

Aproximación metabolómica aplicada al efecto del aceite esencial de *Lippia origanoides*
sobre la formación del *biofilm* de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.

Yurley Tatiana Rojas Medina

Trabajo de Grado para Optar al Título de Química

Director

William Fernando Hidalgo Bucheli

Químico, M.Sc. PhD

Codirector

Marlon Yesid Cáceres Ortiz

Doctor en Ciencias Biomédicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2023

Dedicatoria

Este trabajo lo dedico a mis padres por su sacrificio y esfuerzo, por enseñarme que con dedicación y trabajo todo se puede. A mis hermanos, especialmente a mi hermana Andrea por apoyarme con mis materiales de estudio. A Santiago por sus palabras que me incitan a superarme siempre y a todos mis seres queridos, amigos y profesores por brindarme su apoyo.

Agradecimientos

A Dios por mostrarme luz en la oscuridad, a mi amada familia por siempre estar para mí, por darme las fuerzas para seguir y ser ese motor de vida, a mi gran amor Santiago, por sus palabras de aliento, y a mis demás seres queridos que desde la distancia siempre me brindan apoyo.

A todos mis profesores que de una u otra forma me impulsaron a estudiar esta bonita carrera y aportaron en mi desarrollo profesional.

Al Dr. Marlon Cáceres por toda su paciencia, por ayudarme y orientarme durante este proceso y al Dr. William Hidalgo por toda su paciencia, por su apoyo desinteresado y por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto.

A todos mis compañeros de carrera que durante este proceso de aprendizaje me brindaron su amistad y apoyo, a mis compañeros del grupo de investigación GIBIM por su ayuda desinteresada y enseñanzas.

A la universidad Industrial de Santander por darme la oportunidad de cumplir este sueño.

Tabla de contenido

Introducción	11
1. Objetivos	14
1.2. Objetivo general	14
1.3. Objetivos específicos	14
2. Cuerpo del trabajo	15
2.1. Estado del arte	15
2.2. Marco referencial	17
2.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	17
2.2.1.1. Factores de virulencia	22
2.2.1.2. Formación de <i>biofilm</i>	24
2.2.2. Aceites esenciales	27
2.2.2.1. <i>Lippia origanoides</i>	28
2.2.3. Metabolómica	29
2.3. Materiales y método	33
2.3.1. Microorganismo y material vegetal	33
2.3.1.1. Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	33
2.3.1.2. Aceite esencial de <i>L. origanoides</i>	33
2.3.2. Condiciones de crecimiento y formación del <i>biofilm</i>	35
2.3.3. Evaluación de la formación de <i>biofilm</i>	35
2.3.4. Extracción de metabolitos durante la formación del <i>biofilm</i>	36
2.3.5. Análisis por UHPLC/HRMS de los extractos metanólicos	37
2.3.6. Procesamiento de datos	38
2.3.7. Identificación tentativa de metabolitos e integración de vías metabólicas	39
2.3.8. Análisis estadístico	40
3. Resultados y discusión	41
3.1. Análisis metabólico del efecto del AE LOT-II sobre la formación del <i>biofilm</i> de <i>S. aureus</i>	41
3.1.1. Procesamiento de datos	41
3.1.2. Validación del método analítico con las muestras de control de calidad	44
3.1.3. Análisis estadísticos uni- y multivariados	46

3.1.4.	Identificación tentativa de metabolitos	49
3.1.5.	Integración de vías metabólicas afectadas por el AE LOT-II sobre células sésiles de <i>S. aureus</i>	57
4.	Conclusiones	66
	Referencias Bibliográficas	67

Lista de tablas

Tabla 1. Estudios recientes sobre el efecto biológico de aceites esenciales sobre diferentes microorganismos.....	16
Tabla 2. Nivel de confianza de metabolitos propuestos por la Sociedad de Metabolómica.....	31
Tabla 3. Metabolitos identificados tentativamente estadísticamente significativos de células sésiles tratadas con el AE LOT-II para <i>S. aureus</i>	50
Tabla 4. Clasificación de metabolitos tentativamente identificados según el análisis de enriquecimientos de las vías KEEG.....	58

Lista de Figuras

Figura 1. Sistema de detección Quórum sensing (QS) Agr de <i>Staphylococcus aureus</i>	24
Figura 2. Formación del <i>biofilm</i> de <i>Staphylococcus aureus</i>	25
Figura 3. Resultados del procesamiento de las matrices de datos	42
Figura 4. Desviación del tiempo de retención vs el tiempo de retención para cada modo de adquisición de iones.....	43
Figura 5. Diagrama PCA multigrupo de muestras control, muestras tratamiento y muestras de control de calidad, (a) modo de iones positivos, (b) modo de iones negativos.....	46
Figura 6. Gráficos de análisis multivariado (PCA y PLS-DA) en modo de iones negativos y positivos para <i>S. aureus</i> durante la formación del <i>biofilm</i>	47
Figura 7. Análisis univariado Volcano Plot para cada modo de adquisición de iones.....	49
Figura 8. Clasificación química estructural de los metabolitos tentativamente identificados.....	53
Figura 9. Hierarchical Clustering Heatmaps de los metabolitos más representativos afectados en células sésiles después del tratamiento con el AE LOT-II.	55
Figura 10. Diagrama de cajas y bigotes de algunos metabolitos representativos.....	56
Figura 11. Análisis de enriquecimiento de los metabolitos significativos en el tratamiento que fueron modulados por el AE LOT-II en células de sésiles de <i>S. aureus</i>	60
Figura 12. Esquema general de las principales vías metabólicas afectadas por el AE LOT-II sobre la formación del <i>biofilm</i> de <i>S. aureus</i>	61

Lista de Apéndices

“Los apéndices están adjuntos y se pueden visualizar en la base de datos de la biblioteca UIS.

Apéndice A. Metabolitos identificados tentativamente hasta el nivel 2, según el sistema propuesto por la sociedad de metabolómica.

Apéndice B. Metabolitos diferenciales identificados tentativamente de acuerdo con el valor VIP después del tratamiento con el AE LOT-II sobre la formación de *biofilm* de *S. aureus*.

Apéndice C. Actividad *anti-biofilm* y composición química del aceite *L. origanoides*.

Resumen

Título: Aproximación metabolómica aplicada al efecto del aceite esencial de *Lippia origanoides* sobre la formación del *biofilm* de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.

Autor: Yurley Tatiana Rojas Medina, William Fernando Hidalgo, Marlon Yesid Cáceres Ortiz.

Palabras Clave: Vías metabólicas, Anti-*biofilm*; UHPLC-MS, metabolitos secundarios, antimicrobianos.

Descripción: *Staphylococcus aureus* es un patógeno multirresistente responsable de un amplio espectro de infecciones intrahospitalarias, se ha asociado con un elevado índice de infecciones en dispositivos médicos gracias a su capacidad de formar *biofilm*. A nivel mundial se encuentra presente en aproximadamente 30% en la población humana adulta. Ante este panorama, el estudio productos naturales como los aceites esenciales (AE) han demostrado tener efectos antimicrobianos y *anti-biofilm* sobre *S. aureus*, la evaluación del modo de acción de estos AE permite mejorar nuestra comprensión sobre el metabolismo adaptativo de este patógeno.

En este estudio, se evaluó la actividad del aceite esencial (AE) de *Lippia origanoides* quimiotipo timol (LOT II) sobre las vías metabólicas involucradas durante la formación del *biofilm* de *S. aureus* ATCC 43300. Se llevó a cabo un análisis de metabolómica no dirigida para este propósito. La actividad *anti-biofilm* se evaluó utilizando el método semicuantitativo de tinción de cristal violeta y, posteriormente, se realizó un análisis metabolómico utilizando la técnica UHPLC-ESI/Orbitrap-HRMS. Para el procesamiento y análisis de datos, se utilizaron los programas XCMS, MetaboAnalyst y Xcalibur. La identificación tentativa de metabolitos se realizó por el software online CEU mass mediator junto con la base de datos MassBank, HMDB, Metlin y Pubchem.

Los resultados mostraron que, el AE en concentración de 125 µg/mL inhibió más del 80% de la formación del *biofilm*. Además, se determinó alteraciones en el metabolismo de *S. aureus* especialmente en el metabolismo de aminoácidos, con modulación negativa en metabolitos como la valina y la β-alanina. También, se afectó la vía de las pentosas fosfato, con un incremento en los niveles del metabolito ácido 6-fosfogluconico y, en la biosíntesis del pantotenato y CoA, con una disminución para los metabolitos dihidrouracilo y pantotenato. En conclusión, el AE de *L. origanoides* presentó un efecto inhibitorio sobre la formación del *biofilm* de *S. aureus*. Cuya actividad a nivel biológico como el metabolismo de los aminoácidos y otras vías metabólicas importantes para el desarrollo del *biofilm* por parte del microorganismo de estudio.

*Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: William Fernando Hidalgo Bucheli. Doctor en Química. Codirector: Marlon Yesid Cáceres Ortiz. Doctor en Ciencias biomédicas

Abstract

Title: Metabolomic Approach Applied to the Effect of *Lippia origanoides* Essential Oil on the Formation of *Biofilm* by *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.

Author: Yurley Tatiana Rojas Medina, William Fernando Hidalgo, Marlon Yesid Cáceres Ortiz.

Key Words: Metabolic Pathways, *Anti-biofilm*, UHPLC-MS, Secondary Metabolites, Antimicrobials.

Description: *Staphylococcus aureus* is a multidrug-resistant pathogen responsible for a wide spectrum of nosocomial infections. It has been associated with a high rate of infections in medical devices due to its ability to form *biofilms*. It is found worldwide in approximately 30% of the adult human population. Considering this situation, the study of natural products such as essential oils (EOs) have shown antimicrobial and *anti-biofilm* effects on *S. aureus*. Evaluating the mode of action of these EOs allows us to enhance our understanding of the adaptive metabolism of this pathogen.

In this study, the activity of the essential oil (EO) from *Lippia origanoides* thymol chemotype (LOT II) was evaluated on the metabolic pathways involved during the formation of *S. aureus* ATCC 43300 *biofilms*. An untargeted metabolomics analysis was conducted for this purpose. *Anti-biofilm* activity was assessed using the semiquantitative crystal violet staining method, followed by metabolomic analysis using the UHPLC-ESI/Orbitrap-HRMS technique. The XCMS, MetaboAnalyst, and Xcalibur programs were used for data processing and analysis. Tentative identification of metabolites was performed using the online software CEU mass mediator in conjunction with the MassBank, HMDB, Metlin, and Pubchem databases.

The results showed that the EO at a concentration of 125 µg/mL inhibited more than 80% of *biofilm* formation. Furthermore, alterations in the metabolism of *S. aureus* were observed, especially in amino acid metabolism, with negative modulation of metabolites such as valine and β-alanine. The pentose phosphate pathway was also affected, with an increase in the levels of the metabolite 6-phosphogluconic acid, and in the biosynthesis of pantothenate and CoA, with a decrease in metabolites dihydrouracil and pantothenate. In conclusion, the EO from *L. origanoides* exhibited an inhibitory effect on *S. aureus biofilm* formation. Its biological activity affected amino acid metabolism and other metabolic pathways crucial for the development of the *biofilm* by the studied microorganism.

*Degree Work

** Faculty of Sciences. School of Chemistry. Director: William Fernando Hidalgo Bucheli. Ph.D. in Chemistry. Co-director Marlon Yesid Cáceres Ortiz Ph.D. in Biomedical Sciences.

Introducción

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) es un patógeno asociado a infecciones multirresistentes responsable de un gran número de afecciones crónicas como “endocarditis, infección osteoarticular y neumonía” (Vermote & van Calenbergh, 2017). Además, se ha relacionado con otros síndromes y afecciones, como el síndrome de shock tóxico, fibrosis quística y celulitis (Meidania & Pratiwi, 2020; Tyll *et al.*, 2015). En la actualidad, este patógeno representa un problema crítico dado su importancia en las infecciones asociadas con dispositivos médicos, como implantes médicos, catéteres, marcapasos, prótesis articulares, entre otros. Estas infecciones están relacionadas con la formación de *biofilm* (Fux *et al.*, 2004). El *biofilm* es una matriz extracelular formada por polisacáridos, proteínas y otras biomoléculas (Namivandi *et al.*, 2019), la cual genera una barrera química y física, dificultando la penetración de antibióticos y dando lugar a la formación de bacterias con gran resistencia frente a los antibióticos convencionales. Además, esta resistencia se ha incrementado en gran medida por el uso inadecuado de antibióticos en los últimos años (Camargo, 2023). Ante este escenario, se han desarrollado nuevas estrategias terapéuticas como “terapia anti-virulencia, terapia fotodinámica, terapia bacteriófagos, vacunas y otros” (Wu *et al.*, 2019) con el fin de mitigar y controlar estas infecciones.

El aumento en las infecciones relacionadas con *S. aureus* ha generado el interés de organismos internacionales como la Organización de la Salud Mundial (OMS) y centros para el control y la prevención de enfermedades (CDC) los cuales consideran a *S. aureus* como un problema para la salud mundial de alta prioridad en términos de control, prevención y tratamiento. (Oliveira & Silva, 2008). Este patógeno multirresistente presenta un metabolismo adaptativo que

le permite sobrevivir a diversas condiciones ambientales (Choueiry *et al.*, 2022). Además, de regular la producción de factores de virulencia los cuales influyen en su patogénesis, crecimiento, motilidad, degradación de tejidos, adhesión al huésped y protección contra el sistema inmunitario del hospedador (Defoirdt, 2013). Estudios recientes han identificado factores de virulencia responsables de la respuesta ante el sistema inmunitario del huésped o los antibióticos, entre ellos la sortasa A (SrtA) y α -hemolisina (Hla) (Nitulescu *et al.*, n.d.; Surewaard *et al.*, 2018). Por otro lado, se ha encontrado que diferentes productos naturales inhiben la producción de Hla y de otros factores de virulencia mediante diferentes mecanismos de acción (Qi *et al.*, 2023).

Los productos naturales, como por ejemplo los aceites esenciales (AE), representan una alternativa prometedora para contrarrestar infecciones causadas por agentes patógenos, tales como el microorganismo objeto de estudio. Los AE están conformados por una gran variedad de metabolitos secundarios como el timol, carvacrol, terpinenos, felandrenos, entre otros (Stashenko *et al.*, 2014), estos compuestos presentan diferentes propiedades biológicas, como actividad antibacteriana, antiviral, fungicida. El AE de *L. origanoides*, por ejemplo, ha llamado especial atención debido a su potencial uso como antimicrobiano, pues se ha usado a lo largo del tiempo en tratamientos gastrointestinales y respiratorias (Sarrazin *et al.*, 2015). Estudios previos han destacado que los quimiotipos del aceite esencial (AE) de *L. origanoides*, con una composición rica en timol y carvacrol, exhiben notables propiedades antimicrobianas (Hernandes *et al.*, 2017a), y un efecto inhibitor en la formación del *biofilm* en varios patógenos, entre ellos *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Staphylococcus aureus* (Loaiza *et al.*, 2023).

Los recientes progresos tecnológicos han permitido la evolución de las ciencias “ómicas” aportando la capacidad de comprender el funcionamiento de los organismos a nivel molecular y ofreciendo una visión más completa de los procesos biológicos (Schelli *et al.*, 2017a). La metabolómica, como parte de las ciencias “ómicas”, se enfoca en el estudio de metabolitos, que actúan como la huella digital de los procesos bioquímicos (Chen *et al.*, 2022). Estos metabolitos permiten estudiar los procesos metabólicos y la regulación de las vías metabólicas bajo ciertas condiciones ambientales y de estrés (Turi *et al.*, 2018), otorgando la posibilidad de obtener un perfil metabólico exclusivo asociado a las condiciones presentes (Dunphy *et al.*, 2021). En el contexto de la investigación antimicrobiana, la metabolómica se presenta como una herramienta valiosa. Un ejemplo concreto de su utilidad es el estudio del aceite esencial de *L. origanoides* en su acción contra patógenos como *S. aureus*. Esta metodología detecta cambios en metabolitos clave y sus vías metabólicas, proporcionando información esencial sobre varios aspectos cruciales, entre ellos, la adhesión bacteriana, la formación del *biofilm* y la degradación de la matriz extracelular (Guo *et al.*, 2023). Esta herramienta posibilita el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a contrarrestar la generación de patógenos multirresistentes, ya que permite evaluar a nivel biológico el efecto de agentes antimicrobianos como los productos naturales (Schrimpe *et al.*, 2016).

