella, Salmonella, Vibrio y Haemophilus. Las bacterias de la familia Enterobacteriaceae se caracterizan por ser capaces de respirar facultativamente: anaeróticamente en el interior del intestino y aeróticamente en el ambiente exterior. Debido a esta capacidad muchos de los miembros de esta familia son de vida libre, mientras que otros son principalmente comensales de animales invertebrados y vertebrados o son patógenos de plantas (Logan, 1994).

E. coli es posiblemente uno de los microorganismos más estudiados a nivel mundial, ya que se ha utilizado en el estudio de aspectos bacterianos genéticos y fisiológicos. Su genoma completo y su biología general se conocen desde hace algunos años (Blattner

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

et al., 1997; Neidhardt *et al.*, 1987, 1996). También ha sido utilizada como organismo modelo en estudios de evolución experimental y genética de poblaciones para entender la acción de las diferentes fuerzas evolutivas a corto y largo plazo (Papadopoulos *et al.*, 1999; Souza *et al.*, 2001).

Es importante tener en cuenta que *E. coli* se transmite a los seres humanos principalmente por el consumo de alimentos contaminados, como productos de carne cruda o poco cocida, leche cruda, y hortalizas o semillas germinadas crudas contaminadas por materia fecal. Asimismo, la contaminación fecal del agua, y la contaminación cruzada durante la preparación de alimentos también es causa de infecciones. Los contactos de persona a persona son una forma de transmisión importante por vía oral-fecal. Se ha informado de un estado de portador asintomático, en el que la persona no muestra signos clínicos de la enfermedad, pero puede infectar a otros (World Health Organization, 2018).

E. coli como patógeno

Existen muchas enfermedades en el ser humano que pueden producirse debido a infecciones ocasionadas por bacterias. *E. coli* es un microorganismo fundamental a tener en cuenta cuando se trata con enfermedades gástricas importantes, estando asociado principalmente con diarreas, aunque también puede resultar en enfermedades más graves como el síndrome urémico o la colitis hemorrágica (Donnenberg & Kaper, 1992).

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

El cuadro clínico originado por *E. coli* es considerado una enfermedad emergente, puesto que hasta el año 1993 no se reconocería como un peligro para la salud pública, siendo que en ese año ocurrió un evento en el cual extrañamente muchos niños se presentaron con fallas renales en hospitales de Seattle, Washington y lugares aledaños, con fuertes diarreas con sangre. Algunos niños fallecieron también con síntomas similares en otras partes de Estados Unidos. El común denominador en los casos fue el consumo de carne de hamburguesa contaminada con *E. coli* de una misma cadena de comidas rápidas (Knight, 1993)

Bassett & McClure (2008), informaron que los patógenos originarios de verduras y hortalizas frescas causaron 554 enfermedades transmitidas por alimentos en Estados Unidos entre 1990 y 2003. Esta cantidad es mayor que el número de enfermedades transmitidas por alimentos causadas por bacterias patógenas encontradas en la carne de aves, en el mismo período (1990-2003). Singh *et al.*, (2002) declararon que la mayoría de las enfermedades transmitidas por alimentos son causadas especialmente por *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* y *Salmonella spp.* encontrados en vegetales y frutas. Gleeson & O'Beirne, (2005) revelaron que se aisló *E. coli* O157:H7 en investigaciones realizadas con hortalizas de hoja, repollo, tomate, frijol y rábano. Odumeru *et al.*, (1997) afirmaron que, los brotes de origen alimenticio de *E. coli* O157:H7, se debieron al consumo de lechuga y ensaladas de verduras. Varias investigaciones indicaron que, los AE significativamente disminuyen los recuentos de bacterias patógenas de los

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

alimentos, especialmente *E. coli* O157:H7, *Shigella dysenteria*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* (Burt, 2004; Ceylan & Fung', 2004).

Debido a sus mecanismos de patogenicidad y la afectación en el huésped, *E. coli* puede clasificarse según cómo interactúa con el epitelio intestinal. Entre ellas, se destacan:

E. coli enterotoxigénica (ETEC), considerada el prototipo de *E. coli* diarreico, se establece en la superficie de la mucosa intestinal mediante fimbrias. Constituye una causa frecuente de “diarrea del viajero” y se ha asociado con diarrea en niños menores de cinco años de países en vía de desarrollo (Sweeney *et al.*, 1996).

E. coli enteropatogénica (EPEC) causa un patrón característico de lesión localizada en el tracto intestinal, donde se adhiere al tejido y elimina las vellosidades existentes. Esta cepa en especial es muy virulenta, pudiendo llegar a causar incluso la muerte (Kaper *et al.*, 2004).

E. coli enteroagregativa (EAEC) causa diarrea persistente en niños. Produce toxinas, se adhiere al intestino delgado, pero no es invasiva (Cravioto *et al.*, 1991).

E. coli enteroinvasiva (EIEC) puede causar diarrea líquida, y en algunas ocasiones invadir el intestino. Produce una enfermedad muy similar a la shigelosis (Kaper *et al.*, 2004).

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

E. coli enterohemorrágica (EHEC) genera adherencia a la íntima de la célula huésped (Visbal *et al.*, 2001). Es productora de verotoxina, una exotoxina similar en estructura y actividad a la toxina Shiga producida por *Shyella dysenteriae*, la cual puede ocasionar gran daño al epitelio intestinal incluso dando lugar a enfermedades diarreicas con sangre, y en otros pocos casos, provocar insuficiencia renal (Bryan *et al.*, 2015). Estas características la hacen altamente patógena.

E. coli difusamente adherente (DAEC) genera estructuras en las células epiteliales del intestino, las cuales absorben a la bacteria. Este microorganismo se ha asociado con diarrea líquida, especialmente, en niños (Beinke *et al.*, 1998; Salyers & Whitt, 1995).

Además, este microorganismo no sólo puede causar daños gastrointestinales, sino que también puede afectar el sistema urogenital, ocasionando infecciones. Estas cepas se contagian en sitios como colegios, centros de trabajo o recreacionales, siendo las más susceptibles niñas menores de diez años y mujeres entre 20 y 40 años. Dichas infecciones por cepas uropatógenicas son extrañas en hombres. Esta cepa puede causar cistitis, o pielonefritis si llega a invadir el riñón. De hecho, *E. coli* es la causa más frecuente de infección de las vías urinarias y contribuye a casi 90% de las infecciones primarias urinarias en mujeres jóvenes (Ejrnæs *et al.*, 2011; Orenstein & Wong, 1999).

En Colombia, por ejemplo, *E. coli* posee una incidencia notable, en la cual se presenta un mecanismo de resistencia mcr-1 (mecanismo de resistencia genético por el cual el gen mcr-1 confiere resistencia al antibiótico polipéptido colistina) recurrentemente.

Figura 1. Distribución geográfica de algunos marcadores de resistencia de interés en salud pública. Obtenido de: Instituto Nacional de Salud de la República de Colombia. “Informe de resultados de la vigilancia por laboratorio de resistencia antimicrobiana en infecciones asociadas a la atención en salud 2018” (Instituto Nacional de Salud de la República de Colombia, 2018).



Datos obtenidos del Instituto Nacional de Salud en Colombia evidenciaron la frecuencia de microorganismos en el servicio de UCI adulto, mostrando que *K. pneumoniae* y *E. coli* (17,4 % y 17,2 %, respectivamente) fueron los microorganismos más frecuentes; en UCI pediátrica fueron *E. coli*, *S. aureus* y *K. pneumoniae* (13,4 %, 12,3 % y 11,7 %, respectivamente) y en UCI neonatal fueron *S. epidermidis*, *E.coli* y *K. pneumoniae* (21,2 %, 14,9 % y 14,4 %, respectivamente). Para el servicio de hospitalización adulto se observó que *E. coli* y *K. pneumoniae* (28,4 % y 12,1 %, respectivamente) fueron los más frecuentes mientras que en hospitalización pediátrica

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

fueron *E. coli* y *S. aureus* (31,9 % y 16,1 %, respectivamente) (Instituto Nacional de Salud de la República de Colombia, 2018)

En cuanto al perfil de resistencia global de *E. coli* en UCI's del país, la resistencia a cefalosporinas de tercera generación (antibióticos activos contra algunas Enterobacteriaceae) fue muy similar en UCI adulto y pediátrica con porcentajes que variaron entre 14,5 % y 31 %, mientras que en UCI neonatal se presentaron porcentajes más bajos que estuvieron en el rango de 6,4 % a 13,7 %, (Instituto Nacional de Salud de la República de Colombia, 2018)

En cuanto al perfil de resistencia global de *E. coli* en áreas de hospitalización del país, la resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación fue más alta en el servicio de hospitalización adulto con porcentajes que alcanzaron 24 % y en hospitalización pediátrica 14,1% (Instituto Nacional de Salud de la República de Colombia, 2018).

Antibióticos utilizados para tratamiento de infecciones causadas por E. coli

Una parte fundamental del tratamiento para *E. coli* se basa en reducir los síntomas y prevenir la deshidratación, o en caso de ya estar presente, valorar su severidad y tratarla realizando reposición de líquidos y electrolitos. Se ha constatado que la administración de antibióticos acorta el tiempo de la enfermedad y la duración de excreción de *E. coli* ETEC en adultos en áreas endémicas y en la diarrea del viajero, aunque al haber un aumento en la tasa de resistencia a antibióticos, generalmente no se recomiendan

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

[Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2014]. El antibiótico para utilizar dependerá de los patrones de susceptibilidad de la bacteria en la región geográfica en la que se encuentre. Normalmente, los antibióticos de elección por excelencia son las fluoroquinolonas o la azitromicina.

Las fluoroquinolonas han demostrado ser muy eficaces en el tratamiento de la diarrea del viajero. Son bien absorbidas por vía oral. Las fluoroquinolonas tienen una larga vida media de eliminación, lo que permite su administración por una o dos dosis al día (Al-Abri *et al.*, 2005). Las fluoroquinolonas han demostrado en varios estudios una reducción de diarrea, con alivio de otros síntomas clínicos asociados (C. Ericsson *et al.*, 1987, 1997; Mattila *et al.*, 1993; Steffen *et al.*, 1993; Taylor, 1991). Una única dosis de un fármaco de fluoroquinolona es tan eficaz como tres días de tratamiento, excepto cuando los síntomas persisten o cuando hay síntomas de infección invasiva (C. Ericsson *et al.*, 1997; Keystone, 1994; Salam *et al.*, 1994). Los efectos secundarios de las fluoroquinolonas son pocos: pueden desarrollar ocasionalmente erupciones, fotosensibilidad y molestias gastrointestinales. El uso de fluoroquinolonas en el embarazo no está recomendado.

La azitromicina es una alternativa a las fluoroquinolonas. La azitromicina tiene buena actividad *in vitro* contra muchos patógenos entéricos. Es al menos ocho veces más activa que la eritromicina contra las bacterias patógenas entéricas más comunes. La azitromicina es generalmente segura y bien tolerada y puede ser utilizada en niños

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

pequeños (Ruuskanen, 2004), pero no ha sido autorizada para su uso durante embarazo a menos que no haya otra alternativa disponible.

Como otra opción se presenta la rifaximina oral, un derivado semisintético de la rifamicina. Es un antibacteriano eficaz y bien tolerado para el tratamiento de adultos con diarrea del viajero no invasiva, mas es ineficaz en el tratamiento de pacientes infectados con *E. coli* enteropatógeno inflamatorio o invasivo (Al-Abri *et al.*, 2005).

Algunos fármacos antiseoretos y antimotilidad reducen el número de deposiciones de un 29% a 65%, pero no curan la enfermedad diarreica. El salicilato de bismuto posee propiedades antisecretoras, antibacterianas y antiinflamatorias, pudiendo ser utilizado como profilaxis (Cornick *et al.*, 1990; Graham & Evans, 1990; Steffen *et al.*, 1986) aunque no es lo suficientemente efectivo para ser utilizado como tratamiento (DuPont *et al.*, 1977).

La loperamida es el fármaco antimotilidad de elección (van Loon *et al.*, 1989). Se absorbe rápidamente y reduce el número de deposiciones de manera eficaz. Varios estudios han demostrado que combinar la loperamida con otros antibióticos produce un efecto sinérgico (C. D. Ericsson *et al.*, 1990, 1992). Sin embargo, la loperamida también resulta ineficaz cuando se trata de patógenos bacterianos invasivos y debe usarse con precaución en estas condiciones (DuPont & Hornick, 1973).

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

El cotrimoxazol (trimetoprima-sulfametoxazol) fue el fármaco de elección durante muchos años (C. D. Ericsson *et al.*, 1990, 1992), pero el aumento en la prevalencia de la resistencia bacteriana limitó su utilidad (Hoge *et al.*, 1998).

Es así que cada vez se presentan más dificultades en el tratamiento de microorganismos bacterianos debido a su creciente resistencia a los antibióticos comerciales, esto muchas veces debido a la mala utilización de los antibióticos en su administración oral no supervisada, por ejemplo, como consecuencia de la administración de más de un antimicrobiano y diferentes dosis de estos (Simoneit *et al.*, 2015). Lo anterior se ha convertido en una amenaza para la salud pública y un problema a nivel mundial ya que el paciente tiene cada vez menor acceso a nuevas alternativas y actualmente son escasas las iniciativas de crear nuevos antimicrobianos.

Aceites esenciales

Es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas que logren suplantar a los antibióticos disponibles en el mercado, pudiendo retardar la aparición o disminuir la propagación de organismos resistentes, y entre ellas, la atención se encuentra dirigida hacia soluciones de origen natural, como los AE.

Los AE, son productos destilados de plantas o especies vegetales como metabolitos secundarios, con distintas características organolépticas. Estos, constituyen sustancias volátiles obtenidas a partir de diferentes partes de la planta: flores, tallos, brotes,

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

semillas, hojas, raíces, frutos, madera y corteza (Stashenko *et al.*, 2010). Entre sus principales componentes se encuentran terpenos y compuestos oxigenados (Solomons *et al.*, 1988).

Los AE se han relacionado con actividad antibacteriana, antifúngica y antiviral, asociados a la presencia de terpenoides y aldehídos en su composición química (Raut & Karuppaiyil, 2014; Swamy *et al.*, 2016). Además, se ha demostrado que los AE presentan actividades antioxidantes, insecticidas y repelentes (Ainane *et al.*, 2019).

Oussalah *et al.*, (2006) también informaron que las actividades antimicrobianas de los AE están predominantemente relacionadas con sus componentes fenólicos. Asimismo, resaltaron la presencia de terpenos en los AE, los cuales son hidrófobos. Esto, les permite dividirse en los lípidos de la membrana celular bacteriana y las mitocondrias, llevando eventualmente a la perturbación de la membrana citoplasmática, la interrupción de la fuerza motriz de protones, flujo de electrones, transporte activo, y la fuga de material intracelular vital.

