

Análisis metabólico del efecto de aceites esenciales sobre la inhibición de la formación del  
*biofilm* de *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis ATCC 13076

Yuliany Torcoroma Guillín Rincón

Trabajo de Grado para Optar al Título de Magister en Biología

Director

William Hidalgo Bucheli

PhD. en Química

Codirector

Marlon Yesid Cáceres Ortiz

PhD. en Ciencias Biomédicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Maestría en Biología

Bucaramanga

2023

### **Agradecimientos**

A mis abuelos por su amor

A mis padres por ser mi razón de ser

A mi hermano por su acompañamiento en cada una de mis metas

A Eder por ser parte de mi camino profesional y por su cariño incondicional

A Marlon por todas las palabras de aliento y enseñanzas brindadas

A la Doctora Claudia y al Doctor William por darme la oportunidad de aprender y forjarme en el camino como científica.

A mis amigos por hacer parte de todo este proceso

A los profesores de Biología por cada uno de los aportes brindados para enriquecer mi trayectoria como profesional.

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

**Tabla de Contenido**

	<b>Pág.</b>
Introducción .....	11
2. Objetivos .....	15
2.1 Objetivo General .....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
3. Marco teórico .....	16
3.1 Impacto económico de la resistencia antimicrobiana .....	16
3.2 Descripción general de <i>Salmonella enterica</i> .....	17
3.3 Formación del <i>biofilm</i> en microorganismos .....	19
3.4 Farmacorresistencia generada por la formación del <i>biofilm</i> .....	23
3.5 Estrategias de inhibición del <i>biofilm</i> .....	24
3.6 Aceites esenciales .....	27
3.7 Metabolómica .....	31
4. Metodología .....	37
4.1 Microorganismo y medios de cultivo .....	37
4.2 Material vegetal y caracterización de los aceites esenciales.....	37
4.3 Determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales <i>in vitro</i> sobre células planctónicas.....	38
4.4 Evaluación de la formación e inhibición del <i>biofilm</i> .....	39
4.5 Cuantificación de la viabilidad celular de células planctónicas y células sésiles .....	40
4.6 Evaluación de actividad metabólica del <i>biofilm</i> .....	41
4.7 Análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM).....	42

ANÁLISIS METABÓLICO DEL EFECTO DE ACEITES ESENCIALES...	4
4.8 Evaluación de la integridad de la membrana celular de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	42
4.9 Preparación de muestras de metabolitos y análisis metabólico .....	43
4.9.1 Extracción de metabolitos de células planctónicas y del <i>biofilm</i> .....	43
4.9.2 Análisis de extractos metabólicos por UHPLC-Orbitrap/HRMS .....	44
4.9.3 Procesamiento de datos.....	45
4.0 Análisis estadístico.....	46
5. Resultados .....	47
5.1 Material vegetal y caracterización de los aceites esenciales.....	47
5.2 Determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales in vitro sobre células planctónicas.....	47
5.3 Evaluación de la formación e inhibición del <i>biofilm</i> .....	49
5.4 Cuantificación de la viabilidad celular de células planctónicas y células sésiles .....	51
4.5 Evaluación de la actividad metabólica del <i>biofilm</i> .....	53
4.6 Análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM).....	54
4.7 Efecto de los AE evaluados sobre la integridad de la membrana celular de S. Enteritidis ....	55
4.8 Análisis metabólico.....	57
4.8.1 Análisis metabólico del efecto del AE LOT-I sobre células planctónicas de S. Enteritidis	57
4.8.2 Análisis metabólico del efecto del AE LOT-II sobre la inhibición de la formación del <i>biofilm</i> de S. Enteritidis.....	68
6. Discusión.....	78
7. Conclusión .....	88
Referencias bibliográficas.....	89

**Lista de Tablas**

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Principales estrategias antibiofilm .....	25
Tabla 2. Efecto biológico de aceites esenciales sobre diferentes microorganismos de interés clínico.....	30
Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de los 20 AE frente a <i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076. Los valores están expresados en mg/mL y cada experimento fue llevado a cabo por triplicado.....	48
Tabla 4. Actividad antibiofilm de los AE sobre <i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076. Se calculó el porcentaje de inhibición respecto al control (sin tratamiento con AE). .....	50
Tabla 5. Metabolitos identificados por estar significativamente afectados después del tratamiento con el AE LOT-II sobre células planctónicas de <i>S. Enteritidis</i> . .....	61
Tabla 6. Clasificación de los metabolitos identificados putativamente de acuerdo con el análisis de enriquecimiento de las vías KEGG.....	66
Tabla 7. Metabolitos identificados por estar significativamente afectados después del tratamiento con el AE LOT-II sobre la inhibición de la formación del <i>biofilm</i> de <i>S. Enteritidis</i> .....	71
Tabla 8. Clasificación de los metabolitos identificados putativamente de acuerdo con el análisis de enriquecimiento de las vías KEGG.....	77

### Lista de Figuras

Figura 1. Etapas de la formación del biofilm bacteriano .....	20
Figura 2. Vías metabólicas implicadas en la formación del <i>biofilm</i> (azul). Se destaca principalmente cambios en el metabolismo de aminoácidos, el ciclo de glicerolípidos y el ácido tricarbóxico al compararse con las células planctónicas. ....	22
Figura 3. Reducción del XTT para formar el derivado de formazán.....	41
Figura 4. Conteo de células planctónicas posterior al tratamiento con el AE <i>L. origanoides</i> quimiotipo carvacrol (LOC), <i>L. origanoides</i> quimiotipo timol- <i>p</i> -cimeno (LOT-C) y <i>L. origanoides</i> quimiotipo timol (LOT-II). ....	52
Figura 5. Conteo de células del <i>biofilm</i> posterior al tratamiento con el AE <i>L. origanoides</i> quimiotipo carvacrol (LOC), <i>L. origanoides</i> quimiotipo timol- <i>p</i> -cimeno (LOT-C) y <i>L. origanoides</i> quimiotipo timol (LOT-II). ....	53
Figura 6. Efecto de la viabilidad celular de células sésiles de <i>S. Enteritidis</i> al ser tratadas con diferentes concentraciones de aceites esenciales. ....	54
Figura 7. Micrografías del <i>biofilm</i> de <i>S. Enteritidis</i> sobre cupones de vidrio esmerilado obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). <i>Biofilm</i> de <i>S. Enteritidis</i> sin tratamiento (a, b) y con tratamiento con el AE LOT-II (c, d) a diferentes magnitudes. Las flechas resaltan áreas de matriz extracelular.....	55
Figura 8. Liberación de proteínas en <i>S. Enteritidis</i> al ser tratadas con diferentes concentraciones del AE LOC, LOT-C y LOT-II. ....	56
Figura 9. Liberación de ácidos nucleicos en <i>S. Enteritidis</i> después del tratamiento con diferentes concentraciones del AE LOT, LOT-C y LOT-II.....	57

- Figura 10. Gráficos de puntuación que representan los resultados de PCA y PLS-DA basados en datos de LC/MS en células planctónicas de *S. Enteritidis* con y sin tratamiento con aceite esencial LOT-II. (a y b) PCA con datos obtenidos en modos de adquisición negativo y positivo, respectivamente; (c y d) PLS-DA con datos obtenidos en los modos de adquisición negativo y positivo, respectivamente. Control (color rojo) y células tratadas (color azul). ..... 59
- Figura 11. Volcano-plot de los metabolitos putativamente identificados. (a) modo de iones negativo. (b) modo de iones positivo. Color azul indica metabolitos regulados negativamente; color rojo indica los metabolitos regulados positivamente. .... 65
- Figura 12. Gráfico de mapa de calor de los metabolitos más representativos que se encontraron afectados en las células planctónicas después del tratamiento con el AE LOT-II EO. Fila: metabolitos; columnas: muestras. .... 66
- Figura 13. Ruta general de los metabolitos afectados por el AE LOT-II sobre las células planctónicas de *S. Enteritidis*. Los metabolitos en azul fueron modulados positivamente en la muestra tratada, mientras que los metabolitos en rojo indican metabolitos modulado ..... 68
- Figura 14. Gráficos de puntuación que representan los resultados de PCA y PLS-DA basados en datos de LC/MS en células sésiles de *S. Enteritidis* con y sin tratamiento del AE LOT-II. (a y b) PCA con datos obtenidos en modos de adquisición negativo y positivo, respectivamente; (c y d) PLS-DA con datos obtenidos en los modos de adquisición negativo y positivo, respectivamente. Control (color rojo) y células tratadas (color azul). ..... 70
- Figura 15. Volcano-plot de los metabolitos putativamente identificados. (a) modo de iones negativo. (b) modo de iones positivo. Color azul indica metabolitos regulados negativamente; color rojo indica los metabolitos regulados positivamente. .... 75

Figura 16. Gráfico de mapa de calor de los metabolitos más representativos que se encontraron afectados en las células sésiles después del tratamiento con el AE LOT-II EO. Fila: metabolitos; columnas: muestras. .... 76

Figura 17. Ruta general de los metabolitos afectados por el AE LOT-II sobre la inhibición de la formación del *biofilm* de *S. Enteritidis*. Los metabolitos en azul fueron modulados positivamente en la muestra tratada, mientras que los metabolitos en rojo indican metabolitos modulados negativamente. .... 78

## Resumen

**Título:** Análisis metabólico del efecto de aceites esenciales sobre la inhibición de la formación del *biofilm* de *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis ATCC 13076\*

**Autor:** Yuliany Torcoroma Guillín Rincón\*\*

**Palabras Clave:** *Salmonella*; *biofilm*; metabolómica; aceites esenciales

**Descripción:** Las especies de *Salmonella* no tifoidea son unas de las principales causas bacterianas de enfermedades transmitidas por alimentos, lo cual ocasiona un problema de salud pública. Sumado a esto, estos microorganismos tienen la capacidad de formar *biofilm*, que contribuye a la multirresistencia a los fármacos tradicionales, generando así, deficientes mecanismos terapéuticos contra estos microorganismos. Por lo anterior, la búsqueda y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos que permitan mitigar o evadir la resistencia de patógenos de alta incidencia, como bacterias del género *Salmonella*, constituyen un campo de gran interés clínico y científico. Entre las alternativas, los aceites esenciales (AE) extraídos de plantas aromáticas medicinales han generado expectativas como agentes fitoterapéuticos promisorios. En la presente investigación, se evaluó el potencial antimicrobiano y anti-*biofilm* de 20 AE sobre *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, así como el mecanismo de acción del AE de *Lippia origanoides* quimiotipo timol (LOT-II). Los AE fueron suministrados y caracterizados por el CENIVAM. El efecto antimicrobiano fue evaluado mediante el método de microdilución en caldo y el efecto anti-*biofilm* mediante el método con cristal violeta. Finalmente, por medio de una aproximación de metabolómica no dirigida, basada en espectrometría de masas de alta resolución (HRMS), se dilucidó el efecto del AE sobre el metabolismo de células planctónicas y sésiles. De los 20 AE evaluados, cuatro presentaron actividad antimicrobiana y tres inhibieron la formación del *biofilm* de *S. Enteritidis* en un porcentaje mayor al 60%, sin afectar la actividad metabólica a concentraciones sub-inhedoras. El análisis del perfil metabólico permitió identificar cambios en la modulación de los metabolitos de las células planctónicas y células sésiles al ser tratadas con el AE de LOT-II. Esos cambios demostraron la alteración de diferentes rutas metabólicas, entre las que se encuentran el metabolismo central del carbono, el metabolismo de nucleótidos y aminoácidos.

---

\* Trabajo de Grado

\*\*Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Maestría en Biología. Director: William Hidalgo Bucheli. PhD. Codirector: Marlon Yesid Cáceres Ortiz. PhD.

### Abstract

**Title:** Metabolic analysis of the effect of essential oils on the inhibition of *biofilm* formation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076\*

**Author(s):** Yuliany Torcoroma Guillín Rincón\*\*

**Key Words:** *Salmonella*; *biofilm*; metabolomics; essential oils

**Description:** Non-typhoidal *Salmonella* species are one of the main bacterial causes of foodborne diseases, which causes a public health problem. In addition, these microorganisms could form *biofilm*, which contributes to multidrug resistance to traditional drugs, thus generating deficient therapeutic mechanisms against these microorganisms. Therefore, the search and development of new antimicrobial agents that allow mitigating or evading the resistance of high incidence pathogens, such as bacteria of the *Salmonella* genus, is a field of great clinical and scientific interest. Among the alternatives, essential oils (EO) extracted from medicinal aromatic plants have generated expectations as promising phytotherapeutic agents. In the present investigation, the antimicrobial and anti-*biofilm* potential of 20 EOs was evaluated on *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, as well as the mechanism of action of the EO from *Lippia origanoides* chemotype thymol (LOT-II). The EOs were supplied and characterized by CENIVAM. The antimicrobial effect was evaluated by the broth microdilution method and the anti-*biofilm* effect by the crystal violet method. Finally, by means of a non-targeted metabolomics approach, based on high resolution mass spectrometry (HRMS), the effect of EO on the metabolism of planktonic and sessile cells was elucidated. Of the 20 EOs evaluated, four exhibited antimicrobial activity and three inhibited *S. Enteritidis* *biofilm* formation by more than 60%, without affecting metabolic activity at sub-inhibitory concentrations. Metabolic profiling analysis identified changes in the modulation of metabolites of planktonic cells and sessile cells upon treatment with LOT-II EO. These changes demonstrated the alteration of different metabolic pathways, including central carbon metabolism, nucleotide, and amino acid metabolism.

---

\* Degree Work

\*\* Faculty of Sciences. School of Biology. Master's degree in biology. Director: William Hidalgo Bucheli. PhD. Co-director: Marlon Yesid Cáceres Ortiz. PhD

## Introducción

En las últimas décadas, las infecciones por *Salmonella* han representado una causa importante de muertes en todo el mundo (Frost et al., 2019). Se estima que anualmente 153 millones de personas son infectadas por bacterias del género *Salmonella* y 57 mil mueren a causa de este patógeno (Quesada et al., 2016). Esto se debe principalmente a la aparición de microorganismos resistentes a antibióticos convencionales (CDC, 2019). Las bacterias desarrollan resistencia antimicrobiana (AMR, por sus siglas en inglés) mediante varios mecanismos que incluyen: inactivación enzimática, modificación en la permeabilidad de la membrana, activación de las bombas de flujo, modificación de rutas metabólicas, entre otros (Sultan et al., 2018).

Actualmente, el nuevo Sistema Mundial de Vigilancia Antimicrobiana de la OMS (GLASS) reportó la prevalencia de resistencia a los antimicrobianos entre los países inscritos en el sistema evidenciando que no hay diferencias significativas en función del ingreso económico (Organización Mundial de la Salud, 2020). Además, el informe de investigación global sobre la Resistencia a los Antimicrobianos reportó en 2019 más de 1.27 millones de muertes en todo el mundo y estima para el año 2050, 10 millones de personas morirán como resultado directo de las infecciones bacterianas resistentes a los antibióticos. A nivel Latinoamericano, más de la mitad de las infecciones intrahospitalarias son causadas por patógenos resistentes a los antibióticos convencionales, y representan pérdidas del producto interno bruto (PIB) del 0,4% -1,6%, lo cual está relacionado principalmente con los altos costos de tratamiento y estancias hospitalarias (Organización Mundial de la Salud, 2015). En Colombia, el Instituto Nacional de Salud mediante programas de vigilancia de resistencia antimicrobiana ha identificado la incidencia de microorganismos resistentes principalmente sobre agentes bacterianos causantes de neumonías,

meningitis, enfermedades gastrointestinales, infecciones de transmisión sexual e infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) (Gaviria et al., 2018). Por ejemplo, los resultados del informe de los microorganismos transmitidos por alimentos reportaron 12.966 aislamientos para *Salmonella* de los cuales, 3.575 correspondían a *Salmonella* Typhimurium seguido de *Salmonella* Enteritidis con 3.515. Sumado a ello, *Salmonella* Enteritidis mostró un aumento de su resistencia a la ampicilina, tetraciclina y trimetropin-sulfametosaxol durante 2017 (Rodríguez et al., 2019). Además, en condiciones adecuadas, la mayoría de las bacterias tienen la capacidad de formar *biofilm*, es decir, consorcios de bacterias embebidas en una matriz de exopolisacáridos, proteínas y ADN (Flemming & Wuertz, 2019).

La formación del *biofilm* es bien conocida por sus propiedades físicas y biológicas que confieren resistencia contra los antibióticos y contribuye a la cronicidad de las infecciones y a su recurrencia, lo que lo convierte en uno de los principales desafíos en la terapia antibiótica actual (Koo et al., 2017). La farmacoresistencia del *biofilm* se ha atribuido a varios factores: (i) sustancias poliméricas extracelulares (EPS), las cuales actúan como barrera física y química; (ii) metabolismo celular disminuido, lo que impide que los antibióticos que actúan sobre células en división no presenten ningún efecto significativo; (iii) el ADN extracelular posee carga negativa lo que permite la unión a los antibióticos con carga positiva, disminuyendo su concentración efectiva, entre otros (Olsen, 2015; Singh et al., 2017).

Por esta razón, se hace indispensable promover y guiar la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos que permitan contrarrestar este problema de salud pública. En este sentido, los aceites esenciales (AE) surgen como una alternativa prometedora al uso de antibióticos convencionales (Mohamed et al., 2018; Y. Zhang et al., 2018). Los AE son mezclas complejas de constituyentes volátiles producidos por plantas, y constituyen una importante defensa de las

plantas frente a diferentes patógenos, por lo cual, a menudo poseen propiedades antimicrobianas (Chouhan et al., 2017a; Sayeed Akthar et al., 2014; Swamy et al., 2016a). Colombia, al ser un país megadiverso, presenta amplias alternativas para el hallazgo, caracterización y aislamiento de nuevas moléculas, sin embargo, han sido poco estudiadas (Stashenko, 2009; Villada, 2018). La biodiversidad de Colombia puede ser aprovechada para la destilación de AE, los cuales se han utilizado para el tratamiento de enfermedades, fabricación de diferentes productos cosméticos y alimenticios, por los cuales son una fuente de subproductos de mayor valor comercial. En el año 2021, Colombia exportó \$1.46 M en AE convirtiéndolo en el exportador número 88 de AE e importó \$17.8 M en AE, siendo el importador número 37 de AE (OEC - The Observatory of Economic Complexity, 2023). Sin embargo, deben implementarse técnicas de destilación y caracterización de AE a gran escala con el fin de obtener posibilidades de cultivo de esas especies promisorias, e incentivar a la exportación de sustancias químicas de alto valor agregado con el fin de impactar positivamente en la economía colombiana, a su vez fortaleciendo el conocimiento científico y la conservación de la biodiversidad (Stashenko, 2009; Villada, 2018). Las propiedades de los AE reportadas en la literatura son muy amplias, y están relacionadas con la composición química, por lo tanto, entre mayor sea la diversidad vegetal mayor será la diversidad química (Stashenko, 2009; Stashenko et al., 2003, 2010a). Entre las propiedades se incluyen prevención de formación de *biofilm*, inhibición del mecanismo de comunicación celular (quorum sensing) e inhibición del crecimiento de los microorganismos resistentes (Mohamed et al., 2018; Y. Zhang et al., 2018). El mecanismo de acción de los AE depende de la composición química, y su actividad biológica no es atribuible a un único mecanismo, sino que es una cascada de reacciones que involucran toda la célula bacteriana (Koo et al., 2017). Se ha planteado que los componentes de los AE toman como punto de acción la pared celular y membrana citoplasmática, generando

alteración en los ácidos grasos de membrana, pérdida del potencial de membrana, incremento en la permeabilidad celular, alteración del ATP y ATPasas, liberación de contenido citoplasmático, inhibición de los mecanismos de comunicación celular y alteración en la síntesis de aminoácidos (Zhang et al., 2020; N. Zhang et al., 2016).

Actualmente, los rápidos avances en las herramientas ómicas, como la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica han facilitado la comprobación de algunas de esas hipótesis y juegan un papel importante en la identificación de posibles dianas terapéuticas. Principalmente, la metabolómica como herramienta sensible y prometedora que permite identificar y cuantificar metabolitos, proporciona información importante sobre genómica funcional, ingeniería metabólica y fisiología celular, debido a que los perfiles metabólicos permiten una captura instantánea de la fisiología de la célula (Nazzaro et al., 2013; Picone et al., 2013). En el presente estudio, se evaluó el efecto antibiofilm de 20 AE sobre *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis ATCC 13076 y, además para el aceite esencial *Lippia origanoides* quimiotipo timol (LOT-II), que exhibió la actividad antibiofilm más promisorio, se estudió la inhibición de la red metabólica involucrada en la formación del biofilm del microorganismo en estudio, a través de una aproximación quimiométrica basada en metabolómica no dirigida.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de aceites esenciales sobre la inhibición de las rutas biosintéticas implicadas en la formación del *biofilm* de *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis ATCC 13076.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Seleccionar el aceite esencial con mayor efecto inhibitorio de la formación de *biofilm* de *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis ATCC 13076.
- Identificar los principales metabolitos afectados por el aceite esencial durante la inhibición de la formación del *biofilm* en *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis ATCC 13076.
- Establecer las rutas metabólicas afectadas por el aceite esencial al inhibir la formación del *biofilm* de *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis ATCC 13076.

### 3. Marco teórico

#### 3.1 Impacto económico de la resistencia antimicrobiana

En las últimas décadas, la Resistencia Antimicrobiana (AMR, por sus siglas en inglés) se ha convertido en una amenaza global para los sistemas de salud pública en todo el mundo (Ferri et al., 2017). La capacidad de las bacterias para resistir la acción de los antibióticos convencionales mediante diversos mecanismos como variabilidad genética, modificación de permeabilidad de membrana y excreción del compuesto entre otros, sumado al uso indebido y excesivo de los mismos han conducido al incremento de la resistencia antimicrobiana. A causa de esto, se ha generado un aumento significativo de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos resistentes y multirresistentes, asociadas principalmente a estancias hospitalarias prolongadas y aumento de morbilidad y mortalidad debido al fracaso terapéutico convencional (Frieri et al., 2017; Ru et al., 2017; Tacconelli et al., 2017, 2018).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el programa Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS), la resistencia a los antibióticos en infecciones bacterianas severas es un problema de relevancia a nivel mundial, y la resistencia para al menos un antibiótico, ha aumentado entre un 35-50% en los últimos años. Según los datos reportados en el sistema GLASS entre las bacterias resistentes más frecuentes se encuentran *Acinetobacter* spp, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Shigella* spp y *Salmonella* spp. Adicionalmente, reportó la prevalencia de resistencia a los antimicrobianos entre los países inscritos en el sistema, demostrando que no hay diferencias significativas en función del ingreso económico (países inscritos: 35 países de ingresos altos, 17 de ingresos medianos altos, 28 de ingresos medianos bajos y 14 de ingreso bajos) (World Health Organization, 2021).

Por otro lado, los reportes del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) muestran que cada año en los Estados Unidos, al menos ~2.8 millones de personas contraen infecciones por microorganismos resistentes a antibióticos y más de 35 mil mueren por esta causa (CDC, 2019). A nivel Latinoamericano, en países como Brasil, Bolivia y Perú, más de la mitad de las infecciones intrahospitalarias son causadas por patógenos resistentes a los antibióticos convencionales, y representan pérdidas del producto interno bruto (PIB) del 0.4% -1.6%, lo cual está relacionado principalmente con los altos costos de tratamiento y estancias hospitalarias (Organización Mundial de la Salud, 2015). En Colombia, el Instituto Nacional de Salud reportó 12.966 aislamientos de *Salmonella* transmitida por alimentos desde 1997 hasta el 2018, de los cuales 3.575 correspondían a *Salmonella* Typhimurium y 3.515 a *Salmonella* Enteritidis. Sumado a ello, *Salmonella* Enteritidis mostró un aumento de su resistencia a la ampicilina, tetraciclina y trimetoprima/sulfametoxazol durante 2017 (Rodríguez et al., 2019).

Por lo tanto, es importante implementar medidas controladas de uso de antibióticos, programas de recopilación de datos epidemiológicos y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos para combatir la prevalencia de la resistencia de los microorganismos.

### **3.2 Descripción general de *Salmonella enterica***

*Salmonella* es un género de bacterias Gram negativas, anaerobias facultativas, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. El género *Salmonella* se clasifica en dos especies, *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. La especie *S. enterica*, se puede clasificar en seis subespecies en función de su relación genómica y sus propiedades bioquímicas. Las subespecies son: *S. enterica* subespecie. *enterica* (I); *S. enterica* subespecie. *salamae* (II); *S. enterica* subespecie. *arizona* (IIIa); *S. enterica* subespecie. *diarizonae* (IIIb); *S. enterica* subespecie. *houtenae* (IV); y *S. enterica* subespecie. *indica* (VI). Entre todas las subespecies de *Salmonella*, *S.*

*enterica* subespecie. *enterica* (I) se encuentra predominantemente en mamíferos y contribuye con aproximadamente el 99% de las infecciones por *Salmonella* en humanos y animales de sangre caliente. En contraste, las otras cinco subespecies de *Salmonella* y *S. bongori* se encuentran principalmente en el medio ambiente y también en animales de sangre fría y, por lo tanto, son raras en humanos (Brenner et al., 2000). Además de la clasificación de subespecies según la filogenia, el esquema estándar de Kauffman-White, ha permitido la clasificación de alrededor de 2600 serotipos de acuerdo con los antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K). La clasificación de *Salmonella* según los patrones clínicos de salmonelosis en humanos permite agrupar las cepas de *Salmonella* en *Salmonella* tifoidea y *Salmonella* no tifoidea (NTS) (Eng et al., 2015a).

Las infecciones por este microorganismo siguen siendo uno de los problemas de salud pública más importantes en todo el mundo, debido a las pérdidas económicas generadas anualmente y a los costos asociados con la vigilancia, prevención y tratamiento de enfermedades transmitidas por alimentos (Eng et al., 2015b). *S. enterica* serovariedad Enteritidis es uno de los serotipos más comunes responsable de gastroenteritis junto con *S. enterica* serovariedad Typhimurium. Estos microorganismos actúan como agentes etiológicos de la salmonelosis no tifoidea, la cual se caracteriza por presentar enfermedades intestinales y sistémicas, siendo la bacteriemia, las afecciones más frecuentes, al igual que el estado portador crónico asintomático o infección localizada (Bermúdez et al., 2014).

Adicionalmente, la mayoría de los microorganismos tienen la capacidad de formar *biofilms* mediante mecanismos de comunicación celular química, característica que los hace responsables del 80% de las infecciones bacterianas en seres humanos (Davies, 2003). El *biofilm* les confiere a

los microorganismos resistencia a los antibióticos, por lo tanto, el control sobre los microorganismos resulta más complejo (Hall & Mah, 2017; Nazar, 2007).