Con la finalidad de aportar en el conocimiento dirigido al desarrollo de prototipos fitoquímicos capaces de erradicar o inhibir la formación del *biofilm* en *Staphylococcus aureus*, la presente investigación estudió, a partir de un enfoque metabolómico el efecto del AE de *Lippia origanoides* sobre el patógeno *S. aureus*. Dentro de este entorno, los estudios realizados por el grupo de investigación en bioquímica y microbiología (GIBIM) mostraron que el AE *L.*

origanoides quimiotipo timol (LOT-II) presentó efectos *anti-biofilm* en diferentes patógenos como *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida auris*, *Escherichia coli*, *Salmonella entérica*, *Seudomona aeruginosa*, entre otras (Ruiz *et al.*, 2023). No obstante, para comprender el mecanismo de acción de este, y los procesos biológicos relacionados con la formación del *biofilm*, el presente trabajo de investigación abordó el estudio detallado de las rutas biosintéticas afectadas en el metabolismo y formación de *biofilm* de *S. aureus*, por la acción biológica de la mezcla compleja de metabolitos secundarios presentes en el AE de *L. origanoides*, cuyos resultados generaron un aporte valioso en el conocimiento metabólico de este microorganismo, que podría utilizarse en un corto o mediano plazo, para el diseño, desarrollo y formulación más eficiente de prototipos farmacológicos a base del AE utilizado en esta investigación.

1. Objetivos

1.2. Objetivo general

Determinar y evaluar la actividad del aceite esencial *Lippia origanoides* sobre las rutas metabólicas que están involucradas en la formación del *biofilm* del patógeno *Staphylococcus aureus*

1.3. Objetivos específicos

- Determinar el perfil metabólico de *Staphylococcus aureus* en la formación del *biofilm*

- Identificar las rutas metabólicas alteradas del patógeno *S. aureus* expuesto al tratamiento con el aceite esencial *Lippia origanoides*

2. Cuerpo del trabajo

2.1. Estado del arte

Los avances en las tecnologías analíticas han permitido la identificación y cuantificación de una amplia variedad de metabolitos. La metodología metabolómica ha servido como herramienta para el estudio del impacto de diversos agentes antimicrobianos y antibióticos en patógenos multirresistente. Los patógenos multirresistentes han presentado en las últimas décadas impactos negativos en la salud pública, generando dificultades en el tratamiento, lo cual genera un mayor riesgo para la salud de los pacientes. Además de presentar mayores costos, dados a los tratamientos prolongados. En ese contexto, la problemática global de cepas cada vez más resistentes, se extiende al estudio de nuevos agentes antimicrobianos que tenga la capacidad de inhibir o erradicar la formación de estos (Kamali *et al.*, 2020) .

En los últimos años, se ha observado un creciente interés en los productos naturales, como los aceites esenciales (AE), como posibles estrategias innovadoras para influir en una variedad de patógenos, como se ilustra en la Tabla 1. Esta actividad antimicrobiana se debe principalmente a la presencia de terpenos y alcoholes como el linalool, el carvacrol, el timol entre otros (Hou *et al.*, 2022). El estudio del modo de acción de estos AE sobre patógenos a partir de estrategias como la metabolómica, nos brinda información sobre aquellas vías metabólicas que son desreguladas por efecto del AE, esto permite desarrollar enfoque terapéutico más preciso.

Tabla 1. Estudios recientes sobre el efecto biológico de aceites esenciales sobre diferentes microorganismos.

Especies de plantas	Microorganismo	Efectos biológicos	Referencia
<i>Citrus paradisi</i>	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i>	Efecto antimicrobiano	(Ruiz & Salazar, 2021)
<i>Melaleuca cajuputi</i> Powell	<i>S. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i> , MRSA, <i>K. pneumoniae</i> y <i>E. coli</i>	Efecto antimicrobiano	(Desam <i>et al.</i> , 2019; Wahab <i>et al.</i> , 2022)
<i>Zingiber officinale</i>	<i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	Afectaciones en el metabolismo energético, ciclo del ácido tricarbóxico y metabolismo del ADN	(Wang <i>et al.</i> , 2020)
<i>Mentha × piperita</i> L	<i>S. aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Efecto antimicrobiano	(Desam <i>et al.</i> , 2019)
<i>Cinamomum burmannii</i>	<i>S. aureus</i>	Efecto antimicrobiano	(Hakim <i>et al.</i> , 2020)

La aplicación de metodologías como la metabolómica han revelado cómo *S. aureus* ajusta su metabolismo para adaptarse a las condiciones del entorno (Aros *et al.*, 2015). Choueiry y colaboradores (2022) evaluaron a través de un enfoque metabolómico no dirigido, el impacto que presenta sustratos energéticos como la glucosa y la dextrina en el metabolismo de *S. aureus*, encontrándose que para la cepa *S. aureus* sensible a la meticilina (MSSA) hay nueve vías metabólicas desreguladas. Entre estas vías, se destacan el metabolismo de purinas, cisteína y metionina, entre otros (Choueiry *et al.*, 2022). Del mismo modo, Schelli y colaboradores (2017) a partir de un enfoque metabolómico dirigido sobre cepas MSSA y MRSA, evaluaron el impacto de

diferentes antibióticos como ampicilina, kanamicina, y norfloxacino. Los resultados obtenidos mostraron un impacto significativo de estos antibióticos en el metabolismo de aminoácidos, metabolismo de purinas y en el metabolismo de piridinas para ambas cepas (Schelli *et al.*, 2017a). Estudios recientes han demostrado que estos metabolitos desempeñan un rol importante en la formación del *biofilm*, en la resistencia a los antibióticos y en la respuesta del sistema inmunitario del hospedador (Aros *et al.*, 2019; Lei *et al.*, 2014).

2.2. Marco referencial

2.2.1. *Staphylococcus aureus*

S. aureus es un patógeno multirresistente responsable de un amplio espectro de infecciones intrahospitalarias, puede causar una extensa variedad de infecciones crónicas y agudas representando un problema crítico para la salud. Su descubrimiento se remonta a 1880, gracias a los esfuerzos de Alexander Ogston, (Cervantes *et al.*, 2014). El género de *Staphylococcus* pertenece a la familia Staphylococceae y está dentro del orden *Bacillales* el cual cuenta con 45 tipos, donde *S. aureus* es la especie más infecciosa (Gherardi *et al.*, 2018). La capacidad de este microorganismo para causar infecciones se debe principalmente a los diferentes mecanismos de virulencia que presenta, como, por ejemplo, la liberación de toxinas como la α -hemolisina, la cual desempeña un papel importante en la virulencia de *S. aureus*, dado que esta tiene la capacidad de causar daño en tejidos, generar lisis en glóbulos rojos, entre otras afectaciones (Gordon *et al.*, 2013). Los genes relacionados con la virulencia de *S. aureus* están mediados en su mayoría por factores ambientales y nutricionales. La disponibilidad de los nutrientes es importante para la síntesis de macromoléculas. Por esta razón, los patógenos como *S. aureus* requieren la regulación

de los factores de virulencia como respuesta a los cambios en el entorno (Somerville & Proctor, 2009).

S. aureus es un patógeno de gran versatilidad, capaz de desarrollarse tanto en ambientes aeróbicos como anaeróbicos. Este es un patógeno grampositivo, catalasa y coagulasa positiva, es de forma esférica con diámetro promedio entre 0.5 a 1.5 μm , se agrupa en forma de racimos y es de color dorado (Guo *et al.*, 2020). En términos taxonómicos, *S. aureus* pertenece al filo *fermicutes*, y se puede encontrar en forma planctónica o formando *biofilm*. El *biofilm* es una matriz extracelular que le otorga características, como rigidez estructural y resistencia. Además, participa en la regulación de los factores de virulencia (Hobley *et al.*, 2015). La formación de *biofilm* conlleva a una reducida penetración de los antibióticos, ya que estos no logran alcanzar las áreas internas donde residen las células bacterianas. Esta característica ha llevado a considerar al *S. aureus* como un patógeno de resistencia notable (Pinto *et al.*, 2019). Además, *S. aureus* permite a través de la transferencia horizontal de genes la creación de bacterias más resistentes (Willems *et al.*, 2011). Por otro parte, la estructura de *S. aureus* tiene un papel importante en la viabilidad celular y en la integridad celular, al ser un patógeno gram-positivo este presenta pared celular con un grosor que oscila entre 20 y 40 nm (Giesbrecht *et al.*, 1998), Esta pared celular está mayormente compuesta por peptidoglucanos, que funcionan como puntos de unión para proteínas y polímeros, además de facilitar la interacción con el huésped. El peptidoglucano está formado por N-acetilglucosaminas y ácidos N -acetilmurámicos, los cuales están unidos mediante enlaces β -1-4 (Turner *et al.*, 2014).