La actividad antibacteriana de los AE varía según el tipo de bacteria y la composición del AE. En general, las bacterias grampositivas presentan mayor susceptibilidad a compuestos antimicrobianos de los AE, en comparación con la de las bacterias gramnegativas; lo que se ha asociado a la falta de membrana externa en las primeras (Shojaee-Aliabadi *et al.*, 2017). Por otra parte, respecto a la composición, varios AE y sus principales constituyentes han sido profundamente estudiados. El componente

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

principal del aceite de hoja de canela estudiada por Friedman *et al.* (2000) es el eugenol, mientras que Ohno *et al.* (2003) encontraron en sus AE estudiados como compuestos más abundantes en aceite de limoncillo el neral y geranial, y en el aceite de albahaca el estragol.

Según Moreira *et al.* (2005), AE de eucalipto, árbol de té, romero, menta, clavo, limón, tomillo tipo orégano, pino y albahaca tienen efecto antimicrobiano sobre *E. coli* O157:H7.

Los AE, al demostrar sus significativas capacidades antibacterianas, han generado interés en investigar más la gran diversidad de aceites disponibles en diferentes partes del mundo y su aplicación contra una amplia variedad de bacterias patógenas. Entre estos, llaman la atención diversos tamizajes realizados para detección de los mejores AE por sus actividades contra estos microorganismos de importancia clínica, midiendo su capacidad inhibitoria mediante de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del AE.

La CMI se define como la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibirá el crecimiento visible de un microorganismo después de su incubación. Los laboratorios de diagnóstico utilizan la CMI principalmente para confirmar la resistencia, pero más a menudo como una herramienta de investigación para determinar la actividad *in vitro* de nuevos antimicrobianos (Andrews, 2001).

EFECTO DE *O. BASILICUM* SOBRE *E. COLI*

Para los AE extraídos de plantas, la edad de la planta, parte de la planta de la cual se extrae el aceite, etapa del desarrollo, lugar de origen del cultivo, período de la cosecha y quimiotipo, son factores que influyen en la vía biosintética de la planta (Barra, 2009; Stashenko *et al.*, 2010; Viuda-Martos *et al.*, 2011) y, por lo tanto, en la actividad antibacteriana que presentan, pudiendo entonces encontrar muy diferentes valores de CMI para determinado microorganismo patógeno con un mismo tipo de AE.

***Ocimum basilicum* L.**

La albahaca (*Ocimum basilicum* L.), miembro de la familia Lamiaceae, es una hierba anual que crece en varias regiones del mundo. Entre más de 65 especies del género *Ocimum*, la albahaca es el principal cultivo de AE que se produce comercialmente en muchos países (Sajjadi, 2006). La albahaca tiene un olor característico y un sabor fuerte. La planta probablemente tiene sus orígenes en países como India, Afganistán, Pakistán, e Irán, y hoy en día se cultiva en todo el mundo (Daneshian *et al.*, 2011).

La albahaca se ha utilizado ampliamente en los alimentos como agente saborizante y en las industrias médica y de perfumería (Telci *et al.*, 2006). Las hojas y las ramas floridas de la planta se conocen en la medicina popular como carminativas, galactógonas, estomacales y antiespasmódicas (Sajjadi, 2006). Otros usos de la albahaca como planta medicinal son el tratamiento de dolores de cabeza, ansiedad, repelente de mosquitos y mal funcionamiento de los riñones. Sin embargo, también se han investigado los usos potenciales del AE de *O.*

EFEECTO DE *O. BASILICUM* SOBRE *E. COLI*

basilicum, particularmente, como agentes antimicrobianos y antioxidantes (Lee *et al.*, 2005; Wannissorn *et al.*, 2005).

Los AE de *O. basilicum* exhiben una amplia gama de compuestos químicos, dependiendo de las variaciones en los quimiotipos, colores de hojas y flores, aroma y origen de las plantas (Silva *et al.*, 2003). Los principales constituyentes de sus quimiotipos más comunes incluyen chavicol metil éter o estragol, linalool y eugenol (Hussain *et al.*, 2008; Omidbaigi *et al.*, 2003). Los estudios en la literatura sugieren que el linalool es el principal agente activo responsable de la actividad antibacteriana (Ravid *et al.*, 1997) y otros estudios sugieren que esta planta es adecuada para usar como antibacteriano contra los microbios que corrompen los productos alimenticios (Politeo *et al.*, 2007).

Se han reportado más de 200 compuestos químicos en el AE de albahaca. Los componentes incluyen monoterpenos, sesquiterpenos y compuestos aromáticos. Los principales componentes del AE de albahaca incluyen linalool, estragol (metil chavicol), anetol, eugenol y metil eugenol, que varían según el quimiotipo. Los tres componentes principales de la albahaca dulce comúnmente cultivada en los Estados Unidos son linalool (7–59 %), estragol (5–29 %) y eugenol (2–12 %). Linalool, un monoterpenol, mostró una amplia gama de actividades biológicas como sedantes, alivio del estrés y efectos neurológicos (Li & Chang, 2016). El estragol posee un olor dulce, herbáceo, tipo anís-hinojo. Se utiliza en composiciones de fragancias y da una agradable nota aromática y anisada. El eugenol se utiliza en perfumerías, saborizantes y como medicamento antiséptico local (Li & Chang, 2016).

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

A continuación, se referencian cromatogramas típicos del aceite de albahaca reportados en la literatura, con sus respectivas identificaciones de componentes mayoritarios (Figuras 2 y 3):

Figura 2. Cromatograma obtenido por GC/MS de componentes volátiles encontrados en el aceite de albahaca (1000 $\mu\text{g/mL}$ en acetona). Identificación de picos: 1) α -pineno; 2) linalool; 3) *trans*-anetol; 4) 4-metoxi benzaldehído; 5) estragol; 6) 1-metoxi-4-(1-metoxipropil)-benceno; 7) *trans*-cariofileno; 8) 2,3-dihidro-1H-indeno-5-ol; 9) 1-(1,1-dimetil)-2-metoxi-4-metil-3,5-dinitrobenceno. Tomado de Li & Chang, (2016).

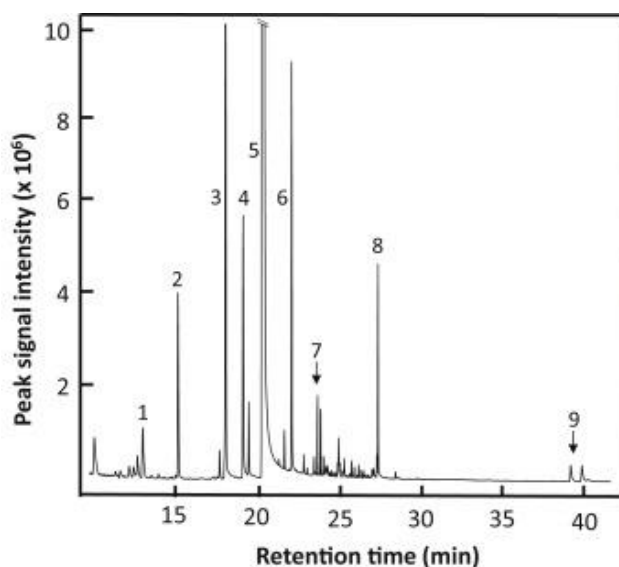


Figura 3. Cromatograma típico de los componentes del AE de *O. basilicum*. Tomado de Hussain *et al.*, (2008)

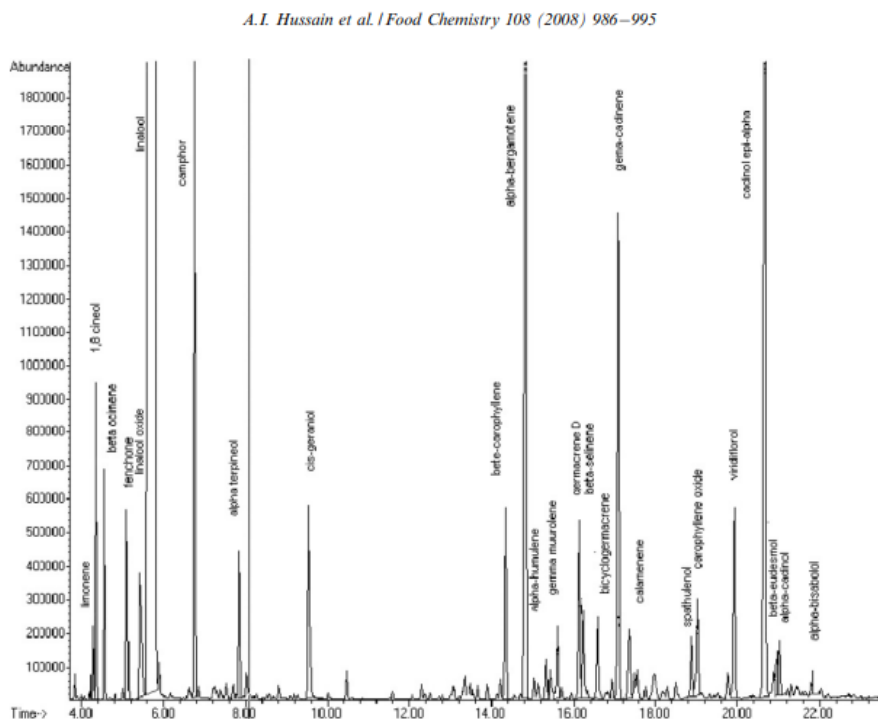


Fig. 3. Typical chromatogram of *Ocimum basilicum* essential oil components.

En cuanto a su actividad antibacteriana, OB presenta resultados prometedores. Las concentraciones mínimas inhibitorias de aceite de OB reportadas por Shirazi *et al.*, (2014) fueron 145,160 y 40,45 µg/mL contra las bacterias gramnegativas *Salmonella typhirium* y *E. coli*, y las bacterias grampositivas *S. aureus* y *Bacillus Subtilis*, respectivamente. El AE de OB mostró actividad contra *Streptococcus pneumoniae*, *Hemophilus influenzae*, *C. albicans* y *A. niger*, pero no contra *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas aeruginosa* (Srivastava *et al.*, 2014). Ouibrahim *et al.*, (2013) informaron efectos bacteriostáticos del aceite de albahaca en 20 cepas bacterianas Gram-positivas y Gram-negativas. Especies de *Vibrio* como *Vibrio parahaemolyticus* mostraron una alta sensibilidad al aceite de albahaca.

EFFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

A continuación, se presentan en la tabla 2, diversos reportes de CMI del AE de *OB* frente a *E. coli*.

Tabla 2. Concentraciones mínimas inhibitorias de *Ocimum basilicum* (AE) reportado por diferentes autores en ensayos experimentales contra *Escherichia coli*.

Nombre botánico de la planta	CMI contra <i>E. coli</i>	Cepa de <i>E. coli</i>	Autores
<i>Ocimum basilicum</i> L.	3200 mg/mL	ATCC 25922	(Thielmann <i>et al.</i> , 2019)
	8 µL/mL	ATCC 25922	(Sienkiewicz <i>et al.</i> , 2013)
	400 µg/mL	Biotype 1	(Ozdemir <i>et al.</i> , 2021)
	0,364 mg/mL	ATCC 25922	(Stefan <i>et al.</i> , 2013)
	9 µg/mL	PTCC 1535	(Daneshian & Mikaili, 2011)
	18 µg/mL	PTCC 1535	(Daneshian & Mikaili, 2011)
	200 mg/mL	CVCM 39	(Rivas <i>et al.</i> , 2015)

Metabolómica

A pesar de que existe bastante información en torno a la actividad antimicrobiana de los AE reportada por diferentes autores (Aleksic Sabo & Knezevic, 2019; Atif *et al.*, 2020; Bouyahya *et al.*, 2019; Esmael *et al.*, 2020; Houdkova *et al.*, 2018; Larrazabal-Fuentes *et al.*, 2019; Snene *et al.*, 2020), aún hay mucha deficiencia en información respecto a las posibles rutas de acción que utilizan los AE para inhibir la actividad de estas bacterias patógenas;

EFECTO DE *O. BASILICUM* SOBRE *E. COLI*

información que resulta sumamente importante para continuar avanzando en la búsqueda de diferentes alternativas antimicrobianas contra estos agentes infecciosos.

Como estrategia para la adquisición de estos datos, se encuentran las ciencias ómicas, en las cuales se realiza el estudio integral de las interacciones moleculares complejas que tienen lugar en los sistemas biológicos (Bedia, 2018). Entre ellas, se encuentra la metabolómica, la cual estudia, cuantifica e identifica compuestos de bajo peso molecular proporcionando una imagen de lo que sucede en el metabolismo (Blow, 2008), específicamente, los procesos químicos que involucran metabolitos como huellas únicas que van dejando los procesos celulares, y así, poder relacionarlos con cambios en la patogenicidad (Fiehn, 2002).

Los metabolitos son los sustratos, productos intermedios y productos finales del metabolismo. En metabolómica, un metabolito generalmente se define como una molécula de menos de 1,5 kDa de masa (Wishart *et al.*, 2007), aunque no siempre se cumple esto, al encontrar excepciones dependiendo del tipo de muestra y los métodos de detección a utilizar. El metaboloma entonces, se define como la suma de todos los metabolitos presentes en un sistema biológico en condiciones fisiológicas particulares (Witting, 2013). El análisis del metaboloma se puede realizar mediante dos enfoques: el primero, mediante metabolómica global o no dirigida, el cual tiene como objetivo proporcionar una visión general del metaboloma a través de la detección y cuantificación de tantos metabolitos como sea posible en un solo experimento, dentro de una muestra biológica dada. Esta, tiene un alcance global, y una forma de generación de hipótesis (Nalbantoglu, 2019). En el segundo, se habla de metabolómica dirigida, cuyo objetivo es detectar y cuantificar moléculas específicas conocidas, metabolitos químicamente caracterizados de rutas metabólicas y bioquímicamente anotados (Ghosson *et al.*, 2018; Lu *et al.*, 2008; Roberts *et al.*, 2012),

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

pudiendo centrarse en una o más rutas metabólicas relacionadas que sean consideradas relevantes. Generalmente esta última es una prueba de hipótesis y se utiliza para la validación de un análisis no dirigido (Nalbantoglu, 2019).

Los métodos químicos analíticos son importantes en el estudio de metabolitos, pues permiten detectar, identificar y cuantificar las variaciones metabolómicas en una condición dada (Zhan *et al.*, 2021). Inicialmente, los analitos contenidos en una muestra metabolómica suponen una gran y compleja mezcla, la cual puede ser simplificada antes de la detección mediante métodos de separación. Sin embargo, este paso no es obligatorio y puede omitirse en algunos análisis. Posteriormente, se realiza la detección de las variaciones metabolómicas y finalmente se utilizan métodos de análisis estadísticos multivariados para establecer modelos matemáticos e interpretar los resultados obtenidos (Kitteringham *et al.*, 2009).