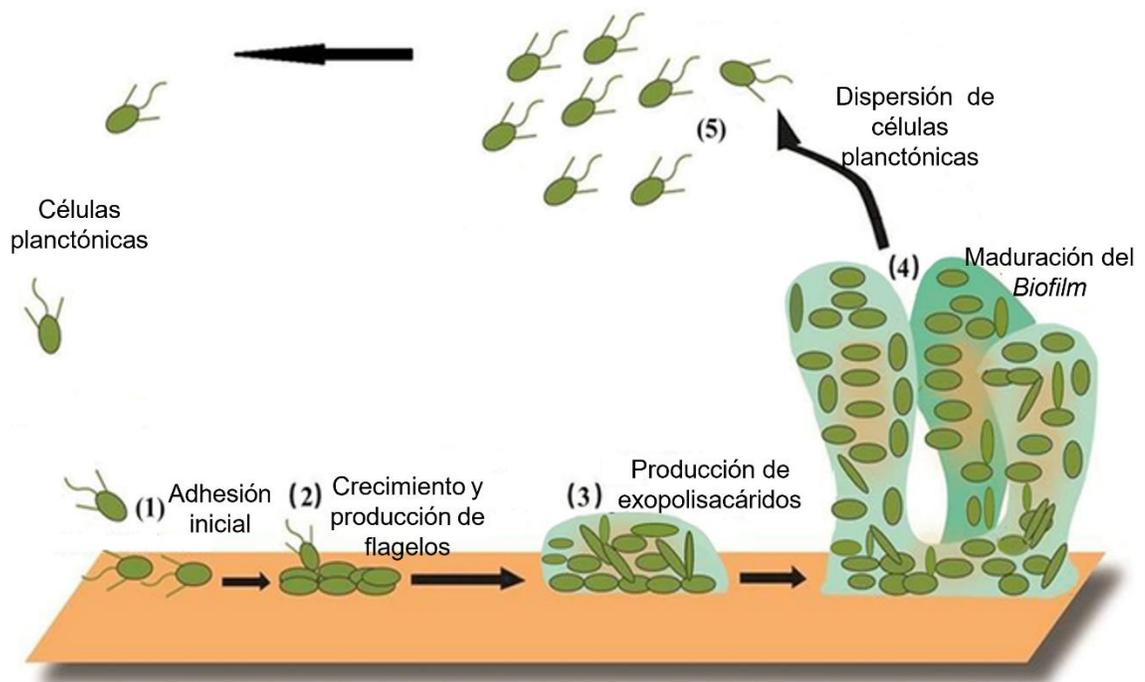
### 3.3 Formación del *biofilm* en microorganismos

*Salmonella* puede vivir en estado planctónico, o en forma de agregados conocidos como *biofilm* (Chylkova et al., 2017; Secor et al., 2011). El *biofilm* es una comunidad microbiana compuesta de células sésiles, irreversiblemente unidas a un sustrato o a una interfaz, incrustada en una matriz de polímero extracelular producido por sustancias sintetizadas por los propios microorganismos y, que presentan una modificación del fenotipo en relación con la velocidad de crecimiento y la transcripción de genes (Azeredo et al., 2017). De acuerdo con estudios recientes, la formación del *biofilm* es el producto de un sistema de comunicación o señalización célula-célula (J. Wang et al., 2018).

El proceso de formación del *biofilm* ocurre en cinco etapas principales (Figura 1): (i) Adherencia: las células bacterianas móviles se unen a una superficie, debido a un cambio en la expresión génica, que inicia la biosíntesis de proteínas de superficie celular como adhesinas, flagelos y pilis (Ramírez et al., 2014); (ii) formación de una monocapa de células: las bacterias empiezan a dividirse formando microcolonias, lo que genera una adherencia irreversible mediante el anclaje de apéndices bacterianos y la producción de exopolímeros (Römling & Balsalobre, 2012); (iii) producción de la matriz extracelular: inicia la secreción de componentes del exopolisacárido (EPS), tales como proteínas, ADN genómico extracelular (ADNe) y ácidos nucleicos. El EPS actúa como una barrera de difusión, que evita la penetración de cualquier sustancia que pueda afectar la integridad del agregado (Moormeier et al., 2014); (IV) maduración del *biofilm*: las microcolonias crecen de forma confluyente formando macrocolonias, las cuales colonizan de manera homogénea la superficie a la que se encuentran adheridas mediante

interacciones electrostáticas (Rasamiravaka et al., 2015); (V) dispersión del *biofilm*: proceso de lisis controlada, en esta etapa se liberan algunas células junto con residuos metabólicos que favorecen la nueva colonización. Las señales de dispersión pueden ser dependientes de la densidad celular o ambientales, incluida la disponibilidad de nutrientes (Azeredo et al., 2017).

**Figura 1.** Etapas de la formación del *biofilm* bacteriano.



*Nota:* Tomado de (Sadekuzzaman et al., 2015a).

Las células en estado planctónico difieren de las células en estado sésil (*biofilm*) en su morfología, fisiología y metabolismo, lo que refleja los cambios en la expresión génica de las bacterias frente a las diferentes señales ambientales como temperatura, pH, oxígeno y nutrientes (Ramírez et al., 2014). Estos cambios son percibidos por las células bacterianas por medio de proteínas relacionadas con diferentes mecanismos de comunicación celular como el *quorum*

*sensing* y el sistema intracelular del 3',5'-diguanylate cíclico (c-di-GMP). Sumado a ello, estos mecanismos se encuentran vinculados con las diferentes rutas metabólicas en los microorganismos formadores de *biofilm* (Römling et al., 2013; Williams et al., 2007). Las comunidades de *biofilm* contienen micronichos distintos que dan como resultado heterogeneidad metabólica y variabilidad de la expresión génica (Moormeier et al., 2014).

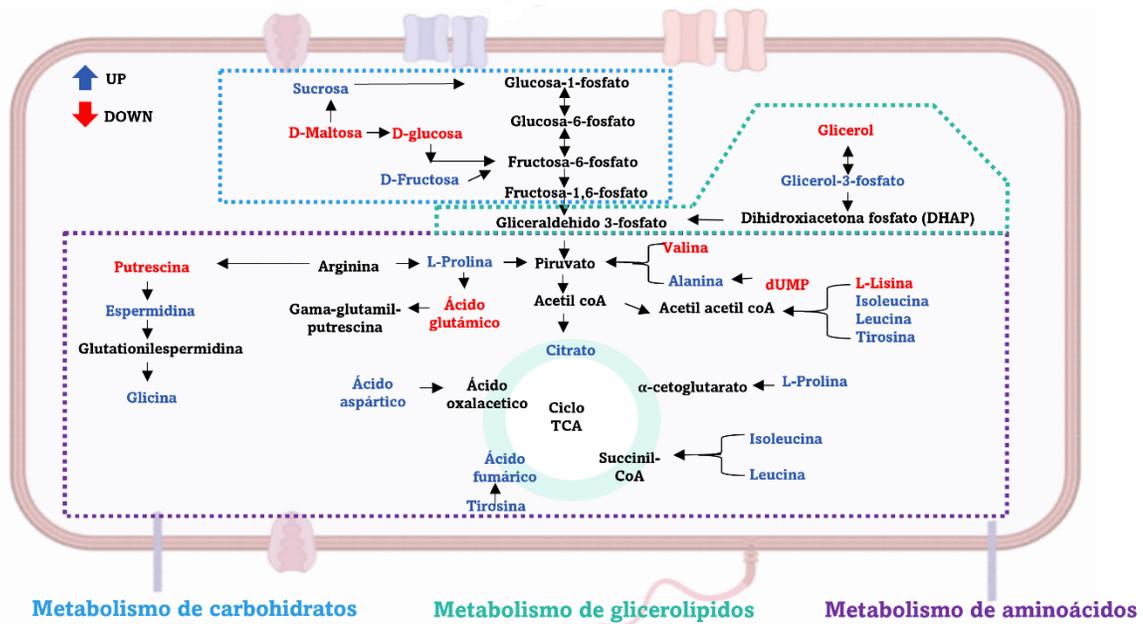
Una de las principales rutas metabólicas implicadas en la formación del *biofilm* es la del metabolismo del nitrógeno. Los compuestos que contienen nitrógeno transmiten señales ambientales inorgánicas y orgánicas que les permiten adaptarse a distintas condiciones fisiológicas y microambientales (Rinaldo et al., 2018). Su metabolismo está implicado en aspectos del metabolismo central, los cuales son cruciales como fuentes de carbono y nitrógeno para el anabolismo de aminoácidos, nucleótidos y para la división celular. Además, estos compuestos también son esenciales para la producción de energía (fermentación de aminoácidos y respiración del nitrógeno inorgánico) y pueden controlar el metabolismo de carbono (Commichau et al., 2006).

El ácido glutámico, la glutamina y la arginina (implicada en la formación de adhesinas) son los aminoácidos más representativos en la formación del *biofilm*, siendo al mismo tiempo fuentes potenciales de nitrógeno, carbono y energía (Rinaldo et al., 2018). Adicionalmente, las reacciones metabólicas canónicas del metabolismo central y la homeostasis de hierro desempeñan un papel fundamental en la formación del *biofilm* (Xu et al., 2013, 2015).

El metabolismo de los aminoácidos, el metabolismo de los carbohidratos y el metabolismo de los glicolípidos no está implicado únicamente en la biosíntesis y almacenamiento de energía, también juegan un papel muy importante en la síntesis de los componentes esenciales para la formación del *biofilm*, como lo son, aminoácidos, azúcares, lípidos, uridinas y ácidos orgánicos (Figura 2). De esta manera, los carbohidratos están estrechamente relacionados con el aumento de

la capacidad adhesiva del *biofilm*, mientras que los aminoácidos son reprogramados para la formación del *biofilm* (H. Lu et al., 2019).

**Figura 2.** Vías metabólicas implicadas en la formación del *biofilm* (azul). Se destaca principalmente cambios en el metabolismo de aminoácidos, el ciclo de glicerolípidos y el ácido tricarbóxico al compararse con las células planctónicas.



Nota. Tomada de (H. Lu et al., 2019).

A pesar de la caracterización de algunos aminoácidos y rutas de regulación de la formación del *biofilm*, es necesario realizar estudios metabólicos para comprender el papel de los metabolitos en la composición, estructura y dinámica de las comunidades agrupadas en *biofilm*. Principalmente, orientados a la identificación de moléculas y vías biosintéticas involucradas en la señalización de c-di-GMP y quorum sensing (QS), debido a que estos representan objetivos atractivos para el desarrollo de fármacos que inhiban o destruyan la formación del *biofilm*.

### 3.4 Farmacorresistencia generada por la formación del *biofilm*

La estructura heterogénea del *biofilm* confiere a los microorganismos entre cien y mil veces más resistencia a los antimicrobianos en comparación con las células planctónicas (Olsen, 2015). En el caso de las infecciones por *Salmonella* se ha reportado resistencia frente antibióticos de primera línea como la ciprofloxacina (fluoroquinolona); Gonzáles y colaboradores demostraron que las células del *biofilm* de *S. Typhimurium* y *S. Typhi* son más resistentes a este antibiótico en comparación con las células planctónicas (González et al., 2018). Así mismo, Tabak y colaboradores reportaron una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 0.125 µg/mL sobre células planctónicas de *S. Typhimurium* tratada con el antibiótico ciprofloxacina, mientras que, las células del *biofilm* solo presentaron una ligera reducción de recuentos de células al ser tratadas a una concentración de 1000 µg/mL (<0.7 log) (Tabak et al., 2009). Olson y colaboradores compararon el efecto de los antibióticos gentamicina, enrofloxacin, eritromicina, tilmicosina, ampicilina, oxitetraciclina y trimetoprima/sulfadoxina sobre células planctónicas y del *biofilm*, evidenciando que las células planctónicas eran sensibles a todos los antibióticos, excepto a la eritromicina y tilmicosina, mientras que las células del *biofilm* solo eran sensibles a enrofloxacin y ampicilina (Olson et al., 2002). Lo anterior, genera preocupación debido a que la ciprofloxacina, junto con las cefalosporinas de tercera generación, son usadas comúnmente para tratar infecciones no tifoideas de *Salmonella* (Sakarikou et al., 2020).

Esta resistencia ocurre debido a varios factores: (i) El EPS actúa como barrera física y química, impidiendo el ingreso de los antibióticos, (ii) los polímeros extracelulares poseen carga negativa, lo que permite la unión de los antibióticos cargados positivamente, como los aminoglucósidos y los polipéptidos, disminuyendo así, su concentración efectiva, (iii) el metabolismo de los microorganismos se encuentra alterado, debido a la disponibilidad de

nutrientes y oxígeno dentro del *biofilm*, esto implica que se expresen distintas rutas metabólicas en función de las condiciones ambientales del *biofilm*, por ejemplo, las células que se encuentran metabólicamente inactivas son menos susceptibles a los agentes antimicrobianos (iv) los microorganismos pueden evitar el efecto citotóxico de los antibióticos debido a tasas de crecimiento lentas o inanición, en este caso los antibióticos que actúan en procesos de replicación, transducción y síntesis de la pared celular no tienen efecto significativo, (v) la formación de células persistentes (población de células tolerantes a los agentes antimicrobianos) dentro de la matriz del *biofilm* favorece la resistencia antimicrobiana; (vi) intercambio de ADN extra cromosómico (plásmidos) entre las bacterias embebidas en el EPS, lo cual contribuye a la adaptación genética dentro del *biofilm* para reducir la susceptibilidad y adoptar el fenotipo persistente, (vii) el sistema de *quorum sensing* contribuye a la tolerancia antimicrobiana porque induce la formación del *biofilm* y genera resistencia al sistema inmune del huésped (Singh et al., 2017; Yan & Bassler, 2019).

### **3.5 Estrategias de inhibición del *biofilm***

Las infecciones asociadas al *biofilm*, tienden a ser recurrentes y presentar largos periodos de quiescencia, comprometiendo la efectividad de los tratamientos antibióticos, trayendo consigo, un problema de salud pública (Koo et al., 2017). Debido a esto, en las últimas décadas, ha surgido la necesidad de encontrar nuevas estrategias terapéuticas que permitan prevenir y erradicar el *biofilm* o mejorar la eficacia de los fármacos (Abdel-Aziz & A, 2014). Esencialmente, existen cuatro estrategias conocidas para combatir el *biofilm*: (i) prevenir la adhesión, (ii) inhibir la maduración, (iii) alterar la matrix de EPS y (iv) destruir los microorganismos en el *biofilm* (Plakunov et al., 2017; Silva et al., 2016). La primera estrategia mencionada, se reconoce como la más efectiva, cuando los microorganismos se encuentran aún en estado plantónico. Una alternativa

es inhibir la adhesión a través de la interferencia con la producción de adhesinas o apéndices como pili, curli y flagelos (Toyofuku et al., 2016). La segunda estrategia se relaciona con la intervención de la producción de exopolisacárido a través de la interrupción de señales relacionadas con el c-di-GMP y el sistema de quorum sensing; compuestos capaces de intervenir esta señalización afectan la maduración del *biofilm* (Plakunov et al., 2017; Sadekuzzaman et al., 2015b).

Una vez el *biofilm* se ha establecido, se requiere un tratamiento diferente por cuanto; la tercera estrategia permitiría romper o erradicar el *biofilm* a través de moléculas que degraden la matriz extracelular o compuestos que bloquen la señalización por c-di-GMP y; la última estrategia se relaciona con eliminar los microorganismos al interior del *biofilm* mediante la combinación de antimicrobianos que penetren el EPS (Silva et al., 2016).

La búsqueda de estrategias *antibiofilm* se detalla en la Tabla 1, junto con sus ventajas y desventajas, con el fin de indicar su posible potencial clínico.

**Tabla 1.** Principales estrategias *antibiofilm*

<b>Tipo</b>	<b>Fase del <i>biofilm</i></b>	<b>Estado de desarrollo</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
<b>Antibióticos</b>	Todas las fases	Clínico	-Nuevas combinaciones promisorias -Muchos pueden ser combinados para potenciar su efecto	-Resistencia -Citotoxicidad -Penetración limitada en el EPS
<b>Péptidos antimicrobianos</b>	Todas las fases	Pre-Clínico	-Moléculas pequeñas diseñadas fácilmente para su optimización -La ruptura física de la membrana	-La carga puede limitar el transporte dentro del <i>biofilm</i> -Potencial degradación proteolítica

			<p>reduce la probabilidad de resistencia.</p> <p>-Amplio espectro</p> <p>-Posibilidad de selección de especies</p>	<p>-pH puede afectar la actividad</p>
<b>Oligonucleótidos antimicrobianos</b>	<i>Biofilm</i> temprano y maduro	<i>In vivo</i>	<p>-Moléculas pequeñas diseñadas fácilmente para su optimización</p>	<p>-La carga puede limitar el transporte a través del <i>biofilm</i></p> <p>-Potencial unión con el ADNe</p> <p>-Potencial degradación por nucleasas</p>
<b>Nanopartículas (inorgánicas, orgánicas)</b>	Todas las fases	<i>In vivo</i> , pre-clínico, clínico	<p>-Bioactividad intrínseca combinada con la capacidad de administración de fármacos</p> <p>-Tamaño pequeño permite el transporte al EPS</p>	<p>-La carga puede limitar la penetración del EPS del <i>biofilm</i></p> <p>- Propiedades afectadas por fluidos biológicos.</p> <p>-Entrega al sitio infectado.</p> <p>-Citotoxicidad.</p>
<b>Bacteriófagos</b>	<i>Biofilm</i> temprano y maduro	<i>In vivo</i>	<p>-Tamaño pequeño y alta especificidad para entrar en el EPS del <i>biofilm</i></p>	<p>-Entrega al sitio infectado y transporte al <i>biofilm</i></p>
<b>Productos naturales</b>	Todas las fases	<i>In vivo</i> , clínico	<p>-Presentan una amplia gama de bioactividad (desde inhibidores de enzimas hasta antimicrobianos).</p> <p>-Diversidad química con propiedades similares a las de las drogas</p>	<p>-Citotoxicidad</p> <p>-Variabilidad de la composición química</p> <p>-Resistencia</p> <p>-Aislamiento de moléculas bioactivas complejos</p>

---

-Múltiple modo de acción.

---

*Nota. Tomado de (Koo et al., 2017).*

### **3.6 Aceites esenciales**

Las plantas producen una gran diversidad de metabolitos secundarios con una función biológica de protección contra predadores y patógenos microbianos. Algunos de estos metabolitos están también involucrados en mecanismos de defensa contra estrés abiótico (p. ej. exposición a UV-B) y son importantes en la interacción de las plantas con otros organismos (p. ej. atracción de polinizadores) (Seow et al., 2014). Se estima que alrededor de 100 mil metabolitos secundarios podrían ser encontrados en las plantas, y que la mayoría de ellos participan en sistemas de defensa química. No obstante, estos metabolitos han aparecido como respuesta de las plantas a interacciones con predadores a través de millones de años de co-evolución (Jiménez et al., 2003; Moore et al., 2014).

Entre los productos naturales sintetizados por las plantas se destacan los aceites esenciales (AE), los cuales son mezclas complejas de constituyentes volátiles producidos por plantas aromáticas. Los principales componentes de los AE son los terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos y sus derivados oxigenados, como alcoholes, aldehídos, ésteres, éteres, cetonas, fenoles y óxidos), y también compuestos fenólicos y fenilpropanoides derivados del ácido acetato-mevalónico y vías de ácido siquímico, respectivamente (Basak & Guha, 2018). La actividad antimicrobiana de los AE se encuentra mayoritariamente en terpenoides oxidados (p. ej. alcoholes y terpenos fenólicos), aunque otros compuestos también tienen efectos antimicrobianos como los producidos por algunas algas (furanonas halógenadas) (Bauer & Robinson, 2002; Gonzalez & Keshavan, 2006; Skrinjar & Nemet, 2009). Por otro lado, las interacciones entre estos componentes pueden llevar a efectos antagonistas, aditivos o sinérgicos. Algunos estudios han

demostrado que los AE tienen usualmente actividad antibacteriana más alta que las mezclas de sus componentes mayoritarios (Tabla 2), sugiriendo que los componentes minoritarios son críticos para la actividad sinérgica (Bączek et al., 2017; Stefanakis et al., 2013; Yagi et al., 2016).

En la década del 2000, las publicaciones sobre propiedades antimicrobianas de los AE incluían análisis mucho más completos, los cuales permitían relacionar la actividad biológica con algunos de los compuestos químicos presentes en los aceites esenciales (Burt, 2004). En el caso de *Salmonella enterica* los principales aceites que presentaron actividad antimicrobiana fueron *Salvia rosmarinus*, *Origanum vulgare*, *Cymbopogon*, *Thymus vulgaris* y *Lippia* spp, y los componentes principales encontrados en estos aceites fueron el  $\alpha$ -terpineol, carvacrol, citral, eugenol, geraniol y timol (Bakkali et al., 2008; Nostro et al., 2007). Se ha determinado que la actividad antimicrobiana difiere de un compuesto a otro, así como las dianas bacterianas dependiendo del tipo de microorganismo; un ejemplo de ello es el extracto de sándalo, que presenta un mayor efecto antimicrobiano sobre bacterias Gram positivas que sobre Gram negativas (Andrade, 2010). Así mismo, algunos estudios han demostrado que los aceites esenciales de canela, clavo, pimienta, tomillo, y romero poseen una fuerte actividad antimicrobiana contra *Salmonella Typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, cuyo efecto se encuentra relacionado con el quimiotipo presente en cada uno de los aceites o extractos, como el carvacrol, timol, aldehído cinámico, eugenol y *p*-cimeno (Bazargani & Rohloff, 2016; Stashenko et al., 2010b; Swamy et al., 2016b).

La actividad *antibiofilm* de los AE también ha generado resultados prometedores, un ejemplo de esto es el estudio de Kuźma y colaboradores., en el que se demuestra la inhibición de la formación del *biofilm* de *S. aureus* y *S. epidermidis* por el AE *Salvia sclarea* (Kuźma et al., 2007). Otra de las plantas ampliamente estudiadas ha sido *Rosmarinus officinalis* debido a sus usos

medicinales y a su contenido de compuestos aromáticos bioactivos (Fu et al., 2007). En un estudio reciente, se evaluó la capacidad para inhibir la formación del *biofilm* de *S. epidermidis* obteniéndose una inhibición del 57% (Jardak et al., 2017). De igual manera, el AE *Lippia alba* ha presentado actividad inhibitoria del *biofilm* de *S. aureus* (Tabla 2) (Porfírio et al., 2017).

Adicionalmente, algunos investigadores han establecido modelos predictivos de clasificación, a partir de la relación cuantitativa de la actividad y la composición de diferentes AE, permitiendo la identificación de los componentes involucrados en la inhibición de células planctónicas y sésiles mediante paquetes de programación en Python, análisis de red y bases de datos como TCMSP (Artini et al., 2018; Miao et al., 2020). Además, se han propuesto hipótesis sobre el posible mecanismo de acción de los aceites esenciales en células planctónicas y en estado de *biofilm*. En las células planctónicas, los componentes de estos AE interactúan con la bicapa lipídica de las membranas citoplasmáticas, interfiriendo en la integridad de la membrana y ocasionando fuga de material celular como ADN, ATP o iones (Chang et al., 2014; Pusic et al., 2016). En las células del *biofilm*, los posibles mecanismos de acción han sido atribuidos a la capacidad del AE para difundir a través de la matriz de EPS, permitiendo la interacción con las proteínas de la membrana bacteriana, disminuyendo la unión de las células planctónicas a las superficies mediante la reducción de la motilidad y la interferencia de la producción de adhesinas o apéndices como las proteínas curli y flagelos (Chouhan et al., 2017b; Diao et al., 2014; Miao et al., 2020; Saad et al., 2013; Simm et al., 2004; Toyofuku et al., 2016).

Actualmente, el surgimiento de nuevas técnicas de análisis, como la transcriptómica y la metabolómica han orientado las investigaciones al reconocimiento de las posibles dianas y mecanismos de acción de los aceites esenciales sobre los microorganismos, con el fin de establecer

estrategias que permitan determinar el potencial terapéutico de plantas aromáticas y así emplearlos como agentes antimicrobianos (Torres et al., 2019; Xu et al., 2017).

**Tabla 2.** Efecto biológico de aceites esenciales sobre diferentes microorganismos de interés clínico.

Especies de plantas	Componentes mayoritarios	Microorganismo	Efectos	Ref.
<i>Salvia officinalis</i>	1,8-cineol (39.18%)  β-cariofileno (12.8%)	<i>Salmonella enterica</i>	Efecto antimicrobiano, inhibición de la formación del <i>biofilm</i>	(Selim et al., 2022)
<i>Lippia origanoides</i>	Timol (55.53%)  Carvacrol (18.87%)	<i>S. aureus</i> ; <i>E. coli</i>	Efecto antimicrobiano	(Leal et al., 2019)
<i>Thymus vulgaris</i>	Timol (55.3%)  <i>p</i> -cimeno (11.2%)	<i>S. aureus</i>  <i>Salmonella</i> spp	Efecto antimicrobiano	(Gedikoğlu et al., 2019)
<i>Origanum</i> sp,	Carvacrol (69.98%)  <i>p</i> -cimeno (7.7%)	<i>Salmonella</i> Enteritidis	Inhibición de formación del <i>biofilm</i> e inhibición de producción de exopolisacárido	(Čabarkapa et al., 2019)
<i>Thymus</i> sp	Timol (43.23%)  <i>p</i> -cimeno (18.71%)			
<i>Citrus reticulata</i>		<i>E. coli</i>	Disminución de la formación del <i>biofilm</i>	(Aumeerudd y et al., 2018)
<i>Citrus hystrix</i>	Limoneno (85.39%)	<i>S. epidermidis</i>		

<i>Citrus reticulata</i>	Limoneno (89.81%)	<i>P. aeruginosa</i>	Inhibición de factores QS que regulan la formación e inhibición factores de virulencia	(Luciardi et al., 2016)
--------------------------	-------------------	----------------------	--	-------------------------

### 3.7 Metabolómica

La metabolómica se define como el estudio sistemático de metabolitos en un sistema biológico (Blow, 2008). Los metabolitos son pequeñas moléculas orgánicas que se caracterizan por una gran diversidad fisicoquímica en sus estructuras moleculares, entre las que se incluye, una amplia gama de polaridades, pesos moleculares, grupos funcionales, reactividad química, entre otras. Los metabolitos cambian químicamente durante las reacciones metabólicas y son necesarios para el correcto crecimiento, mantenimiento y función de las células (Dettmer et al., 2007; Haggarty & Burgess, 2017). A diferencia de los genes y las proteínas, cuyas funciones están sujetas a regulación epigenética y modificaciones postraduccionales, respectivamente, los metabolitos cambian como resultado directo de actividad bioquímica (Dettmer et al., 2007; Patti et al., 2012). Por lo tanto, la correlación de las concentraciones de los metabolitos con la actividad metabólica proporciona una idea del fenotipo y sus cambios asociados como resultado de la respuesta celular a estímulos genéticos o ambientales (Dettmer et al., 2007; Fiehn, 2002; Patti et al., 2012).