En otra línea, es importante destacar que la pared celular del *S. aureus* incluye ácidos teicoicos, que se encuentran unidos tanto a glicanos como a la membrana lipídica. Esta unión forma los conocidos ácidos teicoicos de pared (WTA) y ácidos lipoteicoicos (LTA), respectivamente. Los WTA desempeñan una función esencial, ya que están relacionados con la secreción y el plegamiento de proteínas extracelulares, además de estar vinculados con la colonización en tejidos y células, así como con la formación de *biofilm* (Wang *et al.*, 2022). Del mismo modo, los LTA están involucrados con el crecimiento y división celular, así como de la capacidad de infección. Los ácidos teicoicos muestran propiedades zwitteriónicas como resultado de la presencia de un grupo fosfato y del aminoácido D-alanina. Asimismo, los ácidos teicoicos son responsables de la resistencia de *S. aureus* a los antibióticos, dado que ayudan a prevenir el paso de moléculas antimicrobianas a través de la pared celular (Xia *et al.*, 2010).

Los patógenos multirresistentes desencadenan tanto infecciones agudas como crónicas, incrementando significativamente su complejidad terapéutica y costos asociados, lo cual representa una amenaza para la salud pública. Esta problemática se agudiza debido al continuo decrecimiento del repertorio de compuestos antimicrobianos efectivos frente a estos patógenos oportunistas (Vermote & van Calenbergh, 2017). Entre estos patógenos, destaca *S. aureus* como un agente principal en infecciones relacionadas con el tracto respiratorio, además de su implicación en infecciones relacionadas con prótesis, infecciones cardiovasculares y bacteriemia, entre otras (Cheung *et al.*, 2021). La bacteriemia causada por *S. aureus*, es una infección grave con un porcentaje alto de incidencia y mortalidad (Arientová & Holub, 2021). Un estudio realizado por (Steinhaus *et al.*, 2018) referente a un centro hospitalario sudafricano, se documentó una tasa de mortalidad del 41.8% para la bacteriemia hospitalaria, la cual se incrementó al 47% después de

transcurrir 90 días. Asimismo, se evidenció una tendencia hacia un aumento en la mortalidad en individuos con comorbilidades.

S. aureus es un patógeno multirresistente que se encuentra presente en aproximadamente 30% en la población humana adulta y en un rango de 40-50% en niños y adolescentes (Stensen *et al.*, 2022). Este microorganismo se localiza principalmente en la región nasal, aunque también puede encontrarse en otras partes del cuerpo, como la faringe. El impacto clínico de *S. aureus* es significativo, manifestándose con una alta morbilidad y aproximadamente un 40% de mortalidad en los casos más graves (Mohammed *et al.*, 2020). Además, este patógeno es responsable de un considerable número de afecciones crónicas potencialmente mortales, entre las que destacan la neumonía y el shock séptico (Zheng *et al.*, 2021). El grado de infección por *S. aureus* en heridas quirúrgicas está influenciado por una combinación de factores endógenos y exógenos. Entre los factores endógenos, se incluyen la edad del paciente, su estado nutricional y la presencia de otras enfermedades que puedan afectar su sistema inmunológico (Astagneau & Ambrogi, 2014). Estos elementos pueden contribuir a una mayor susceptibilidad a la infección por *S. aureus* en el sitio quirúrgico. Además, los factores exógenos, como el tipo de cepa bacteriana presente, también desempeñan un papel crucial en la evolución de la infección (Pestaña *et al.*, 2022).

S. aureus se caracteriza por su capacidad de colonizar de manera persistente y asintomática las cavidades nasales de los seres humanos. Esta particularidad adquiere una significancia crítica en el ámbito médico y quirúrgico, ya que esta colonización puede aumentar sustancialmente los factores de riesgo asociados con las infecciones en sitios quirúrgicos, lo que, a su vez, conlleva a un incremento del riesgo de infección postoperatoria (Mulcahy & McLoughlin, 2016; Pynnonen

et al., 2011; Sakr *et al.*, 2018). Un estudio realizado en Tailandia por (Pongbangli *et al.*, 2021) mostro que, de 352 pacientes sometidos a cirugía cardiaca el 13.1 % son portadores nasales positivos para *S. aureus*. Este grupo de pacientes revelo una incidencia de infecciones profundas y superficiales del 1.3%. Estos resultados destacan la importancia del cribado preoperatorio para detectar la colonización nasal por *S. aureus* como una medida preventiva para reducir la incidencia de infecciones en las heridas quirúrgicas.

Las infecciones por *S. aureus* se dan fundamentalmente a través de dos vías principales: el contacto directo con individuos portadores de la bacteria y la contaminación de superficies, agua y alimentos (Zhang *et al.*, 2016). No obstante, es importante destacar que esta bacteria no se limita a afectar a los seres humanos, ya que también tiene un impacto en los animales. Dentro de este contexto, un estudio reveló que la resistencia a los antimicrobianos en cerdos era de “100 % a la tetraciclina, 88 % a la penicilina y 64 % a la clindamicina y en humanos de 81,6 % a la penicilina, 44% a la clindamicina y 43% a la tetraciclina” (Rao *et al.*, 2022). También se observó en este estudio que los cerdos presentaban una mayor prevalencia del gen *mecA* en comparación con los humanos. Por otro lado, el uso de aditivos a largo plazo en la agricultura para tratar infecciones dentro del rebaño puede producir infecciones más resistentes a los antibióticos (Smith, 2015). Estas infecciones en animales, particularmente en el ganado lechero, como la mastitis bovina son una carga económica, productiva y en la industria alimentaria. Además, es importante destacar que los animales infectados pueden promover y ser reservorio para infecciones en humanos.

En los últimos años, la prevención y el control de infecciones asociadas a bacterias como *S. aureus* han cobrado gran relevancia debido a su papel crucial en la reducción de costos

intrahospitalarios y brotes, además de garantizar la seguridad del personal sanitario. Un dato alarmante es que, en Colombia, para el año 2021 según el boletín epidemiológico semanal 9 comparado con el boletín 9 del año 2022, se evidenció un preocupante aumento del 124% en infecciones asociadas a la atención en la salud, relacionados a patógenos como *S. aureus* y *E. coli*, donde se presentaron 1024 casos registrados y una tasa de mortalidad del 38%. Estos casos están principalmente relacionados con dispositivos médicos, siendo las infecciones del torrente sanguíneo las más predominantes, representando el 73.9% de los casos. Además, el 60% de estos casos están vinculados a problemas de higiene, limpieza y desinfección (Aires, 2017; Algharib *et al.*, 2020). Por otro lado, un estudio de cohorte multicéntrico sobre infecciones por *S. aureus* realizado en Bogotá por (Camacho *et al.*, 2022), entre los años 2014 y 2018 en pacientes menores de 18 años, reveló que, de 551 casos positivos, 356 casos estaban relacionados con infecciones en la piel y tejidos blandos, de los cuales 137 están relacionados con la cepa *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y 219 relacionados con la cepa *S. aureus* sensible a la meticilina (MSSA). Ante este panorama, se hace imprescindible priorizar medidas como el lavado constante de manos y mantener un estricto control y vigilancia en el uso de antibióticos. Además del estudio de nuevos agentes antimicrobianos, para enfrentar esta problemática de salud pública (Haag *et al.*, 2019).

2.2.1.1. Factores de virulencia

S. aureus exhibe una notable habilidad para ajustarse ante los cambios en su entorno, lo que le permite adaptarse con celeridad al organismo humano. Esta cualidad intrínseca, gestionada por los factores de virulencia, le confiere la capacidad de evadir la respuesta del sistema inmunológico y de generar resistencia a un amplio espectro de antibióticos. Los factores de