Los métodos de detección que se utilizan más comúnmente en metabolómica son los métodos basados en espectrometría de masas (en inglés, MS) o resonancia magnética nuclear (en inglés, NMR) (Zhan *et al.*, 2021). MS se utiliza para identificar y cuantificar metabolitos después del paso opcional de separación de la muestra, aprovechando los distintos patrones en los que se fragmentan los analitos. Los patrones de fragmentación son considerados como una huella dactilar única espectral de masas, y existen bibliotecas espectrales que permiten la identificación de un metabolito de acuerdo con su patrón de fragmentación, como, por ejemplo, MassBank o NIST.

La cromatografía de gases (en inglés, GC), cuando se encuentra acoplada a la espectrometría de masas (en inglés, GC/MS), es una técnica ampliamente utilizada para análisis metabolómicos (Ogbaga *et al.*, 2016). La cromatografía de gases ofrece una alta resolución cromatográfica y se puede acoplar tanto a un detector de ionización de llama (en inglés,

EFEECTO DE *O. BASILICUM* SOBRE *E. COLI*

GC/FID) como a un espectrómetro de masas (GC/MS). Este método se considera un “estándar de oro” para detectar moléculas pequeñas y volátiles (Deda *et al.*, 2019). GC/MS consiste en utilizar la cromatografía de gases para la separación de moléculas, seguida del análisis de MS. Este método es adecuado para compuestos no polares y volátiles, cuyas ventajas son la disponibilidad de una base de datos para identificación, alta sensibilidad y alta reproducibilidad, y cuyas desventajas son solo detección de compuestos no polares y volátiles, requerimiento de derivatización de compuestos no polares y requerimiento de mayor cantidad de muestras (Zhan *et al.*, 2021). GC-MS puede medir variables de tiempo, m/z e intensidad (Mastrangelo *et al.*, 2015; Naz *et al.*, 2014).

La cromatografía líquida de alta eficiencia (en inglés, HPLC) es una de las técnicas más comunes en metabolómica, y puede ser acoplada a espectrometría de masas (en inglés, LC/MS). HPLC tiene una resolución cromatográfica más baja que GC, pero puede detectar un rango mucho más amplio de analitos (Gika *et al.*, 2007). LC/MS permite usar cromatografía líquida para la separación de moléculas, seguida de análisis MS. Este método es adecuado para compuestos polares y apolares. Sus ventajas son el requisito de una cantidad mínima de muestras, alta sensibilidad y flexibilidad en la química de la columna que amplía la gama de compuestos que se logran separar; y cuyas desventajas son la falta de suficientes bases de datos de metabolitos y el requisito de condiciones cromatográficas específicas para moléculas muy polares (Zhan *et al.*, 2021). LC/MS puede medir el tiempo de retención (t_R), m/z e intensidad (Kohler & Giera, 2017; Mizuno *et al.*, 2017; Naz *et al.*, 2014).

La cromatografía líquida de ultra alta eficiencia (en inglés, UHPLC) es una técnica de cromatografía líquida de alta resolución, que ha ganado popularidad en los últimos años debido a su capacidad para separar y analizar compuestos en muestras complejas con una alta

EFECTO DE *O. BASILICUM* SOBRE *E. COLI*

eficiencia y velocidad. Sin embargo, una de las diferencias más claras entre HPLC y UHPLC es que la primera puede manejar una unidad interna de presión de hasta 6000 psi, mientras que UHPLC puede manejar hasta 15000 psi. Debido a su mayor sensibilidad, UHPLC se puede usar para muestras más complejas, que pueden tener cantidades más bajas de varios componentes, por ejemplo, muestras biológicas (Alwsci Technologies, 2022).

Para el análisis por espectrometría de masas, los analitos deben recibir energía y transferirse a la fase gaseosa. La ionización electrónica (en inglés, EI) es la técnica de ionización más común que se aplica a las separaciones de GC al ser ambas compatibles con compuestos volátiles (Dass, 2007). La ionización por electrospray (en inglés, ESI), es la técnica de ionización más común aplicada en LC/MS (Dass, 2007). Esta ionización suave es idónea para moléculas polares con grupos funcionales ionizables. La ionización química a presión atmosférica (en inglés, APCI) es un método de ionización en fase gaseosa, que proporciona una ionización ligeramente más potente que ESI, y es adecuada para compuestos menos polares y térmicamente estables (Dass, 2007). Otro método de ionización es la desorción/ionización por láser asistida por matriz (en inglés, MALDI); sin embargo, MALDI se aplica tradicionalmente a biopolímeros de alta masa molecular, pues una matriz MALDI puede agregar un fondo excesivo a <500 Da que interfiere en el análisis de analitos de baja masa (Dass, 2007), como los metabolitos. Otros tipos de técnicas que pueden utilizarse para este fin son ionización por electrospray secundaria (en inglés, SESI), espectrometría de masas de iones secundarios (en inglés, SIMS), ionización por desorción con electrospray (en inglés, DESI), etc. (Dass, 2007). Más recientemente, las técnicas de trampa de iones, como la espectrometría de masas orbitrap, también se aplican a la investigación en metabolómica (Ghaste *et al.*, 2016).

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear es una técnica de detección que no se basa en la separación de los analitos y, por lo tanto, la muestra puede recuperarse para análisis posteriores. Todo tipo de metabolitos de moléculas pequeñas se pueden medir simultáneamente. Existen métodos de NMR unidimensionales, bidimensionales y tridimensionales (1D-NMR, 2D-NMR y 3D-NMR) (Kruk *et al.*, 2017), que se basan en utilizar la interacción de los espines nucleares en campos electromagnéticos para obtener información del entorno estructural, químico y molecular (Kruk *et al.*, 2017; Mizuno *et al.*, 2017). Sus ventajas son la no destrucción de la muestra, preparación mínima de la muestra, rendimiento relativamente alto, alta reproducibilidad y precisión cuantitativa (Markley *et al.*, 2017; Nagana Gowda & Raftery, 2015). Sin embargo, en la práctica, es relativamente insensible en comparación con las técnicas basadas en espectrometría de masas (Beckonert *et al.*, 2007; Griffin, 2003). En efecto, NMR y MS son las técnicas más utilizadas en metabolómica.

Se han empleado otros métodos de detección para llevar a cabo análisis metabolómicos. Estos incluyen resonancia de ciclotrón de iones por transformada de Fourier (Habchi *et al.*, 2018), espectrometría de movilidad de iones (King *et al.*, 2019), espectroscopía Raman y marcaje con radioisótopos (Jayan *et al.*, 2022), entre otros.

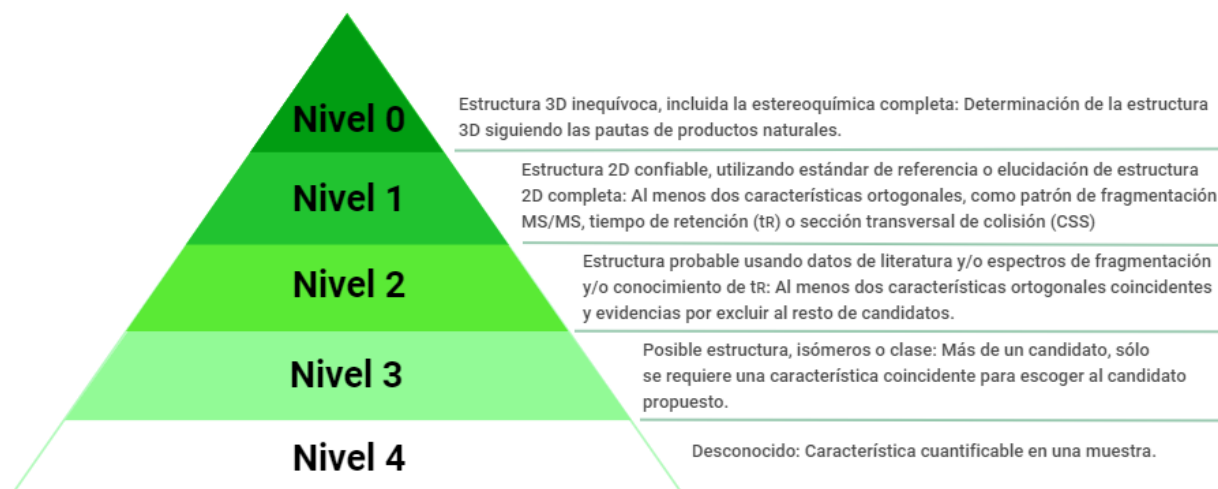
Actualmente, la metabolómica se ha convertido en un enfoque ampliamente utilizado en el descubrimiento de fármacos. El análisis metabolómico ayuda en la definición de la respuesta fisiológica, los marcadores de interacción directa con el target molecular, y en la elucidación del modo de acción de los fármacos candidatos bajo investigación (Alarcon-Barrera *et al.*, 2022).

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

Diversos estudios han demostrado la aplicación de técnicas metabolómicas para entender el metabolismo microbiano y los cambios producidos al interactuar con diferentes compuestos naturales (Chen *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020; Rempe *et al.*, 2017; Shu *et al.*, 2020; Tang *et al.*, 2021).

La Sociedad de Metabolómica, propone establecer unos determinados niveles de certeza en la identificación de metabolitos cuando se realizan estudios no dirigidos de la siguiente manera:

Figura 4. Diagrama de niveles de certeza en la identificación de metabolitos propuestos por la Sociedad de metabolómica. Tomado de Gil-De-La-Fuente *et al.* (2018).



En el presente estudio metabolómico no dirigido, se realizó una identificación con un alcance del nivel 3: Posible estructura.

Materiales y métodos

Materiales

Cepas y condiciones de ensayos

Se obtuvieron cepas de *Escherichia coli* ATCC 11775 de LabCare Medellín, Colombia. Como medio de cultivo se utilizó caldo Luria Bertani (LB) obtenido de Oxoid (Hampshire, Reino Unido). El dimetilsulfóxido (DMSO) utilizado como disolvente fue grado HPLC y adquirido en Merck (Darmstadt, Alemania). Las microplacas de 96 pozos de polipropileno de fondo plano con tapa fueron marca Biologix. Todos los ensayos de actividad antimicrobiana se realizaron con agua Milli-Q de 18,2 Ω de resistividad, extraída del kit Smart 2 Pure (Thermo Fisher Scientific, Helsinki, Finlandia).

Material vegetal y caracterización de aceites esenciales

El AE utilizado fue caracterizado y suministrado por el Centro Nacional de Investigación en Agroindustrialización de Plantas Aromáticas Medicinales Tropicales (CENIVAM), de la Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga, Colombia).

Métodos

Determinación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de Ocimum basilicum frente a Escherichia coli.

La determinación de la actividad antimicrobiana se realizó mediante pruebas de inhibición de crecimiento bacteriano determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) causada por el AE en la bacteria *E. coli* ATCC 11775. Para determinar el efecto antimicrobiano del AE se empleó el método de microdilución en caldo, estandarizado en el laboratorio (Cruz *et al.*, 2014) del Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM) de la Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga, Colombia), y la determinación de los valores de CMI se realizó utilizando placas de 96 pozos de polipropileno y fondo plano.

Para evaluar la actividad antimicrobiana del AE se preparó inicialmente un cultivo bacteriano en estado planctónico del microorganismo durante 24 h. Posteriormente, se verificó la viabilidad del cultivo y, a partir de este, se realizó un preinóculo de la bacteria en caldo Luria Bertani (LB), durante 12 h a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una concentración bacteriana adecuada (entre 10⁵ y 10⁶ UFC/mL). Se realizó la cinética de crecimiento empleando microplacas que contenían 100 µL del inóculo bacteriano junto con 100 µL de diluciones seriadas a diferentes concentraciones del AE disueltas en dimetilsulfóxido (DMSO). Las mediciones del ensayo se realizaron durante ocho horas a 37 °C con una agitación de 200 rpm en un lector de microplaca ELISA (Biorad, Imarck, California, EE. UU), utilizando una longitud de onda de 595 nm.

EFEECTO DE *O. BASILICUM* SOBRE *E. COLI*

Se realizó una evaluación de la concentración mínima bactericida (CMB), la cual es la concentración en la que el crecimiento bacteriano fue inhibido completamente en comparación con el control de crecimiento que se encontraba sin tratamiento de AE; para esto en los pozos en los que la absorbancia fue inferior a 0,2 se tomó una alícuota de 100 μ L de cada pozo de la microplaca y se adicionó a tubos Eppendorf que contenían 900 μ L de BHI. Posteriormente, se llevó a incubación a 37 °C durante 24 h. Más adelante, se colocaron 10 μ L de cada tubo en placas de agar BHI con el fin de corroborar el efecto bactericida.

Extracción de metabolitos de células de cultivo

Para la extracción de metabolitos bacterianos se realizó un pre-inóculo de la bacteria. Se realizó la cinética de crecimiento microbiano y a la cuarta hora el medio de cultivo fue retirado y el microorganismo aislado mediante centrifugación a 5000 rpm durante diez minutos; seguidamente, se adicionaron 500 μ L de agua peptonada al 0,1% v/v y se centrifugó nuevamente. Luego, se llevó a cabo la lisis química con metanol y acetonitrilo al 50% v/v, mediante sonicación en hielo utilizando un sonicador de punto Cole Parmer, con una metodología de trabajo con pulsos de 10 s en encendido y 45 s en apagado por triplicado. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 12.000 rpm durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido fue transferido a tubos Eppendorf de fondo en U, cuidando de no arrastrar los desechos celulares precipitados. Luego, los solventes fueron evaporados en un equipo Savant Speed Vac SPD120 (Thermo-Fisher Scientific, Asheville, EE. UU) y las muestras conservadas en un refrigerador a -20 °C. Finalmente, el residuo fue reconstituido en 300 μ L de una mezcla de metanol frío grado HPLC al 50 % v/v, que contenía los estándares internos Z-GlyTyr-OH y cafeína a una concentración de 5 ppm, y fue almacenado

EFEECTO DE *O. BASILICUM* SOBRE *E. COLI*

a -80 °C para su análisis por UHPLC-MS. Se utilizaron muestras de control de calidad (QC) preparadas a partir de las extracciones obtenidas elaborando una solución que contenía una mezcla de 50 µL de extracto de cada una de las diferentes muestras control y tratadas que se utilizarían en el montaje, con el objetivo de garantizar que los resultados obtenidos se debían a diferencias entre las muestras de control y tratamiento. Todos los experimentos se llevaron a cabo con nueve réplicas biológicas (n = 9).