El metaboloma se define como la suma de todos los metabolitos administrados en un sistema biológico en condiciones fisiológicas particulares y se puede dividir en el exometaboloma (metabolitos fuera de la célula) y el endometaboloma (metabolitos intracelulares). El análisis del metaboloma es posible realizarlo mediante dos enfoques, el primero mediante metabolómica global o no dirigida, la cual tiene como objetivo proporcionar una visión imparcial del metaboloma

a través de la detección y cuantificación de tantos metabolitos como sea posible dentro de una muestra biológica dada, para así identificar las alteraciones metabólicas y patrones que se correlacionan con un estado fisiológico particular. Los análisis mediante metabolómica no dirigida son intensivos en datos y trabajo, en su mayoría generan hipótesis durante el análisis, que deberán ser probadas posteriormente (Witting, 2013).

El flujo general de la metabolómica no dirigida sigue los siguientes pasos:

- (I) Adquisición de datos brutos: se realiza empleando espectrómetros de masas de alta resolución como tiempo de vuelo (TOF, por sus siglas en ingles) y trampa de iones, e instrumentos híbridos como cuadrupolo/Q-TOF y cuadrupolo/trampa de iones;
- (II) almacenamiento y conversión de datos: generalmente se analizan los datos en los softwares correspondientes al proveedor, luego se realiza una conversión a formatos basados en XML (mzXML, mzData y mzML);
- (III) importación y construcción de matrices: una vez los archivos han sido convertidos a formatos de datos abiertos, se utilizan software como XCMS, para la construcción de matrices, este software realiza corrección del tiempo de retención, alineación y anotación;
- (IV) normalización, escalado y transformación: la normalización de muestras permite ajustar las diferencias entre las muestras. Se pueden emplear dos estrategias de normalización: químicas o matemáticas. Las primeras se basan en la utilización de estándares internos y muestras de control de calidad (QC, por sus siglas en inglés) mientras que las matemáticas emplean normalización de intensidades por suma o por mediana. Por otro lado, el escalado consiste en un pretratamiento de datos que divide cada variable por un factor, el factor escala, el cual es diferente para cada variable,

- puede ser mediante una medida de dispersión como la desviación estándar, o como una medida de tamaño como la media. Por ejemplo, los métodos de escalado que utilizan una medida de dispersión para el escalado incluyen el escalado automático, el escalado de Pareto y el escalado de rango. Finalmente, las transformaciones son conversiones no lineales de los datos, como el logaritmo y la transformación de potencia;
- (V) detección e identificación de biomarcadores: se basa en la aplicación de pruebas de hipótesis estadísticas, por ejemplo, análisis por componentes principales (PCA), el cual es un análisis exploratorio que permite reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos y resumirlos en un gráfico de dos o tres dimensiones (Karamizadeh et al., 2013); El mapa de calor (heatmap, en inglés), el cual consiste en una visualización bidireccional de una matriz de datos en la que las celdas individuales se muestran como rectángulos de colores, la finalidad es encontrar patrones o grupos (clúster) dentro de un conjunto de observaciones (Wilkinson & Friendly, 2009); análisis del fold-change (FC), este análisis compara el valor absoluto del cambio entre las medias de los grupos. Las características importantes son aquellas características cuyos FC están más allá del umbral de FC dado (ya sea modulados positiva o negativamente); prueba uni-variada como el t-test, permite identificar si hay diferencias significativas entre las medias de los grupos control y tratamiento; volcano-plot, este gráfico de dispersión muestra la significancia estadística (valor p) frente a la magnitud del FC; análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) el cual es un análisis supervisado del análisis de componentes principales para determinar los valores de proyección VIP significativos, entre otros. La iniciativa de Estándares en Metabolómica (Metabolomics Standard Initiative, MSI), establece cuatro niveles en los que se puede identificar un

metabolito. El nivel uno se asigna a los compuestos identificados de manera inequívoca mediante el aislamiento y la caracterización estereoquímica. El nivel dos se asigna a compuestos putativamente anotados (por ejemplo, sin estándares de referencia químicos, basados en propiedades fisicoquímicas y/o similitud espectral con bibliotecas espectrales públicas/comerciales). El nivel tres corresponde a clases de compuestos putativamente caracterizados (por ejemplo, basados en propiedades fisicoquímicas características de una clase química de compuestos, o por similitud espectral con compuestos conocidos de una clase química). El nivel cuatro asociados con compuestos desconocidos, aunque no identificados o clasificados, estos metabolitos aún se pueden diferenciar y cuantificar en función de los datos espectrales (Sumner et al., 2007a);

- (VI) interpretación bioquímica: se emplea bases de datos de referencia como KEGG y Metaboanalyst para la construcción de los mapas metabólicos (Gorrochategui et al., 2016).

El segundo enfoque corresponde a metabolómica dirigida, la cual tiene como objetivo detectar y cuantificar un grupo predefinido de compuestos químicamente caracterizados de rutas metabólicas de interés (W. Lu et al., 2008; Roberts et al., 2012). Los experimentos de metabolómica dirigida generalmente tienen como objetivo analizar decenas a cientos de metabolitos de manera cuantitativa o semicuantitativa mediante estándares internos (Witting, 2013). Los compuestos analizados son conocidos y definidos químicamente, por lo tanto, los métodos de preparación de muestra para su extracción y purificación pueden ser optimizados en la plataforma analítica empleada para su separación y detección. Los pasos para realizar análisis mediante metabolómica dirigida son los siguientes: (i) adquisición de datos sin procesar, (ii)

generación de una base de datos de referencia, (iii) aislamiento e identificación de metabolitos, (iv) normalización de datos, (v) cuantificación e interpretación bioquímica (Gorrochategui et al., 2016).

La capacidad de utilizar la metabolómica para describir cuantitativamente el estado celular de un sistema biológico ha llevado a su reconocimiento como una herramienta importante en la biología celular y de sistemas (Patti et al., 2012). El conjunto de datos obtenido por medio de la metabolómica ha permitido asociar los niveles y perfiles de modulación de los metabolitos involucrados en la adherencia a superficies, patogénesis, factores de virulencia, y mecanismos de comunicación celular bacteriana con el efecto producido por diferentes agentes antimicrobianos, como la inhibición de la formación de *biofilm* (Grimm et al., 2018; Qin et al., 2015). Diversos estudios han demostrado la aplicación de técnicas metabolómicas para entender el metabolismo microbiano y los cambios producidos al interactuar con diferentes compuestos naturales (He et al., 2022; Liu et al., 2022; Rempe et al., 2017; Tang et al., 2021).

Por ejemplo, Chen y colaboradores, evaluaron el posible mecanismo de acción del AE *Cinnamomum camphora* sobre *Staphylococcus aureus* mediante un enfoque metabolómico. Los resultados evidenciaron una CMI de 0.8 mg/mL y la modulación diferencial de 74 metabolitos de interés, de los cuales, 29 fueron modulados positivamente y 45 metabolitos modulados negativamente. Las rutas afectadas por el AE estaban asociadas con el metabolismo de aminoácidos y el metabolismo energético dependiente del ciclo de Krebs, lo cual, fue corroborado mediante ensayos enzimáticos. Adicionalmente, se realizó la evaluación de integridad de membrana, evidenciando fuga de material celular. Finalmente, permitieron inferir que el mecanismo de acción del AE se relaciona con daños en la integridad de la membrana celular bacteriana y perturbación de la regulación del metabolismo del grupo amino (Chen et al., 2020a).

En otro estudio realizado por Lu y colaboradores, se analizó el perfil metabólico de una cepa de *Escherichia coli* asociada con infecciones urinarias en su estado de crecimiento planctónico y sésil; para ello, se utilizó un enfoque de metabolómica dirigida y no dirigida mediante espectrometría de masas. Los resultados obtenidos permitieron evidenciar claras diferencias en la morfología fenotípica como en el metabolismo de los dos patrones de crecimiento evaluados. En esta investigación, se identificaron y caracterizaron 38 metabolitos diferenciales y se detectaron cambios metabólicos en la formación del *biofilm* principalmente, en tres vías metabólicas asociadas con el metabolismo de glicerolípidos, aminoácidos y carbohidratos (Lu et al., 2019).

Por lo anterior, el enfoque metabolómico del presente estudio proporciona una visión de la adaptación y el comportamiento de las bacterias al ser tratadas con un aceite esencial, con un posible efecto sobre las vías de comunicación celular y formación de *biofilm*.

## 4. Metodología

### 4.1 Microorganismo y medios de cultivo

El microorganismo empleado fue *Salmonella enterica* Enteritidis ATCC 13076 la cual fue obtenida del American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA). Los medios de cultivo M63 y Mueller Hinton (MH) fueron obtenidos de OXOID (Hampshire, UK). El Dimetil Sulfóxido (DMSO) utilizando como disolvente fue grado HPLC. Todas las reacciones y ensayos de actividad *antibiofilm* se realizaron empleando agua MilliQ de resistividad 18.2  $\Omega$ , obtenida del Equipo Smart 2 Pure (Thermo Fisher Scientific, MA, USA).

### 4.2 Material vegetal y caracterización de los aceites esenciales

Los aceites esenciales empleados en este estudio fueron caracterizados y suministrados por el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM), Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga, Colombia).

Se evaluaron 20 aceites esenciales los cuales fueron destilados de las siguientes especies vegetales: *Steiractinia aspera* (SA), *Turnera diffusa* (TD-I), *Lippia organoides* quimiotipo felandreno (LOP), *Calycolpus moritzianus* (CM-I), *Piper aduncum* (PA), *Elaphandra quinquenervis* (EQ), *Hyptis dilatate* (HD), *L. organoides* quimiotipo carvacrol (LOC), *L. organoides* quimiotipo  $\beta$ -cariofileno-timol (LOCpT), *L. organoides* quimiotipo timol (LOT-I), *T. diffusa* (TD-II), *Satureja viminea* (SV), *Psidium sartorianum* (PS), *Varronia curassavica* (VC), *Ocimum basilicum* (OB), *C. moritzianus* (CM-II), *T. diffusa* (TD-III), *L. organoides* quimiotipo timol-*p*-cimeno (LOTc), *L. organoides* quimiotipo timol (LOT-II) y *L. micromera* (LM).

### **4.3 Determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales *in vitro* sobre células planctónicas**

El efecto antimicrobiano de 20 aceites esenciales fue determinado mediante el método de microdilución en caldo (CLSI, 2015). La evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) se realizó de acuerdo con el protocolo descrito y estandarizado en el Laboratorio de Bioquímica y Microbiología (Paredes et al., 2014).

Para esto, se preparó un preinóculo de *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis ATCC 13076 en medio M63 cultivado durante 12 horas a 37 °C y a 200 rpm. El preinóculo fue diluido en medio de cultivo hasta alcanzar una concentración bacteriana de  $10^5$ - $10^6$  unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL) para posteriormente ser usado en los estudios de efecto de aceites esenciales sobre los cultivos bacterianos. Seguidamente, se sembró 100 µL de cultivo bacteriano y 100 µL de AE disueltos en Dimetil sulfóxido (DMSO, 100%) a diferentes concentraciones, en un rango de 0.18 mg/mL-1.5 mg/mL, el porcentaje de DMSO en las concentraciones probadas de los AE fue menor al 1%. Las microplacas se incubaron a 37 °C con agitación constante (200rpm) y se realizaron medidas del crecimiento microbiano en un espectrofotómetro lector de microplaca ELISA (Biorad, imarck, Hercules, CA, USA) a 595 nm cada hora durante 24 h. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se definió como la menor concentración del AE a la cual se produce una inhibición en el crecimiento de la bacteria. Los valores de CMI correspondieron a las dosis que inhibió el crecimiento microbiano. Como control positivo se empleó el antibiótico ofloxacina.

Posterior a la cinética de crecimiento, se tomó una alícuota de 100 µL de cada pozo que contenían diferentes concentraciones de AE y se incubó en 900 µL de medio de infusión cerebro corazón (BHI) en tubos eppendorf a 37°C durante 24 horas. Luego se tomó una alícuota de 10 µL

y se transfirió a placas de agar BHI con el fin de confirmar el efecto bactericida. El valor de la concentración mínima bactericida (CMB) se determinó como la concentración donde el 100% del crecimiento bacteriano se inhibe completamente en comparación con el control positivo de crecimiento de los microorganismos (sin tratamiento con los AE). Todos los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado.

#### **4.4 Evaluación de la formación e inhibición del *biofilm***

Para evaluar la formación del *biofilm* se siguió la metodología reportada por (O'Toole, 2011). Para esto, se realizó un cultivo overnight de *Salmonella enterica* Enteritidis ATCC 13076 en 3 mL de medio M63 a 37 °C y 200 rpm. Seguidamente, se agregó 100 µL de un cultivo bacteriano overnight diluido 1:10 (~1x10<sup>6</sup> UFC/mL) en medio fresco a una microplaca fondo redondo que contenía 100 µL de AE (los AE que presentaron actividad antimicrobiana fueron evaluados a concentraciones subinhibitorias). Las microplacas fueron incubadas a 37° C por 24 h sin agitación.

La biomasa del *biofilm* se cuantificó mediante el método semicuantitativo de tinción con cristal violeta. La microplaca se lavó tres veces con agua peptonada al 0.1% (p/v), con el fin de remover las células planctónicas. Luego, 200 µL de cristal violeta al 0.4% (p/v) fueron adicionados a cada uno de los pozos durante 15 min. El exceso de cristal violeta fue eliminado mediante tres lavados consecutivos con agua peptonada al 0.1% (p/v). Seguidamente, se agregaron 200 µL de ácido acético al 30% (v/v) para remover el colorante adherido y se cuantificó la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas de elisa (Biorad, imarck, Hercules, CA, USA) (O'Toole, 2011). El porcentaje de inhibición de la formación del *biofilm* fue calculado mediante la siguiente ecuación:

$$PF = \frac{A_c - A_m}{A_c} \times 100$$

$$PI = 100 - PF$$

Dónde:

-Ac= Absorbancia del control positivo

-Am= Absorbancia de la muestra

- PF= Porcentaje de formación

-PI= Porcentaje de inhibición

#### 4.5 Cuantificación de la viabilidad celular de células planctónicas y células sésiles

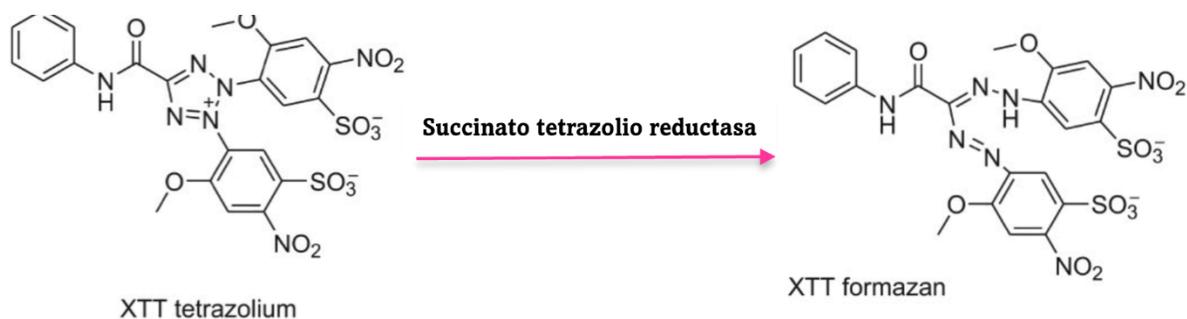
Se realizó la cuantificación de las células planctónicas y células del *biofilm* mediante recuento en placa de acuerdo con la metodología de la CLSI y Kart y colaboradores, respectivamente (CLSI, 2015; Kart et al., 2020). Para esto, se agregó 100  $\mu\text{L}$  de un cultivo bacteriano overnight diluido 1:10 ( $\sim 1 \times 10^6$  UFC/mL) en medio fresco a una microplaca que contenía 100  $\mu\text{L}$  de AE a concentraciones subinhibitorias. Se emplearon concentraciones subinhibitorias debido a que se buscaba determinar el posible efecto de AE sin afectar la viabilidad celular en la bacteria. Las microplacas fueron incubadas durante 24 h a 37 °C. Transcurrido el tiempo se colectaron las células planctónicas y se realizó el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC/mL). Seguidamente, se realizaron tres lavados consecutivos. Luego, se agregó 200  $\mu\text{L}$  de agua peptonada al 0.1% (p/v) a cada pozo, y se removió el *biofilm* utilizando espátulas estériles. Se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en medio de cultivo Müller-Hinton (MH). Las placas se incubaron durante 12 horas a 37 °C. Posteriormente, se realizó el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC/mL). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos.

#### 4.6 Evaluación de actividad metabólica del *biofilm*

Para evaluar la viabilidad celular y la actividad metabólica del *biofilm* se realizó el ensayo de reducción de 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino) carbonil]-2H-tetrazolio hidróxido (XTT) (Misba et al., 2016). Para ello, se preparó una solución de 1 mg/mL de XTT disuelto en buffer fosfato 0.1 M pH 7 y una solución de menadiona a una concentración 0.4 mM en etanol, esta solución fue preparada antes de cada ensayo. Luego, se mezcló en una proporción 20:1 (v/v) XTT y menadiona respectivamente.

Después de las 24 h de crecimiento del *biofilm*, se removieron las células planctónicas y se agregó 42  $\mu$ L de XTT-menadiona junto con 158  $\mu$ L de buffer fosfato 0.1 M pH 7 en cada pozo de la microplaca, se incubó a 37° C bajo oscuridad durante 4 h. Transcurrido el tiempo, se cuantificó la absorbancia a 490 nm en un lector de microplaca ELISA (Biorad, imarck). La formación del compuesto formazán (de color naranja), es una variable cuantitativa respecto a la capacidad de las células sésiles (metabólicamente activas) para reducir la sal de tetrazolio (XTT) Figura 3. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

**Figura 3.** Reducción del XTT para formar el derivado de formazán.



#### 4.7 Análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para visualizar el efecto del AE LOT-II, el cual presentó el mayor porcentaje de inhibición de la formación del *biofilm* de *S. Enteritidis* ATCC 13076, se realizó un análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM). El *biofilm* fue formado en cupones de vidrio de 1x1.5 cm durante 24 h a 37°C. Para esto, se agregó el inóculo bacteriano diluido 1:10 ( $\sim 1 \times 10^6$  UFC/mL) de un cultivo overnight a un vial que contenía cupones de vidrio esmerilado, medio de cultivo y AE a una concentración de 0.13 mg/mL. Los cupones fueron lavados tres veces con agua peptonada al 0.1% (p/v) para eliminar las células planctónicas. Seguidamente, se realizó el proceso de fijación con glutaraldehído al 2.5% (v/v) por 60 min y la deshidratación con un gradiente de isopropanol (10-95% (v/v)) por 10 min a temperatura ambiente (Fischer et al., 2012). Finalmente, los cupones fueron observados en un microscopio electrónico Quanta 650 FEG (FEI, Hillsboro, OR, USA), y se tomaron las micrografías en un detector de imágenes Everhart Thornley detector ETD.

#### 4.8 Evaluación de la integridad de la membrana celular de *Salmonella* Enteritidis

La integridad de la membrana de *Salmonella* fue determinada mediante la cuantificación de la liberación de constituyentes celulares de acuerdo con Diao y colaboradores, con algunas modificaciones (Diao et al., 2014). Brevemente, se preparó un pre-inóculo de *Salmonella* Enteritidis en medio M63 cultivado durante 12 horas a 37 °C y 200 rpm. El pre-inóculo fue lavado dos veces mediante centrifugación a 5000 rpm durante 10 min y resuspendido en buffer fosfato 0.1 M pH 7.4. Seguidamente, el pre-inóculo fue diluido hasta alcanzar una concentración bacteriana de  $\sim 1 \times 10^6$  UFC/mL. Luego, se sembró 500  $\mu$ L de cultivo bacteriano y 500  $\mu$ L de aceite esencial disuelto en buffer fosfato 0.1 M pH 7.4 a unas concentraciones de 2\*MIC, MIC y ½ MIC. Los microorganismos fueron incubados durante 24 h a 37 °C. Transcurrido el tiempo, las muestras fueron centrifugadas a 11000 g por 5 min. El sobrenadante fue separado y utilizado para determinar

la concentración de ácidos nucleicos y proteínas a 260 nm y 280 nm, respectivamente, en un nanofotómetro NP80 (IMPLEN, Munich, Alemania). Las células sin tratamiento con el AE fueron empleadas como control negativo.

#### **4.9 Preparación de muestras de metabolitos y análisis metabolómico**

##### **4.9.1 Extracción de metabolitos de células planctónicas y del *biofilm***

Los metabolitos microbianos fueron extraídos mediante el método de Zhou y colaboradores (Zhou et al., 2019) con algunas modificaciones. La extracción de metabolitos en células planctónicas en presencia y ausencia del AE que presentó el mayor efecto inhibitorio, se realizó a la tercera hora de la cinética de crecimiento microbiano, durante la fase exponencial. En el caso de las células sésiles, se realizó la formación del *biofilm* en microplacas que contenían cupones de vidrio de 1x1.5 cm. Posteriormente, se agregó el inóculo de  $\sim 1 \times 10^6$  UFC/mL y el AE de LOT-II a una concentración subinhibitoria de 0.13 mg/mL. La extracción inició con el desprendimiento de células adheridas después de 24 h. El *biofilm* fue desprendido mediante el uso de espátulas estériles. Adicionalmente, se incluyó un control de células sésiles no tratadas con el aceite esencial.

Posteriormente, los cultivos bacterianos se lavaron 3 veces con agua peptonada al 0.1 % (p/v) y se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Luego, se adicionaron 500  $\mu$ L del solvente de extracción, en este caso metanol al 75% (v/v) seguido de 500  $\mu$ L de acetonitrilo (ACN) (grado HPLC) al 100%. Después, la muestra se sonicó durante 15 min en baño con hielo y luego se centrifugó a 14000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se depositó en un tubo Eppendorf y se evaporó el disolvente utilizando un concentrador de vacío Savant Speed Vac SPD120 (Thermo Fisher Scientific, Asheville, NC 28804, EE.UU). Las muestras fueron almacenadas a -80 °C para su posterior análisis por UHPLC-Orbitrap/HRMS. Finalmente, el residuo se reconstituyó en 400  $\mu$ L de metanol acuoso al 70% (v/v) que contenía los estándares

internos Z-Gly-Tyr-OH y cafeína a una concentración de 5  $\mu\text{M}$ . Se prepararon muestras de control de calidad (QC, por sus siglas en inglés, Quality Control) a partir de las extracciones obtenidas, con el objetivo de garantizar que las diferencias obtenidas entre las muestras control y tratadas ocurre por cambios biológicos (Sadiq et al., 2020; Witting, 2013). Los ensayos fueron realizados por nonuplicado (n=9).

#### ***4.9.2 Análisis de extractos metabólicos por UHPLC-Orbitrap/HRMS***

Los metabolitos extraídos fueron analizados mediante cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (UHPLC-ESI-Orbitrap/HRMS) utilizando el equipo Orbitrap<sup>TM</sup> Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, USA). Se empleó un UHPLC Dionex<sup>TM</sup> Ultimate <sup>TM</sup> 3000 (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, EE.UU), equipado con un desgasificador (SRD-3400), una bomba binaria de gradiente (HPG3400RS), un inyector automático de muestras (WPS 300 TRS) y una unidad termostatada para la columna (TCC 3000). Columna Hypersil GOLD <sup>TM</sup> aQ (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, EE. UU.; 100 x 2.1 mm, 1.9  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula) se usó a 30°C. Se utilizó como fase móvil ácido fórmico al 0.2% en agua (A) y ácido fórmico al 0.2% en acetonitrilo (B). La condición inicial de gradiente fue la siguiente: 100 % de A cambiando linealmente a 100% de B en 8 min, se mantuvo constante 4 min, se regresó a 100% A en 1 min y se mantuvo en equilibrio durante 3 min. El flujo de la fase móvil fue de 300  $\mu\text{L}/\text{min}$  y el volumen de inyección, 1  $\mu\text{L}$ . El UHPLC se acopló a un espectrómetro de masas de alta resolución con un sistema de detección de corrientes de iones tipo Orbitrap (Exactive Plus, Thermo Scientific, Sunny, CA, EE. UU), a través de una interfaz de electronebulización con calefacción (HESI-II), operada en modo de iones positivos, a 350 °C, voltaje capilar +3500V, temperatura del capilar 320 °C. El analizador Orbitrap operó en modo de barrido completo (Full MS Scan) con resolución 70000. Los iones se enviaron

para su fragmentación a la celda de colisiones HCD (High-Energy Collisional Dissociation), a diferentes energías (10 y 20 eV) en el modo de barrido por pasos (Stepped Scan). Para cada energía de colisión, se utilizó una resolución RFWHM de 35000, usando AGC de  $3 \times 10^6$  y un tiempo de inyección en la cámara C-trap de 50 ms. Todos los espectros de masas se obtuvieron en el rango de  $m/z$  50-750 u.m.a. Una metodología similar fue utilizada para el modo de iones negativo.

#### 4.9.3 Procesamiento de datos

Los archivos de datos sin procesar se convirtieron a archivos de formato mzXML mediante la herramienta MSconvert (software ProteoWizard 3.0x) y se cargaron en la plataforma interactiva en línea XCMS versión 3.7.1 (Tautenhahn et al., 2012). La configuración de parámetros para la alineación de cromatogramas y normalización de datos fue la siguiente: se ejecutó un análisis multigrupo en el modo centWave para la detección de características ( $\Delta = 5$  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); y la alineación del cromatograma: mzwid = 0.025 y bw = 5). Se obtuvo como salida la matriz de datos con las intensidades de las características detectadas.

La matriz de datos fue filtrada de acuerdo con el coeficiente de variación (CV) de las muestras control de calidad (QC). Los datos que presentaron mayor dispersión en la media fueron eliminados ( $CV > 25\%$ ). Seguidamente, para determinar los cambios en los perfiles metabólicos entre las células control y tratadas con el AE, la matriz de datos fue sometida a un análisis uni- y multivariado con el software MetaboAnalyst 5.0 (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 de variables en la proyección (VIP). Las

características ( $m/z$ ) con un  $VIP > 1$  y una tasa de descubrimiento falso ( $FDR < 0.05$ ). Adicionalmente, se realizó un heatmap, con el fin de determinar patrones o grupos (clúster), un análisis del fold change (FC) para obtener una cuantificación relativa de los metabolitos, cuyos valores de 0-0.5 corresponden a metabolitos que presentaron un incremento en su concentración, y valores mayores de 2 indican metabolitos con disminución en su concentración. Luego, se realizó un t-test para determinar la variación estadística de las medidas de los dos grupos y un volcano plot el cual permite relacionar la significancia estadística (valor P) frente a la magnitud del cambio (FC). Finalmente, se realizó la identificación putativa de los metabolitos estadísticamente significativos utilizando la base de datos CEU Mass Mediator versión 3.0 (<http://ceumass.eps.uspceu.es/>), la base de datos del metaboloma humano (<https://hmdb.ca/>), PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) y MassBank (<https://massbank.eu/MassBank/>).