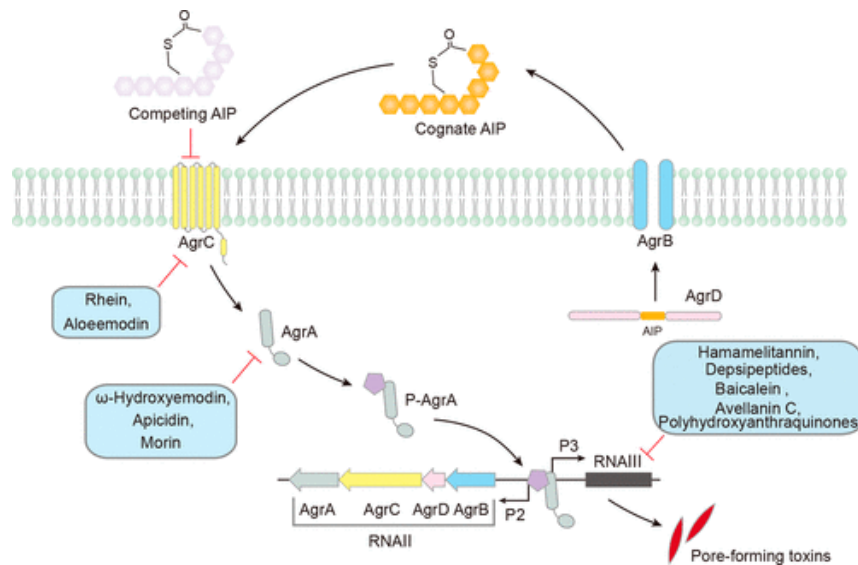
virulencia se encuentran regulados por el operón Agr del sistema de detección Quórum, el cual participa en la patogénesis de *S. aureus* (Somerville *et al.*, 2002). El operón agr está compuesto por dos ARNm, denominados ARN II y ARN III. El ARN II lleva la información genética para la síntesis de las proteínas agrA, agrB, agrC, agrD, mientras que el ARN III codifica la expresión de otros genes de virulencia, como es el caso α -hemolisina. Por otro lado, el operón Agr está compuesto por dos operadores, P2 y P3, los cuales se correlacionan respectivamente con el ARN II y el ARN III. La regulación del sistema de detección Quórum responde a la densidad de población. Este sistema regula la expresión de los factores de virulencia como respuesta a la señal del péptido autoinductor (AIP) (Wu *et al.*, 2019).

El péptido autoinductor (AIP) está compuesto por 8 aminoácidos y presenta un anillo de 5 miembros de tiolactona (Yarwood & Schlievert, 2003) La síntesis del AIP se inicia con la codificación de un precursor por parte del agrD, posteriormente, agrB, una proteasa de membrana integral que facilita la maduración y el transporte del AIP hacia el entorno extracelular, tal como se ilustra en la Figura 1, Una vez alcanzada la concentración adecuada de AIP, este activa el receptor agrC, el cual es una histidina quinasa de membrana. Este evento desencadena la fosforilación de agrA, lo que a su vez activa los promotores P2 y P3 (Tan *et al.*, 2018). En este ciclo, la proteína agrA desempeña un papel crucial como autorregulador, como lo detalla (Novick, 2003).

El aumento en el promotor P3 genera un incremento en el ARN III. Este ARN III funciona como un regulador transcripcional de múltiples factores de virulencia, por ejemplo, la codificación de la toxina α -hemolisina a través del gen *hla* y la toxina 1 TSS. Las hemolisinas presentan en la

patogénesis de *S. aureus* un papel importante ya que tienen la capacidad de degradar los tejidos del huésped, contribuyendo así a la generación de nutrientes esenciales para la supervivencia de *S. aureus* (Hurtado *et al.*, 2021). Adicionalmente, existen otras toxinas que están parcialmente reguladas como las enterotoxinas B, C y D, y otras como las enterotoxinas A y K, que no encuentran reguladas por el ARN III (Yarwood & Schlievert, 2003).

Figura 1. Sistema de detección Quórum sensing (QS) Agr de *Staphylococcus aureus*.



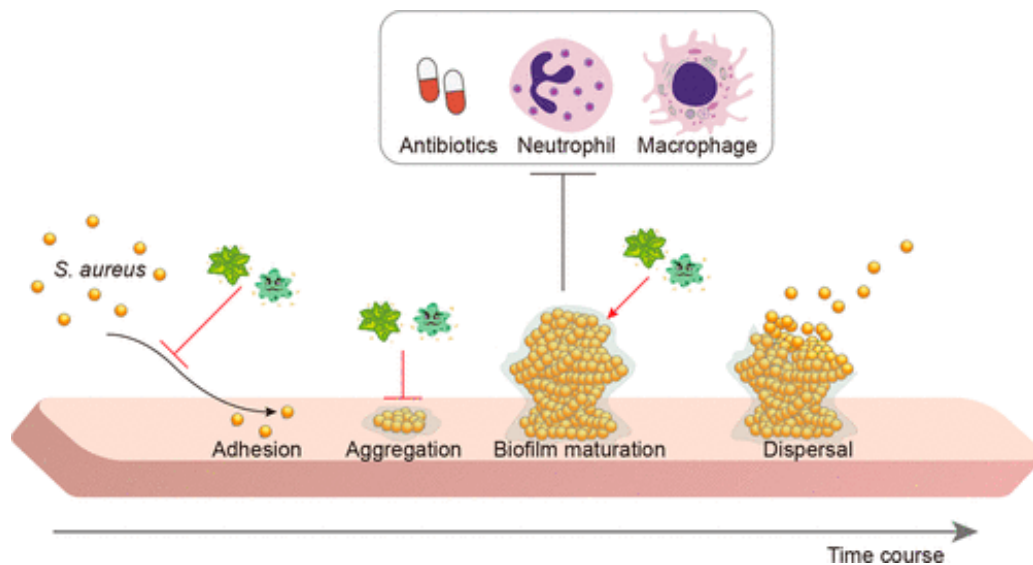
Nota. El sistema de detección Quórum Agr de *S. aureus* compuesto por dos ARNm, el ARN II y ARN III, que codifican las proteínas AgrABCD y los factores de virulencia. Tomado de (Wu *et al.*, 2019)

2.2.1.2. Formación de biofilm

La alta patogénesis de *S. aureus* se debe en gran medida a la capacidad de formar *biofilm* en superficies bióticas y abióticas. Esta característica le confiere una mayor resistencia a los antibióticos y le permite evadir las defensas del huésped (Waters *et al.*, 2016). El *biofilm* es una

comunidad microbiana altamente desarrollada, la cual se encuentra rodeada por una matriz extracelular que está compuesta por proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos (Yang *et al.*, 2015). Esta estructura proporciona a *S. aureus* mayor resistencia a condiciones hostiles como la privación de los nutrientes (Savage *et al.*, 2013). Del mismo modo, el *biofilm* es un sistema dinámico que está mediada por una serie de factores genéticos y de virulencia. Este presenta desafíos significativos en el tratamiento de las infecciones, dado que *S. aureus* genera estrategias de supervivencia que permiten la disipación o propagación del *biofilm* en otros sitios (Schilcher & Horswill, 2020a).

Figura 2. Etapas de formación del *biofilm* del modelo clásico, que incluye adhesión, agregación, maduración del *biofilm* y degradación y dispersión del este.



Nota. Modelo clásico de la formación del *biofilm*. Tomada de (Wu *et al.*, 2019).

La formación del *biofilm* implica varios pasos como se evidencia en la Figura 2. En primer lugar, *S. aureus* se adhiere a la superficie mediante la ayuda de los ácidos teicoicos de pared (WTA) y las proteínas de componente de superficie microbiana que reconoce las moléculas de matriz adhesiva (MSCRAMM) que se unen a la sortasa A (Foster, 2019; Foster *et al.*, 2013). Luego, se

inicia la agregación de las bacterias a través de la proliferación, dando origen a microcolonias. Posteriormente, el *biofilm* entra en una fase de maduración caracterizada por la formación de la matriz extracelular, compuesta principalmente por proteínas, ADN y polisacáridos. En esta etapa, se activan los PSM (modulinas solubles en fenol) y las nucleasas, que desempeñan un papel esencial en la creación de canales y torres en el *biofilm* maduro. En la fase final del proceso, las proteasas y los PSM la cuales son péptidos anfipáticos, trabajan en conjunto para degradar la matriz extracelular, lo que resulta en la liberación de células y la colonización de regiones distales (Schilcher & Horswill, 2020b). Este proceso de formación, maduración y eventual desprendimiento del *biofilm* es de importancia para *S. aureus*, ya que le permite adaptarse a diferentes ambientes como superficies médicas y tejidos biológicos.

La formación del *biofilm* se encuentra regulada principalmente por el operón agr del sistema de detección Quórum (QS) el cual es un mecanismo de comunicación que responde a la densidad celular. El operón agr genera factores de virulencia que participan a la baja o al alza en la adhesión, formación y degradación del *biofilm* (Donlan, 2001). Los principales reguladores del sistema Quórum son el agrA y el ARN III. La activación del sistema de detección Quórum incrementa el ARN III, el cual regula al alza las proteínas secretadas como las exoenzimas, que están relacionadas con daño en los tejidos, daño tisular y evasión del sistema inmunológico. Por otro lado, el ARN III regula la baja de las proteínas asociadas de adhesión a la superficie, que se generan como una respuesta ante la densidad celular (Cheung *et al.*, 2011). Por su parte, la proteína agrA regula las transcripciones de los PSM α y β que está relacionado con la dispersión del *biofilm* (Fechter *et al.*, 2014).