Análisis de extractos metabólicos por UHPLC-ESI-Orbitrap-HRMS

Los metabolitos extraídos se analizaron mediante cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (UHPLC-ESI-Orbitrap-HRMS) utilizando un equipo Orbitrap™ Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, EE. UU.) equipado con una columna Hypersil GOLD™ aQ (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, EE. UU.; 100 × 2,1 mm, tamaño de partícula de 1,9 µm). La espectrometría de masas de los metabolitos separados se realizó utilizando un sistema de detección de corriente iónica Orbitrap (Exactive Plus, Thermo Scientific, Sunny, CA, EE. UU.), equipado con una interfaz de ionización por electronebulización con calentamiento (Heated ESI). El Orbitrap se hizo funcionar en modo de escaneo MS completo (Fullscan) con una resolución de 70.000. Los iones se enviaron para su fragmentación a la celda de colisiones activadas (HCD) a diferentes energías (10 eV y 20 eV) en modo stepscan.

Análisis de los datos

Los datos sin procesar de MS obtenidos se convirtieron en archivos de formato mzXML utilizando la herramienta MSconvert (software ProteoWizard 3.0x) y se cargaron en la plataforma interactiva en línea XCMS (Tautenhahn *et al.*, 2012). La configuración de parámetros para el procesamiento de datos XCMS fue la siguiente: se ejecutó un análisis multigrupo en el modo centWave para la detección de características ($\Delta\text{ppm} < 5$ ppm, ancho de pico mínimo = 5 s y ancho de pico máximo = 20 s); la corrección del tiempo de retención se realizó con un método obiwrap (profStep = 1) para la alineación del cromatograma, minfrac = 5, bw = 5, mzwid = 0,025. Como salida se obtuvieron tablas con las intensidades de las características (relación m/z), con el perfil mencionado anteriormente.

La matriz de datos se filtró según el coeficiente de variación (CV) de las muestras de control de calidad (QC). Se eliminaron los datos con mayor dispersión en la media ($\text{CV} > 30\%$). Luego, para determinar los cambios en los perfiles metabólicos entre el control y las células tratadas con AE, la matriz de datos se sometió a análisis estadístico uni y multivariado usando el software Metaboanalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) (JavaServer Faces Technology, CA) [Acceso abierto] (Pang *et al.*, 2021).

Se aplicó el análisis de componentes principales (PCA) para discriminar grupos con diferentes perfiles metabólicos. Para respaldar los resultados del PCA, se realizó un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). Las características más significativas se filtraron utilizando el análisis de importancia variable en la proyección (VIP). Las características con un $\text{VIP} > 1.5$ y una tasa de descubrimiento falso (FDR) $< 0,05$

EFEECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

se identificaron utilizando CEU Mass Mediator versión 3.0 (<http://ceumass.eps.uspceu.es/>) [Acceso abierto] (Gil-De-La-Fuente *et al.*, 2018), la base de datos del metaboloma humano (<https://hmdb.ca/>), PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) (NIH, EUA) [Acceso abierto] y MassBank (<https://massbank.eu/MassBank/>)(MassBank consortium, EU) [Acceso abierto]. Los análisis de enriquecimiento y vía se realizaron utilizando MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) (JavaServer Faces Technology, CA) [Acceso abierto] (Pang *et al.*, 2021).

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la desviación estándar de la media para cada uno de los ensayos. Todos los experimentos se realizaron por triplicado (n=9 para el análisis de metabolómica no dirigida).

Resultados y discusión**Determinación de la CMI del aceite esencial de *O. basilicum* sobre *E. coli***

Se determinó la CMI₅₀ del AE de *O. basilicum* sobre *E. coli* obteniendo:

Tabla 3. Composición química del AE de OB y su CMI sobre *E. coli*

Planta	Composición química (%)	<i>E. coli</i> ATCC 11775 CMI ₅₀ (mg/mL)
<i>Ocimum basilicum</i>	Linalool (42.7), estragol (18.6), 1,8-cineol (8.1), germacreno D (4.9), epi- α -cadinol (4.2), γ -cadineno (3.7), α -humuleno (2.5), β -elemeno (2.2), biciclogermacreno (2.2) y trans- α -bergamoteno (1,1).	0,3

Dicha concentración fue utilizada posteriormente para realizar la extracción de metabolitos de células de cultivo.

Análisis metabólico del efecto del AE sobre el crecimiento de *E. coli* ATCC 11775 con un enfoque no dirigido.

Para el análisis mediante metabolómica no dirigida del efecto del AE de *O. basilicum* sobre el crecimiento de *E. coli* ATCC 11775, se realizó un análisis por componentes principales (PCA) de las señales obtenidas luego del alineamiento y deconvolución de los cromatogramas del grupo control y tratamiento (Figuras 5 a y 5 b). Los resultados mostraron una varianza analizada en, el componente 1 y 2 de 7.9% y 7.6%, respectivamente, en el modo

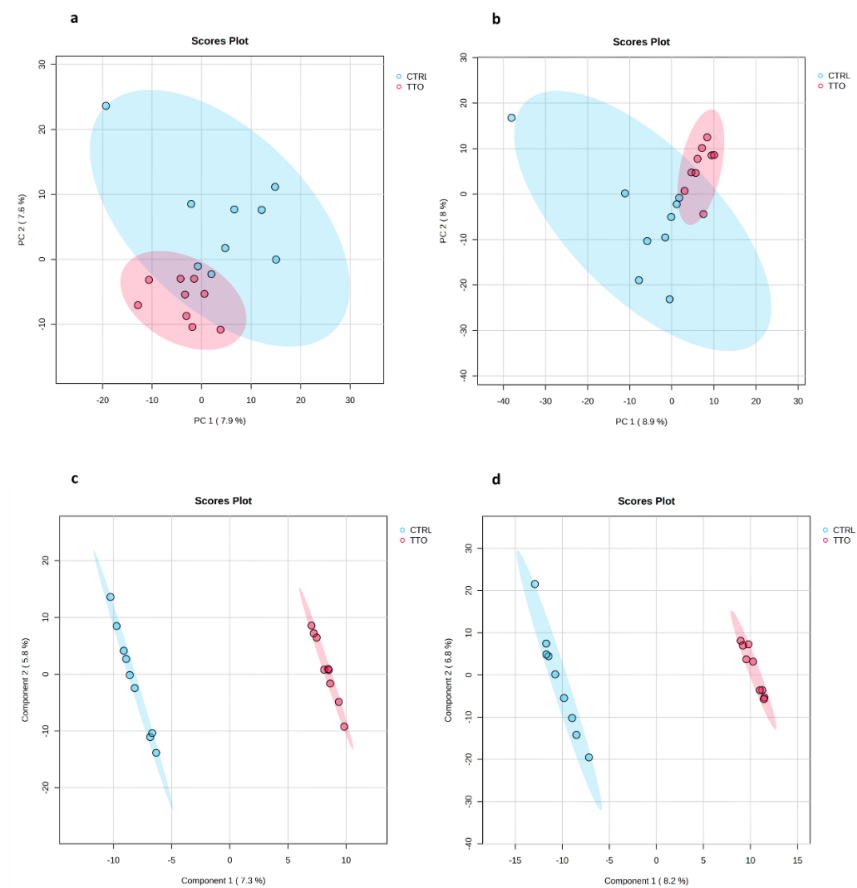
EFFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

de iones negativo (Figura 5a) y una varianza analizada en el componente 1 y 2 de 8.9% y 8.0%, respectivamente, en el modo de iones positivo (Figura 5b).

Se evidenció la necesidad de realizar un análisis por un método supervisado como el PLS-DA del grupo control y tratamiento (Figuras 5 c y 5 d). Los resultados mostraron una varianza analizada en el componente 1 y 2 de 7.3% y 5.8%, respectivamente, en el modo de iones negativo (Figura 5C) y una varianza analizada en el componente 1 y 2 de 8.2% y 6.8%, respectivamente, en el modo de iones positivo (Figura 5d).

EFFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

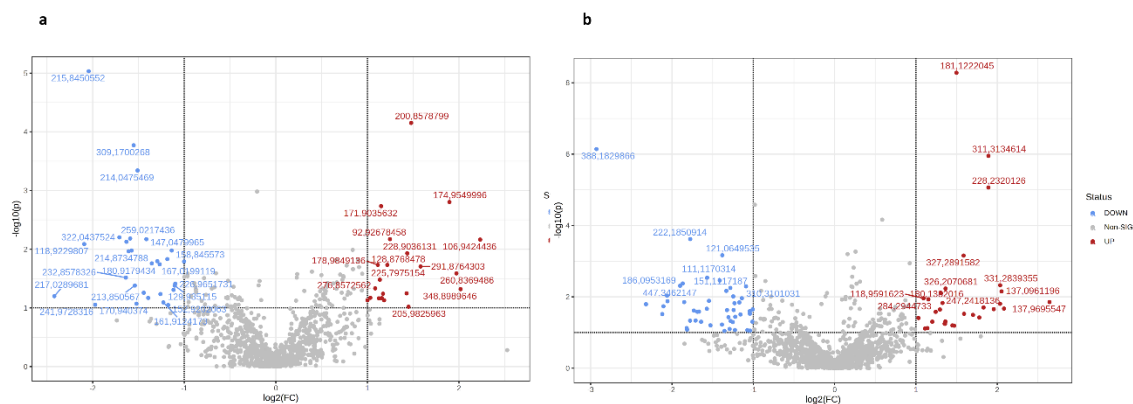
Figura 5. Análisis de componentes principales (PCA) y de cuadrados mínimos parciales discriminante PLS-DA de los resultados obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS de muestras control versus muestras con tratamiento en el enfoque no dirigido. a-b ESI en modo de adquisición de iones positivos y c-d ESI en modo de adquisición de iones negativos. Las muestras control se presentan en color azul y las de tratamiento en color rojo.



A continuación, se realizó un diagrama de Volcano Plot para observar de manera más sencilla la modulación de las señales tratamiento/control, siendo las de color rojo, aquellas moduladas positivamente y las de color azul, aquellas moduladas negativamente.

EFFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

Figura 6. Gráfico de volcano de los datos obtenidos por LC/MS en modo de adquisición: A) Iones negativos . B) Iones positivos.



A las relaciones masa/carga (m/z) que fueron estadísticamente significativas, se les determinó los valores p y FDR. Las comparaciones de estas características con las reportadas en base de datos de espectrometría de masas (HMDB, CEU Mass Mediator, Metlin), permitió la identificación tentativa (nivel 3 de identificación) de los metabolitos. De lo anterior, se identificaron 33 metabolitos con diferencias significativas en su expresión (Tabla 3), los cuales se utilizaron para la búsqueda de las vías metabólicas posiblemente afectadas en *E. coli* O157:H7 por el efecto del AE de OB.

EFFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

Tabla 4. Metabolitos (presuntivamente identificados) significativamente alterados por el efecto

del AE sobre el crecimiento de *E. coli* ATCC 11775

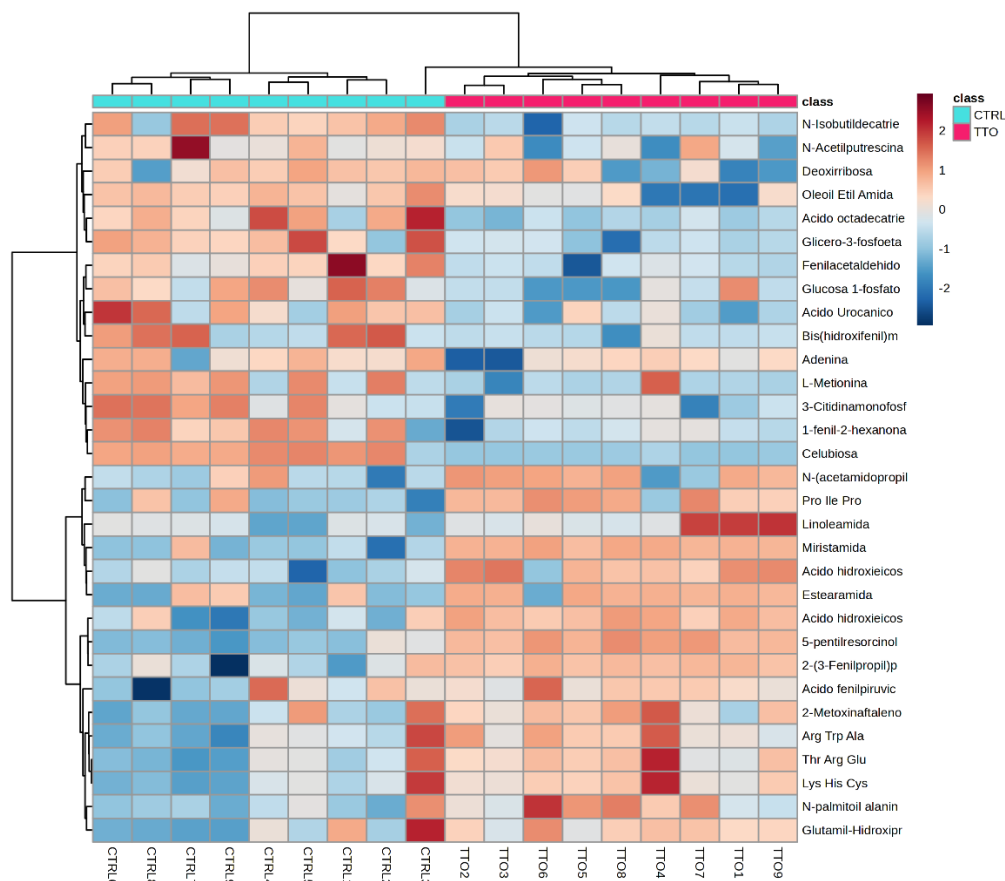
Metabolito	Fórmula	m/z	Δ ppm	Molécula protonada	t _R (min)	Modulado
5-Pentilresorcinol	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	181,1222	3,69	[M+H] ⁺	7,57	Positivo ↑
Miristamida	C ₁₄ H ₂₉ NO	228,2320	3,31	[M+H] ⁺	8,85	Positivo ↑
Ácido octadecatrienoico isobutilamida	C ₂₂ H ₃₉ NO	334,3101	2,71	[M+H] ⁺	9,66	Negativo ↓
Ácido Hidroxieicosadienoico	C ₂₀ H ₃₆ O ₃	325,2733	3,03	[M+H] ⁺	9,41	Positivo ↑
N-Isobutildecatrienamida	C ₁₄ H ₂₃ NO	222,1851	3,17	[M+H] ⁺	6,15	Negativo ↓
Arg Trp Ala	C ₂₀ H ₂₉ N ₇ O ₄	432,2374	3,37	[M+H] ⁺	7,13	Positivo ↑
Fenilacetaldehído	C ₈ H ₈ O	121,0650	2,93	[M+H] ⁺	9,21	Negativo ↓
Ácido hidroxieicosenoico	C ₂₀ H ₃₈ O ₃	327,2892	2,25	[M+H] ⁺	9,62	Positivo ↑
2-(3-Fenilpropil)piridina	C ₁₄ H ₁₅ N	198,1277	2,98	[M+H] ⁺	4,74	Positivo ↑
Thr Arg Glu	C ₁₅ H ₂₈ N ₆ O ₇	405,2096	0,46	[M+H] ⁺	7,12	Positivo ↑
Lys His Cys	C ₁₅ H ₂₆ N ₆ O _{4S}	387,1797	4,56	[M+H] ⁺	7,13	Positivo ↑
Ácido urocánico	C ₆ H ₆ N ₂ O ₂	139,0501	4,80	[M+H] ⁺	1,48	Negativo ↓
N-Palmitoil alanina	C ₁₉ H ₃₇ NO ₃	328,2842	3,00	[M+H] ⁺	8,96	Positivo ↑
Oleoil etil amida	C ₂₀ H ₃₉ NO	310,3101	2,92	[M+H] ⁺	9,76	Negativo ↓
Pro Ile Pro	C ₁₆ H ₂₇ N ₃ O ₄	326,2071	2,75	[M+H] ⁺	4,03	Positivo ↑
1-Fenil-2-hexanona	C ₁₂ H ₁₆ O	177,1273	3,70	[M+H] ⁺	5,68	Negativo ↓
Bis(hidroxifenil)metano	C ₁₃ H ₁₂ O ₂	201,0909	3,33	[M+H] ⁺	7,12	Negativo ↓
Estearamida	C ₁₈ H ₃₇ NO	284,2945	3,01	[M+H] ⁺	9,66	Positivo ↑
Glutamil-Hidroxiprolina	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₆	261,1094	2,77	[M+H] ⁺	6,57	Positivo ↑
2-Metoxinaftaleno	C ₁₁ H ₁₀ O	159,0804	3,80	[M+H] ⁺	7,13	Positivo ↑
Celubiosa	C ₁₄ H ₂₆ O ₁₁	388,1830	2,87	[M+NH ₄] ⁺	7,12	Negativo ↓
Metionina	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	172,0402	3,60	[M+Na] ⁺	1,10	Negativo ↓