Los análisis de vía y enriquecimiento se realizaron con MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>). Se integraron los resultados obtenidos y se construyeron las posibles rutas metabólicas afectadas a causa del efecto por el AE, con ayuda de herramientas bioinformáticas como MetaboAnalyst 3.0 y KEGG (Enciclopedia de genes y genomas de Kioto). El análisis fue realizado seleccionando la biblioteca apropiada para *S. entérica*.

#### **4.0 Análisis estadístico**

Para determinar el efecto de los AE sobre células planctónicas y células sésiles sobre el porcentaje de inhibición como variable dependiente, se evaluó la normalidad de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk y se verificó la homocedasticidad. Seguidamente se usó la prueba paramétrica de análisis de varianza (ANOVA). La comparación de las medias entre los diferentes niveles dentro de cada tratamiento fue realizada empleando la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Las barras de error en los gráficos representan la desviación estándar de la media para

cada uno de los ensayos. Todos los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado (y n=9 para el análisis metabólico). En todos los casos, el nivel de significancia fue de  $p < 0.05$ .

## 5. Resultados

### 5.1 Material vegetal y caracterización de los aceites esenciales

La caracterización química de los AE realizada por el CENIVAM permitió la identificación de 81 compuestos diferentes. Al analizar la abundancia de los compuestos individualmente se encontró que los constituyentes mayoritarios de los AE fueron hidrocarburos sesquiterpénicos (43%, SH), seguido de hidrocarburos monoterpénicos (17%, MH), monoterpénos oxigenados (16%, OM), sesquiterpenos oxigenados (16%, OS) y compuestos oxigenados (8%, OC).

### 5.2 Determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales in vitro sobre células planctónicas

Se determinó la actividad antimicrobiana de los 20 AE mediante el método de microdilución en caldo. Los resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI<sub>50</sub>) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) se presentan en la Tabla 3.

De los 20 AE evaluados, tres AE (*L. origanoides* quimiotipo carvacrol (LOC), *L. origanoides* quimiotipo timol-*p*-cimeno (LOT-C) y *L. origanoides* quimiotipo timol (LOT-II)) presentaron actividad antimicrobiana sobre la cepa microbiana en estudio. Los valores de CMI se encuentran en un rango de 0.37 mg/mL a 0.75 mg/mL y los de CMB desde 0.75 a 1.5 mg/mL.

**Tabla 3.** Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de los 20 AE frente a *S. Enteritidis* ATCC 13076. Los valores están expresados en mg/mL y cada experimento fue llevado a cabo por triplicado

Código	Especie de planta	<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	
		CMI <sub>50</sub> (mg/mL)	CMB (mg/mL)
SA	<i>Steiractinia aspera</i> Cuatrec.	>1.5	>1.5
TD-I	<i>Turnera diffusa</i> Willd	>1.5	>1.5
LOP	<i>Lippia origanoides</i> H.B.K quimiotipo felandreno	>1.5	>1.5
CM-I	<i>Calycolpus moritzianus</i> Burret	>1.5	>1.5
PA	<i>Piper aduncum</i> Lam	>1.5	>1.5
EQ	<i>Elaphandra quinquenervis</i> H.Rob	>1.5	>1.5
HD	<i>Hyptis dilatate</i> Benth	>1.5	>1.5
LOC	<i>L. origanoides</i> H.B.K quimiotipo carvacrol	0.75 ± 0.0041	1.5
LOCpT	<i>L. origanoides</i> H.B.K quimiotipo β- cariofileno-timol	>1.5	>1.5
LOT-I	<i>L. origanoides</i> H.B.K quimiotipo timol	>1.5	>1.5
TD-II	<i>T. diffusa</i> Willd	>1.5	>1.5
SV	<i>Satureja viminea</i> (L.) Kuntze	>1.5	>1.5
PS	<i>Psidium sartorianum</i> (O.Berg) Nied	>1.5	>1.5
VC	<i>Varronia curassavica</i> Jacq.	>1.5	>1.5
OB	<i>Ocimum basilicum</i> L.	>1.5	>1.5

Código	Especie de planta	<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	
		CMI <sub>50</sub> (mg/mL)	CMB (mg/mL)
CM-II	<i>C. moritzianus</i> Burret	>1.5	>1.5
TD-III	<i>T. diffusa</i> Willd	>1.5	>1.5
LOT-C	<i>L. origanoides</i> H.B.K quimiotipo timol- <i>p</i> - cimeno	0.37 ± 0.0070	0.75
LOT-II	<i>L. origanoides</i> H.B.K quimiotipo timol	0.37 ± 0.0043	0.75
LM	<i>L. micromera</i> Schauer	>1.5	>1.5

### 5.3 Evaluación de la formación e inhibición del *biofilm*

Se evaluó la actividad antibiofilm de los 20 AE frente a *S. Enteritidis* ATCC 13076. Las concentraciones de los AE evaluados dependieron de la actividad del AE frente a las células planctónicas, por lo tanto, los AE que presentaron actividad antimicrobiana fueron evaluados a concentraciones sub-inhedoras. Los resultados fueron expresados en porcentaje de inhibición (Tabla 4).

Los AE que presentaron mayor actividad antibiofilm fueron *L. origanoides* quimiotipo timol-*p*-cimeno (LOT-C) y *L. origanoides* quimiotipo timol (LOT-II), los cuales inhibieron la formación del *biofilm* de *S. Enteritidis* en un porcentaje mayor al 60% a una concentración de 0.13 mg/mL. Así mismo, los AE *L. origanoides* quimiotipo carvacrol (LOC) y *L. origanoides* quimiotipo timol (LOT-I), inhibieron la formación del *biofilm* en un 58% y 52% respectivamente, a una concentración de 0.18 mg/mL. Los AE *L. origanoides* quimiotipo  $\beta$ -cariofileno-timol (LOCpT) y *L. micromera* (LM) inhibieron el *biofilm* en un 44 y 25% respectivamente, a una concentración de

0.75 mg/mL. Otros AE presentaron porcentajes de inhibición de la formación del *biofilm* en un rango de 15-57% a una concentración de 1.5 mg/mL.

**Tabla 4.** Actividad antibiofilm de los AE sobre *S. Enteritidis* ATCC 13076. Se calculó el porcentaje de inhibición respecto al control (sin tratamiento con AE).

Código	Especie de planta	Inhibición del <i>biofilm</i> (%)	Concentración del AE (mg/mL)
SA	<i>Steiractinia aspera</i> Cuatrec.	57.69 ± 0.18 <sup>c</sup>	1.5
TD-I	<i>Turnera diffusa</i> Willd	33.27 ± 0.37 <sup>b</sup>	1.5
LOP	<i>Lippia origanoides</i> H.B.K quimiotipo felandreno	67.40 ± 0.11 <sup>c</sup>	1.5
CM-I	<i>Calycolpus moritzianus</i> Burret	66.66 ± 0.10 <sup>c</sup>	1.5
PA	<i>Piper aduncum</i> Lam	-	>1.5
EQ	<i>Elaphandra quinquenervis</i> H.Rob	-	>1.5
HD	<i>Hyptis dilatate</i> Benth	54.06 ± 0.07 <sup>c</sup>	1.5
LOC	<i>L. origanoides</i> H.B.K quimiotipo carvacrol	58.47 ± 0.08 <sup>c</sup>	0.18
LOCpT	<i>L. origanoides</i> H.B.K quimiotipo $\beta$ -cariofileno-timol	44.00 ± 0.19 <sup>c</sup>	0.75
LOT-I	<i>L. origanoides</i> H.B.K quimiotipo timol	52.19 ± 0.28 <sup>c</sup>	0.18
TD-II	<i>T. diffusa</i> Willd	-	>1.5
SV	<i>Satureja viminea</i> (L.) Kuntze	-	>1.5
PS	<i>Psidium sartorianum</i> (O.Berg) Nied	-	>1.5

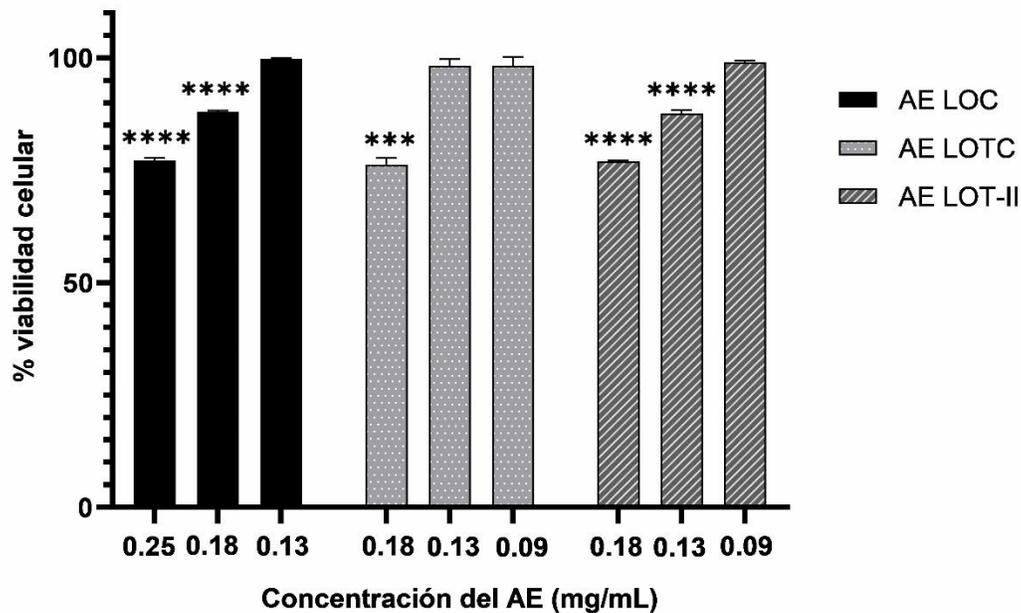
Código	Especie de planta	Inhibición del <i>biofilm</i> (%)	Concentración del AE (mg/mL)
VC	<i>Varronia curassavica</i> Jacq.	-	>1.5
OB	<i>Ocimum basilicum</i> L.	15.25 ± 0.37 <sup>b</sup>	1.5
CM-II	<i>C. moritzianus</i> Burret	45.84 ± 0.07 <sup>b</sup>	1.5
TD-III	<i>T. diffusa</i> Willd	-	>1.5
LOTC	<i>L. origanoides</i> H.B.K quimiotipo timol- <i>p</i> - cimeno	61.14 ± 0.07 <sup>c</sup>	0.13
LOT-II	<i>L. origanoides</i> H.B.K quimiotipo timol	63.24 ± 0.06 <sup>c</sup>	0.13
LM	<i>L. micromera</i> Schauer	25.00 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.75

Nota. La prueba ANOVA mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ( $p < 0.05$ ) con un nivel de significancia del 95% y una prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Las letras indican diferencias significativas entre los grupos de prueba.

#### 5.4 Cuantificación de la viabilidad celular de células planctónicas y células sésiles

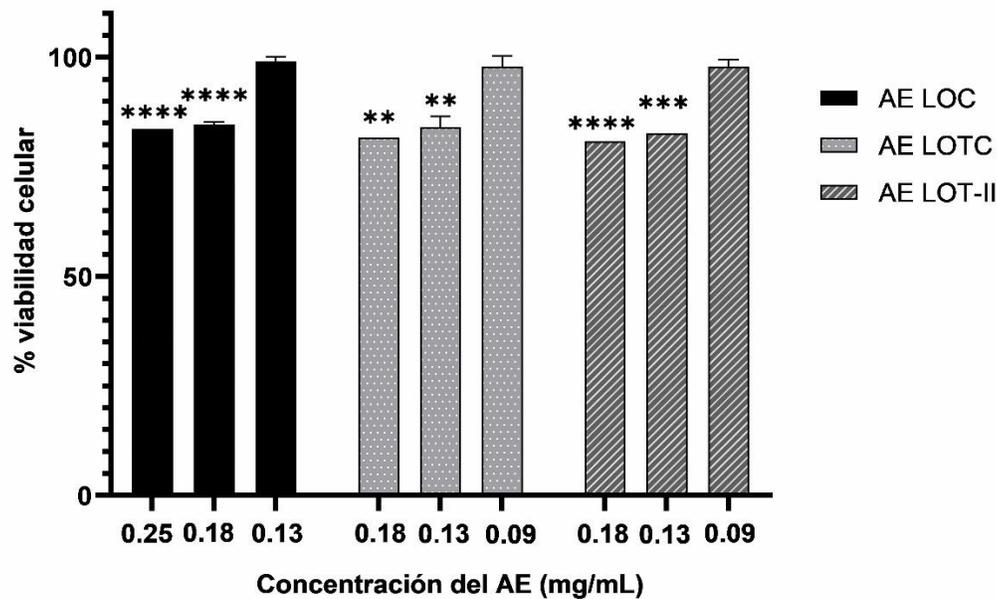
El conteo de células planctónicas (Figura 4) y sésiles (Figura 5) tratadas y sin tratamiento con el AE permitió determinar que existen diferencias significativas al ser tratadas con las concentraciones subinhibitorias más altas de los AE (0.25 mg/mL y 0.18 mg/mL). El AE LOC a una concentración de 0.13 mg/mL y los AE LOTC y LOT-II a una concentración de 0.09 mg/mL no presentan cambios significativos en la viabilidad celular de células planctónicas y sésiles.

**Figura 4.** Conteo de células planctónicas posterior al tratamiento con el AE *L. origanoides* quimiotipo carvacrol (LOC), *L. origanoides* quimiotipo timol-*p*-cimeno (LOT-C) y *L. origanoides* quimiotipo timol (LOT-II).



Nota. La prueba ANOVA mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ( $p < 0.05$ ) con un nivel de significancia del 95% y una prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Las barras de error en los gráficos representan la desviación estándar de la media para cada uno de los ensayos ( $n = 3$ ) (\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

**Figura 5.** Conteo de células del *biofilm* posterior al tratamiento con el AE *L. origanoides* quimiotipo carvacrol (LOC), *L. origanoides* quimiotipo timol-*p*-cimeno (LOT-C) y *L. origanoides* quimiotipo timol (LOT-II).

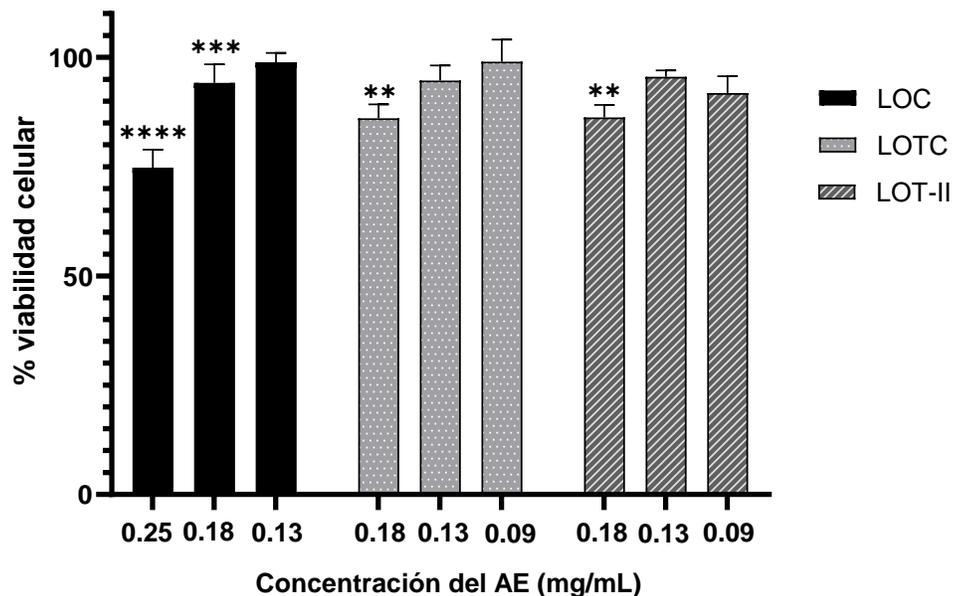


Nota. La prueba ANOVA mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ( $p < 0.05$ ) con un nivel de significancia del 95% y una prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Las barras de error en los gráficos representan la desviación estándar de la media para cada uno de los ensayos ( $n = 3$ ) (\*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

#### 4.5 Evaluación de la actividad metabólica del *biofilm*

Las células sésiles presentaron diferencias significativas cuando fueron tratadas con el AE LOC a una concentración de 0.25 y 0.18 mg/mL, mientras que el tratamiento con los AE LOTC y LOT-II solo presentaron diferencias significativas a una concentración de 0.18 mg/mL, el tratamiento con concentraciones sub-inhedoras no genera cambios significativos en la viabilidad celular. Finalmente, el porcentaje de viabilidad celular fue mayor al 70% en todos los casos (Figura 6).

**Figura 6.** Efecto de la viabilidad celular de células sésiles de *S. Enteritidis* al ser tratadas con diferentes concentraciones de aceites esenciales.

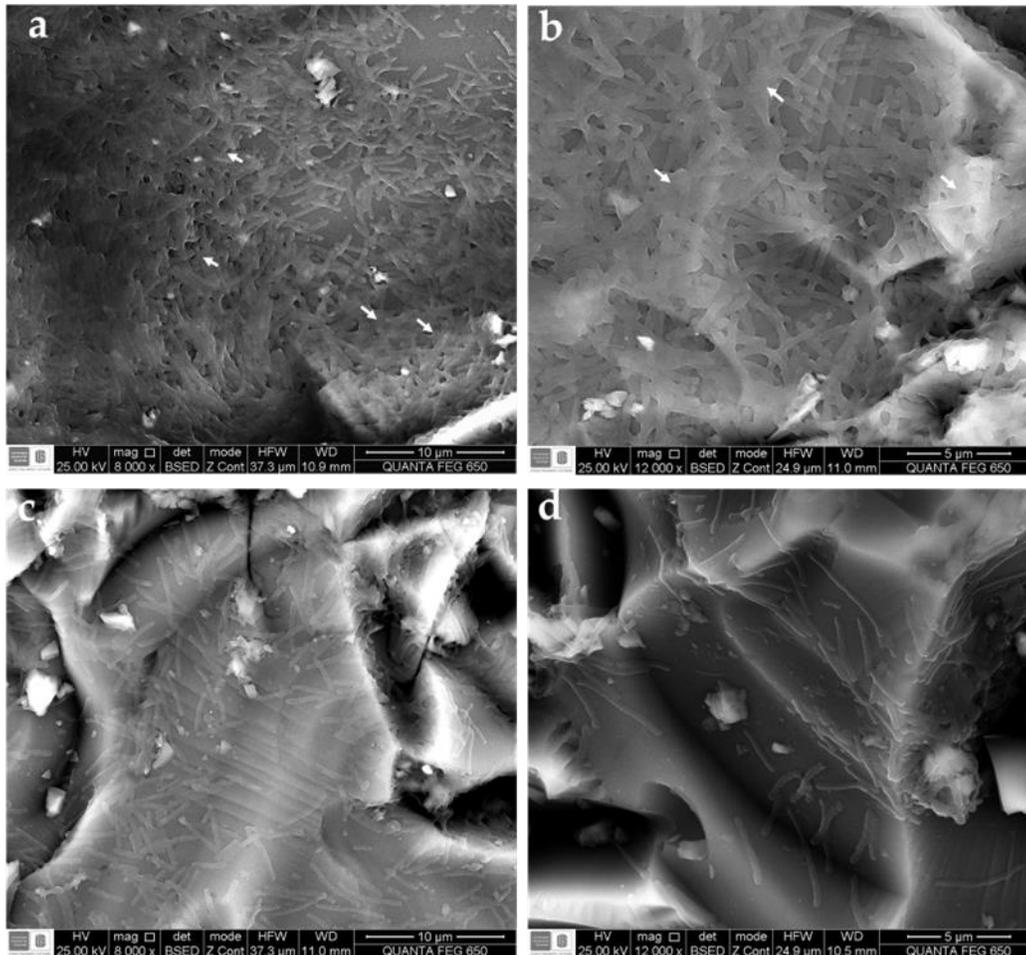


Nota. La prueba ANOVA mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ( $p < 0.05$ ) con un nivel de significancia del 95% y una prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Las barras de error en los gráficos representan la desviación estándar de la media para cada uno de los ensayos  $n = 3$ ) (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

#### 4.6 Análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las células del *biofilm* de *S. Enteritidis* exhibieron diferencias en la densidad celular al ser tratadas con el AE LOT-II. En las micrografías del *biofilm* no tratado de *S. Enteritidis*, se observaron microorganismos de forma bacilar, lisos, embebidos en una matriz extracelular de polisacáridos densa (Figura 7a-b). Mientras que las bacterias tratadas con el AE presentaron una disminución de la matriz de exopolisacáridos y células más dispersas (Figura 7c-d), evidenciando la propiedad *antibiofilm* del AE LOT-II.

**Figura 7.** Micrografías del *biofilm* de *S. Enteritidis* sobre cupones de vidrio esmerilado obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). *Biofilm* de *S. Enteritidis* sin tratamiento (a, b) y con tratamiento con el AE LOT-II (c, d) a diferentes magnitudes. Las flechas resaltan áreas de matriz extracelular.

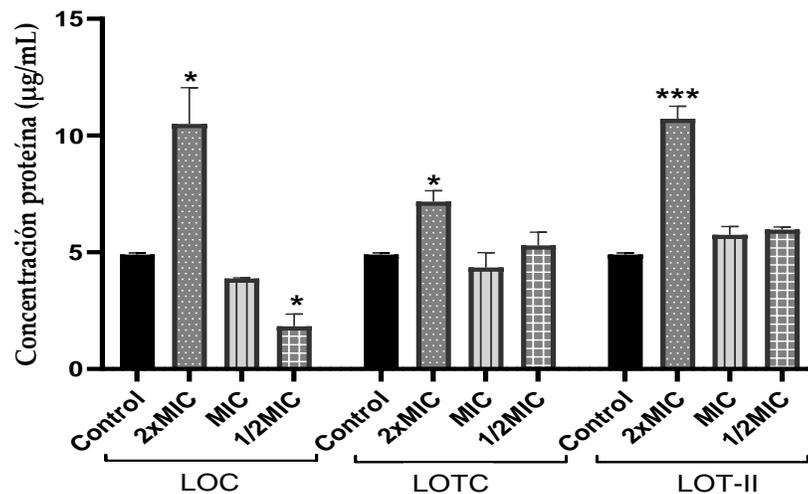


#### 4.7 Efecto de los AE evaluados sobre la integridad de la membrana celular de *S. Enteritidis*

Se determinó la integridad de la membrana celular mediante la medición de liberación de biomoléculas como proteínas (Figura 8) y ácidos nucleicos (Figura 9). Los resultados mostraron un incremento en la liberación de constituyentes celulares a medida que aumentó la concentración

de los AE. En comparación con el control, la concentración de proteínas y ácidos nucleicos en las suspensiones tratadas con 2xMIC presentaron diferencias significativas.

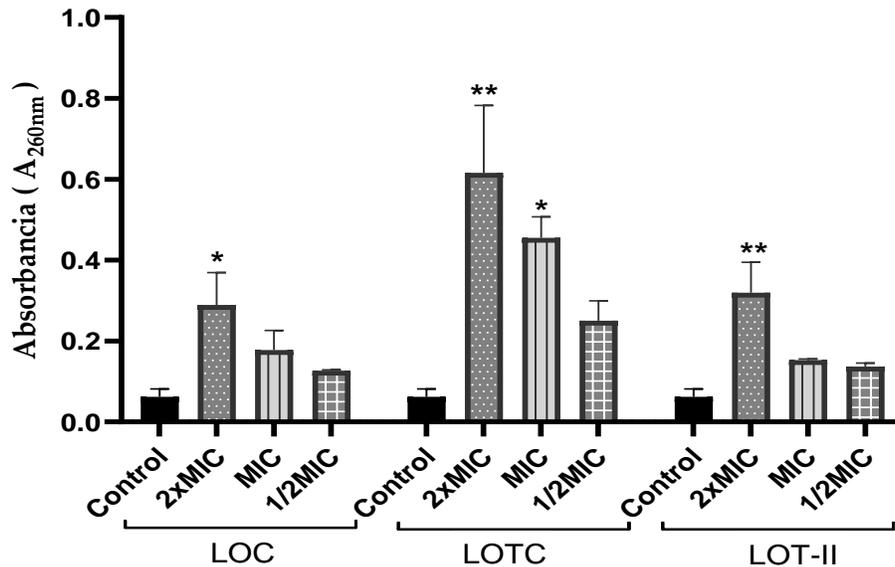
**Figura 8.** Liberación de proteínas en *S. Enteritidis* al ser tratadas con diferentes concentraciones del AE LOC, LOTC y LOT-II.



Nota. La prueba ANOVA mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ( $p < 0.05$ ) con un nivel de significancia del 95% y una prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Las barras de error en los gráficos representan la desviación estándar de la media para cada uno de los ensayos ( $n = 3$ ). (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

Liberación de ácidos nucleicos en *S. Enteritidis* después del tratamiento con diferentes concentraciones del AE LOT, LOTC y LOT-II

**Figura 9.** Liberación de ácidos nucleicos en *S. Enteritidis* después del tratamiento con diferentes concentraciones del AE LOT, LOTC y LOT-II



Nota. La prueba ANOVA mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ( $p < 0.05$ ) con un nivel de significancia del 95% y una prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Las barras de error en los gráficos representan la desviación estándar de la media para cada uno de los ensayos ( $n = 3$ ). (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

## 4.8 Análisis metabólico

### 4.8.1 Análisis metabólico del efecto del AE LOT-I sobre células planctónicas de *S. Enteritidis*

Se llevó a cabo una estrategia de metabolómica no dirigida en células planctónicas para determinar el efecto del aceite esencial de LOT-II en el metaboloma celular. Por lo tanto, se utilizó LC-MS operada en modos de adquisición de iones positivos (PI) y negativos (NI). La matriz de datos analizada contenía 3312 y 5706 características para los modos NI y PI, respectivamente. Los gráficos de análisis de componentes principales (PCA) mostraron una separación bien definida de

células planctónicas no tratadas (control) y tratadas (con AE) con la matriz de datos obtenida por ambos modos de ionización (Figura 10). Los dos componentes principales (PC1 y PC2) explicaron el 31,3% y el 45,3% de la variabilidad total de los conjuntos de datos para los modos de adquisición NI y PI, respectivamente (Figura 10a, b). Según los resultados, el AE LOT-II indujo cambios en el metaboloma de *S. Enteritidis*. Para investigar con más detalle tales cambios, se aplicó un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) como se muestra en la Figura 10c y 10d. Los parámetros R<sup>2</sup> y Q<sup>2</sup> mostraron un modelo ajustado de alta predictibilidad y confiabilidad (0.99 y 0.86, para modo NI y 0.98 y 0.91 para modo PI, respectivamente). En general, nuestros resultados demostraron el efecto significativo del AE LOT-II sobre el metabolismo de *S. Enteritidis*.