Recientes estudios han demostrado que la baja activación del sistema de detección Quórum es importante para la formación del *biofilm*, dado que ciertas proteínas que presentan un papel importante en la adhesión a las células y tejidos del huésped, como las FnBP (Proteínas de unión a fibronectina) y las SdrC (Proteína C repetida de serina-aspartato) se inhiben por la activación del sistema de detección QS (Boles & Horswill, 2008). Asimismo, las proteasas como SspB, ScpA y los PSM, se modula positivamente cuando se activa el sistema QS. Estas proteasas y los PSM tienen importancia en la formación y degradación de la estructura del *biofilm* (Golonka *et al.*, 2004; Ythier *et al.*, 2012).

2.2.2. Aceites esenciales

Los aceites esenciales (AE) son productos naturales de plantas aromáticas que cumple con la función de proteger a las plantas de virus y bacterias. Estos son una mezcla de metabolitos secundarios, los cuales poseen propiedades que varían según la planta de origen y del tipo de quimiotipo (Karaman *et al.*, 2017). Entre las diversas propiedades biológicas que presentan, destacan su capacidad como agentes antimicrobianos (Algburi *et al.*, 2016). Estudios recientes han demostrado que la actividad de los AE como antimicrobianos no se puede atribuir al componente mayoritario, sino que también está relacionada con la interacción de estos con los metabolitos presentes en menor proporción, generando un efecto sinérgico (Jayasena & Jo, 2013). Una de las características de los AE es que pueden interferir con el sistema de detección Quórum y con la permeabilidad de la membrana. Además, inhibir la secreción de proteínas de superficie de unión, lo cual implica interferir con la formación del *biofilm* de diferentes patógenos como *S. aureus* (Bouhdid *et al.*, 2010).

Consecuentemente, se ha reportado que los AE también pueden actuar con propiedades *anti-biofilm* sobre *S. aureus*, tales como el aceite de orégano (*Lippia origanoides*), el aceite de canela, el aceite de árbol de té, entre otros (Bazargani & Rohloff, 2016). Por su parte, el estudio realizado por (Ben Abdallah *et al.*, 2020) en relación con la cepa *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA), evidenció que los AE de tomillo *Zygis* y de majorana, presentaron actividades de inhibición del *biofilm*, siendo estos 10.20 y 95.91%, respectivamente. Conjuntamente, el estudio realizado por (Cui *et al.*, 2020) mostró que el AE de cardamomo presenta actividad *anti-biofilm* contra MRSA, donde el AE de cardamomo cuyos principales componentes son el cineol, acetato de terpinilo, linalol y β -pineno (Rios *et al.*, 2007), los cuales inhibe la formación de los polímeros extracelulares, los cuales son de importancia para la formación del *biofilm*.

Los AE están constituidos principalmente por terpenoides, entre los que se destacan el timol, el mentol y el carvacrol. Estos compuestos han evidenciado la capacidad de disminuir la síntesis de α -hemolisina, así como las enterotoxinas A y B de *S. aureus* (Qiu *et al.*, 2011), y también han mostrado efectos inhibitorios sobre la expresión de la proteína agrA. Por otro lado, se ha demostrado que estos monoterpenos inhiben la acción de la enzima coagulasa y lipasas de *S. aureus* (Silva *et al.*, 2016) reduciendo la patogénesis de *S. aureus*. En este sentido, los AE representan en la actualidad una gran alternativa para inhibir la formación de *biofilm* de patógenos multirresistentes, y de esta manera reducir la crisis actual en la salud pública.

2.2.2.1. *Lippia origanoides*

Entre los aceites esenciales que más se destacan se encuentra el obtenido de *Lippia origanoides*, comúnmente conocido como orégano u orégano del monte (Hernandes *et al.*, 2017). Este AE pertenece a la familia de las Verbenácea, se ubica primordialmente en entornos caracterizados por bosques áridos, matorrales y hábitats semidesérticos. Sus constituyentes principales comprenden el carvacrol, timol, limoneno y *p*-cimeno, entre otros, cuyas proporciones oscilan en función de las condiciones ambientales en que la planta se desarrolla (Stashenko *et al.*, 2010). De acuerdo con el estudio realizado por (Cáceres *et al.*, 2020), se evidenció que la proporción de los constituyentes principales del AE de *L. origanoides* de dos quimiotipos diferentes, LTC I y LTC II, fue timol (22.1%) y (32.7%), así como carvacrol (10.7%) y (18.8%), respectivamente. Estos monoterpenos exhiben propiedades antimicrobianas que les permite inhibir *biofilm* mostrando una concentración mínima inhibitoria del *biofilm* (MIBC₅₀) de 1.6 mg/ml para LTC I y 0.7 mg/ml para LTC II contra el microorganismo *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) (Gómez *et al.*, 2020). Los AE interactúan con la bicapa lipídica de la membrana causando permeabilidad, esto genera pérdida de iones, ATP y ADN, de tal manera que se provoca la lisis celular (Nostro *et al.*, 2007). Adicionalmente, se distribuyen a través de la matriz extracelular inhibiendo la formación del *biofilm*.

2.2.3. Metabolómica

La metabolómica es una rama de las ciencias ómicas, la cual permite obtener un análisis global de metabolitos de los sistemas biológicos en determinadas condiciones (Sogin *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2012). Los metabolitos son moléculas resultantes de las reacciones químicas que ocurren en los procesos metabólicos de los seres vivos. Estas moléculas desempeñan diversas funciones críticas en la célula y el organismo en su conjunto (Patti *et al.*, 2012). Su participación

en el almacenamiento y liberación de energía es esencial para el funcionamiento celular. Además, algunos metabolitos actúan como mensajeros químicos, transmitiendo información intercelular para regular el crecimiento y el desarrollo, respondiendo a estímulos externos (Guijas *et al.*, 2018). Al conjunto de metabolitos se denomina metaboloma, estos reflejan el estado funcional de un organismo y cómo este responde a diferentes estímulos, incluyendo factores ambientales (Huang & Wang, 2022)

En el campo de los análisis metabólicos, se pueden distinguir dos enfoques fundamentales. El primero de ellos corresponde a una estrategia de **metabolómica no dirigida**, la cual conlleva una caracterización completa del metaboloma mediante la identificación de aquellos metabolitos detectables en una muestra determinada (Luo *et al.*, 2023). Mediante este enfoque, se puede obtener un primer acercamiento al estado biológico del microorganismo en cuestión, además de permitir la identificación de metabolitos vinculados con diversas vías metabólicas, tales como el metabolismo de lípidos, carbohidratos y aminoácidos, entre otros. (Xu *et al.*, 2017a). Por otro lado, el segundo enfoque se refiere a la **metabolómica dirigida**, que se focaliza en la cuantificación precisa de metabolitos específicos previamente seleccionados. Esto da lugar a un estudio más minucioso y confiable de las vías metabólicas involucradas (Cajka & Fiehn, 2016).

El flujo general del análisis de la metabolómica no dirigida implica, en primer lugar, la selección de la técnica para caracterizar los metabolitos presentes en una muestra. Para llevar a cabo el análisis metabólico, se utilizan técnicas como la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (MS) (Sumner *et al.*, 2007). El segundo paso comprende el procesamiento de los datos mediante herramientas como XCMS. Durante este proceso, se realizan

correcciones en los tiempos de retención, se reduce el ruido, la alineación de los datos, y la identificación de señales (Smith *et al.*, 2006). En tercer lugar, se realiza una normalización de los datos con las muestras control de calidad (QC), con el objetivo de asegurar la validez de los resultados, la normalización permite eliminar sesgos técnicos y facilitar la normalización de los datos, en este paso se hace la identificación tentativa de metabolitos con ayuda de programas como Ceu-mass mediator y bases de datos que permitan comparar las características (relaciones m/z) obtenidas por espectrometría de masas (Gil *et al.*, 2019a; Reisdorph *et al.*, 2019; Salek *et al.*, 2013). La anotación e identificación de metabolitos se rige por los estándares de Metabolómica (MSI) del Grupo de Trabajo de Análisis Químico (CAWG) (Tabla 2).

Tabla 2. Nivel de confianza de metabolitos propuestos por la Sociedad de Metabolómica.