EFEECTO DE *O. BASILICUM* SOBRE *E. COLI*

Linoleamida	$C_{18}H_{33}NO$	280,2632	3,05	$[M+H]^+$	9,16	Negativo ↓
N-Acetilputrescina	$C_6H_{14}N_2O$	131,1180	3,45	$[M+H]^+$	1,11	Positivo ↑
Glicero-3-fosfoetanolamina	$C_5H_{14}NO_6$ P	214,0475	2,49	$[M-H]^-$	0,92	Negativo ↓
3'-Citidinamonofosfato	$C_9H_{14}N_3O_8$ P	322,0438	0,66	$[M-H]^-$	1,04	Negativo ↓
Glucosa 6-fosfato	$C_6H_{13}O_9P$	259,0217	0,69	$[M-H]^-$	0,87	Negativo ↓
N-(3-Acetamidopropil)pirrolidin-2-ona	$C_9H_{16}N_2O_2$	185,1284	3,33	$[M+H]^+$	4,17	Negativo ↓
Ácido fenilpirúvico	$C_9H_8O_3$	165,0546	3,30	$[M+H]^+$	7,94	Negativo ↓
N-Acetilprolina	$C_7H_{11}NO_3$	158,0811	3,75	$[M+H]^+$	2,89	Negativo ↓
Ácido oxopentanóico	$C_5H_8O_3$	117,0548	2,94	$[M+H]^+$	7,13	Positivo ↑
Deoxirribosa	$C_5H_{10}O_4$	134,0580	2,96	$[(M+H)-H_2O]^+$	7,13	Positivo ↑
Adenina	$C_5H_5N_5$	136,0618	3,64	$[M+H]^+$	3,75	Negativo ↓

Un análisis univariado *Heatmap* fue realizado con los metabolitos de interés (Tabla 3), lo que permitió una mejor visualización de los datos relacionados con la abundancia química entre la muestra control y las muestras tratadas de las células bacterianas.

Figura 7. Mapa de calor (Heatmap) de los metabolitos más representativos que se vieron significativamente afectados en *E. coli* después del tratamiento con *OB*.



Análisis de las vías metabólicas posiblemente alteradas por efecto del AE sobre el crecimiento de *E. coli* ATCC 11775

Para comprender los cambios en las rutas metabólicas, se realizó un análisis de enriquecimiento utilizando la base de datos KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/compound/>) (Kanehisa, 2016) [Acesso abierto]. El análisis de las principales vías metabólicas posiblemente afectadas en *E. coli* ATCC11775 por el efecto

EFFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

del AE se llevó a cabo utilizando los metabolitos detectados con diferencias estadísticamente significativas, los cuales se encuentran listados en la Tabla 3.

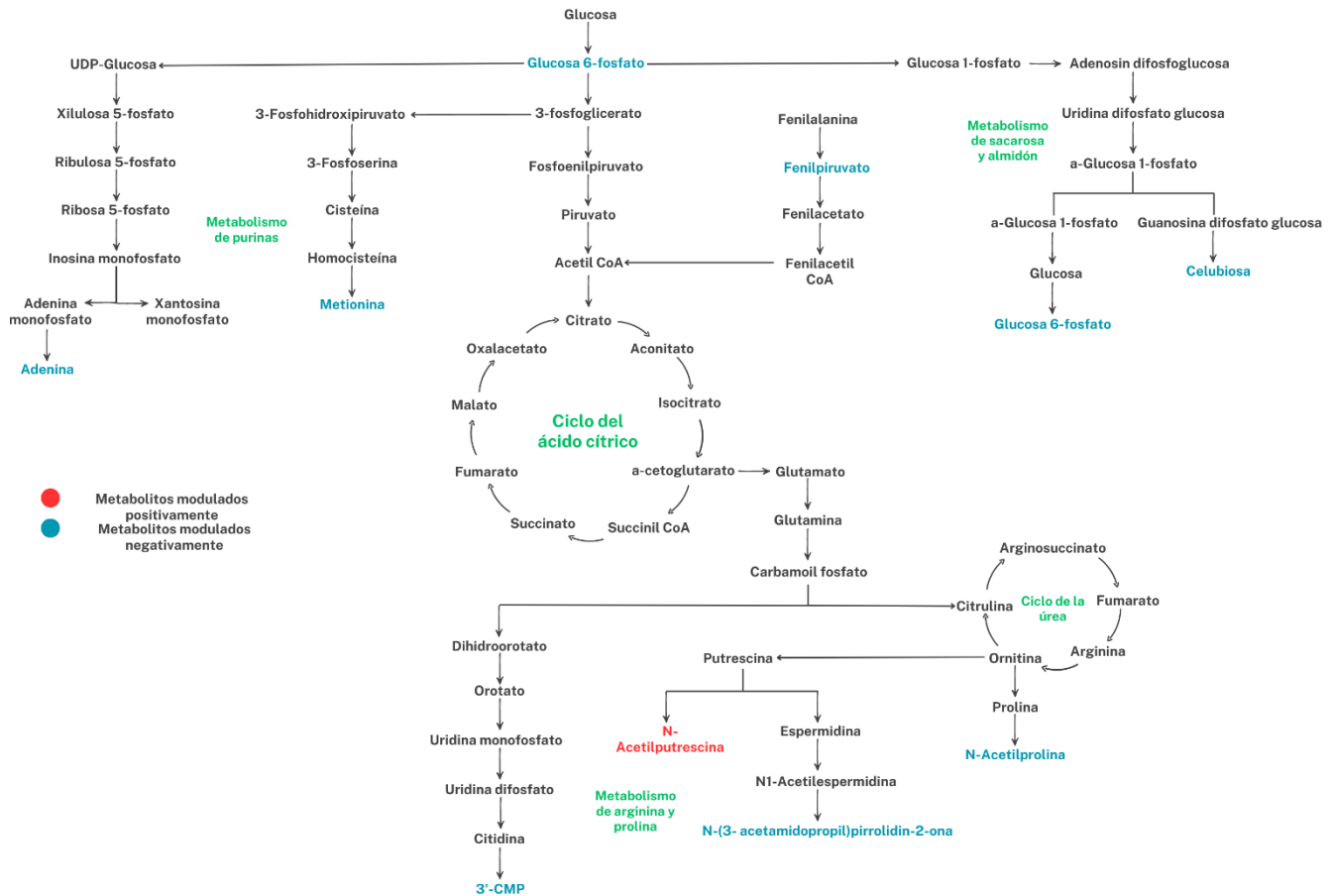
Estos metabolitos fueron asociados con sus respectivas vías metabólicas y se realizó el análisis de los posibles efectos metabólicos producidos por el AE (Tabla 4).

Tabla 5. Análisis de enriquecimiento de vías metabólicas afectadas por el AE de OB sobre el crecimiento de *E. coli* con metabolitos presuntivamente identificados.

Ruta metabólica	Metabolitos
Metabolismo de arginina y prolina	N-(3-acetamidopropil)pirrolidin-2-ona, N-acetilprolina, ácido fenilpirúvico, N-acetilputrescina, Glutamil-idroxiprolina
Metabolismo de cisteína y metionina	Metionina
Glucólisis/Gluconeogénesis	Glucosa 6-fosfato
Metabolismo de pirimidinas	3'-Citidinamonofofato
Metabolismo de glicerofosfolípidos	glicero-3-fosfoetanolamina
Metabolismo de sacarosa y almidón	Celubiosa, Glucosa 6-fosfato
Degradación de lisina	Ácido 5-oxo-pentanóico
Ruta de la pentosa fosfato	Deoxirribosa
Metabolismo de purinas	Adenina
Metabolismo de fenilalanina	Fenilacetaldehído

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

Figura 8. Posibles rutas metabólicas alteradas en *E. coli* tras tratamiento con *OB*. Los metabolitos de color rojo y azul indican metabolitos modulados positiva y negativamente, respectivamente, en muestras tratadas.



El modo de acción de los AE destilados de plantas se ha asociado principalmente con toxicidad a nivel de la membrana celular, debido a que los componentes característicamente hidrofóbicos del AE se acumulan en la superficie de la membrana celular afectando su estructura y función (Lambert *et al.*, 2001).

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

Se debe tener en cuenta que, las bacterias gramnegativas tienen una envoltura celular más compleja que las grampositivas, que comprende una membrana externa unida a la capa interna de peptidoglicano a través de lipoproteínas. La membrana externa contiene proteínas y lipopolisacáridos, lo que la hace más resistente a las moléculas hidrófobas del AE (S. G. Griffin *et al.*, 1999).

Uno de los posibles mecanismos de acción que se han planteado para el estragol, hace referencia a que este fenilpropeno tiene la capacidad de penetrar la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Auezova *et al.* (2020) y Gharib *et al.* (2017) examinaron el mecanismo de los fenilpropenos propenílicos (estragol y anetol) en la pared celular de *E. coli* y *Staphylococcus epidermidis*. En su estudio, demostraron la capacidad distintiva del estragol y el anetol para penetrar la membrana externa de *E. coli*. La potencia antimicrobiana es conferida por la mayor naturaleza lipofílica del estragol (log P valor de 3,5). Esto resulta importante considerando que en el caso del aceite de OB utilizado para el presente trabajo, en general, el componente mayoritario es el estragol, lo que podría estar indicando que puede producirse un daño irreversible en la membrana de *E. coli* ATCC 11775 en el estudio realizado, provocando la pérdida de constituyentes celulares.

Estudios recientes no solo han demostrado que el daño de la membrana celular provoca la muerte celular de los microorganismos, sino también que los AE generan alteraciones metabólicas (Chen *et al.*, 2020; Miao *et al.*, 2020). En las células de *E. coli*, los resultados obtenidos muestran que los posibles metabolitos diferenciales correspondieron principalmente al metabolismo de arginina y prolina.

EFEECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

En el metabolismo de arginina y prolina, la N-(3-acetamidopropil)pirrolidin-2-ona, el ácido fenilpirúvico, y la N-acetilprolina fueron modulados negativamente, mientras que la glutamil-hidroxiprolina y N-acetilputrescina fueron moduladas positivamente. La prolina juega un papel fundamental en el metabolismo celular ya que es una importante fuente de carbono y nitrógeno y se desempeña como regulador osmótico (Goswami *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2014). La modulación negativa de las células tratadas evitaría la activación de varias respuestas de estrés para protegerse de los efectos del AE.

En el metabolismo de sacarosa y almidón, la glucosa 6-fosfato y la celubiosa estuvieron moduladas negativamente. El metabolismo de la sacarosa juega un papel fundamental en el desarrollo, la respuesta al estrés y la formación del rendimiento, principalmente mediante la generación de azúcares como metabolitos para impulsar el crecimiento y sintetizar compuestos esenciales, y como señales para regular la expresión de microARN, factores de transcripción, y otros genes, y para comunicación intracelular con señalización hormonal, oxidativa y de defensa (Ruan, 2014).

Los resultados mostraron también una disminución en la presencia de metionina, que afecta directamente la síntesis de proteínas, pero posiblemente protege a la célula contra los radicales libres producidos por los efectos del AE. La metionina es un aminoácido proteínogénico de gran importancia para iniciar la síntesis de proteínas y contribuye a mantener el equilibrio de especies reactivas de oxígeno (Guillín *et al.*, 2023).

Conclusiones

El aceite esencial destilado de *O. basilicum* presentó efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli* ATCC 11775 a una MIC₅₀ de 0,30 mg/mL. Es posible que el mecanismo de acción del AE de *O. basilicum* en células tratadas de *E. coli* se encuentre asociado principalmente con alteraciones en el metabolismo de arginina y prolina, siendo la ruta con mayor número de metabolitos encontrados. También, se evidenciaron cambios en el metabolismo de cisteína y metionina, lo cual podría estar relacionado con presuntas alteraciones en el sistema celular de síntesis de proteínas. Adicionalmente, se observaron variaciones en los metabolismos de pirimidinas, purinas, lo cual estaría relacionado con posibles alteraciones en la síntesis de ácidos nucleicos. El metabolismo de glicerofosfolípidos, sacarosa y almidón, fenilalanina y rutas como la glucólisis/gluconeogénesis, la ruta de pentosa fosfato y degradación de lisina, fueron otras en las que se encontraron alteraciones con el tratamiento del AE.

Los resultados obtenidos brindan un panorama general sobre el posible mecanismo de acción del aceite esencial de *Ocimum basilicum* sobre *Escherichia coli* y promueven el estudio de la actividad farmacológica de los AE como productos antibacterianos de origen natural.