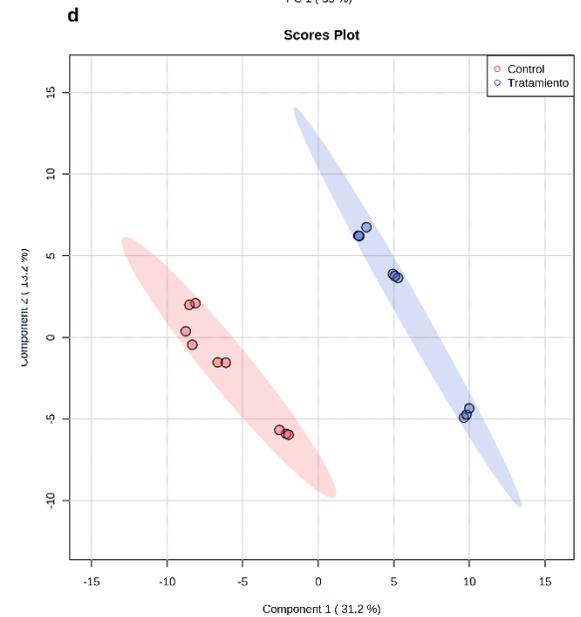
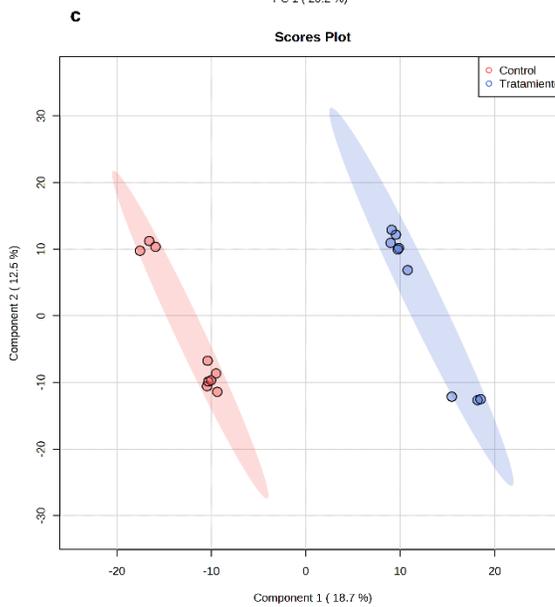
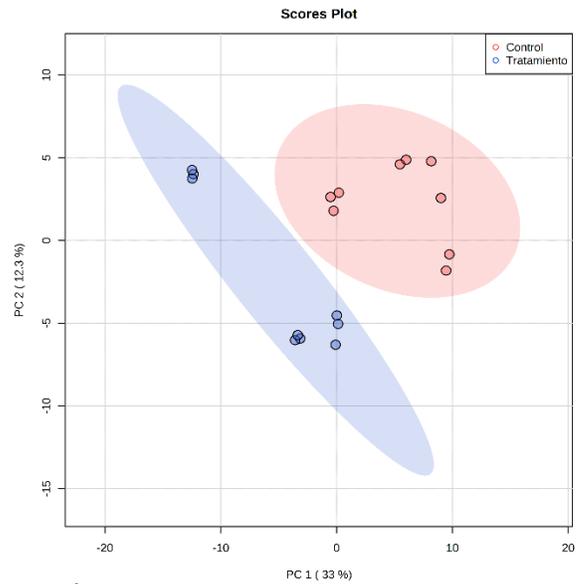
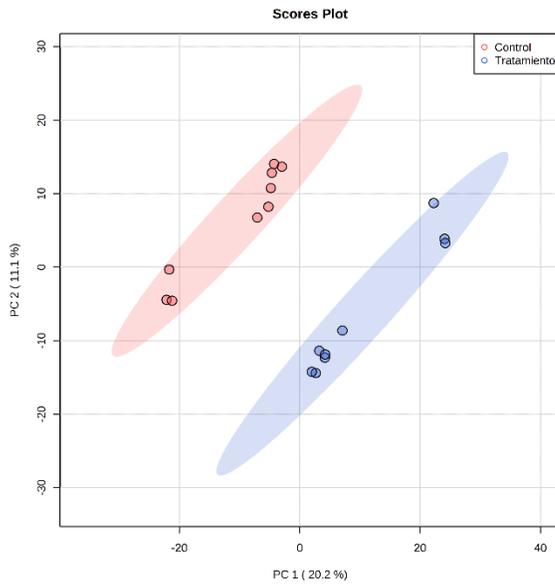
De acuerdo con la importancia de las variables en la proyección (VIP), se encontró que un total de 106 compuestos putativamente identificados (nivel 2 de identificación de metabolitos, de acuerdo con Metabolomics Standards Initiative) fueron responsables de la separación de grupos en el análisis PLS-DA y su identificación fue realizado mediante la comparación de espectros de masas, iones de fragmentos y masa exacta con los informados en la literatura y las bases de datos (Tabla 5) (Fiehn et al., 2007; Sumner et al., 2007). Entre los metabolitos diferenciales identificados, 42 fueron modulados positivamente y 64 modulados negativamente. Por ejemplo, en el modo NI, los metabolitos como citidina, ácido formiminoglutámico, 2',3'-AMP cíclico, 5-hidroxiisourato se modularon positivamente en células de cultivo tratadas con el AE LOT-II; mientras que la inosina, guanosina, adenina, 2-oxoglutarato, timidina fueron moduladas negativamente. Para el modo PI, la muestra tratada contenía ácido treónico, biotina, citosina, ribosa, ácido cítrico y ácido oxoglutarico, y metabolitos como metionina, lisina, alanina, glutatión, ácido 4-imidazolina-5-propanoico disminuyeron en términos de concentración. El nivel de expresión de los metabolitos se visualizó a través de volcano-plot (Figura 11). Adicionalmente,

los metabolitos diferenciales más representativos se trazaron en un mapa de calor, lo que permitió una mejor visualización de los datos relacionados con la abundancia química entre las células bacterianas de control y tratadas (grupos) (Figura 12). Los resultados evidenciaron que la mayoría de los metabolitos fueron modulados negativamente por el AE LOT-II.

Finalmente, para comprender los cambios en las rutas metabólicas, se realizó un análisis de enriquecimiento en la base de datos KEGG. Ocho vías metabólicas posiblemente se vieron afectadas por el tratamiento con el AE en células planctónicas de *S. Enteritidis* ( $p < 0,05$ ) entre las rutas metabólicas afectadas por acción del AE se encuentra el metabolismo de la arginina y la prolina, el metabolismo central del carbono, el metabolismo de las purinas y pirimidinas. La Tabla 6 contiene los hits de los metabolitos modulados diferencialmente en las rutas metabólicas y la Figura 13 representa una descripción general de estas rutas metabólicas.

**Figura 10.** Gráficos de puntuación que representan los resultados de PCA y PLS-DA basados en datos de LC/MS en células planctónicas de *S. Enteritidis* con y sin tratamiento con aceite esencial LOT-II. (a y b) PCA con datos obtenidos en modos de adquisición negativo y positivo,

respectivamente; (c y d) PLS-DA con datos obtenidos en los modos de adquisición negativo y positivo, respectivamente. Control (color rojo) y células tratadas (color azul).



**Tabla 5.** Metabolitos identificados por estar significativamente afectados después del tratamiento con el AE LOT-II sobre células planctónicas de *S. Enteritidis*.

Metabolito	Formula	Aducto	m/z	$\Delta$ ppm	tR	MI	M
Disulfuro de glutatión	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>12</sub> S <sub>2</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	611.143447	1.11	1.08	ESI(-)	↓
Glutatión	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S	[M-H] <sup>-</sup>	306.076014	0.11	1.16	ESI(-)	↓
Citidina	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	242.077583	0.43	0.85	ESI(-)	↑
2'-desoxiuridina	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	227.066500	1.27	2.04	ESI(-)	↓
2,5-dioxopentanoato	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	129.018163	4.77	0.49	ESI(-)	↑
Gly Asp Val	C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	288.119633	0.25	0.96	ESI(-)	↓
2',3'-AMP cíclico	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> P	[M-H] <sup>-</sup>	328.044713	0.07	2.00	ESI(-)	↑
Timidina	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	241.082345	0.39	2.78	ESI(-)	↓
Pantoato	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	[(M-H)- H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	129.054564	4.61	3.06	ESI(-)	↓
Ácido málico	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	[(M-H)- H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	115.002471	5.72	0.49	ESI(-)	↓
Serilcisteína	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	[(M-H)- H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	189.032975	2.14	0.53	ESI(-)	↑
Cis Thr Cis	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub>	[(M-H)- H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	306.057370	2.77	1.16	ESI(-)	↓
Uridina	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	243.061602	0.44	1.36	ESI(-)	↓
O-succinil-homoserina	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>6</sub>	[(M-H)- H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	200.055546	1.71	1.16	ESI(-)	↓
Gln-Pro	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	242.113933	0.60	0.93	ESI(-)	↑
Ácido $\alpha$ -cetoglutárico	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>	[2M-H] <sup>-</sup>	289.067269	0.30	1.36	ESI(-)	↓
Pro Gly Gln	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	299.135537	0.01	0.53	ESI(-)	↓
3'-ceto-3'-desoxi-AMP	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> P	[M-H] <sup>-</sup>	344.039479	0.35	1.80	ESI(-)	↑
Malato de 2-fosfinometilo	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub> P	[M-H] <sup>-</sup>	211.000418	1.62	0.42	ESI(-)	↓
3-hidroxi-2-metil piridina- 5-carboxilato	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	152.034191	3.74	1.40	ESI(-)	↓
Adenina	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	134.046074	444	0.81	ESI(-)	↓
Ácido formiminoglutámico	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	[(M-H)- H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	155.045069	3.81	0.73	ESI(-)	↑
Asn Leu Asp	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	359.156679	0.02	2.87	ESI(-)	↓

Metionina	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> S	[M-H] <sup>-</sup>	148.042572	4.37	0.69	ESI(-)	↓
N-3-(oxohexanoil)- homoserina lactona	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub> S	[M-H] <sup>-</sup>	242.085616	2.21	2.08	ESI(-)	↓
Asp-Lys Pro	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	357.177418	0.05	3.07	ESI(-)	↓
Leu His Val	C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	[(M+Na)- 2H] <sup>-</sup>	412.219488	4.20	3.55	ESI(-)	↑
2-hidroxietanosulfonato	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S	[M-H] <sup>-</sup>	124.990257	4.74	0.51	ESI(-)	↓
Treonato	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	135.028746	4.39	0.65	ESI(-)	↓
Ácido eritrónico	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	[(M-H)- H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	117.018130	5.54	1.08	ESI(-)	↓
3-fosfoadenilil-selenato	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>13</sub> P <sub>2</sub> Se	[M-3H] <sup>-</sup>	183.969294	1.23	0.85	ESI(-)	↑
Glutamilglicina	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	[(M-H)- H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	185.055796	2.34	0.77	ESI(-)	↓
Val-Asn	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	230.113931	0.64	1.36	ESI(-)	↓
Fosfato de 2-(2-carboxi-4- metiltiazol-5-il)etilo	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>6</sub> PS	[M-H] <sup>-</sup>	265.988346	1.74	1.11	ESI(-)	↓
Asn Leu Asp	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	[(M-H)- H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	341.146024	0.22	0.53	ESI(-)	↓
Ácido leucínico	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	131.070207	4.60	4.30	ESI(-)	↓
Inosina	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	267.072955	0.05	2.35	ESI(-)	↓
Guanosina	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	282.083870	0.10	2.40	ESI(-)	↓
gamma-glutamilvalina	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	245.113596	0.58	1.32	ESI(-)	↓
Glutaminileucina	C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	258.145430	0.19	2.87	ESI(-)	↑
Carboxilato de 5-ureido-4- imidazol	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	[(M-H)- H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	151.024953	4.28	1.12	ESI(-)	↑
Ácido hidroxipropanodioico	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	118.997404	5.34	1.76	ESI(-)	↓
Ácido 3,4- dihidroxi-mandélico	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	[(M-H)- H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	165.018259	3.15	3.53	ESI(-)	↓
Fenilalanina	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	164.070639	3.11	2.44	ESI(-)	↓
5-hidroxiisourato	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	[(M-H)- H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	165.004353	3.07	0.88	ESI(-)	↑
Thr Gly Pro	C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	[(M+H)- H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	256.128740	3.86	0.50	ESI(+)	↑
N1-acetilespermidina	C <sub>9</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O	[M+H] <sup>+</sup>	188.175670	3.24	0.47	ESI(+)	↑
Ácido 12-amino- dodecanoico	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>2</sub>	[(M+H)- H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	198.185147	3.19	5.55	ESI(+)	↓
N-acetilputrescina	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O	[M+H] <sup>+</sup>	131.118026	3.07	0.51	ESI(+)	↑

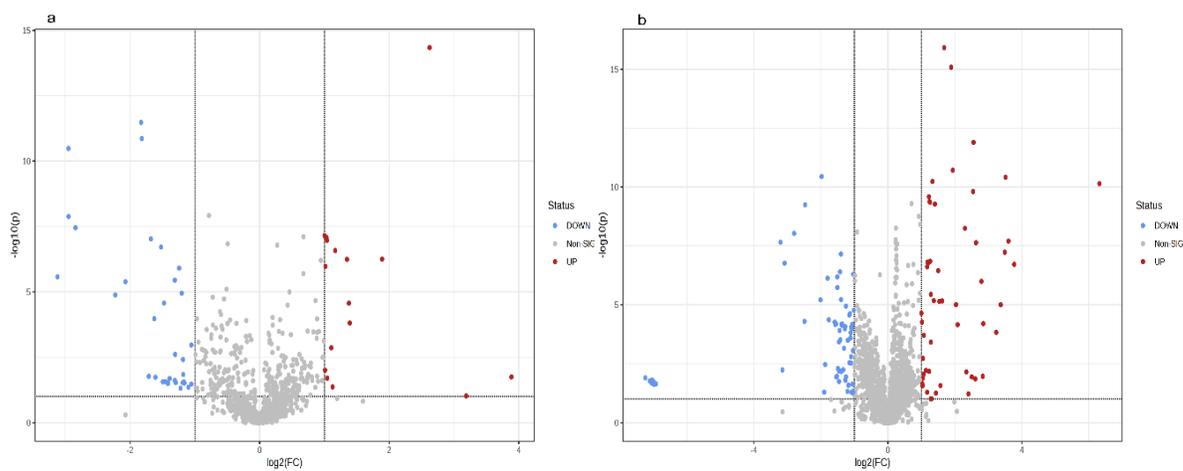
Biotina	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	245.095832	0.60	0.82	ESI(+)	↑
Citosina	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> N <sub>3</sub> O	[M+H] <sup>+</sup>	112.050808	2.43	0.51	ESI(+)	↑
Isoleucina	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	114.091548	2.90	0.51	ESI(+)	↑
Glutati3n	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	308.090624	3.26	0.54	ESI(+)	↓
2-fenilpropanal	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O	[2M+Na] <sup>+</sup>	291.137643	5.33	0.96	ESI(+)	↓
Ácido 2-hidroxi-2-etilsuccínico	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	163.061381	4.54	1.17	ESI(+)	↑
Ácido 12-amino-dodecanoico	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	216.195710	2.95	5.56	ESI(+)	↓
Ribosa	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	133.049537	4.07	0.51	ESI(+)	↑
Pantotenato	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	220.117850	2.90	2.94	ESI(+)	↓
1-palmitoilglicerofosfocolina	C <sub>24</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>7</sub> P	[M+2Na] <sup>+</sup>	271.159059	3.19	0.54	ESI(+)	↓
N6,N6,N6-trimetil-lisina	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	171.149131	3.49	0.47	ESI(+)	↑
Histidinil-hidroxi-prolina	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	269.124056	3.43	0.78	ESI(+)	↑
Ácido cítrico	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	175.023566	3.96	0.77	ESI(+)	↑
Citidina	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	244.092565	3.17	0.82	ESI(+)	↑
Glutaminilglutamina	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	275.134636	3.28	1.05	ESI(+)	↑
Glicerol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	[M+Na] <sup>+</sup>	115.036981	1.12	0.86	ESI(+)	↑
Citrato de acetil tributilo	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>8</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	403.232039	2.85	8.64	ESI(+)	↑
Arbutina	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	273.096551	3.18	8.63	ESI(+)	↑
N-acetilcadaverina	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O	[M+H] <sup>+</sup>	145.133529	3.79	0.88	ESI(+)	↑
N-ciclohexilformamida	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> NO	[M+H] <sup>+</sup>	128.107084	3.47	6.19	ESI(+)	↑
5-hidroxiquinurenina	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	[M+2H] <sup>+</sup>	113.047763	0.77	0.82	ESI(+)	↑
Arg Val Ser	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	361.221533	4.41	8.64	ESI(+)	↑
4-Dimetilamino-fenilalanina	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	209.128227	3.69	0.51	ESI(+)	↓
Ácido bencilsuccínico	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	209.080786	2.84	6.70	ESI(+)	↓
1-(beta-D-ribofuranosil)-1,4-dihidronicotinamida	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	257.112715	3.98	2.32	ESI(+)	↓
Ser Arg Tyr	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	425.213885	2.27	8.64	ESI(+)	↑
Ácido oxoglutarico	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	129.018303	3.69	8.65	ESI(+)	↑
Xantina	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	153.040657	3.87	1.13	ESI(+)	↑

2-furancarboxaldehído	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	97.028751	2.04	0.47	ESI(+)	↓
Ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)prop-2-enoico	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	181.049448	3.49	6.70	ESI(+)	↓
dTDP-forosamina	C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>12</sub> P <sub>2</sub>	[M+3H] <sup>+</sup>	182.052866	5.76	6.70	ESI(+)	↓
Adenina	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	136.061737	4.28	3.70	ESI(+)	↓
Arginil-Tirosina	C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	338.181817	2.96	1.09	ESI(+)	↓
5-hidroxiectoína	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	159.076384	3.61	0.49	ESI(+)	↓
Gentisalaldehído	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	121.028600	2.88	9.87	ESI(+)	↓
Fenilalanil-arginina	C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	322.186829	3.35	2.28	ESI(+)	↓
Ácido 4-acetamido-2-aminobutanoico	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	161.092036	3.55	0.51	ESI(+)	↑
5-hidroxiquinurenina	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	[M+2H] <sup>+</sup>	113.047858	1.65	0.51	ESI(+)	↓
Metionina	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	150.058253	4.11	0.70	ESI(+)	↓
Ácido aconítico	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	139.002575	3.99	8.64	ESI(+)	↑
Histamina	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	112.087177	2.61	0.46	ESI(+)	↑
Ácido 5-oxo-pentanoico	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	117.054817	2.92	0.50	ESI(+)	↑
Piridoxamina 5'-fosfato	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> P	[M+2H] <sup>+</sup>	125.036567	5.17	0.51	ESI(+)	↓
Gamma-glutamil-gamma-aminobutiraldehído	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	217.118157	3.09	4.60	ESI(+)	↓
Gamma-glutamil-putrescina	C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	200.139236	3.31	0.70	ESI(+)	↓
Ácido piroglutámico	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	130.049977	3.32	0.82	ESI(+)	↓
Ácido urocánico	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	121.039806	3.08	1.04	ESI(+)	↑
GMP cíclico	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> P	[M+H] <sup>+</sup>	346.054268	2.83	1.77	ESI(+)	↑
2-fenilacetamida	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO	[M+H] <sup>+</sup>	136.075700	3.89	3.77	ESI(+)	↓
Ácido 4-imidazolona-5-propanoico	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	157.060765	3.46	0.50	ESI(+)	↓
Lisina	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	129.102357	3.27	0.50	ESI(+)	↓
Prolina	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	116.070792	3.08	0.51	ESI(+)	↓
Alanina	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	90.055369	1.44	0.47	ESI(+)	↓
Ácido fenilpirúvico	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	165.054598	3.40	1.09	ESI(+)	↓
Piridoxamina	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	169.097072	3.71	2.71	ESI(+)	↓
2'-desoxiadenosina	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	252.108958	2.78	2.57	ESI(+)	↓

Creatinina	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O	[M+H] <sup>+</sup>	114.066471	2.27	0.50	ESI(+)	↓
------------	--	--------------------	------------	------	------	--------	---

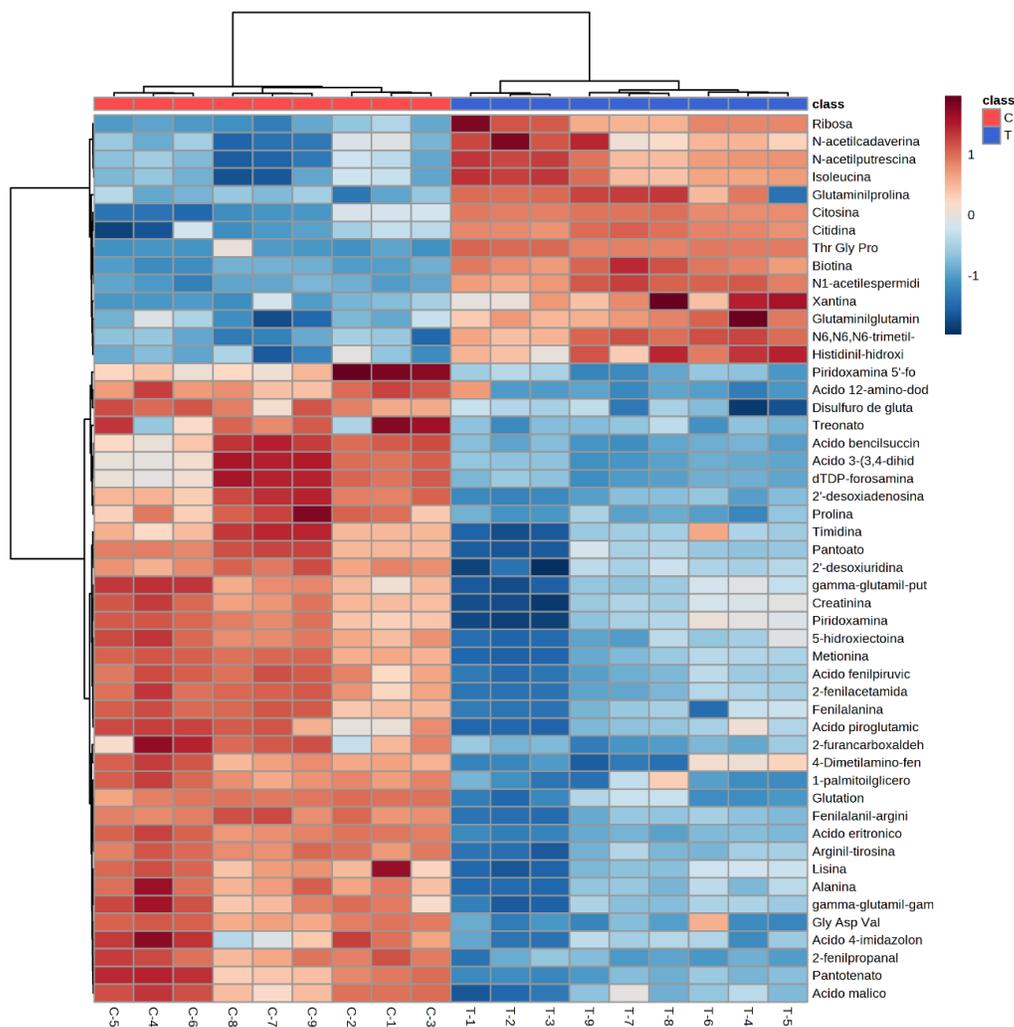
Nota. tR: Tiempo de retención. \*MI: Modo de ionización. \*M: Modulación

**Figura 11.** Figura 11. Volcano-plot de los metabolitos putativamente identificados. (a) modo de iones negativo. (b) modo de iones positivo. Color azul indica metabolitos regulados negativamente; color rojo indica los metabolitos regulados positivamente.



**Figura 12.** Gráfico de mapa de calor de los metabolitos más representativos que se encontraron afectados en las células planctónicas después del tratamiento con el AE LOT-II EO. Fila: metabolitos; columnas: muestras.

**Figura 12.** Gráfico de mapa de calor de los metabolitos más representativos que se encontraron afectados en las células planctónicas después del tratamiento con el AE LOT-II EO. Fila: metabolitos; columnas: muestras.

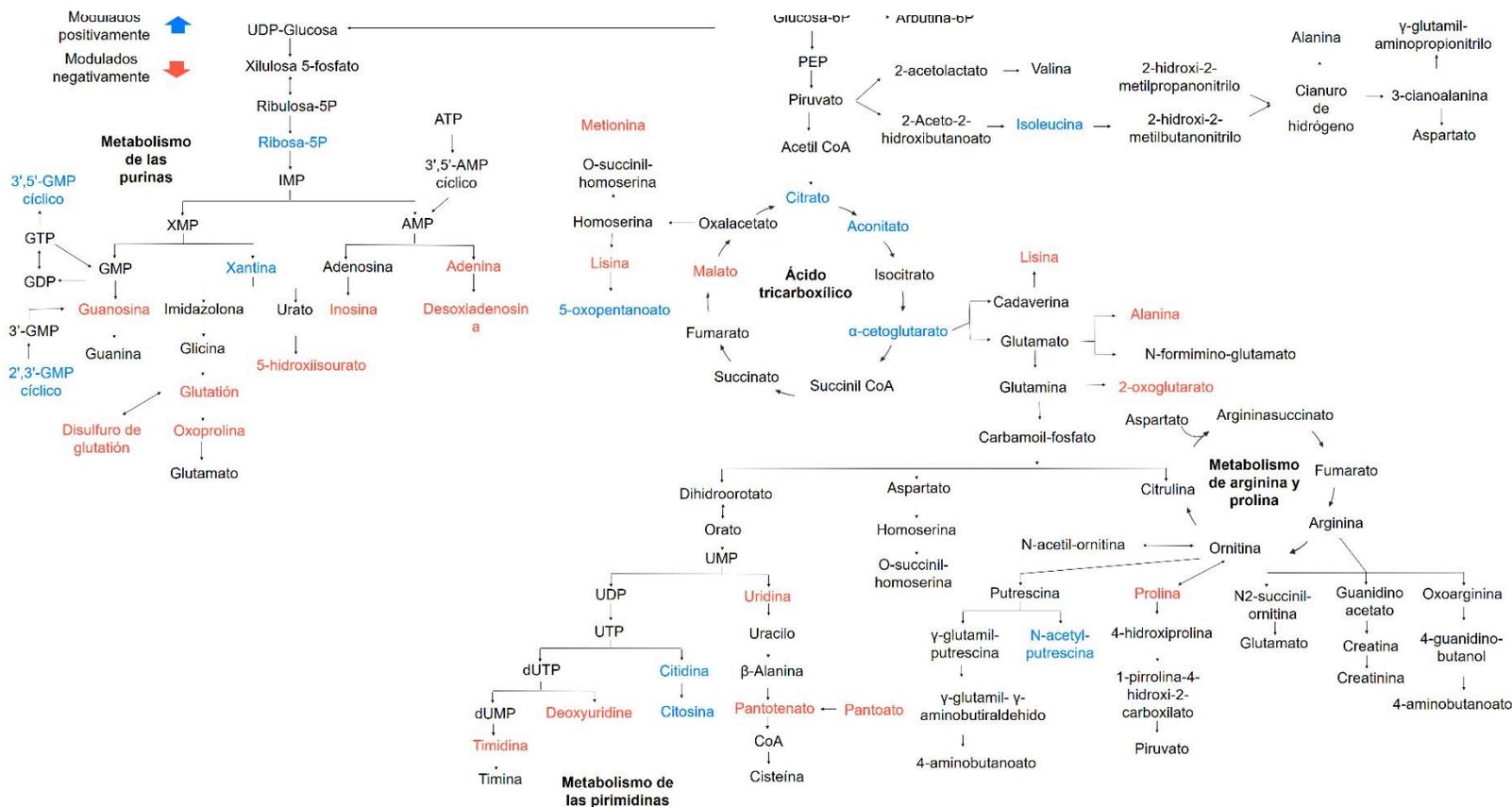


**Tabla 6.** Clasificación de los metabolitos identificados putativamente de acuerdo con el análisis de enriquecimiento de las vías KEGG.