Bibliografía

- Abdullahi, A., Khairulmazmi, A., Yasmeen, S., Ismail, I. S., Norhayu, A., Sulaiman, M. R., Ahmed, O. H., & Ismail, M. R. (2020). Phytochemical profiling and antimicrobial activity of ginger (*Zingiber officinale*) essential oils against important phytopathogens. *Arabian Journal of Chemistry*, *13*(11), 8012–8025. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.09.031>
- Ainane, A., Khammour, Charaf, S., Elabboubi, M., Elkouali, M., Talbi, M., Benhima, R., Cherroud, S., & Ainane, T. (2019). Chemical composition and insecticidal activity of five essential oils: *Cedrus atlantica*, *Citrus limonum*, *Rosmarinus officinalis*, *Syzygium aromaticum* and *Eucalyptus globules*. *Materials Today: Proceedings*, *13*, 474–485. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019bur.04.004>
- Al-Abri, S. S., Beeching, N. J., & Nye, F. J. (2005). Traveller's diarrhoea. *The Lancet Infectious Diseases*, *5*(6), 349–360. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70139-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70139-0)
- Alarcón-Barrera, J. C., Kostidis, S., Ondo-Méndez, A., & Giera, M. (2022). Recent advances in metabolomics analysis for early drug development. *Drug Discovery Today*, *27*(6), 1763–1773. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.02.018>
- Aleksic Sabo, V., & Knezevic, P. (2019). Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. plant extracts and essential oils: A review. In *Industrial Crops and Products*, *132*, 413–429. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.02.051>
- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F., & Di Ilio, C. (2013). *Escherichia coli* in Europe: An overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *10*(12), 6235–6254. MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijerph10126235>
- Alwsci Technologies. (2022). *HPLC Vs UPLC - What's The Difference?* <https://www.alwsci.com/news/hplc-vs-uplc-what-s-the-difference-53930252.html>

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

- Al-Zyoud, W., Nasereddin, A., Aljarajah, H., & Saket, M. (2019). Culturable gut bacteria lack *Escherichia coli* in children with phenylketonuria. *New Microbes and New Infections*, 32, 100616. doi:10.1016/j.nmni.2019.100616
- Andrews, J. (2001). Determination of Minimum Inhibitory Concentration. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(1), 5–16. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf083>
- Atif, M., Ilavenil, S., Devanesan, S., AlSalhi, M. S., Choi, K. C., Vijayaraghavan, P., Alfuraydi, A. A., & Alanazi, N. F. (2020). Essential oils of two medicinal plants and protective properties of jack fruits against the spoilage bacteria and fungi. *Industrial Crops and Products*, 147, 112239. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112239>
- Auezova, L., Najjar, A., Kfoury, M., Fourmentin, S., & Greige-Gerges, H. (2020). Antibacterial activity of free or encapsulated selected phenylpropanoids against *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Applied Microbiology*, 128(3), 710–720. <https://doi.org/10.1111/jam.14516>
- Bandeira, G., Pês, T. S., Saccol, E. M. H., Sutili, F. J., Rossi, W. R., Murari, A. L., Heinzmann, B. M., Pavanato, M. A., de Vargas, A. C., de L. Silva, L., & Baldisserotto, B. (2017). Potential uses of *Ocimum gratissimum* and *Hesperozygis ringens* essential oils in aquaculture. *Industrial Crops and Products*, 97, 484–491. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.040>
- Barra A. (2009). Factors affecting chemical variability of essential oils: a review of recent developments. *Natural product communications*, 4(8), 1147–1154.
- Bassett, J., & McClure, P. (2008). A risk assessment approach for fresh fruits. *Journal of Applied Microbiology*, 104(4), 925–943. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03697.x>

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

- Bassolé, I. H., & Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *17*(4), 3989–4006. <https://doi.org/10.3390/molecules17043989>
- Beckonert, O., Keun, H. C., Ebbels, T. M. D., Bundy, J., Holmes, E., Lindon, J. C., & Nicholson, J. K. (2007). Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nature Protocols*, *2*(11), 2692–2703. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.376>
- Bedia, C. (2018). Experimental Approaches in Omic Sciences. In J. Jaumot, C. Bedia, & R. Tauler (Eds.), *Comprehensive Analytical Chemistry, Elsevier*, *82*, 13–36 . <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.coac.2018.07.002>
- Beinke, C., Laarmann, S., Wachter, C., Karch, H., Greune, L., & Schmidt, M. A. (1998). Diffusely Adhering *Escherichia coli* Strains Induce Attaching and Effacing Phenotypes and Secrete Homologs of Esp Proteins. *Infection and Immunity*, *66*(2), 528–539. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.2.528-539.1998>
- Benites, J., Bustos, L., Ríos, D., Bravo, F., López, J., Gajardo, S., Rojo, L., & Calderón, P. (2013). Antidepressant and anxiolytic-like effects of essential oil from *Acantholippia deserticola* Phil in female rats. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, *12*, 413–419.
- Bess, A., Berglind, F., Mukhopadhyay, S., Brylinski, M., Griggs, N., Cho, T., Galliano, C., & Wasan, K. M. (2022). Artificial intelligence for the discovery of novel antimicrobial agents for emerging infectious diseases. *Drug Discovery Today*, *27*(4), 1099–1107. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.10.022>
- Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A.,

EFFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

- Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., & Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. In *Science*, 277(5331), 1453–1462. American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.277.5331.1453>
- Blow, N. (2008). Biochemistry's new look. *Nature*, 455(7213), 697–698. <https://doi.org/10.1038/455697a>
- Bouyahya, A., Abrini, J., Dakka, N., & Bakri, Y. (2019). Essential oils of *Origanum compactum* increase membrane permeability, disturb cell membrane integrity, and suppress quorum-sensing phenotype in bacteria. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 9(5), 301–311. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2019.03.001>
- Bryan, A., Youngster, I., & McAdam, A. J. (2015). Shiga Toxin Producing *Escherichia coli*. *Clinics in Laboratory Medicine*, 35(2), 247–272. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.02.004>
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. In *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Cavanagh, H. M. A., & Wilkinson, J. M. (2005). Lavender essential oil: a review. *Australian Infection Control*, 10(1), 35–37. <https://doi.org/10.1071/HI05035>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2006). Questions & Answers: Sickness caused by *E. coli*. https://www.cdc.gov/ecoli/qa_ecoli_sickness.htm .
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2011). *E. coli and food safety*. <https://www.cdc.gov/foodsafety/communication/ecoli-and-food-safety.html>.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2014). *Enterotoxigenic E. coli (ETEC)*. <https://www.cdc.gov/ecoli/etec.html>. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases (DFWED).

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

- Ceylan, E., & Fung', D. Y. C. (2004). Antimicrobial activity of spices. *Journal of rapid methods and automation in microbiology*, 12(1), 1-55. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4581.2004.tb00046.x>
- Chellappandian, M., Vasantha-Srinivasan, P., Senthil-Nathan, S., Karthi, S., Thanigaivel, A., Ponsankar, A., Kalavani, K., & Hunter, W. B. (2018). Botanical essential oils and uses as mosquitocides and repellents against dengue. In *Environment International*, 113, 214–230. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.12.038>
- Chen, J., Tang, C., Zhang, R., Ye, S., Zhao, Z., Huang, Y., Xu, X., Lan, W., & Yang, D. (2020). Metabolomics analysis to evaluate the antibacterial activity of the essential oil from the leaves of *Cinnamomum camphora* (Linn.) *Journal of Ethnopharmacology*, 253, 112652. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112652>
- Chen, L., Zhao, X., Li, R., & Yang, H. (2022). Integrated metabolomics and transcriptomics reveal the adaptive responses of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to thyme and cinnamon oils. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 157, 111241. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111241>
- Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. *Medicines*, 4(3), 58. <https://doi.org/10.3390/medicines4030058>
- Chraibi, M., Fadil, M., Farah, A., Lebrazi, S., & Fikri-Benbrahim, K. (2021). Antimicrobial combined action of *Mentha pulegium*, *Ormenis mixta* and *Mentha piperita* essential oils against *S. aureus*, *E. coli* and *C. tropicalis*: Application of mixture design methodology. *LWT*, 145, 111352. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111352>

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

- Cornick, N. A., Silva, M., & Gorbach, S. L. (1990). *In Vitro* Antibacterial activity of bismuth subsalicylate. *Clinical Infectious Diseases*, 12(1), S9–S10. https://doi.org/10.1093/clinids/12.Supplement_1.S9
- Cravioto, A., Tello, A., Navarro, A., Ruiz, J., Villafán, H., Uribe, F., & Eslava, C. A. (1991). Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhea. *Lancet*, 337, 262–264. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)90868-P](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)90868-P)
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. In *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), 822–880. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>
- Cruz, J., Ortiz, C., Guzmán, F., Cárdenas, C., Fernandez-Lafuente, R., & Torres, R. (2014). Design and activity of novel lactoferrampin analogues against O157:H7 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Biopolymers*, 101(4), 319–328. doi:10.1002/bip.22360
- Daneshian, A. M., & Mikaili, P. (2011). Antimicrobial activity of essential oil extract of *Ocimum basilicum* L. leaves on a variety of pathogenic bacteria antisecretory effect of hydrogen sulfide on gastric acid secretion and the Involvement of nitric oxide view project thesis view project. *Journal of Medicinal Plant Research* 5(15). <https://www.researchgate.net/publication/216747910>
- Dass, C. (2007). *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*. John Wiley & Sons, Inc., 575. <https://doi.org/10.1002/0470118490>
- de Souza, D. P., de Carvalho Gonçalves, J. F., de Carvalho, J. C., da Silva, K. K. G., Fernandes, A. V., de Oliveira Nascimento, G., Ramos, M. V., Koolen, H. H. F., Bezerra, D. P., & Santos, A. S. (2022). Untargeted metabolomics used to describe the chemical composition and antimicrobial effects of the essential oil from the leaves of *Guatteria citriodora* Ducke. *Industrial Crops and Products*, 186, 115180. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115180>

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

- Deda, O., Gika, H., Raikos, N., & Theodoridis, G. (2019). GC-MS-based metabolic phenotyping. In *The Handbook of Metabolic Phenotyping*. Elsevier, 137–169. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812293-8.00004-9>
- Derakhshandeh, A., Firouzi, R., Moatamedifar, M., Motamedi, A., Bahadori, M., & Naziri, Z. (2013). Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains isolated from human samples. *Molecular Biology Research Communications*, 2(4), 143–149. <http://mbrc.shirazu.ac.ir>
- Donnenberg, M. S., & Kaper, J. B. (1992). Enteropathogenic *Escherichia coli*. In *Infection and immunity*, 60(10), 3953–3961. <https://doi.org/10.1128/iai.60.10.3953-3961.1992>
- DuPont, H. L., & Hornick, R. B. (1973). Adverse effect of lomotil therapy in shigellosis. *JAMA*, 226(13), 1525–1528.
- DuPont, H. L., Sullivan, P., Pickering, L. K., Haynes, G., & Ackerman, P. B. (1977). Symptomatic treatment of diarrhea with bismuth subsalicylate among students attending a Mexican university. *Gastroenterology*, 73(4 Pt 1), 715–718.
- Edris, A. E. (2007). Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. *Phytother. Res*, 21(2), 308–323. <https://doi.org/10.1002/ptr>
- Ejrnæs, K., Stegger, M., Reisner, A., Ferry, S., Monsen, T., Holm, S. E., Lundgren, B., & Frimodt-Møller, N. (2011). Characteristics of *Escherichia coli* causing persistence or relapse of urinary tract infections: Phylogenetic groups, virulence factors and biofilm formation. *Virulence*, 2(6), 528–537. <https://doi.org/10.4161/VIRU.2.6.18189>
- El-Zehery, H. R. A., Zaghloul, R. A., Abdel-Rahman, H. M., Salem, A. A., & El-DougDoug, K. A. (2022). Novel strategies of essential oils, chitosan, and nano- chitosan for inhibition of multi-drug resistant: *E. coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(4), 2582–2590. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.12.036>

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

- Ericsson, C. D., DuPont, H. L., Mathewson, J. J., West, M. S., Johnson, P. C., & Bitsura, J. A. (1990). Treatment of traveler's diarrhea with sulfamethoxazole and trimethoprim and loperamide. *JAMA*, *263*(2), 257–261.
- Ericsson, C. D., Nicholls-Vasquez, I., DuPont, H. L., & Mathewson, J. J. (1992). Optimal dosing of trimethoprim-sulfamethoxazole when used with loperamide to treat traveler's diarrhea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *36*(12), 2821–2824. <https://doi.org/10.1128/AAC.36.12.2821>
- Ericsson, C., DuPont, H., & Mathewson, J. (1997). Single Dose Ofloxacin plus Loperamide Compared with Single Dose or Three Days of Ofloxacin in the Treatment of Traveler's Diarrhea. *Journal of Travel Medicine*, *4*(1), 3–7. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8305.1997.tb00765.x>
- Ericsson, C., Johnson, P., DuPont, H., & Morgan, D. (1987). Ciprofloxacin or Trimethoprim-Sulfamethoxazole as Initial Therapy for Travelers' Diarrhea. *Annals of Internal Medicine*, *106*(2), 216. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-106-2-216>
- Esmael, A., Hassan, M. G., Amer, M. M., Abdelrahman, S., Hamed, A. M., Abd-raboh, H. A., & Foda, M. F. (2020). Antimicrobial activity of certain natural-based plant oils against the antibiotic-resistant acne bacteria. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *27*(1), 448–455. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.11.006>
- Fiehn, O. (2002). Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology* *48*, 155–171. <https://doi.org/10.1023/A:1013713905833>
- Friedman, M., Kozukue, N., & Harden, L. A. (2000). Cinnamaldehyde content in foods determined by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(11), 5702–5709. <https://doi.org/10.1021/jf000585g>

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

- Gharib, R., Najjar, A., Auezova, L., Charcosset, C., & Greige-Gerges, H. (2017). Interaction of Selected Phenylpropenes with dipalmitoylphosphatidylcholine Membrane and Their Relevance to Antibacterial Activity. *Journal of Membrane Biology*, 250(3), 259–271. <https://doi.org/10.1007/s00232-017-9957-y>
- Ghaste, M., Mistrik, R., & Shulaev, V. (2016). Applications of Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FT-ICR) and Orbitrap Based High Resolution Mass Spectrometry in Metabolomics and Lipidomics. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 816. <https://doi.org/10.3390/ijms17060816>
- Ghosson, H., Schwarzenberg, A., Jamois, F., & Yvin, J.-C. (2018). Simultaneous untargeted and targeted metabolomics profiling of underivatized primary metabolites in sulfur-deficient barley by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole/time-of-flight mass spectrometry. *Plant Methods*, 14(1), 62. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0329-0>
- Gika, H. G., Theodoridis, G. A., Wingate, J. E., & Wilson, I. D. (2007). Within-Day Reproducibility of an HPLC–MS-Based Method for Metabonomic Analysis: Application to Human Urine. *Journal of Proteome Research*, 6(8), 3291–3303. <https://doi.org/10.1021/pr070183p>
- Gil-De-La-Fuente, A., Godzien, J., Saugar, S., Garcia-Carmona, R., Badran, H., Wishart, D. S., Barbas, C., & Otero, A. (2018). CEU Mass Mediator 3.0: A Metabolite Annotation Tool. *Journal of Proteome Research*, 18(2), 797–802. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00720>
- Gleeson, E., & O’Beirne, D. (2005). Effects of process severity on survival and growth of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* on minimally processed vegetables. *Food Control*, 16(8 SPEC. ISS.), 677–685. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.06.004>

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

- Gordon, D. M., & Cowling, A. (2003). The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: Host and geographic effects. *Microbiology*, *149*(12), 3575–3586. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26486-0>
- Goswami, G., Hazarika, D. J., Chowdhury, N., Bora, S. S., Sarmah, U., Naorem, R. S., Boro, R. C., & Barooah, M. (2022). Proline confers acid stress tolerance to *Bacillus megaterium* G18. *Scientific Reports*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12709-0>
- Graham, D. Y., & Evans, D. G. (1990). Prevention of Diarrhea Caused by Enterotoxigenic *Escherichia coli*: Lessons Learned with Volunteers. *Clinical Infectious Diseases*, *12*(Supplement_1), S68–S72. https://doi.org/10.1093/clinids/12.Supplement_1.S68
- Griffin, J. (2003). Metabonomics: NMR spectroscopy and pattern recognition analysis of body fluids and tissues for characterisation of xenobiotic toxicity and disease diagnosis. *Current Opinion in Chemical Biology*, *7*(5), 648–654. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2003.08.008>
- Griffin, S. G., Wyllie, S. G., Markham, J. L., & Leach, D. N. (1999). The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal*. *14*(5), 322–332. doi:10.1002/(sici)1099-1026(199909/10)14:5<322::aid-ffj837>3.0.co;2-4
- Guillín, Y., Cáceres, M., Stashenko, E., Hidalgo, W., & Ortiz, C. (2023). Untargeted Metabolomics for Unraveling the Metabolic Changes in Planktonic and Sessile Cells of *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076 after Treatment with *Lippia origanoides* Essential Oil. *Antibiotics*, *12*(5). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12050899>
- Habchi, B., Alves, S., Jouan-Rimbaud Bouveresse, D., Appenzeller, B., Paris, A., Rutledge, D. N., & Rathahao-Paris, E. (2018). Potential of dynamically harmonized Fourier transform ion cyclotron resonance cell for high-throughput metabolomics fingerprinting: control of data

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

quality. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(2), 483–490.