Ruta metabólica	Hits	Valor p	Metabolitos
Metabolismo de la arginina y la prolina	5	4.73E-3	Creatinina; gamma-glutamilputrescina; N-acetilputrescina; prolina; gamma-glutamil-gamma-aminobutiraldehído

<b>Ciclo del citrato (ciclo TCA)</b>		4	6.79E-3	Malato; ácido cítrico; aconitato; 2-oxoglutarato
<b>Biosíntesis de aminoacil-tRNA</b>	<b>de</b>	6	7.30E-3	Fenilalanina; metionina; alanina; lisina; isoleucina; prolina
<b>Metabolismo de purinas</b>		7	2.23E-2	5-hidroxiisourato; 3',5'-GMP cíclico; guanosina; inosina; adenina; desoxiadenosina; xantina
<b>Degradación de lisina</b>		3	2.75E-2	Lisina; 5-oxopentanoato; 2-oxoglutarato
<b>Metabolismo de pirimidinas</b>	<b>de</b>	5	4.85E-2	Citosina; citidina; desoxiuridina; timidina; uridina
<b>Metabolismo de alanina, aspartato y glutamato</b>	<b>de</b>	3	5.42E-2	Alanina; 2-oxoglutarato; 2-oxoglutaramato
<b>Metabolismo del glutatión</b>	<b>del</b>	3	5.42E-2	Glutatión; 5-oxoproline; disulfuro de glutatión

**Figura 13.** Ruta general de los metabolitos afectados por el AE LOT-II sobre las células planctónicas de *S. Enteritidis*. Los metabolitos en azul fueron modulados positivamente en la muestra tratada, mientras que los rojos fueron modulados negativamente.



#### 4.8.2 Análisis metabólico del efecto del AE LOT-II sobre la inhibición de la formación del *biofilm* de *S. Enteritidis*

El análisis metabólico se realizó en células sésiles de *S. Enteritidis*, de manera similar a la descrita para las células planctónicas. Para este caso, la matriz de datos analizada contenía 1631 y 3051 características para los modos NI y PI, respectivamente. Los gráficos PCA mostraron separación entre células sésiles no tratadas (control) y tratadas (con AE) por ambos modos de ionización (Figura 14). Los dos componentes principales (PC1 y PC2) explicaron el 31,5% y el

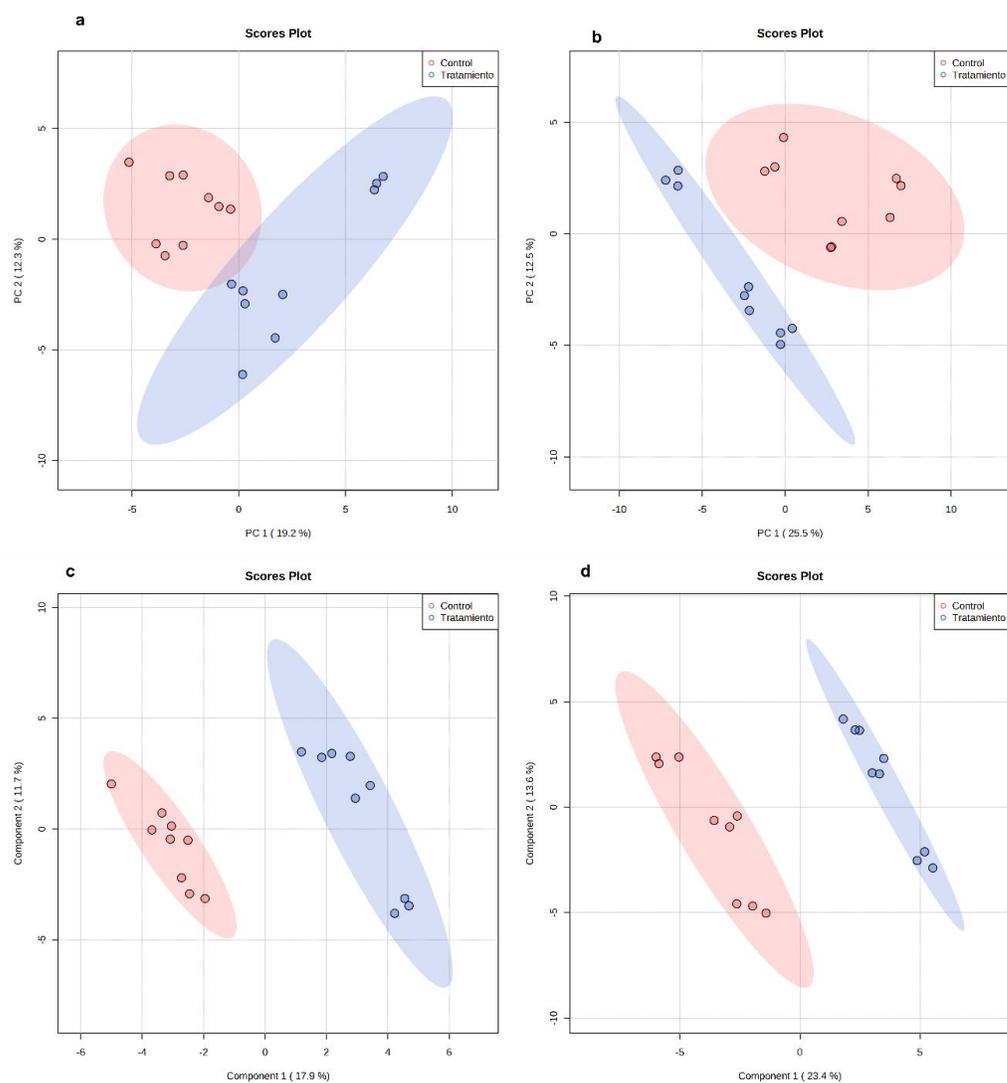
38% de la variabilidad total para los conjuntos de datos o modos de adquisición NI y PI, respectivamente (Figura 1a y b). También se aplicó un método supervisado (PLS-DA) a los datos (Figura 1c y d). Los valores de los parámetros R<sup>2</sup> y Q<sup>2</sup> (0.99 y 0.81, para modo NI y 0.99 y 0.89 para modo PI, respectivamente) indicaron un modelo ajustado a alta predictibilidad y confiabilidad.

Como resultado, un total de 115 metabolitos putativamente identificados fueron estadísticamente significativos (VIP >1) (Tabla 7). Entre los metabolitos identificados, se encontró que 30 estaban modulados positivamente y 85 negativamente. Los metabolitos como el ácido formiminoglutámico, arbutina 6-fosfato, asparaginil-isoleucina, malato, guanina, 6-desoxi-glucosa, N-acetilputrescina, cadaverina, putrescina y arginina se modularon positivamente en las células de cultivo tratadas con el AE LOT-II; mientras que la adenosina monofosfato cíclica, guanosina 2',3'-fosfato cíclica, citrato, inosina, uridina 5'-difosfato, adenosina 2'-fosfato, glutamato, adenina, citosina, valina y uracilo fueron moduladas negativamente. El nivel de expresión de los metabolitos se visualizó a través de volcano-plot (Figura 15). Adicionalmente, los metabolitos diferenciales más representativos se trazaron en un mapa de calor, lo que permitió una mejor visualización de los datos relacionados con la abundancia química entre las células bacterianas de control y tratadas (grupos) (Figura 16). Los resultados evidenciaron que la mayoría de los metabolitos fueron afectados negativamente por el tratamiento con el aceite esencial.

Finalmente, para comprender los cambios en las rutas metabólicas, se realizó un análisis de enriquecimiento en la base de datos KEGG. Doce vías metabólicas fueron posiblemente afectadas por el AE en células sésiles de *S. Enteritidis* ( $p < 0.05$ ). Las principales rutas metabólicas afectadas por el tratamiento con el aceite esencial están relacionadas con el metabolismo de la arginina y prolina, el metabolismo de las purinas y pirimidinas, el metabolismo de los aminoácidos

como la valina, leucina, isoleucina, glutamato y glutamina. La Tabla 8 contiene los aciertos que se refieren a metabolitos modulados diferencialmente alterados en rutas metabólicas y la Figura 17 representa una descripción general de estas rutas metabólicas.

**Figura 14.** Gráficos de puntuación que representan los resultados de PCA y PLS-DA basados en datos de LC/MS en células sésiles de *S. Enteritidis* con y sin tratamiento del AE LOT-II. (a y b) PCA con datos obtenidos en modos de adquisición negativo y positivo, respectivamente; (c y d) PLS-DA con datos obtenidos en los modos de adquisición negativo y positivo, respectivamente. Control (color rojo) y células tratadas (color azul).



**Tabla 7.** Metabolitos identificados por estar significativamente afectados después del tratamiento con el AE LOT-II sobre la inhibición de la formación del *biofilm* de *S. Enteritidis*.

Metabolito	Fórmula	Aducto	m/z	$\Delta$ ppm	tR	MI	M
Ácido formiminoglutámico	$C_6H_{10}N_2O_4$	$[(M-H)-H_2O]^-$	155.04506	3.81	0.54	ESI(-)	↑
AMP cíclico	$C_{10}H_{12}N_5O_6P$	$[M-H]^-$	328.04478	0.29	1.69	ESI(-)	↓
N-(3,4-diclorofenil)-malonato	$C_9H_7Cl_2NO_3$	$[(M+Na)-2H]^-$	267.95443	0.09	0.78	ESI(-)	↓

Guanosina cíclico	2',3'-fosfato	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> P	[M-H] <sup>-</sup>	344.03957	0.08	1.78	ESI(-)	↓
Serilcisteína		C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	[(M-H)-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	189.03301	1.95	0.51	ESI(-)	↓
Palmitato de araquidilo		C <sub>36</sub> H <sub>72</sub> O <sub>2</sub>	[M-3H] <sup>-</sup>	177.84367	2.47	0.42	ESI(-)	↑
Adenosina 5'-monofosfato		C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> P	[M-H] <sup>-</sup>	346.05517	0.21	0.50	ESI(-)	↓
1-desoxi-ribitol		C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	[(M-H)-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	117.05445	0.44	2.37	ESI(-)	↓
Arbutina 6-fosfato		C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> O <sub>10</sub> P	[(M+HCOOH)- H] <sup>-</sup>	397.05362	0.10	5.37	ESI(-)	↑
(1,2-Diclorovinil)glutati3n		C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S	[(M+Na)-2H] <sup>-</sup>	421.99864	2.27	5.38	ESI(-)	↑
1-pirrolina-4-hidroxi-2- carboxilato		C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	128.03418	4.48	0.47	ESI(-)	↑
Ácido galact3nico		C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	195.05014	1.65	0.47	ESI(-)	↓
Aspartil-prolina		C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	229.08219	1.06	1.33	ESI(-)	↓
2-oxoarginina		C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	172.07164	3.30	0.47	ESI(-)	↓
Ácido 2-ceto-glutarámico		C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>	[2M-H] <sup>-</sup>	289.06724	0.30	1.37	ESI(-)	↓
Cetoleucina		C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	[(M-H)-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	129.05456	4.61	7.69	ESI(-)	↓
O-succinil-homoserina		C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>6</sub>	[(M-H)-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	200.05548	1.71	0.47	ESI(-)	↓
Uridina		C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	243.06162	0.44	1.29	ESI(-)	↓
Citrato		C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	191.01882	1.79	0.78	ESI(-)	↓
Ácido tre3nico		C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	[(M-H)-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	117.01812	5.54	1.09	ESI(-)	↓
Gamma glutamil ornitina		C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	260.12458	0.20	0.50	ESI(-)	↓
Ácido yodhídrico		HI	[M-H] <sup>-</sup>	126.90385	4.74	0.46	ESI(-)	↓
Leu Thr		C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	231.13433	0.62	1.61	ESI(-)	↓
Val Pro Ala		C <sub>13</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	[(M-H)-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	266.15091	1.71	8.11	ESI(-)	↓
Guanosina cíclico	2',3'-fosfato	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> P	[M-H] <sup>-</sup>	344.03943	0.35	1.85	ESI(-)	↓
N2-acetil-ornitina		C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	173.09211	2.83	0.98	ESI(-)	↓
Glu Ala		C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	[(M-H)-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	199.07150	1.86	1.41	ESI(-)	↓
Val Ala Arg		C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	343.20940	0.09	2.25	ESI(-)	↓
Gly Pro Val		C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	270.14542	0.16	1.65	ESI(-)	↓
Gln Leu		C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	258.14549	0.44	2.84	ESI(-)	↓
Ácido 2-picolínico		C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	122.02357	5.10	0.74	ESI(-)	↓
Leu Ala		C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	201.12361	1.46	2.09	ESI(-)	↓
N6-acetil-lisina		C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	187.10778	2.52	0.90	ESI(-)	↓
Timidina		C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	241.08237	0.25	2.09	ESI(-)	↓
Fosfato de 2-(2-carboxi-4- metiltiazol-5-il)etilo		C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>6</sub> PS	[M-H] <sup>-</sup>	265.98834	1.74	1.13	ESI(-)	↓
Inosina		C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	267.07295	0.05	2.37	ESI(-)	↓

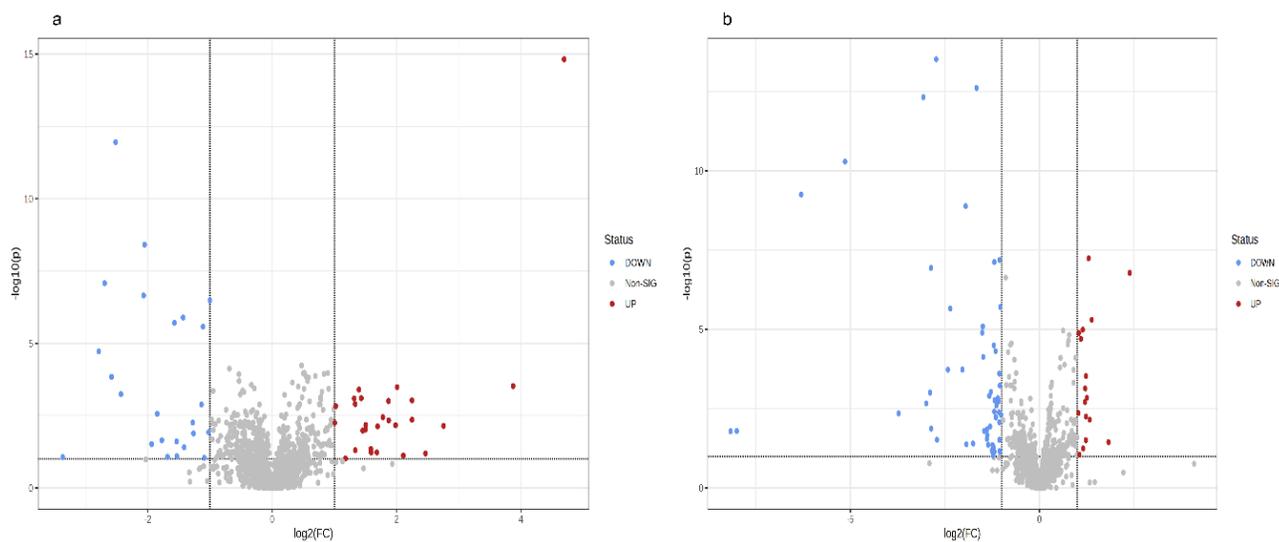
Ácido treónico	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	135.02875	4.31	0.62	ESI(-)	↓
Asn Ile	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	244.12981	0.32	2.72	ESI(-)	↓
Glutamilglicina	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	[(M-H)-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	185.05584	2.06	0.50	ESI(-)	↑
2'-desoxiuridina	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	227.06665	0.59	0.98	ESI(-)	↓
Uridina 5'-difosfato	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>12</sub> P <sub>2</sub>	[(M-H)-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	384.98185	5.05	7.14	ESI(-)	↓
Ácido málico	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	[(M-H)-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	115.00247	5.67	0.50	ESI(-)	↓
O-acetilserina	C <sub>13</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> PS	[M+2H] <sup>+</sup>	191.04840	1.18	0.70	ESI(+)	↑
1-Estearoilglicerofosfoglicerol	C <sub>24</sub> H <sub>49</sub> O <sub>9</sub> P	[M+H] <sup>+</sup>	513.31916	0.14	6.18	ESI(+)	↓
N5-acetil-N2-gamma-glutamil-ornitina	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	286.13940	3.09	0.50	ESI(+)	↓
Guanosina 2',3'-fosfato cíclico	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> P	[M+H] <sup>+</sup>	346.05428	2.79	1.80	ESI(+)	↓
Adenosina 2'-fosfato	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> P	[M+H] <sup>+</sup>	348.06987	2.94	0.86	ESI(+)	↓
N5-hidroxi-ornitina	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	131.08167	2.85	0.47	ESI(+)	↓
Guanina	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub> O	[M+H] <sup>+</sup>	152.05664	4.14	0.78	ESI(+)	↑
Adenosina 2',3'-fosfato cíclico	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> P	[M+H] <sup>+</sup>	330.05936	2.94	1.98	ESI(+)	↑
Piridoxina	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	170.08117	3.14	0.54	ESI(+)	↓
Pantotenato	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	220.11785	2.90	2.94	ESI(+)	↑
6-desoxi-glucosa	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	165.07572	3.43	5.37	ESI(+)	↓
Asn Arg	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	271.15292	3.93	1.83	ESI(+)	↑
Etanolamina	C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> NO	[M+H] <sup>+</sup>	62.060602	0.35	0.47	ESI(+)	↓
Ácido indolacético	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	176.07052	3.56	5.08	ESI(+)	↓
5-Metiltetrahidropteroiltri-glutamato	C <sub>25</sub> H <sub>36</sub> N <sub>8</sub> O <sub>12</sub>	[M+2H] <sup>+</sup>	321.13042	0.10	5.37	ESI(+)	↓
Glutamina	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	275.13463	3.03	1.05	ESI(+)	↑
Glutamato	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	148.06038	4.01	0.47	ESI(+)	↓
Malil-N-acetil-glucosamina	C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>10</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	338.10763	3.21	5.36	ESI(+)	↓
2-hidroxi-2-metilbutanonitrilo	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO	[(2M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	181.13370	2.18	3.92	ESI(+)	↑
N-acetil-hexosamina	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>6</sub>	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	204.08663	2.73	0.48	ESI(+)	↓
Leu Phe	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	[(M+2Na)-H] <sup>+</sup>	323.13589	3.54	5.33	ESI(+)	↓
7-metiladenina	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> N <sub>5</sub>	[2M+H] <sup>+</sup>	299.14852	1.42	5.36	ESI(+)	↑
Gamma-glutamil-2-aminobutirato	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	215.10237	3.74	0.51	ESI(+)	↑
Ácido 2-acetil-2-hidroxi-butanoico	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	129.05471	3.44	7.16	ESI(+)	↑
Piroglutamil valina	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	229.11806	3.33	0.50	ESI(+)	↑

Hidroxiacetona	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	[M+K] <sup>+</sup>	113.00012	3.17	0.47	ESI(+)	↑
Met-Val-OH	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	339.10188	1.24	5.36	ESI(+)	↓
Pantotenamida	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	219.13376	3.24	0.50	ESI(+)	↑
4-aminobutanoato	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	86.060484	1.11	9.44	ESI(+)	↑
N-acetilprolina	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	158.08118	3.34	0.47	ESI(+)	↓
N-palmitoil tirosina	C <sub>25</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>4</sub>	[(M+H)+2K] <sup>+</sup>	166.07902	3.42	5.36	ESI(+)	↑
2-oxoarginina	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	174.08727	3.35	0.54	ESI(+)	↑
Pantoato	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	[(M+2Na)-H] <sup>+</sup>	193.04429	5.04	0.70	ESI(+)	↑
5-hidroxiquinurenamina	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	181.09708	3.40	2.53	ESI(+)	↓
Aminoacetona	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	56.05009	1.30	12.77	ESI(+)	↓
N-acetilcadaverina	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O	[M+H] <sup>+</sup>	145.13358	3.79	0.87	ESI(+)	↓
Trietilamina	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N	[M+H] <sup>+</sup>	102.12796	2.77	10.02	ESI(+)	↓
Asn-Arg	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	271.15176	0.41	0.51	ESI(+)	↓
Ácido imidazolpropiónico	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	123.05543	3.30	1.17	ESI(+)	↓
N-acetilputrescina	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	113.10756	2.72	0.47	ESI(+)	↓
Homoserina lactona	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	84.044834	1.13	0.47	ESI(+)	↑
Adenina	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	136.06174	4.20	3.70	ESI(+)	↓
Citosina	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> N <sub>3</sub> O	[M+H] <sup>+</sup>	112.05080	2.43	0.82	ESI(+)	↓
Cadaverina	C <sub>5</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	103.12328	2.24	0.43	ESI(+)	↓
LisoPA(i-19:0/0:0)	C <sub>22</sub> H <sub>45</sub> O <sub>7</sub> P	[M+2H] <sup>+</sup>	227.15219	3.40	2.23	ESI(+)	↑
3-butin-1-al	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O	[M+H] <sup>+</sup>	69.034038	0.12	5.37	ESI(+)	↑
Monofosfato de tiamina	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> PS	[M+2H] <sup>+</sup>	173.04204	6.84	0.47	ESI(+)	↑
Homofenilalanina	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	180.10186	3.27	3.70	ESI(+)	↓
Putrescina	C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	89.10775	1.34	0.43	ESI(+)	↓
N-carbamoilputrescina	C <sub>5</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	114.10284	2.41	0.47	ESI(+)	↑
Ácido 5-amino-pentanoico	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	100.07600	2.20	0.50	ESI(+)	↓
Gamma-glutamyl-beta-aminopropionitrilo	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	[M+Na] <sup>+</sup>	222.08471	3.36	0.70	ESI(+)	↓
4-hidroxifenilglicina	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	168.06547	3.46	0.90	ESI(+)	↑
Uracilo	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	113.03476	2.99	2.05	ESI(+)	↑
Ácido fenilpirúvico	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	165.05456	3.59	8.01	ESI(+)	↓
Guanosina	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	284.09845	3.64	2.43	ESI(+)	↓
Valina	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	118.08642	3.18	0.47	ESI(+)	↓
L-3-Cyanoalanine	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[(2M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	211.08268	2.08	0.50	ESI(+)	↓
Ala Ala	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	161.09206	3.37	0.50	ESI(+)	↓
Treonina	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	102.05526	2.26	0.47	ESI(+)	↓

5-aminopentanamida	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	[M+H] <sup>+</sup>	117.10239	3.27	0.49	ESI(+)	↓
Alanil-leucina	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	203.13897	2.87	2.75	ESI(+)	↓
Lisina	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	147.11277	3.89	0.43	ESI(+)	↓
N-butiril-homoserina lactona	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	136.07569	3.96	3.74	ESI(+)	↓
Sulfóxido de biotina	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	261.08995	3.62	2.09	ESI(+)	↓
Timina	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	127.05031	3.44	2.75	ESI(+)	↑
Arginina	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	157.10836	3.56	0.70	ESI(+)	↓
N2-succinil-ornitina	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	197.09200	3.05	3.30	ESI(+)	↑
Tiramina	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	120.08091	3.34	2.94	ESI(+)	↓
Ala Arg	C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	228.14533	3.07	0.98	ESI(+)	↓
Betaína	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	[(2M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	217.15451	3.26	2.39	ESI(+)	↓
Ornitina	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	115.08673	3.41	0.47	ESI(+)	↓
gamma-glutamil glutamina	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	[(M+H)-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	258.10816	3.20	0.87	ESI(+)	↓

Nota. tR: Tiempo de retención. \*MI: Modo de ionización. \*M: Modulación

**Figura 15.** Volcano-plot de los metabolitos putativamente identificados. (a) modo de iones negativo. (b) modo de iones positivo. Color azul indica metabolitos regulados negativamente; color rojo indica los metabolitos regulados positivamente.





**Tabla 8.** Clasificación de los metabolitos identificados putativamente de acuerdo con el análisis de enriquecimiento de las vías KEGG.

Ruta metabólica	Hits	Valor p	Metabolitos
<b>Metabolismo de la arginina y la prolina</b>	9	2.52E-4	Arginina; putrescina; 4-aminobutanoato; N-acetilputrescina; ornitina; N2-succinil ornitina; glutamato; oxo-arginina; 1-pirrolina-4-hidroxi-2-carboxilato
<b>Biosíntesis de arginina</b>	5	5.84E-4	Arginina; Ornitina; N-acetilornitina; Glutamina; glutamato
<b>Metabolismo de pirimidinas</b>	7	1.96E-3	Citosina; UDP (uridina difosfato); uridina; uracilo; timidina; timina; glutamina
<b>Metabolismo del glutati3n</b>	4	1.75E-2	Glutamato; ornitina; putrescina; cadaverina
<b>Biosíntesis de valina, leucina e isoleucina</b>	3	1.75E-2	Treonina; valina; 2-acetil-2-hidroxi-butanoico
<b>Metabolismo de la alanina, el aspartato y el glutamato</b>	3	1.75E-2	2-oxoglutamato; glutamato; glutamina
<b>Metabolismo de purinas</b>	8	1.83E-2	Glutamina; guanosina; guanosina 2',3'-fosfato c3clico; inosina; adenina; adenosina 5'-monofosfato; adenosina 2',3'-fosfato c3clico; guanina
<b>Metabolismo beta-alanina</b>	3	2.06E-2	Uracilo; pantotenato; 4-aminobutanoato
<b>Biosíntesis de Pantotenato y CoA</b>	4	2.37E-2	Uracilo; valina; pantoato; pantotenato
<b>Metabolismo de la glutamina y el glutamato</b>	2	3.99E-2	Glutamina; glutamato
<b>Metabolismo de cianoamino3ccidos</b>	3	4.29E-2	3-cianoalanina; 2-hidroxi-2-metilbutanonitrilo; gamma-glutamil-beta-aminopropiononitrilo
<b>Biosíntesis de aminoacil-tRNA</b>	5	5.73E-2	Glutamina; valina; treonina; glutamato; arginina



origen geográfico, macro y micronutrientes del suelo, factores genéticos, tiempo de cosecha, parte de la planta de la cual se extrae el AE, método de extracción, entre otros (Viuda-Martos et al., 2011). Lo anterior, influye en las vías biosintéticas de los metabolitos secundarios, y por lo tanto genera diferentes quimiotipos, con diferentes propiedades antimicrobianas.