<https://doi.org/10.1007/s00216-017-0738-3>

Hajji, M., Hamdi, M., Sellimi, S., Ksouda, G., Laouer, H., Li, S., & Nasri, M. (2019). Structural characterization, antioxidant and antibacterial activities of a novel polysaccharide from *Periploca laevigata* root barks. *Carbohydrate Polymers*, 206, 380–388. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.020>

Hanafi, R. S., Sobeh, M., Ashour, M. L., El-Readi, M. Z., Desoukey, S. Y., Niess, R., Abadi, A. H., & Wink, M. (2014). Chemical Composition and Biological Activity of Essential Oils of Cumin and Coriander Fruits from Egypt. *The Natural Products Journal*, 4(1), 63-69.

He, R., Chen, W., Chen, H., Zhong, Q., Zhang, H., Zhang, M., & Chen, W. (2022). Antibacterial mechanism of linalool against *L. monocytogenes*, a metabolomic study. *Food Control*, 132, 108533. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108533>

Hernández, J. J., Ragone, M. I., Bonazzola, P., Bandoni, A. L., & Consolini, A. E. (2018). Antitussive, antispasmodic, bronchodilating and cardiac inotropic effects of the essential oil from *Blepharocalyx salicifolius* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 210, 107–117. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.08.013>

Hoge, C. W., Gambel, J. M., Srijan, A., Pitarangsi, C., & Echeverria, P. (1998). Trends in Antibiotic Resistance Among Diarrheal Pathogens Isolated in Thailand Over 15 Years. *Clinical Infectious Diseases*, 26(2), 341–345. <https://doi.org/10.1086/516303>

Houdkova, M., Urbanova, K., Duskocil, I., Rondevaldova, J., Novy, P., Nguon, S., Chrun, R., & Kokoska, L. (2018). *In vitro* growth-inhibitory effect of Cambodian essential oils against pneumonia causing bacteria in liquid and vapour phase and their toxicity to lung fibroblasts. *South African Journal of Botany*, 118, 85–97. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.06.005>

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

- Hussain, A. I., Anwar, F., Hussain Sherazi, S. T., & Przybylski, R. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*, *108*(3), 986–995.
- Imane, N. I., Fouzia, H., Azzahra, L. F., Ahmed, E., Ismail, G., Idrissa, D., Mohamed, K. H., Sirine, F., L'Houcine, O., & Noureddine, B. (2020). Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of some essential oils against multidrug resistant bacteria. *European Journal of Integrative Medicine*, *35*, 101074. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2020.101074>
- Instituto Nacional de Salud de la República de Colombia. (2018). *Informe de resultados de la vigilancia por laboratorio de resistencia antimicrobiana en infecciones asociadas a la atención en salud*.
- Jang, J., Hur, H. G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., & Ishii, S. (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. *Journal of Applied Microbiology*, *123*(3), 570–581. <https://doi.org/10.1111/JAM.13468>
- Jayan, H., Sun, D.-W., Pu, H., & Wei, Q. (2022). Surface-enhanced Raman spectroscopy combined with stable isotope probing to assess the metabolic activity of *Escherichia coli* cells in chicken carcass wash water. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *280*, 121549. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121549>
- Jayasena, D. D., & Jo, C. (2013). Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends in Food Science and Technology*. *34*(2), 96–108. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.09.002>
- Jiang, L., Wang, W., Wen, P., Shen, M., Li, H., Ren, Y., Xiao, Y., Song, Q., Chen, Y., Yu, Q., & Xie, J. (2020). Two water-soluble polysaccharides from mung bean skin: Physicochemical characterization, antioxidant and antibacterial activities. *Food Hydrocolloids*, *100*. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105412>

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

- Kanehisa M. (2016). KEGG Bioinformatics Resource for Plant Genomics and Metabolomics. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1374, 55–70. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3167-5_3
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123–140. doi:10.1038/nrmicro818
- Keystone, J. S. (1994). Single-dose antibiotic treatment for travellers' diarrhoea. *The Lancet*, 344(8936), 1520–1521. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)90343-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)90343-3)
- King, A. M., Mullin, L. G., Wilson, I. D., Coen, M., Rainville, P. D., Plumb, R. S., Gethings, L. A., Maker, G., & Trengove, R. (2019). Development of a rapid profiling method for the analysis of polar analytes in urine using HILIC–MS and ion mobility enabled HILIC–MS. *Metabolomics*, 15(2), 17. <https://doi.org/10.1007/s11306-019-1474-9>
- Kitteringham, N. R., Jenkins, R. E., Lane, C. S., Elliott, V. L., & Park, B. K. (2009). Multiple reaction monitoring for quantitative biomarker analysis in proteomics and metabolomics. *Journal of Chromatography B*, 877(13), 1229–1239. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.11.013>
- Knight, P. (1993). Hemorrhagic *Escherichia coli*: the danger increases. *ASM News* 59:247-250.
- Kohler, I., & Giera, M. (2017). Recent advances in liquid-phase separations for clinical metabolomics. *Journal of Separation Science*, 40(1), 93–108. <https://doi.org/10.1002/jssc.201600981>
- Kruk, J., Doskocz, M., Jodłowska, E., Zacharzewska, A., Łakomiec, J., Czaja, K., & Kujawski, J. (2017). NMR Techniques in Metabolomic Studies: A quick overview on examples of utilization. *Applied Magnetic Resonance*, 48(1), 1–21. <https://doi.org/10.1007/s00723-016-0846-9>

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G.-J. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of *oregano essential* oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology*, *91*(3), 453–462. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>
- Larrazabal-Fuentes, M., Palma, J., Paredes, A., Mercado, A., Neira, I., Lizama, C., Sepulveda, B., & Bravo, J. (2019). Chemical composition, antioxidant capacity, toxicity and antibacterial activity of the essential oils from *Acantholippia deserticola* (Phil.) Moldenke (*Rica rica*) and *Artemisia copa* Phil. (*Copa copa*) extracted by microwave-assisted hydrodistillation. *Industrial Crops and Products*, *142*. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111830>
- Lee, S. J., Umamo, K., Shibamoto, T., & Lee, K. G. (2005). Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, *91*(1), 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.05.056>
- Leite de Souza, E. (2021). Insights into the current evidence on the effects of essential oils toward beneficial microorganisms in foods with a special emphasis to lactic acid bacteria – A review. In *Trends in Food Science and Technology*, *114*, 333–341. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.011>
- Li, Q. X., & Chang, C. L. (2016). Basil (*Ocimum basilicum* L.) Oils. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, 231–238. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00025-0>
- Liu, Q., Chen, L., Laserna, A. K. C., He, Y., Feng, X., & Yang, H. (2020). Synergistic action of electrolyzed water and mild heat for enhanced microbial inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 revealed by metabolomics analysis. *Food Control*, *110*. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.107026>

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

- Logan, N. A. (1994). *Bacterial systematics*. Wiley. DOI:10.1002/9781444313949
- López, M. (2004). Los aceites esenciales. *Offarm*, 23(7), 88–91. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-los-aceites-esenciales-13064296>
- Lu, W., Bennett, B. D., & Rabinowitz, J. D. (2008). Analytical strategies for LC-MS-based targeted metabolomics. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 871(2), 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.04.031>
- Maree, J., Kamatou, G., Gibbons, S., Viljoen, A., & Van Vuuren, S. (2014). The application of GC-MS combined with chemometrics for the identification of antimicrobial compounds from selected commercial essential oils. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 130, 172–181. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2013.11.004>
- Markley, J. L., Brüschweiler, R., Edison, A. S., Eghbalnia, H. R., Powers, R., Raftery, D., & Wishart, D. S. (2017). The future of NMR-based metabolomics. *Current Opinion in Biotechnology*, 43, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.08.001>
- Mastrangelo, A., Ferrarini, A., Rey-Stolle, F., García, A., & Barbas, C. (2015). From sample treatment to biomarker discovery: A tutorial for untargeted metabolomics based on GC-(EI)-Q-MS. *Analytica Chimica Acta*, 900, 21–35. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.001>
- Mattila, L., Peltola, H., Siitonen, A., Kyronseppä, H., Simula, I., & Kataja, M. (1993). Short-Term Treatment of Traveler's Diarrhea with Norfloxacin: A Double-Blind, Placebo-Controlled Study During Two Seasons. *Clinical Infectious Diseases*, 17(4), 779–782. <https://doi.org/10.1093/clinids/17.4.779>
- Miao, Q., Zhao, L., Wang, Y., Hao, F., Sun, P., He, P., Liu, Y., Huang, J., Liu, X., Liu, X., Deng, G., Li, H., Li, L., Tang, Y., Wang, L., Feng, M., & Jia, W. (2020). Microbial metabolomics

EFEECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

- and network analysis reveal fungistatic effect of basil (*Ocimum basilicum*) oil on *Candida albicans*. *Journal of Ethnopharmacology*, 260. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113002>
- Mizuno, H., Ueda, K., Kobayashi, Y., Tsuyama, N., Todoroki, K., Min, J. Z., & Toyo'oka, T. (2017). The great importance of normalization of LC-MS data for highly-accurate non-targeted metabolomics. *Biomedical Chromatography*, 31(1), e3864. <https://doi.org/10.1002/bmc.3864>
- Moreira, M. R., Ponce, A. G., Del Valle, C. E., & Roura, S. I. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT Journal*, 38(5), 565–570. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.07.012>
- Nagana Gowda, G. A., & Raftery, D. (2015). Can NMR solve some significant challenges in metabolomics? *Journal of Magnetic Resonance*, 260, 144–160. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2015.07.014>
- Nalbantoglu, S. (2019). Metabolomics: Basic Principles and Strategies. *Molecular Medicine*. IntechOpen, 15. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88563>
- Naz, S., Moreira dos Santos, D. C., García, A., & Barbas, C. (2014). Analytical protocols based on LC–MS, GC–MS and CE–MS for nontargeted metabolomics of biological tissues. *Bioanalysis*, 6(12), 1657–1677. <https://doi.org/10.4155/bio.14.119>
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6, 1451–1474. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>
- Neidhardt, F. C., Curtiss R., Ingraham, J., Lin E. C. C., Low K. B., Magasanik B., Reznikoff W.S., Riley M., Schaechter M., & Umberger H.E. (1996). *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. *American Society for Microbiology, Washington, D.C., EUA*, 2nd ed, 29-47.

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

- Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M., & Umberger, H. E. (1987). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. *American Society for Microbiology, Washington, D.C., EUA*, 2, 1190–1219.
- Odumeru, J. A., Mitchell, S. J., Alves, D. M., Lynch, J. A., Yee, A. J., Wang, S. L., Styliadis, S., & Farber, J. M. (1997). Assessment of the Microbiological Quality of Ready-To-Use Vegetables for Health-Care Food Services. In *Journal of Food Protection*, 60(8), 954-960.
- Ogbaga, C. C., Stepien, P., Dyson, B. C., Rattray, N. J. W., Ellis, D. I., Goodacre, R., & Johnson, G. N. (2016). Biochemical Analyses of Sorghum Varieties Reveal Differential Responses to Drought. *PLOS ONE*, 11(5), e0154423. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154423>
- Ohno, T., Kita, M., Yamaoka, Y., Imamura, S., Yamamoto, T., Mitsufuji, S., Kodama, T., Kashima, K., & Imanishi, J. (2003). Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 8(3), 207-215. <https://doi.org/10.1046/j.1523-5378.2003.00146.x>
- Omidbaigi, R., Hassani, A., & Sefidkon, F. (2003). Essential oil content and composition of sweet basil (*ocimum basilicum*) at different irrigation regimes. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 6(2), 104–108. <https://doi.org/10.1080/0972-060X.2003.10643335>
- O’Neil, D. A. (2021). Innovation in infectious disease therapies from immunology. In *Drug Discovery Today*, 26(9), 2090–2094. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.03.023>
- Orenstein, R. M., & Wong, E. S. (1999). Urinary tract infections in adults. *American Family Physician*, 59 (5), 1225–1234, 1237.
- Ouibrahim, A., Tlili-Ait-kaki, Y., Bennadja, S., Amrouni, S., Djahoudi, A. G., & Djebar, M. R. (2013). Evaluation of antibacterial activity of *Laurus nobilis* L., *Rosmarinus officinalis* L.

EFEECTO DE *O. BASILICUM* SOBRE *E. COLI*

and *Ocimum basilicum* L. from Northeast of Algeria. *African Journal of Microbiology Research*, 7(42), 4968–4973. <https://doi.org/10.5897/ajmr2012.2390>

Oussalah, M., Phane, S., & Lacroix, M. (2006). Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against Cell Membranes and Walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 69(5), 1046–1055. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-69.5.1046>

Ozdemir, N., Bayrak, A., Tat, T., Yanık, Z. N., Altay, F., & Halkman, A. K. (2021). Fabrication and characterization of basil essential oil microcapsule-enriched mayonnaise and its antimicrobial properties against *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*. *Food Chemistry*, 359. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129940>

Pang, Z., Chong, J., Zhou, G., De Lima Morais, D. A., Chang, L., Barrette, M., Gauthier, C., Jacques, P. É., Li, S., & Xia, J. (2021). MetaboAnalyst 5.0: Narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W388–W396. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab382>

Papadopoulos, D., Schneider, D., Meier-Eiss, J., Arber, W., Lenski, R. E., & Blot, M. (1999). Genomic evolution during a 10,000-generation experiment with bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(7), 3807–3812. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3807>

Pitout, J. D. D. (2012). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: A combination of virulence with antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*, 3(9). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00009>

Politeo, O., Jukic, M., & Milos, M. (2007). Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. *Food Chemistry*, 101(1), 379–385. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.045>

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

- Randrianarivo, E., Maggi, F., Nicoletti, M., & Rasoanaivo, P. (2016). Evaluation of the anticonvulsant activity of the essential oil of *Myrothamnus moschatus* in convulsion induced by pentylenetetrazole and picrotoxin. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(6), 501–505. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.01.017>
- Raut, J. S., & Karuppayil, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, 62, 250–264. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055>
- Ravid, U., Putievsky, E., Katzir, I., & Lewinsohn, E. (1997). Enantiomeric Composition of Linalol in the Essential Oils of *Ocimum* Species and in Commercial Basil Oils, *Flavour Fragrance Journal*, 12, 293-296.
- Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U., & Saller, R. (2009). Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties - An overview. *Forschende Komplementarmedizin*, 16(2), 79–90. <https://doi.org/10.1159/000207196>
- Rempe, C. S., Lenaghan, S. C., Burris, K. P., & Stewart, C. N. (2017). Metabolomic analysis of the mechanism of action of yerba mate aqueous extract on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Metabolomics*, 13(2). <https://doi.org/10.1007/s11306-016-1159-6>
- Rivas, K., Rivas, C., & Gamboa, L. (2015). Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum* L.). *Multiciencias*, 15, 281–289.
- Roberts, L. D., Souza, A. L., Gerszten, R. E., & Clish, C. B. (2012). Targeted metabolomics. *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 30, 30(2), 1-24. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3002s98>
- Ruan, Y. L. (2014). Sucrose metabolism: Gateway to diverse carbon use and sugar signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 65, 33–67. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040251>

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

- Rubey, K. M., & Brenner, J. S. (2021). Nanomedicine to fight infectious disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 179, 113996. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113996>
- Ruuskanen, O. (2004). Safety and tolerability of azithromycin in pediatric infectious diseases: 2003 update. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 23(2), S135–S139. <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000112528.75956.41>
- Sajjadi, S. E. (2006). *Analysis of the essential oil of two cultivated Basil (Ocimum basilicum L.) from Iran*. 14(3), 128-130. <http://journals.tums.ac.ir/>
- Salam, I., Katelaris, P., Farthing, M. J. G., & Leigh-Smith, S. (1994). Randomised trial of single-dose ciprofloxacin for travellers' diarrhoea. *The Lancet*, 344(8936), 1537–1539. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)90350-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)90350-6)
- Salyers, A. A., & Whitt, D. D. (1995). *Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach*. Washington, DC: ASM Press, 1994. ISBN 1-55581-094-2. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 89(5), 581. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(95\)90126-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(95)90126-4)
- Serafino, A., Vallebona, P., Andreola, F., Zonfrillo, M., Mercuri, L., Federici, M., Rasi, G., Garaci, E., & Pierimarchi, P. (2008). Stimulatory effect of *Eucalyptus* essential oil on innate cell-mediated immune response. *BMC Immunology*, 9, 17. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-9-17>
- Shirazi, M. T., Gholami, H., Kavooosi, G., Rowshan, V., & Tafsiry, A. (2014). Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of *Tagetes minuta* and *Ocimum basilicum* essential oils. *Food Science and Nutrition*, 2(2), 146–155. <https://doi.org/10.1002/fsn3.85>

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

- Shojaee-Aliabadi, S., Hosseini, S. M., & Mirmoghtadaie, L. (2017). *Antimicrobial Activity of Essential Oil', Essential Oils in Food Processing: Chemistry, Safety and Applications*. 191-229. <https://doi.org/10.1002/9781119149392.ch6>
- Shu, H., Zhang, W., Yun, Y., Chen, W., Zhong, Q., Hu, Y., Chen, H., & Chen, W. (2020). Metabolomics study on revealing the inhibition and metabolic dysregulation in *Pseudomonas fluorescens* induced by 3-carene. *Food Chemistry*, 329. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127220>
- Sienkiewicz, M., Łysakowska, M., Kowalczyk, E., Szymańska, G., Kochan, E., Krukowska, J., Olszewski, J., & Zielińska-Bliźniewska, H. (2017). The ability of selected plant essential oils to enhance the action of recommended antibiotics against pathogenic wound bacteria. *Burns*, 43(2), 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2016.08.032>
- Sienkiewicz, M., Łysakowska, M., Pastuszka, M., Bienias, W., & Kowalczyk, E. (2013). The potential of use basil and rosemary essential oils as effective antibacterial agents. *Molecules*, 18(8), 9334–9351. <https://doi.org/10.3390/molecules18089334>
- Silva, F., Santos, R., Diniz, E. R., Casali, V. W. D., & De Lima, R. (2003). Content and composition of basil (*Ocimum basilicum*) essential oil at two different hours in the day and two seasons. *Revista brasileira de plantas medicinais*, 6(1), 33-38
- Simoneit, C., Burow, E., Tenhagen, B. A., & Käsbohrer, A. (2015). Oral administration of antimicrobials increases antimicrobial resistance in E. coli from chicken - A systematic review. In *Preventive Veterinary Medicine*, 118(1), 1–7. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.11.010>
- Singh, N., Singh, R. K., Bhunia, A. K., & Stroshine, R. L. (2002). Effect of inoculation and washing methods on the efficacy of different sanitizers against *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce. *Food Microbiology*, 19(2–3), 183–193. <https://doi.org/10.1006/fmic.2001.0471>

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

- Snene, A., Mokni, R. El, Mahdhi, A., Joshi, R. K., & Hammami, S. (2020). Comparative study of essential oils composition and in vitro antibacterial effects of two subspecies of *Daucus carota* growing in Tunisia. *South African Journal of Botany*, *130*, 366–370. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.01.028>
- Sokurenko, E. V, Chesnokova, V., Dykhuizen, D. E., Ofek, I., Wu, X.-R., Krogfelt, K. A., Struve, C., Schembri, M. A., & Hasty, D. L. (1998). Pathogenic adaptation of *Escherichia coli* by natural variation of the FimH adhesin, *95*(15) 8922-8926. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.8922>
- Solgi, M., & Ghorbanpour, M. (2014). Application of essential oils and their biological effects on extending the shelf-life and quality of horticultural crops. *Trakia Journal of Sciences*, *12*(2), 198–210. <http://www.uni-sz.bg>
- Solomons, T. W. G., Craig, B. F., & Scott, A. S. (1988). *Organic Chemistry*. (John Wiley & Sons Inc, Ed.).
- Solórzano-Santos, F., & Miranda-Novales, M. G. (2012). Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, *23*(2), 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.005>
- Soulaimani, B., Hidar, N. El, Ben El Fakir, S., Mezrioui, N., Hassani, L., & Abbad, A. (2021). Combined antibacterial activity of essential oils extracted from *Lavandula maroccana* (Murb.), *Thymus pallidus* Batt. and *Rosmarinus officinalis* L. against antibiotic-resistant Gram-negative bacteria. *European Journal of Integrative Medicine*, *43*(4). <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2021.101312>
- Souza, V., Rocha, M., Silva, C., Sandner, L., Castillo, A., & Eguiarte, L. E. (2001). Ecología evolutiva de *Escherichia coli*. *Interciencia*, *26*(10), 513–517. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33906116>

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

- Srivastava, H. C., Shukla, P., Tripathi, S., & Shanker, B. (2014). Antioxidant and antimicrobial activities of sweet basil oils. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5(1), 279. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5\(1\).279-85](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5(1).279-85)
- 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>
- Stefan, M., Zamfirache, M. M., Padurariu, C., Trută, E., & Gostin, I. (2013). The composition and antibacterial activity of essential oils in three *Ocimum* species growing in Romania. *Central European Journal of Biology*, 8(6), 600–608. <https://doi.org/10.2478/s11535-013-0171-8>
- Steffen, R., DuPont, H. L., Heusser, R., Helminger, A., Witassek, F., Manhart, M. D., & Schär, M. (1986). Prevention of traveler's diarrhea by the tablet form of bismuth subsalicylate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 29(4), 625–627. <https://doi.org/10.1128/AAC.29.4.625>
- Steffen, R., Jori, J., DuPont, H. L., Mathewson, J. J., & Stürchler, D. (1993). Treatment of travellers' diarrhoea with fleroxacin: a case study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 31(5), 767–776. <https://doi.org/10.1093/jac/31.5.767>
- Swamy, M. K., Akhtar, M. S., & Sinniah, U. R. (2016). Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An Updated Review. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2016, 3012462. <https://doi.org/10.1155/2016/3012462>
- Sweeney, N. J., Klemm, P., McCormick, B. A., Moller-Nielsen, E., Utley, M., Schembri, M. A., Laux, D. C., & Cohen, P. S. (1996). The *Escherichia coli* K-12 gntP gene allows E. coli F-

EFEECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

- 18 to occupy a distinct nutritional niche in the streptomycin-treated mouse large intestine. *Infection and immunity*, 64(9), 3497–3503. <https://doi.org/10.1128/iai.64.9.3497-3503.1996>
- Szabadváry, F. (1966). CHAPTER III - ANALYTICAL KNOWLEDGE DURING THE PERIOD OF IATROCHEMISTRY. In F. SZABADVÁRY (Ed.), *History of Analytical Chemistry*, 26, 21–41. Pergamon. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-010980-0.50006-7>
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21(9), 1199–1218. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.02.003>
- Tang, C., Chen, J., Zhou, Y., Ding, P., He, G., Zhang, L., Zhao, Z., & Yang, D. (2021). Exploring antimicrobial mechanism of essential oil of *Amomum villosum* Lour through metabolomics based on gas chromatography-mass spectrometry in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiological Research*, 242. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126608>
- Tautenhahn, R., Patti, G. J., Rinehart, D., & Siuzdak, G. (2012). XCMS online: A web-based platform to process untargeted metabolomic data. *Analytical Chemistry*, 84(11), 5035–5039. <https://doi.org/10.1021/ac300698c>
- Taylor, D. N. (1991). Treatment of Travelers' Diarrhea: Ciprofloxacin plus Loperamide Compared with Ciprofloxacin Alone. *Annals of Internal Medicine*, 114(9), 731. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-114-9-731>
- Telci, I., Bayram, E., Yilmaz, G., & Avcı, B. (2006). Variability in essential oil composition of Turkish basils (*Ocimum basilicum* L.). *Biochemical Systematics and Ecology*, 34(6), 489–497. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2006.01.009>
- Thielmann, J., Muranyi, P., & Kazman, P. (2019). Screening essential oils for their antimicrobial activities against the foodborne pathogenic bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Heliyon*, 5(6), e01860. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e01860

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

- Troeger, C., Forouzanfar, M., Rao, P. C., Khalil, I., Brown, A., Reiner, R. C., Fullman, N., Thompson, R. L., Abajobir, A., Ahmed, M., Alemayohu, M. A., Alvis-Guzman, N., Amare, A. T., Antonio, C. A., Asayesh, H., Avokpaho, E., Awasthi, A., Bacha, U., Barac, A., ... Mokdad, A. H. (2017). Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet Infectious Diseases*, *17*(9), 909–948. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30276-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30276-1)
- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mazzanti, G., & Bisignano, G. (2005). Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, *49*(6), 2474–2478. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.6.2474-2478.2005>
- Van Loon, F. P., Bennish, M. L., Speelman, P., & Butler, C. (1989). Double blind trial of loperamide for treating acute watery diarrhoea in expatriates in Bangladesh. *Gut*, *30*(4), 492–495. <https://doi.org/10.1136/gut.30.4.492>
- Visbal, J., Máttar, S., & Arrieta, G. (2001). *E. coli* O157:H7 enterohemorrágico: un agente etiológico de diarrea en columbia subestimado. Parte I. *Revista MVZ Córdoba*, *6*, 15–23.
- Viuda-Martos, M., Mohamady, M. A., Fernández-López, J., Abd ElRazik, K. A., Omer, E. A., Pérez-Alvarez, J. A., & Sendra, E. (2011). *In vitro* antioxidant and antibacterial activities of essentials oils obtained from Egyptian aromatic plants. *Food Control*, *22*(11), 1715–1722. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.04.003>
- Wang, G., Zhang, J., Wang, G., Fan, X., Sun, X., Qin, H., Xu, N., Zhong, M., Qiao, Z., Tang, Y., & Song, R. (2014). Proline responding1 plays a critical role in regulating general protein synthesis and the cell cycle in maize. *Plant Cell*, *26*(6), 2582–2600. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.125559>

EFECTO DE O. BASILICUM SOBRE E. COLI

- Wannissorn, B., Jarikasem, S., Siriwangchai, T., & Thubthimthed, S. (2005). Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia*, *76*(2), 233–236. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2004.12.009>
- Wencewicz, T. A. (2016). New antibiotics from Nature's chemical inventory. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *24*(24), 6227–6252. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.09.014>
- Wishart, D. S., Tzur, D., Knox, C., Eisner, R., Guo, A. C., Young, N., Cheng, D., Jewell, K., Arndt, D., Sawhney, S., Fung, C., Nikolai, L., Lewis, M., Coutouly, M. A., Forsythe, I., Tang, P., Shrivastava, S., Jeroncic, K., Stothard, P., ... Querengesser, L. (2007). HMDB: The human metabolome database. *Nucleic Acids Research*, *35*(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkl923>
- Witting, M. (2013). *Host-Pathogen metabolomics of Pseudomonas aeruginosa infection models*.
- World Health Organization. (1999). New frontiers in the development of vaccines against enterotoxinogenic (ETEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *E. coli* infections. Part I. Releve epidemiologique hebdomadaire, *74*(13), 98–101.
- World Health Organization. (2018). *E. coli*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>.
- Yang, C., Hu, D. H., & Feng, Y. (2015). Antibacterial activity and mode of action of the *Artemisia capillaris* essential oil and its constituents against respiratory tract infection-causing pathogens. *Molecular Medicine Reports*, *11*(4), 2852–2860. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.3103>
- Zhan, X., Yang, J., Zheng, S., Li, N., & Li, N. (2021). Introductory Chapter: Metabolomics. In *Metabolomics - Methodology and Applications in Medical Sciences and Life Sciences*. IntechOpen, 14. <https://doi.org/10.5772/intechopen.99138>

EFECTO DE *O. BASILICUM* SOBRE *E. COLI*