Los AE con mayor actividad biológica fueron extraídos de la especie *L. origanoides*, perteneciente a la familia Verbenaceae *biofilm* (Escobar et al., 2020; Kachur & Suntres, 2020; Marchese et al., 2016; Nostro et al., 2007). Al comparar la composición química de los AE destilados de la especie *L. origanoides* se evidenció que los hidrocarburos monoterpénicos como el p-cimeno estaba presente en la mayoría de los AE en proporciones similares (~11.9%) al igual que y-terpineno (~5%). Por otro lado, los hidrocarburos sesquiterpénicos como el trans- $\beta$ -cariofileno y el  $\alpha$ -humuleno (7.91 y 8, respectivamente) se reportan en la mayoría de los AE destilados de esta especie (Bueno-Sánchez et al., 2009; Quintero Ruiz et al., 2017; Stashenko et al., 2003). Sin embargo, los compuestos mayoritarios representativos de este AE son los compuestos oxigenados como el timol y el carvacrol, los cuales han sido reportados en la literatura por presentar propiedades antimicrobiana y anti-*biofilm*. (Escobar et al., 2020; Kachur & Suntres, 2020; Marchese et al., 2016; Nostro et al., 2007). La diferencia en la composición química de los AE permite clasificar las especies de plantas en quimiotipos. Los quimiotipos que presentan entre un mayor porcentaje de compuestos oxigenados presentan una mayor actividad antimicrobiana y anti-*biofilm* (Cáceres et al., 2020; Gómez-Sequeda et al., 2020; Martínez et al., 2021). El estudio de Cáceres y colaboradores evidenció que el AE de *L. origanoides* quimiotipo timol-carvacrol con un porcentaje de timol y de carvacrol de (32% y 18%) inhibían el crecimiento microbiano de *S. epidermidis* y *E. coli*, al igual que inhibían el mecanismo de formación del *biofilm* y el quorum sensing (Cáceres et al., 2020). Sarrazin et al., reportaron la actividad antimicrobiana del AE *L.*

*origanoides* quimiotipo carvacrol sobre *Staphylococcus aureus* y *E. coli* a una concentración de 1.25 y 0.31  $\mu\text{L/mL}$ , respectivamente, asociando la actividad antimicrobiana del AE con la presencia de los constituyentes mayoritarios, carvacrol (47.2%) y timol (10.65%) (Sarrazin et al., 2015). De igual manera, Ribeiro et al., demostraron el potencial antimicrobiano de *L. origanoides* contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, relacionando la actividad biológica con el alto contenido de carvacrol y 1,8-cineol (Ribeiro et al., 2021).

El mecanismo de acción de estos compuestos ha sido atribuido a la capacidad de interactuar con la membrana celular debido a su propiedad hidrofóbica, lo cual les permite acumularse, perturbar las estructuras celulares y causar un aumento en la permeabilidad, ocasionando fuga de iones y macromoléculas, deterioro de sistemas enzimáticos microbianos y finalmente muerte celular (Bajpai et al., 2013; Bouyahya et al., 2019; Kwon et al., 2019). Wang et al., comprobaron la alteración en los componentes de la membrana de *S. aureus* al ser expuesto a bajas concentraciones de timol. La proporción de ácidos grasos como el ácido 12-metiltetradecanoico y ácido 14-metilhexadecanoico, componentes de la membrana lipídica de *S. aureus* disminuyeron, mientras el tratamiento con altas concentraciones de timol alteró la integridad de la membrana, reduciendo la viabilidad celular (L. H. Wang et al., 2017). El carvacrol también modificó la composición de los ácidos grasos de la membrana citoplasmática de diferentes microorganismos como *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Brochothrix thermosphacta* y *S. aureus* cuando fueron expuestos a concentraciones subletales, aumentando el contenido de ácidos grasos insaturados (Nostro & Papalia, 2012).

Además, se comprobó que el timol interactúa con el ADN genómico mediante la unión al surco menor, generando una leve desestabilización en la estructura secundaria del ADN, lo cual dificulta la agregación de las moléculas de ADN (L. H. Wang et al., 2017) También se comprobó

que el timol afecta la membrana celular bacteriana de *S. Typhimurium*, suscitando la liberación de iones indispensables para el metabolismo celular (Chauhan & Kang, 2014). Lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este estudio (Figura 8 y 9) donde se evidenció alteración en la permeabilidad de la membrana de *S. Enteritidis*, al ser tratada con el AE LOT-II. La integridad de la membrana citoplasmática es un factor muy importante para la viabilidad celular, por eso, la evaluación de ácidos nucleicos mediante cuantificación a 260 nm y cuantificación de proteínas, son indicadores de la homeostasis de la célula, pues son los encargados de la transferencia de información y de importantes funciones celulares y estructurales en las bacterias.

La actividad biológica del AE de LOT-II no puede ser atribuida solo a los componentes mayoritarios, se ha comprobado que los componentes minoritarios potencializan la acción del AE (Nazzaro et al., 2013). Por ejemplo, el *p*-cimeno, precursor biológico del carvacrol, provoca mayor permeabilidad en la membrana citoplasmática en comparación con el carvacrol, sin embargo, la actividad antimicrobiana es menos eficiente, las mezclas con carvacrol o 4-terpineol generan un efecto sinérgico, mejorando la actividad biológica (Andrade-Ochoa et al., 2015; Marchese et al., 2017). Es probable que la mayor eficiencia del *p*-cimeno al incorporarse en la bicapa lipídica facilite el transporte de carvacrol a través de la membrana citoplasmática (Burt, 2004). Otros componentes como el  $\gamma$ -terpineno y el *trans*- $\beta$ -cariofileno presentes en el AE, han presentado propiedades biológicas amplias, antioxidantes, antimicrobianas, a concentraciones inhibitorias mayores en comparación a las del timol y carvacrol (Giweli et al., 2012).

Estudios recientes han demostrado que no solo el daño de las membranas celular provoca la muerte celular de los microorganismos, sino también la alteración metabólica generada por los AE (Chen et al., 2020b; Miao et al., 2020). Para comprender mejor las respuestas metabólicas de los microorganismos por acción de los AE, se evaluó mediante metabolómica no dirigida el efecto

del AE LOT-II sobre células planctónicas de *S. Enteritidis* al ser tratada con concentraciones subinhibitorias. Los resultados mostraron que los principales metabolitos diferenciales estaban involucrados en las vías del metabolismo del carbono central, metabolismo de aminoácidos, metabolismo de purinas y metabolismo de pirimidinas. Además, se incluyeron la biosíntesis de aminoacil-tRNA y metabolismo del glutatión (Tabla 6, Figura 13).

El metabolismo del carbono central es indispensable para el crecimiento celular y la biosíntesis de macromoléculas como nucleótidos, lípidos y proteínas. Además, es responsable del mantenimiento de la homeostasis celular debido a que responde a estímulos ambientales (Martínez-Reyes & Chandel, 2020). Este estudio mostró cambios en la vía del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA, por sus siglas en inglés) metabolitos como el citrato, el aconitato, y el  $\alpha$ -cetoglutarato fueron modulados positivamente, mientras que el malato fue modulado negativamente, lo cual evidencia que el metabolismo energético podría verse interrumpido (Chen et al., 2020b). Una acumulación de metabolitos en los primeros pasos del TCA podría indicar que la bacteria estaría impulsando la producción de energía para mantener la homeostasis celular, debido a que rutas como la del metabolismo de aminoácidos estaba siendo afectada por el tratamiento del AE, por ejemplo, el aumento del  $\alpha$ -cetoglutarato no solo podría estar relacionado en el TCA, sino también en rutas alternas como la biosíntesis de arginina, el metabolismo de alanina, aspartato y glutamato, y el metabolismo de aminoácidos. Por su parte, la reducción del malato podría estar relacionada con la actividad de la enzima fumarasa, que cataliza la reacción reversible de hidratación/deshidratación del fumarato a malato, sin embargo, para corroborarlo sería necesario evaluar la actividad enzimática (Xu et al., 2017).

El metabolismo de los aminoácidos está estrechamente relacionado con el TCA debido a que proporciona esqueletos de carbono para ingresar en el ciclo (Y. Wang et al., 2022) esta podría

ser otra de las razones por las cuales incrementó la concentración de algunos de los metabolitos del TCA disminuyendo la concentración de los aminoácidos (Figura 13). En el metabolismo de la arginina y la prolina, la creatinina, gamma-glutamyl-gamma-aminobutiraldehído, prolina y gamma-glutamyl-putrescina fueron modulados negativamente mientras la N-acetilputrescina estuvo modulada positivamente. La prolina desempeña un papel multifuncional, es una fuente importante de carbono y nitrógeno, y un regulador osmótico indispensable (Goswami et al., 2022; G. Wang et al., 2014). La disminución de la concentración estaría impidiendo la activación de varias respuestas de estrés para proteger las células del efecto del AE. Por otro lado, en el metabolismo de la alanina, aspartato y glutamato, la alanina y el 2-oxoglutarato fueron modulados negativamente, al igual que otros aminoácidos como lisina, fenilalanina y metionina. La glutamina, alanina y lisina, son componentes principales del peptidoglicano, el cual hace parte de la pared celular bacteriana, cuya función es proteger los componentes celulares internos y brindar apoyo a la estructura celular, la disminución en la concentración de estos metabolitos indicaría posiblemente que el microorganismo agotó esos aminoácidos intentando sintetizar peptidoglucano para proteger la célula (Park et al., 2019). La metionina es un aminoácido proteínogénico de vital importancia para iniciar la síntesis de proteínas, además, el grupo sulfhidrilo transportado por la metionina ayuda a las células a luchar contra las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Ezraty et al., 2017; He et al., 2022). La disminución en las concentraciones de metionina dificultaría la síntesis de proteínas, pero posiblemente protegería la célula contra los radicales libres producidos por el efecto del AE. Metabolitos como el glutatión y el disulfuro de glutatión relacionados con respuesta al estrés oxidativo también fueron modulados negativamente, lo cual indica que el microorganismo estaba tratando de contrarrestar el efecto generado por el AE LO.

En el metabolismo de los ácidos nucleicos, la concentración de 5-hidroxiisourato, guanosina, inosina, adenina, deoxiadenosina disminuyó significativamente, mientras el guanosin 3'5'-monofosfato cíclico, guanosin- 2'3'-monofosfato cíclico y xantina aumentaron en el metabolismo de las purinas. Las purinas desempeñan un papel integral en diversos procesos, incluido el metabolismo energético, la señalización celular y la codificación de la composición genética (Chua & Fraser, 2020). Además, en el metabolismo de las pirimidinas, timidina, uridina y deoxiuridina disminuyeron su concentración, mientras citidina y citosina aumentaron significativamente. El metabolismo de las pirimidinas está relacionado con funciones de reparación y supervivencia bajo estrés ambiental en bacterias (He et al., 2022). Por lo tanto, la alteración del equilibrio metabólico de las purinas y pirimidinas tuvo un efecto adverso sobre las actividades fisiológicas de las bacterias, como la síntesis y el metabolismo del ADN.

En cuanto a la actividad antibiofilm, los AE extraídos de *L. origanoides* (LOT-C) y (LOT-II) inhibieron la formación del biofilm de *S. Enteritidis* en un porcentaje mayor al 60% (Tabla 5). Resultados similares fueron reportados por Somrani et al., donde el AE de clavo (*Syzygium aromaticum*) inhibió la adhesión celular de *S. Enteritidis* en 49.8% a una concentración de 0.10 mg/mL (Somrani et al., 2022). Liu et al., evaluaron el efecto de los AE de clavo y de orégano sobre un aislado de *Salmonella* Derby. Los resultados mostraron que los AE inhibieron significativamente la formación del biofilm en un 90.29% y 48.79% respectivamente, concluyendo que los AE inhibían la actividad metabólica y la producción de exopolisacáridos (Liu et al., 2022).

Uno de los posibles mecanismos de acción de los AE sobre el biofilm ha sido asociado principalmente a la inhibición de la matriz de EPS, el cual es secretado por los microorganismos durante las etapas iniciales de la formación del biofilm, el EPS mejora la adhesión celular a la superficie y permite pasar de la unión reversible a la irreversible (Zhao et al., 2017). Este

mecanismo fue corroborado en este estudio mediante las micrografías de SEM (Figura 7) donde se evidencia disminución de la matriz de EPS cuando *S. Enteritidis* fue tratada con concentraciones subinhibitorias del AE LOT-II.

Otros de los mecanismos de acción de los AE están relacionados con modificaciones en la expresión de genes y proteínas, los cuales inhiben la producción de adhesinas, y mecanismos de formación del *biofilm* como el c-di-GMP y el quorum sensing. Así como cambios en la modulación del metabolismo, lo cual genera alteraciones en la integridad y viabilidad celular. Además de sus características antimicrobianas intrínsecas (Lahiri et al., 2019; Ouhayoun, 2003; Rossi et al., 2022).

Con el fin de comprender el mecanismo de acción de los AE sobre las células sésiles, se evaluó mediante metabolómica no dirigida el efecto del AE LOT-II sobre la formación del *biofilm* de *S. Enteritidis* al ser tratada con concentraciones subinhibitorias. Los resultados mostraron que los principales metabolitos diferenciales estaban involucrados en el metabolismo de aminoácidos y nucleótidos y en el metabolismo del pantotenato (Tabla 8, Figura 17).

El metabolismo de aminoácidos es un sistema complejo que contribuye en numerosas reacciones biológicas, siendo al mismo tiempo fuentes potenciales de nitrógeno, carbono y energía, además juega un papel muy importante en la formación del *biofilm* (H. Lu et al., 2019). Los resultados de este estudio indicaron cambios significativos en la modulación de la arginina, glutamato, treonina, valina y glutamina. El ácido glutámico, la glutamina y la arginina (implicados en la formación de adhesinas) son los aminoácidos más representativos en la formación del *biofilm*. El glutamato (modulado negativamente) es uno de los metabolitos clave para la generación de energía mediante la gluconeogénesis, así como el punto de partida para la anaplerosis de los metabolitos que contienen nitrógeno, su función está relacionada con el control de la división

celular en condiciones de estrés. La glutamina (modulado negativamente) es un metabolito necesario para la biosíntesis de nucleótidos y proteínas, su función está relacionada con la configuración de la morfología del *biofilm*. La arginina (modulado positivamente), regula el ciclo del nitrógeno y la comunicación celular del c-di-GMP (Rinaldo et al., 2018). Además, estos metabolitos transmiten señales ambientales para que los organismos se adapten a distintas condiciones fisiológicas, la alteración en el equilibrio metabólico de los aminoácidos afectó la formación del *biofilm* de *S. Enteritidis*.

Este estudio también demostró que la exposición de las células sésiles de *S. Enteritidis* al AE LOT-II generó alternaciones en el metabolismo del carbono central. La concentración de citrato disminuyó significativamente, lo cual indica que la actividad del ciclo TCA estuvo interrumpida. El citrato se regenera en cada ciclo por condensación de un acetyl-CoA con una molécula de oxaloacetato. La reducción de la concentración de este metabolito no solo estaría afectando el ciclo del TCA sino también la biosíntesis de ácidos grasos, los cuales son esenciales en la elaboración de fosfolípidos de la membrana celular. Otro metabolito modulado negativamente fue el pantotenato, un intermediario necesario para el metabolismo del TCA y precursor clave para la síntesis de coenzima A (relacionada con el metabolismo de ácidos grasos) además, regula la síntesis de glutatión, metabolito encargado de contrarrestar la apoptosis y destrucción celular (Guo & Tao, 2018; He et al., 2022).

El metabolismo de nucleótidos también fue afectado por el tratamiento del AE, se detectaron modificaciones en la concentración de siete metabolitos asociados con el metabolismo de las pirimidinas, la citosina, UDP (uridina difosfato glucosa), uridina, uracilo, timidina, timina, y glutamina fueron modulados negativamente. La disminución en esta ruta metabólica afecta la producción de fibras curli y celulosa, componentes importantes de la matriz del *biofilm* bacteriano.

Adicionalmente, la interrupción en la biosíntesis de pirimidinas puede actuar como una señal de inanición severa de nutrientes, lo que a su vez puede generar inhibición en la formación del *biofilm* y promover la dispersión de este (Garavaglia et al., 2012). El metabolismo de las purinas también fue alterado, se identificaron 8 metabolitos modulados diferencialmente de los cuales la glutamina, guanosina, guanosina 2',3'-fosfato cíclico, inosina, adenina, adenosina 5'-monofosfato, adenosina 2',3'-fosfato cíclico disminuyeron su concentración, mientras la guanina fue modulada positivamente. Estos resultados evidencian cambios en la síntesis de novo de adenina a partir del precursor AMP, esta disminución podría afectar la producción de ATP, molécula fundamental para la adhesión inicial del *biofilm* (Sharma et al., 2016; Spari & Beldi, 2020). Por lo tanto, la alteración del metabolismo de los nucleótidos tiene un efecto adverso sobre las actividades fisiológicas de *S. Enteritidis* como la síntesis de ADN y el metabolismo.

Finalmente, se evidenciaron cambios en el metabolismo de las poliaminas, metabolitos como la cadaverina y la putrescina fueron modulados positivamente, lo cual podría estar indicando que la célula está tratando de reducir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por efecto del AE y, por lo tanto, prevenir el daño a las biomoléculas por estrés oxidativo (Miao et al., 2020).

## 7. Conclusión

Los AE extraídos de la especie *Lippia origanoides* presentaron el mayor efecto antimicrobiano y *antibiofilm* sobre *S. Enteritidis*. El posible mecanismo de acción del AE *Lippia origanoides* quimiotipo timol (LOT-II) sobre células planctónicas tratadas con concentraciones 2\*MIC estuvo relacionado con alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular debido a fuga de biomoléculas como ADN y proteínas, mientras que el tratamiento con concentraciones subinhibitorias generó variaciones en el metabolismo de aminoácidos, el metabolismo central del carbono y el metabolismo de ácidos nucleicos. Por otro lado, el efecto sobre las células del *biofilm* tratadas con concentraciones subinhibitorias visualizado mediante micrografías de SEM, evidenció la disminución en la producción de EPS, lo cual está estrechamente relacionado con la alteración en el metabolismo de aminoácidos. Adicionalmente, el AE LOT-II generó cambios en el metabolismo de las purinas y pirimidinas, el metabolismo de las poliaminas y la biosíntesis de pantotenato. Estos hallazgos brindan nuevos conocimientos sobre los mecanismos antimicrobianos y *antibiofilm* de los AE y promueven el estudio de la actividad farmacológica de los AE como producto antibacteriano natural.

### Referencias bibliográficas

Abdel-Aziz, S. M., & A, A. (2014). Bacterial *Biofilm*: Dispersal and Inhibition Strategies. *Scholarena Journal of Biotechnology*, 1(1), 105. <https://doi.org/10.18875/2375-6713.1.105>

Sadiq, F., Yan, B., Zhao, J., Zhang, H., & Chen, W. (2020). Untargeted metabolomics reveals metabolic state of *Bifidobacterium bifidum* in the *biofilm* and planktonic states. *LWT - Food Science and Technology*, 118, 108772. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108772>

Andrade, M. A. (2010). Óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus* e *Zingiber officinale*: Caracterização química, atividade antioxidante e antibacteriana. Universidade Federal de Lavras, 101.

Andrade-Ochoa, S., Nevárez-Moorillón, G. V., Sánchez-Torres, L. E., Villanueva-García, M., Sánchez-Ramírez, B. E., Rodríguez-Valdez, L. M., & Rivera-Chavira, B. E. (2015). Quantitative structure-activity relationship of molecules constituent of different essential oils with antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0858-2>

Artini, M., Patsilidakos, A., Papa, R., Boović, M., Sabatino, M., Garzoli, S., Vrenna, G., Tilotta, M., Pepi, F., Ragno, R., & Selan, L. (2018). Antimicrobial and antibiofilm activity and machine learning classification analysis of essential oils from different mediterranean plants against *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecules*, 23(2). <https://doi.org/10.3390/molecules23020482>

Aumeeruddy, Z., Ismaël, E., Ismaël, S., Hosenally, M., & Zengin, G. (2018). Essential oils from tropical medicinal herbs and food plants inhibit *biofilm* formation in vitro and are non-cytotoxic to human cells. *3 Biotech*, 8(9), 395. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1413-x>

Azeredo, J., Azevedo, N., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A. R., Desvaux, M., Di Bonaventura, G., Hébraud, M., Jaglic, Z., Kačániová, M., Knöchel, S., Lourenço, A.,

Mergulhão, F., Meyer, R. L., Nychas, G., Simões, M., Tresse, O., & Sternberg, C. (2017). Critical review on *biofilm* methods. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(3), 313–351. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1208146>

Bączek, K. B., Kosakowska, O., Przybył, J. L., Pióro-Jabrucka, E., Costa, R., Mondello, L., Gniewosz, M., Synowiec, A., & Węglarz, Z. (2017). Antibacterial and antioxidant activity of essential oils and extracts from costmary (*Tanacetum balsamita* L.) and tansy (*Tanacetum vulgare* L.). *Industrial Crops and Products*, 102, 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.03.009>

Bajpai, V. K., Sharma, A., & Baek, K. H. (2013). Antibacterial mode of action of *Cudrania tricuspidata* fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens. *Food Control*, 32(2), 582–590. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.01.032>

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>

Basak, S., & Guha, P. (2018). A review on antifungal activity and mode of action of essential oils and their delivery as nano-sized oil droplets in food system. *Journal of Food Science and Technology*, 55(12), 4701–4710. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3394-5>

Bauer, W. D., & Robinson, J. B. (2002). Disruption of bacterial quorum sensing by other organisms. *Current Opinion in Biotechnology* 13(3), pp. 234–237). [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00310-5](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00310-5)

Bazargani, M. M., & Rohloff, J. (2016). Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food Control*, 61, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.036>

Bermúdez, P. M., Rincón, S. M., & Suárez, M. C. (2014). Evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. aisladas del beneficio porcino en Colombia. Revista Facultad Nacional de Salud Pública, 32(1), 88–94. <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=114851780&lang=es&site=ehost-live>

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>

Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R., & Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* Nomenclature. Journal of Clinical Microbiology, 38(7), 2465–2467.

Bueno-Sánchez, J., René Martínez-Morales, J., Stashenko, E. E., & Ribón, W. (2009). Anti-tubercular activity of eleven aromatic and medicinal plants occurring in Colombia. Biomédica, 29(1), 51-60

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. International Journal of Food Microbiology, 94(3), 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>

Čabarkapa, I., Čolović, R., Đuragić, O., Popović, S., Milanov, D., & Pezo, L. (2019). Anti-*biofilm* activities of essential oils rich in carvacrol and thymol against *Salmonella* Enteritidis. Biofouling, 35(3), 361–375. <https://doi.org/10.1080/08927014.2019.1610169>

Cáceres, M., Hidalgo, W., Stashenko, E., Torres, R., & Ortiz, C. (2020). Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Anti-*Biofilm* and Anti-Quorum Sensing Activities against Pathogenic Bacteria. *Antibiotics*, 9(4), 147. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040147>

CDC. (2019). Antibiotic resistance threats in the United States. Centers for Disease Control and Prevention, 114. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15620/cdc:82532>

Chang, K.-C., Kuo, H., Tang, C. Y., Chang, C., Lu, C., Liu, C., Lin, H., Chen, K., & Liou, M. (2014). Transcriptome profiling in imipenem-selected *Acinetobacter baumannii*. *BMC Genomics*, 15(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-815>

Chauhan, A. K., & Kang, S. C. (2014). Thymol disrupts the membrane integrity of *Salmonella* ser. Typhimurium in vitro and recovers infected macrophages from oxidative stress in an ex vivo model. *Research in Microbiology*, 165(7), 559–565. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.07.001>

Chen, J., Tang, C., Zhang, R., Ye, S., Zhao, Z., Huang, Y., Xu, X., Lan, W., & Yang, D. (2020a). Metabolomics analysis to evaluate the antibacterial activity of the essential oil from the leaves of *Cinnamomum camphora* (Linn.) Presl. *Journal of Ethnopharmacology*, 253, 112652. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112652>

Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017a). Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines*, 4(3), 58. <https://doi.org/10.3390/medicines4030058>

Chua, S. M. H., & Fraser, J. A. (2020). Surveying purine biosynthesis across the domains of life unveils promising drug targets in pathogens. *Immunology and Cell Biology*, 98(10) 819–831. <https://doi.org/10.1111/imcb.12389>

Chylkova, T., Cadena, M., Ferreiro, A., & Pitesky, M. (2017). Susceptibility of *Salmonella biofilm* and planktonic bacteria to common disinfectant agents used in poultry processing. *Journal of Food Protection*, 80(7), 1072–1079. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-393>

CLSI. (2015). M100-S25 Performance Standards for Antimicrobial (Issue January).

Commichau, Forchhammer, K., & Stülke, J. (2006). Regulatory links between carbon and nitrogen metabolism. *Current Opinion in Microbiology*, 9(2), 167–172. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.01.001>

Davies, D. (2003). Understanding *biofilm* resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(2), 114–122. <https://doi.org/10.1038/nrd1008>

Dettmer, K., Aronov, P., & Hammock, B. (2007). Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass spectrometry reviews*, 26(1), 51–78. <https://doi.org/10.1002/mas>

Diao, W. R., Hu, Q. P., Zhang, H., & Xu, J. G. (2014). Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Food Control*, 35(1), 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.056>

Eng, S., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N., Ser, H., Chan, K., & Lee, L. (2015a). *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*, 8(3), 284–293. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>

Escobar, A., Pérez, M., Romanelli, G., & Blustein, G. (2020). Thymol bioactivity: A review focusing on practical applications. *Arabian Journal of Chemistry* 13(12), 9243–9269. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.11.009>

Ezraty, B., Gennaris, A., Barras, F., & Collet, J. F. (2017). Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 15(7), 385–396. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.26>

Ferri, M., Ranucci, E., Romagnoli, P., Giaccone, V., Ferri, M., Ranucci, E., Romagnoli, P., & Giaccone, V. (2017). Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(13), 2857–2876. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1077192>

Fiehn, O. (2002). Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Functional Genomics*, 48, 155–171.

Fiehn, O., Robertson, D., Griffin, J., van der Werf, M., Nikolau, B., Morrison, N., Sumner, L. W., Goodacre, R., Hardy, N. W., Taylor, C., Fostel, J., Kristal, B., Kaddurah-Daouk, R., Mendes, P., van Ommen, B., Lindon, J. C., & Sansone, S. A. (2007). The metabolomics standards initiative (MSI). *Metabolomics*, 3(3), 175–178. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0070-6>

Fischer, E. R., Hansen, B. T., Nair, V., Hoyt, F. H., & Dorward, D. W. (2012). Scanning Electron Microscopy. *Current Protocols in Microbiology*, 25(2B.2.1-2B.2), 47. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc02b02s25.Scanning>

Flemming, H. C., & Wuertz, S. (2019). Bacteria and archaea on Earth and their abundance in *biofilms*. *Nature Reviews Microbiology*, 17(4), 247–260. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0158-9>

Frieri, M., Kumar, K., & Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health*, 10(4), 369–378. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.08.007>

Frost, I., Van, T., Pires, J., Craig, J., & Laxminarayan, R. (2019). Global geographic trends in antimicrobial resistance: The role of international travel. *Journal of Travel Medicine*, 26(8), 1–13. <https://doi.org/10.1093/jtm/taz036>

Fu, Y., Y, Z., Chen, L., Shi, X., Wang, Z., Sun, S., & Efferth, T. (2007). Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytotherapy Research*, 22(4), 544–549. <https://doi.org/10.1002/ptr>

Garavaglia, M., Rossi, E., & Landini, P. (2012). The pyrimidine nucleotide biosynthetic pathway modulates production of *biofilm* determinants in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 7(2), e31252. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031252>

Gaviria, A., Correa, L. F. C., Dávila, C. E., Burgos, G. B., Gómez, C., Osorio, E., Girón, S., Ospina, M., & Guzmán, J. (2018). Plan nacional de respuesta a la resistencia a los antimicrobianos. 66.

Gedikoğlu, A., Sökmen, M., & Çivit, A. (2019). Evaluation of *Thymus vulgaris* and *Thymbra spicata* essential oils and plant extracts for chemical composition, antioxidant, and antimicrobial properties. *Food Science & Nutrition*, 7(5), 1704–1714. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1007>

Giweli, A., Džamic, A. M., Sokovic, M., Ristic, M. S., & Marin, P. D. (2012). Antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of *Satureja thymbra* growing wild in libya. *Molecules*, 17(5), 4836–4850. <https://doi.org/10.3390/molecules17054836>

Gómez-Sequeda, N., Cáceres, M., Stashenko, E. E., Hidalgo, W., & Ortiz, C. (2020). Antimicrobial and *antibiofilm* activities of essential oils against *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Antibiotics*, 9(11), 1–18. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110730>

Gonzalez, J. E., & Keshavan, N. D. (2006). Messing with Bacterial Quorum Sensing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(4), 859–875. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00002-06>

González, J. F., Alberts, H., Lee, J., Doolittle, L., & Gunn, J. S. (2018). *Biofilm* Formation Protects *Salmonella* from the Antibiotic Ciprofloxacin *in Vitro* and *in Vivo* in the Mouse Model of chronic Carriage. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18516-2>

Gorrochategui, E., Jaumot, J., Lacorte, S., & Tauler, R. (2016). Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 82, 425–442. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.07.004>

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>

Grimm, I., Dumke, J., Dreier, J., Knabbe, C., & Vollmer, T. (2018). *Biofilm* formation and transcriptome analysis of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in response to lysozyme. *PLOS ONE*, 13(1), e0191705. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191705>

Guo, Y. S., & Tao, J. Z. (2018). Metabolomics and pathway analyses to characterize metabolic alterations in pregnant dairy cows on D 17 and D 45 after AI. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23983-2>

Haggarty, J., & Burgess, K. E. V. (2017). ScienceDirect Recent advances in liquid and gas chromatography methodology for extending coverage of the metabolome. *Current Opinion in Biotechnology*, 43, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.09.006>

Hall, C. W., & Mah, T. F. (2017). Molecular mechanisms of *biofilm*-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 276–301. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux010>

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. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108533>

Jardak, M., Elloumi-Mseddi, J., Aifa, S., & Mnif, S. (2017). Chemical composition, anti-*biofilm* activity and potential cytotoxic effect on cancer cells of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil from Tunisia. *Lipids in Health and Disease*, 16(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0580-9>

Jimenez, G., Ducoing, H., & Sosa, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Rev Mex Fitopatol*, 21(3), 355–363.

Kachur, K., & Suntres, Z. (2020). The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(18), 3042–3053. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1675585>

Karamizadeh, S., Abdullah, S. M., Manaf, A. A., Zamani, M., & Hooman, A. (2013). An Overview of Principal Component Analysis. *Journal of Signal and Information Processing*, 04(03), 173–175. <https://doi.org/10.4236/jsip.2013.43b031>

Kart, D., Yabanoglu, S., & Nemutlu, E. (2020). Altered metabolomic profile of dual-species biofilm : Interactions between *Proteus mirabilis* and *Candida albicans*. *Microbiological Research*, 230, 126346. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126346>

Koo, H., Allan, R., Howlin, R., Stoodley, P., & Hall-Stoodley, L. (2017). Targeting microbial *biofilms*: Current and prospective therapeutic strategies. *Nature Reviews Microbiology*, 15(12), 740–755. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.99>

Kuźma, L., Rózalski, M., Walencka, E., Rózalska, B., & Wysokińska, H. (2007). Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of *Salvia sclarea* L.: Salvipisone as a

potential anti-*biofilm* agent active against antibiotic resistant *Staphylococcus*. *Phytomedicine*, 14(1), 31–35. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2005.10.008>

Kwon, H. il, Jeong, N. H., Kim, S. Y., Kim, M. H., Son, J. H., Jun, S. H., Kim, S., Jeon, H., Kang, S. C., Kim, S. H., & Lee, J. C. (2019). Inhibitory effects of thymol on the cytotoxicity and inflammatory responses induced by *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles in cultured keratinocytes. *Microbial Pathogenesis*, 134. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103603>

Leal, A., Braga, A., de Araujo, B., Rodriguez, A., de Carcalho, A., da Silva, K., Junio, E., de Sousa Leite, T., & Amorim, M. (2019). Antimicrobial action of essential oil of *Lippia origanoides* HBK. *Clinical Microbiology and Biochemical Technology*, 5(1), 007–012. <https://doi.org/10.17352/jcmbt.000032>

Liu, Y., Yan, Y., Dong, P., Ni, L., Luo, X., Zhang, Y., & Zhu, L. (2022). Inhibitory effects of clove and oregano essential oils on *biofilm* formation of *Salmonella* Derby isolated from beef processing plant. *LWT*, 162. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113486>

Lu, H., Que, Y., Wu, X., Guan, T., & Guo, H. (2019). Metabolomics Deciphered Metabolic Reprogramming Required for *Biofilm* Formation. *Scientific Reports*, 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49603-1>

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>

Luciardi, M. C., Blázquez, M. A., Cartagena, E., Bardón, A., & Arena, M. E. (2016). Mandarin essential oils inhibit quorum sensing and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *LWT - Food Science and Technology*, 68, 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.056>

Marchese, A., Arciola, C. R., Barbieri, R., Silva, A. S., Nabavi, S. F., Sokeng, A. J. T., Izadi, M., Jafari, N. J., Suntar, I., Daglia, M., & Nabavi, S. M. (2017). Update on monoterpenes as antimicrobial agents: A particular focus on p-cymene. *Materials*, 10(8), 947. DOI: <https://doi.org/10.3390/ma10080947>

Marchese, A., Orhan, I., Daglia, M., Barbieri, R., di Lorenzo, A., Nabavi, S., Gortzi, O., Izadi, M., & Nabavi, S. (2016). Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chemistry*, 210, 402–414. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.111>

Martínez, A., Manrique-Moreno, M., Klaiss-Luna, M. C., Stashenko, E., Zafra, G., & Ortiz, C. (2021). Effect of essential oils on growth inhibition, *biofilm* formation and membrane integrity of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*, 10(12). DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121474>

Martínez-Reyes, I., & Chandel, N. S. (2020). Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nature Communications*, 11(1), 102. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13668-3>

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 and network analysis reveal fungistatic effect of basil (*Ocimum basilicum*) oil on *Candida albicans*. *Journal of Ethnopharmacology*, 260. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113002>

Misba, L., Kulshrestha, S., & Khan, A. (2016). Antibiofilm action of a toluidine blue O-silver nanoparticle conjugate on *Streptococcus mutans*: a mechanism of type I photodynamic therapy. *Biofouling*, 32(3), 313–328. DOI: <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1141899>

Mohamed, S., Mohamed, M., Khalil, M., Azmy, M., & Mabrouk, M. (2018). Combination of essential oil and ciprofloxacin to inhibit/eradicate *biofilms* in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Applied Microbiology*, 125(1), 84–95. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.13755>

Moore, B. D., Andrew, R. L., Külheim, C., & Foley, W. J. (2014). Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. *The New Phytologist*, 201(3), 733–750. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.12526>

Moormeier, D., Bose, J., Horswill, A., & Bayles, K. (2014). Temporal and stochastic control of *Staphylococcus aureus biofilm* development. *MBio*, 5(5), 1–12. <https://doi.org/10.1128/mBio.01341-14>

Nazar, J. (2007). *Biofilms bacterianos*. *Revista de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*, 67(1), 161–172.

Nazzaro, F., Fratianni, F., Martino, L. De, Coppola, R., & Feo, V. De. (2013). Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451–1474. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph6121451>

Nostro, A., & Papalia, T. (2012). Antimicrobial Activity of Carvacrol: Current Progress and Future Perspectives. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 7(1), 28–35. DOI: <https://doi.org/10.2174/157489112799829684>

Nostro, A., Roccaro, A. S., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M. A., Pizzimenti, F. C., Cioni, P. L., Procopio, F., & Blanco, A. R. (2007). Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis biofilms*. *Journal of Medical Microbiology*, 56(4), 519–523. DOI: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46804-0>

OEC - The Observatory of Economic Complexity. (2023, May 29). Aceites esenciales en Colombia. Aceites Esenciales En Colombia | OEC. (s. f.). OEC URL: <https://Oec.World/Es/Profile/Bilateral-Product/Essential-Oils/Reporter/Col>.

Olaimat, A., Al-Holy, M., Abu Ghoush, M., Al-Nabulsi, A., Osaili, T., & Holley, R. (2019). Inhibitory effects of cinnamon and thyme essential oils against *Salmonella* spp . in hummus (chickpea dip). *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(5), e13925. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfpp.13925>

Olsen, I. (2015). *Biofilm*-specific antibiotic tolerance and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 34(5), 877–886. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2323-z>

Olson, M., Ceri, H., Morck, D., Buret, A., & Read, R. (2002). *Biofilm* bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66(2), 86.

Organización Mundial de la Salud. (2015). Plan de acción sobre la resistencia a los antimicrobianos. No. WHA68.7. URL: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2015/CD54-12-s.pdf>

Organización Mundial de la Salud. (2020). Informe del sistema mundial de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos (GLASS): implementación temprana 2020. Who.

O'Toole, G. A. (2011). Microtiter dish *biofilm* formation assay. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 47(e2437). DOI: 10.3791/2437

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. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab382>

Paredes, D., Ortiz, C., & Torres, R. (2014). Synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial effect of Ag nanoparticles against *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *International Journal of Nanomedicine*, 9(1), 1717–1729. DOI: <https://doi.org/10.2147/IJN.S57156>

Park, J. Y., Jo, S. K., Park, K. M., Yu, H., Bai, J., Ryu, S., & Chang, P. S. (2019). Transcriptomic analysis of *Staphylococcus aureus* under the stress condition of antibacterial erythorbyl laurate by RNA sequencing. *Food Control*, 96, 1–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.08.021>

Patti, G., Yanes, O., & Siuzdak, G. (2012). NIH Public Access. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(4), 263–269. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrm3314>.Metabolomics

Picone, G., Laghi, L., Gardini, F., Lanciotti, R., Siroli, L., & Capozzi, F. (2013). Evaluation of the effect of carvacrol on the *Escherichia coli* 555 metabolome by using <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *Food Chemistry*, 141(4), 4367–4374. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.004>

Plakunov, V., Mart, S., Teteneva, N., & Zhurina, M. (2017). Controlling of Microbial *Biofilms* Formation: Anti- and *Probiofilm* Agents. *Microbiology*, 86(4), 423–438. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0026261717040129>

Porfírio, E. M., Melo, H. M., Pereira, A. M. G., Cavalcante, T. T. A., Gomes, G. A., De Carvalho, M. G., Costa, R. A., & Catunda, F. E. A. (2017). *In vitro* antibacterial and antibiofilm activity of *Lippia alba* essential oil, citral, and carvone against *Staphylococcus aureus*. *Scientific World Journal*, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/4962707>

Pusic, P., Tata, M., Wolfinger, M. T., Sonnleitner, E., Häussler, S., Bläsi, U., Folkesson, A., Worlitzsch, D., Kolpen, M., Yoon, S. S., Kolpen, M., Vogel, J., Luisi, B. F., Wagner, E. G. H.,

Romby, P., Sonnleitner, E., Sonnleitner, E., Romeo, A., Blasi, U. Tanabe, M. (2016). Cross-regulation by CrcZ RNA controls anoxic *biofilm* formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 6(1), 39621. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep39621>

Qin, N., Tan, X., Jiao, Y., Liu, L., Zhao, W., Yang, S., & Jia, A. (2015). RNA-Seq-based transcriptome analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* *biofilm* inhibition by ursolic acid and resveratrol. *Scientific Reports*, 4(1), 5467. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep05467>

Quesada, A., Reginatto, G. A., Español, A. R., Colantonio, L. D., & Burrone, M. S. (2016). Resistencia antimicrobiana de *Salmonella* spp aislada de alimentos de origen animal para consumo humano. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 33(1), 32–44. DOI: <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2016.331.1899>

Quintero Ruiz, N., Córdoba Campo, Y., Stashenko, E. E., & Fuentes, J. L. (2017). Antigenotoxic Effect Against Ultraviolet Radiation-induced DNA Damage of the Essential Oils from *Lippia* Species. *Photochemistry and Photobiology*, 93(4), 1063–1072. DOI: <https://doi.org/10.1111/php.12735>

Ramírez, A., Fernández, I. J., Nuñez, K. J., Xiqui, M. L., & Baca, B. E. (2014). Redes de señalización en la producción de biopelículas en bacterias: Quorum sensing, di-GMPc y óxido nítrico. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(3), 242–255. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0325-7541\(14\)70079-3](https://doi.org/10.1016/s0325-7541(14)70079-3)

Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., & El Jaziri, M. (2015). The Formation of *Biofilms* by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *BioMed Research International*, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/759348>

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). DOI: <https://doi.org/10.1007/s11306-016-1159-6>

Ribeiro, F. P., Santana De Oliveira, M., de Oliveira Feitosa, A., Santana Barbosa Marinho, P., Moacir Do Rosario Marinho, A., de Aguiar Andrade, E. H., & Favacho Ribeiro, A. (2021). Chemical Composition and Antibacterial Activity of the *Lippia origanoides* Kunth Essential Oil from the Carajás National Forest, Brazil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1155/2021/9930336>

Rinaldo, Giardina, G., Mantoni, F., & Paone, A. (2018). Beyond nitrogen metabolism: nitric oxide, cyclic-di-GMP and bacterial *biofilms*. *FEMS microbiology letters*, 365(6), fny029. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsle/fny029>

Roberts, L. D., Souza, A. L., Gerszten, R. E., & Clish, C. B. (2012). Targeted metabolomics. *Current Protocols in Molecular Biology*, 98(30.2), 1–30. DOI: <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3002s98>

Rodríguez, E., Montaña, L., Sossa, D., & Correa, F. (2019). Informe de vigilancia por laboratorio de *Salmonella* spp. : "Colombia 1997-2018). URL: <https://www.ins.gov.co/BibliotecaDigital/informe-de-vigilancia-por-laboratorio-Salmonella -spp-colombia-1997-2018.pdf>

Römling, Galperin, M., & Gomelsky, M. (2013). Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1), 1-52. DOI: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00043-12>

Römling, U., & Balsalobre, C. (2012). *Biofilm* infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *Journal of Internal Medicine*, 272(6), 541–561. DOI: <https://doi.org/10.1111/joim.12004>

Ru, M., Duijkeren, E. van, Mateus, A., Moreno, M. A., Pyo, S., Teale, C., Threlfall, E. J., Kunsagi, Z., Torren-edo, J., & Valle, C. (2017). Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(4), 957-968. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkw481>

Saad, N. Y., Muller, C. D., & Lobstein, A. (2013). Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal* (Vol. 28, Issue 5, pp. 269–279). DOI: <https://doi.org/10.1002/ffj.3165>

Sadekuzzaman, M., Yang, S., Mizan, M. F. R., & Ha, S. D. (2015a). Current and Recent Advanced Strategies for Combating *Biofilms*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(4), 491–509. DOI: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12144>

Sadekuzzaman, M., Yang, S., Mizan, M. F. R., & Ha, S. D. (2015b). Current and Recent Advanced Strategies for Combating *Biofilms*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(4), 491–509. DOI: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12144>

Sakarikou, C., Kostoglou, D., Simões, M., & Giaouris, E. (2020). Exploitation of plant extracts and phytochemicals against resistant *Salmonella* spp. in *biofilms*. *Food Research International*, 128, 108806. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108806>

Sarrazin, S. L. F., da Silva, L. A., de Assunção, A. P. F., Oliveira, R. B., Calao, V. Y. P., da Silva, R., Stashenko, E. E., Maia, J. G. S., & Mourão, R. H. v. (2015). Antimicrobial and seasonal evaluation of the carvacrol-chemotype oil from *Lippia organoides* kunth. *Molecules*, 20(2), 1860–1871. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules20021860>

Sayeed Akthar, M., Degaga, B., & Azam, T. (2014). Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research*, 2(1), 1–007. DOI: <http://www.journalissues.org/IBSPR/>

Secor, P. R., James, G. A., Fleckman, P., Olerud, J. E., McInnerney, K., & Stewart, P. S. (2011). *Staphylococcus aureus* Biofilm and Planktonic cultures differentially impact gene expression, mapk phosphorylation, and cytokine production in human keratinocytes. *BMC Microbiology*, 11. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-143>

Selim, S., Almuhayawi, M. S., Alqhtani, H., Al Jaouni, S. K., Saleh, F. M., Warrad, M., & Hagagy, N. (2022). Anti-*Salmonella* and Antibiofilm Potency of *Salvia officinalis* L. Essential Oil against Antibiotic-Resistant *Salmonella enterica*. *Antibiotics*, 11(4). DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040489>

Seow, Y. X., Yeo, C. R., Chung, H. L., & Yuk, H. (2014). Plant essential oils as active antimicrobial agents. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(5), 625–644. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.599504>

Sharma, G., Sharma, S., Sharma, P., Chandola, D., Dang, S., Gupta, S., & Gabrani, R. (2016). *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *Journal of Applied Microbiology* 121(2), 309–319. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.13078>

Silva, Zimmer, K., Macedo, A., & Trentin, D. (2016). Plant Natural Products Targeting Bacterial Virulence Factors. *Chemical Reviews*, 116(16), 9162–9236. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00184>

Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M., & Römling, U. (2004). GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessibility to motility.

Molecular Microbiology, 53(4), 1123–1134. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04206.x>

Singh, S., Singh, S. K., Chowdhury, I., & Singh, R. (2017). Understanding the Mechanism of Bacterial *Biofilms* Resistance to Antimicrobial Agents. *The Open Microbiology Journal*, 11(1), 53–62. DOI: <https://doi.org/10.2174/1874285801711010053>

Skrinjar, M., & Nemet, N. (2009). Antimicrobial effects of spices and herbs essential oils. *Acta Periodica Technologica*, 220(40), 195–209. DOI: <https://doi.org/10.2298/APT0940195S>

Somrani, M., Debbabi, H., & Palop, A. (2022). Antibacterial and antibiofilm activity of essential oil of clove against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis. *Food Science and Technology International*, 28(4), 331–339. DOI: <https://doi.org/10.1177/10820132211013273>

Spari, D., & Beldi, G. (2020). Extracellular ATP as an inter-kingdom signaling molecule: Release mechanisms by bacteria and its implication on the host. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 1–14. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21155590>

Stashenko, E. E. (2009). *Aceites esenciales*. Universidad Industrial de Santander.

Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E., & Martínez, J. R. (2003). Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante in vitro de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia verbenaceae. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas.*, 27(105), 579–597.

Stashenko, E. E., Martínez, J. R., Ruíz, C. A., Arias, G., Durán, C., Salgar, W., & Cala, M. (2010a). *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. *Journal of Separation Science*, 33(1), 93–103. DOI: <https://doi.org/10.1002/jssc.200900452>

Stefanakis, M. K., Touloupakis, E., Anastasopoulos, E., Ghanotakis, D., Katerinopoulos, H. E., & Makridis, P. (2013). Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus *Origanum*. *Food Control*, 34(2), 539–546. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.05.024>

Sultan, I., Rahman, S., Jan, A. T., Siddiqui, M., Mondal, A., & Haq, Q. (2018). Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: A bacterial perspective. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2066. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02066>

Sumner, L. W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M. H., Beger, R., Daykin, C. A., Fan, T. W. M., Fiehn, O., Goodacre, R., Griffin, J. L., Hankemeier, T., Hardy, N., Harnly, J., Higashi, R., Kopka, J., Lane, A. N., Lindon, J. C., Marriott, P., Nicholls, A. W., Viant, M. R. (2007). Proposed minimum reporting standards for chemical analysis: Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics*, 3(3), 211–221. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0082-2>

Swamy, M., Akhtar, M., & Sinniah, U. (2016a). Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/3012462>

Tabak, M., Scher, K., Chikindas, M. L., & Yaron, S. (2009). The synergistic activity of triclosan and ciprofloxacin on *biofilms* of *Salmonella* Typhimurium. *FEMS Microbiology Letters*, 301(1), 69–76. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01804.x>

Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D., & Kluytmans, J. . . . (2018). Discovery , research , and development of new antibiotics : the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet infectious diseases*, 18(3), 318–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)

Tacconelli, E., Sifakis, F., Harbarth, S., Schrijver, R., Mourik, M. Van, Voss, A., & Sharland, M. (2017). Surveillance for control of antimicrobial resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), e99-e106. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30485-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30485-1)

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. DOI: <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. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac300698c>

Torres, N. J., Hartson, S. D., Rogers, J., & Gustafson, J. E. (2019). Proteomic and metabolomic analyses of a tea-tree oil-selected *Staphylococcus aureus* small colony variant. *Antibiotics*, 8(4), 248. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040248>

Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., Obana, N., Yawata, Y., & Nomura, N. (2016). Environmental factors that shape *biofilm* formation. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 80(1), 7–12. DOI: <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1058701>

Villada, L. (2018). Aceites esenciales: un mercado potencial para el aprovechamiento de la biodiversidad colombiana. *Ingeniería y Sociedad*, 13, 22–28.

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 essential oils obtained from Egyptian aromatic plants. *Food Control*, 22(11), 1715–1722. DOI: <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. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.114.125559>

Wang, J., Ding, L., Li, K., Huang, H., Hu, H., Geng, J., Xu, K., & Ren, H. (2018). Estimation of spatial distribution of quorum sensing signaling in sequencing batch *biofilm* reactor (SBBR) *biofilms*. *Science of the Total Environment*, 612, 405–414. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.277>

Wang, L. H., Zhang, Z. H., Zeng, X. A., Gong, D. M., & Wang, M. S. (2017). Combination of microbiological, spectroscopic and molecular docking techniques to study the antibacterial mechanism of thymol against *Staphylococcus aureus*: membrane damage and genomic DNA binding. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(6), 1615–1625. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-016-0102-z>

Wang, Y., Wu, J., & Yang, H. (2022). Comparison of the metabolic responses of eight *Escherichia coli* strains including the “big six” in pea sprouts to low concentration electrolysed water by NMR spectroscopy. *Food Control*, 131. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108458>

Wilkinson, L., & Friendly, M. (2009). History corner the history of the cluster heat map. *American Statistician*, 63(2), 179–184. DOI: <https://doi.org/10.1198/tas.2009.0033>

Williams, P., Winzer, K., Chan, W. C., & Cámara, M. (2007). Look who’s talking: Communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362(1483), 1119–1134. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2039>

Witting, M. (2013). Host-Pathogen metabolomics of *Pseudomonas aeruginosa* infection models (Doctoral dissertation, München, Technische Universität München, Diss., 2013)

World Health Organization. (2021). Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report: 2021.

Xu, Fang, X., Wood, T. K., & Huang, Z. J. (2013). A systems-level approach for investigating *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. PloS one, 8(2), e57050. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057050>

Xu, Islam, S., Wood, T. K., & Huang, Z. (2015). An integrated modeling and experimental approach to study the influence of environmental nutrients on biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. BioMed research international, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/506782>

Xu, J., Shao, X., Li, Y., Wei, Y., Xu, F., & Wang, H. (2017). Metabolomic analysis and mode of action of metabolites of tea tree oil involved in the suppression of *Botrytis cinerea*. Frontiers in microbiology, 8, 1017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01017>

Yagi, S., Babiker, R., Tzanova, T., & Schohn, H. (2016). Chemical composition, antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from aromatic plants growing in Sudan. Asian Pacific journal of tropical medicine, 9(8), 763-770. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.06.009>

Yan, J., & Bassler, B. (2019). Surviving as a Community: Antibiotic Tolerance and Persistence in Bacterial Biofilms. Cell Host and Microbe, 26(1), 15–21. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.06.002>

Zhang, Gan, R., Zhang, J., Farha, A., Li, H., Zhu, F., Wang, X., & Corke, H. (2020). Antivirulence properties and related mechanisms of spice essential oils: A comprehensive review.

Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 19(3), 1018–1055. DOI: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12549>

Zhang, N., Zhang, L., Feng, L., & Yao, L. (2016). The anxiolytic effect of essential oil of *Cananga odorata* exposure on mice and determination of its major active constituents. *Phytomedicine*, 23(14), 1727–1734. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.10.017>

Zhang, Y., Kong, J., Xie, Y., Guo, Y., Cheng, Y., Qian, H., & Yao, W. (2018). Essential oil components inhibit *biofilm* formation in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas fluorescens* via anti-quorum sensing activity. *LWT - Food Science and Technology*, 92(1800), 133–139. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.027>

Zhao, X., Zhao, F., Wang, J., & Zhong, N. (2017). *Biofilm* formation and control strategies of foodborne pathogens: Food safety perspectives. *RSC Advances*, 7(58), 6670–36683). DOI: <https://doi.org/10.1039/c7ra02497e>

Zhou, J., Muhammad, J., Sun, B., Yang, R., Wadood, A., Wang, J., & Jia, A. (2019). Metabolomic analysis of quorum sensing inhibitor hordenine on *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 6271-6285. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09878-w>