Nivel de confianza	Descripción
Nivel 0	Estructura 3D inequívoca, incluida la estereoquímica completa
Nivel 1	Estructura 2D segura, utilizando estándar de referencia o elucidación de estructura 2D completa
Nivel 2	Estructura probable utilizando datos de literatura y/o espectros de fragmentación y/o conocimiento sobre el t_R
Nivel 3	Posible estructura, isómeros o clase: Mas de un candidato solo se requiere una característica coincidente para escoger al candidato
Nivel 4	Desconocido: característica cuantificable en una muestra

Nota. Datos tomados de (Gil *et al.*, 2019b)

Posteriormente, se realiza el análisis estadístico, que consiste en aplicar análisis univariados y multivariados. Los análisis univariados permiten estudiar las características de una variable en particular en un conjunto de datos. En ese contexto, los análisis univariado que se

emplean en metabolómica son el análisis Fold Change, el T-test, el Volcanot Plot y la Pattern Search. El análisis Fold Change permite comparar dos condiciones o grupos diferentes, al comparar cuanto cambia la expresión de una variable entre dos condiciones; la prueba T-test determina si las diferencias observadas son estadísticamente significativas y el volcanot plot visualiza tanto la magnitud del cambio (fold change) como la significancia estadística de las diferencias entre dos condiciones en un solo gráfico. Por otro lado, los análisis multivariados comúnmente empleados en metabolómica son el análisis de componentes principales (PCA) y el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). El PCA permite la visualización multidimensional, este análisis permite reducir la dimensionalidad en componentes y encontrar las componentes principales que explican la mayor varianza en los datos. El PLS-DA permite la clasificación y discriminación de un conjunto de datos, este análisis se centra en maximizar la covarianza entre las variables predictoras y las variables de respuesta (grupos) (Elhaik, 2022; Ruiz *et al.*, 2020). De igual forma, también se realizan heatmap (mapa de calor) los cuales permiten destacar las intensidades relativas de los metabolitos en los grupos de estudio, y observar la dispersión de las réplicas para cada muestra. De esta manera, según la clasificación del color (rojo o azul), podemos decir si un metabolito se encuentra modulado positiva o negativamente, esto permite la visualización de patrones.

El objetivo principal del análisis metabolómico reside en la detección y cuantificación de una amplia variedad de metabolitos. Estos metabolitos permiten diferenciar patrones de respuesta ante diversos estímulos, tales como entornos ambientales, cambios nutricionales o enfermedades (Choueiry *et al.*, 2022). El estudio de estos patrones de respuesta es de utilidad para el diagnóstico temprano de afecciones médicas o la evaluación de fármacos para el estudio de enfermedades (Cui

et al., 2017). La aplicación de esta metodología, junto con su correlación con otras disciplinas ómicas como proteómica, genómica y transcriptómica, otorgan una comprensión más completa de los procesos biológicos. La integración de estos datos permite identificar biomarcadores, el desarrollo farmacéutico y la evaluación del estado nutricional en su conjunto (Xu *et al.*, 2017b). Por ende, la metabolómica emerge como una herramienta esencial para analizar y comprender los perfiles metabólicos únicos de microorganismos patógenos como *S. aureus* (Schelli *et al.*, 2017)

2.3. Materiales y métodos

2.3.1. Microorganismo y material vegetal

2.3.1.1. Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.

El microorganismo *S. aureus* fue donado por la escuela de microbiología de la universidad industrial de Santander y proporcionado por el grupo de investigación GIBIM, la cepa utilizada fue ATCC 43300 la cual fue obtenida del banco Celula America Type Culture Collection (ATCC). El medio de cultivo que se usó para el crecimiento de la bacteria fue Trypto-Casein Soy Broth (TSB) que se adquirió de Sigma-Aldrich. Para el estudio se empleó agua MilliQ de resistividad 18.2 Ω , extraída del Equipo Smart 2 Pure (Thermo Fisher Scientific, MA, U.S.A).

2.3.1.2. Aceite esencial de *L. origanoides*

El aceite esencial que se empleó para el estudio fue *Lippia origanoides*, el cual fue suministrado y caracterizado por el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM)

en la Universidad Industrial de Santander. El disolvente para el aceite esencial fue dimetil sulfóxido (DMSO, grado HPLC) adquirido en Merck. La destilación y caracterización del aceite *L. origanoides* fue realizada según lo propuesto por (Stashenko *et al.*, 2010b). El AE se obtuvo mediante hidrodestilación asistida por radiación de microondas usando un equipo Clevenger. Posteriormente el AE se secó con sulfato de sodio anhidro y se almacenó a 4 °C. La extracción se realizó por triplicado.

Las muestras se analizaron en un equipo Agilent Technologies 6890N Series Network System (Palo Alto, California, EE. UU.), acoplado a un detector selectivo de masas (AT, MSD 5975 Inert XL). Para esto se utilizaron dos columnas, una columna capilar apolar, DB-5MS, de 60 m x 0.25 mm (d.i.) x 0.25 µm (df) con fase estacionaria se utilizó 5%-fenil-poli (dimetilsiloxano), y otra columna capilar polar, DB-WAX, de 60 m x 0.25 mm (d.i.) x 0.25 µm (df), con fase estacionaria de poli (etilenglicol). Se utilizó helio como gas de arrastre (99.995% gas AP, Linde, Bucaramanga, Colombia), con un flujo volumétrico constante de 1 mL/min. La temperatura del horno se programó de 45 °C (5 min) hasta 150 °C (3 min) a 3 °C/min, luego, hasta 220 °C (5 min), a 4 °C/min. Los componentes de los aceites esenciales se identificaron por comparación de sus espectros de masas, obtenidos por GC-MS, y sus valores de índices de retención lineales (LRI) en ambas columnas, polar y apolar, calculados con base en la serie homóloga de n-alcanos C9-C25 (Sigma-Aldrich, Milwaukee, Wisconsin, EE. UU.) y se cotejaron con los valores correspondientes en bases de datos de espectros de masas diversas de NIST 2014 y Wiley 2008, así como con información de estudios científicos previos.

2.3.2. Condiciones de crecimiento y formación del *biofilm*

Para la formación del *biofilm* se empleó el medio de cultivo TSB enriquecido con glucosa al 2% (v/v), siguiendo el protocolo establecido por el grupo de investigación GIBIM, y reportado por (O'Toole, 2011) el cual se basó al propuesto por la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM), para lo cual se utilizó dos microplacas de fondo redondo de 24 pocillos el cual permitió la formación y crecimiento del *biofilm*, las microplacas contienen el medio de cultivo y la cepa bacteriana a condiciones de 37 °C. La microplaca se incubó durante 24 h sin agitación, lo cual permite la adherencia de las bacterias a la superficie. Adicionalmente, para los controles negativos se emplearon medios de cultivo con agua peptonada al 0.1% (p/v). Posteriormente a la incubación se eliminó el contenido líquido el cual representa las bacterias planctónicas, además se lavó tres veces con agua peptonada al 0.1% (p/v) para eliminar completamente las células en estado planctónico, seguido a esto, la microplaca se secó en un horno a 60°C durante 45 min. Se realizaron nueve replicas para el tratamiento y el control.

2.3.3. Evaluación de la formación de *biofilm*

La determinación de la actividad *anti-biofilm* para *S. aureus* se realizó por el método semicuantitativo de tinción con cristal violeta implementado por el grupo de investigación GIBIM. Para esto, se realizó un cultivo de *S. aureus* ATCC 43300 en 3 mL de medio TSB durante 12 h. Posteriormente, se realizó la preparación cultivo líquido suplementado al 2% (v/v) en glucosa. Seguidamente, se tomó 100 µL del cultivo y se agregaron en una microplaca de fondo redondo que contenía 100 µL de AE. La microplaca de 96 pocillos fue incubada a 37 °C por 24 h. Posteriormente, la microplaca se lavó tres veces con agua peptonada al 0.1% (p/v) con el objetivo

de remover las células planctónicas; luego se agregaron 200 μ L de cristal violeta al 0.4% (p/v) por 15 minutos, luego el cristal violeta se eliminó mediante 3 lavados con agua peptonada al 0.1% (p/v), y se agregaron 200 μ L de ácido acético al 30% (v/v). Seguidamente se cuantificó el *biofilm* midiendo la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas de Elisa (Biorad, imarck, Hercules, CA, USA). El porcentaje de inhibición de la formación de *biofilm* fue calculado por la ecuación:

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

$$PI = 100 - PF$$

Donde:

A_c = Absorbancia del control positivo

A_m = Absorbancia de la muestra

PF= Porcentaje de formación

PI= Porcentaje de inhibición

2.3.4. Extracción de metabolitos durante la formación del *biofilm*

El método que se empleó para la extracción de metabolitos se basó en el método de extracción con metanol frío realizado por (Schelli *et al.*, 2017b) con algunas modificaciones. Para la extracción de metabolitos primero se desprendió el *biofilm* de la microplaca fondo redondo, y se agregaron 500 μ L de agua peptonada al 0.1% (p/v), seguido de esto se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C, posteriormente se retiró el sobrenadante y se repitió el procedimiento una vez más. Mas adelante, se agregaron 500 μ L de metanol acuoso (MeOH) al 50% (v/v) y 500 μ L de acetonitrilo acuoso (ACN) al 50% (v/v). Luego, cada vial tanto del grupo control como muestras tratadas con el AE, se pasó por un sonicador (3 veces seguidas) con la configuración 10

seg ON y 45 seg OFF, seguidamente se centrifugó a 14000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. Posteriormente se tomó 150 µl del sobrenadante resultante que se depositó en un tubo Eppendorf para secar en un concentrador de vacío en el equipo Savant Speed Vac SPD120 (Thermo Fisher Scientific, Asheville, NC 28804, EE. UU.). Por último, la muestra seca se reconstituyó en 400 µL de metanol acuoso al 70% (v/v) y se almacenó a -80 °C hasta su análisis por UHPLC/HRMS.

2.3.5. Análisis por UHPLC/HRMS de los extractos metanólicos

El estudio se realizó bajo el enfoque metabolómico no dirigido con el fin de obtener un perfil metabolómico global. En este sentido, para el análisis de los metabolitos extraídos se empleó cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (UHPLC-ESI/Orbitrap-HRMS). El espectrómetro de masas de alta resolución usó como analizador el Orbitrap (Exactive Plus, Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, USA) empleado en modo Full MS Scan con una resolución de 70.000 m/m e interfaz de electrospray con calentamiento (HESI-II) el cual se operó en modo de adquisición de iones negativos y positivos a 350 °C, un voltaje capilar de +3500V y una temperatura de 320 °C. Los iones positivos se fragmentaron en la HCD (celda de disociación de colisiones activadas) a diferentes eV (20,30, 40 y 50) realizado en modo de escaneo escalonado (step-scan), de igual forma con los iones negativos. Para cada energía de colisión, se utilizó una resolución RFWHM de 35000. El espectrómetro de masas se acopló a un Dionex™ Ultimate™ 3000 UHPLC (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, EUA), que cuenta con un desgasificador (SRD-3400), una bomba de gradiente binario (HPG3400RS), un muestreador automático (WPS 300TRS) y una unidad termostataada para la columna (TCC 3000). Se utilizó como columna una columna Hypersil GOLD™ aQ (Thermo

Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, EUA; $100 \times 2,1$ mm, tamaño de partícula de $1,9 \mu\text{m}$) en condiciones de funcionamiento de 30°C .

La fase móvil consistió de ácido fórmico en agua al 0.2% (v/v) (A) y el ácido fórmico en acetonitrilo (ACN) al 0.2% (v/v) (B), cuyo flujo fue de $300 \mu\text{L}/\text{min}$ y volumen de inyección, $1 \mu\text{L}$. La condición de gradiente inicial se realizó de la siguiente manera: 100% A cambiando linealmente a 100% B en 8 min, mantenido constante durante 4 min, devuelto al 100% A en 1 min, y mantenido en equilibrio durante 3 min. Los espectros se tomaron en un rango de m/z 80-1000 Da.

2.3.6. Procesamiento de datos

Los datos obtenidos del espectrómetro de masas se convirtieron desde archivos Thermo raw a mzXML usando el software msconvert de Proteowizard 3.0 (<http://proteowizard.sourceforge.net/>; consultado el 20 de marzo de 2023) (Chambers *et al.*, 2012). Posteriormente, se empleó el software en línea XCMS 3.7.1 (<https://xcmsonline.scripps.edu/>; consultado el 6 de abril de 2023) (Tautenhahn *et al.*, 2012) el cual permitió realizar la deconvolución y alineación de los datos del control de calidad, de las muestras de control y las muestras de tratamiento. Asimismo, corregir el ruido de fondo, alineación de los tiempos de retención en los cromatogramas. La configuración para esto fue un análisis multigrupo en el modo centWave para la detección de características ($\Delta = 2.5$ 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 = 0.015 y bw = 5).

Con el software en línea XCMS 3.7.1 se realizaron 2 estudios multigrupo, donde se compararon las muestras de control calidad (QC), las muestras del tratamiento y las muestras del control para los modos de iones negativo y positivo. Los datos obtenidos se filtraron con base en el coeficiente variación igual o menor al 30% de las muestras control de calidad y se generó una matriz de datos con las intensidades de las características detectadas para cada modo de adquisición de iones. Posteriormente, los datos se analizaron en el software MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>; consultado el 13 de abril del 2023) (Pang *et al.*, 2021) donde se realizó un análisis estadístico uni y multivariado para cada conjunto de datos para el modo de adquisición de iones positivo y de iones negativo.

2.3.7. Identificación tentativa de metabolitos e integración de vías metabólicas.

La identificación de los posibles metabolitos se realizó comparando las relaciones m/z obtenidas con las reportadas por la base de datos, lo cual se realizó con ayuda del software online CEU mass mediator 3.0 (<http://ceumass.eps.uspceu.es/>) y con los datos espectrales reportados por la biblioteca MassBank (<https://massbank.eu/MassBank/>), HMDB (<https://hmdb.ca/>), Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) y el software online CFM-ID 4.0 ([CFM-ID \(wishartlab.com\)](http://cfmid.wishartlab.com/)) (consultado el 4 de mayo del 2023) (Wang *et al.*, 2021). La identificación consistió en la comparación de las relaciones (m/z) significativas junto con los tiempos de retención, con las reportadas en la literatura y en CEU Mass mediator. Este programa permite llevar la identificación hasta el nivel 3 según el sistema propuesto por la sociedad de metabolómica. Estos datos se filtraron con una toleración de 5 ppm y se tomaron en cuenta principalmente los aductos $[M+H]^+$ para el modo de iones positivos y $[M-H]^-$ para el modo de iones negativos. No obstante, se

contemplaron los aductos $[M+K]^+$, $[M+Na]^+$, $[(M+H)-H_2O]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+2H]^{2+}$, $[M+Cl]^-$, $[(M-H)-H_2O]^-$, $[(M+CH_3COOH)-H]^-$, $[M-2H]^{2-}$, en las situaciones donde no se pudo determinar metabolitos con los principales aductos.

La comparación se realizó con los datos de masa exacta con ayuda del programa Xcalibur. Por último, con MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>), se realizó un análisis de vías y enriquecimiento que, junto con KEGG (Enciclopedia de genes y genomas de Kioto) se reconstruyeron las vías metabólicas que fueron afectadas por la presencia del aceite esencial, durante la formación del *biofilm*. Se consideraron como significativas aquellas vías con un valor de p menor a 0.05. La identificación química en el presente estudio se reportó con un nivel 2 (según la iniciativa de estándares metabolómicos, MSI) (Sansone *et al.*, 2007), a través de comparación de los iones fragmentos de cada metabolito con los reportados en la literatura.

2.3.8. Análisis estadístico

Para el estudio, se realizó nueve replicas biológicas para el control y el tratamiento para analizar el efecto de *L. origanoides* en las rutas metabólicas de *S. aureus*. Se realizó un análisis estadístico uni y multivariado con el programa MetaboAnalyst 5.0. Para el análisis multivariado se realizó un análisis de componentes principales (PCA). Los datos empleados para el PCA fueron normalizados por suma, la normalización por suma permite ajustar los valores de un conjunto de datos, para que sean comparables en términos de sus proporciones relativas. Posteriormente se realizó un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), donde las relaciones masa-carga más significativas se examinaron utilizando el valor de la importancia de la variable

independiente en la proyección (VIP), siendo valores $VIP > 1.5$ tomados como significativos. Para el análisis univariado se realizó un análisis fold change (FC) para obtener una cuantificación relativa de los metabolitos. En el mismo sentido, se analizaron los datos a través de un gráfico volcán el cual permite relacionar la significancia estadística (valor P) frente a la magnitud de las veces de cambio (FC). Los resultados se complementaron con un análisis de mapa de calor (heatmap), con el fin de determinar patrones o grupos (clúster) y establecer la modulación positiva y negativa en el control y el tratamiento.

3. Resultados y discusión

3.1. Análisis metabólico del efecto del AE LOT-II sobre la formación del *biofilm* de *S. aureus*

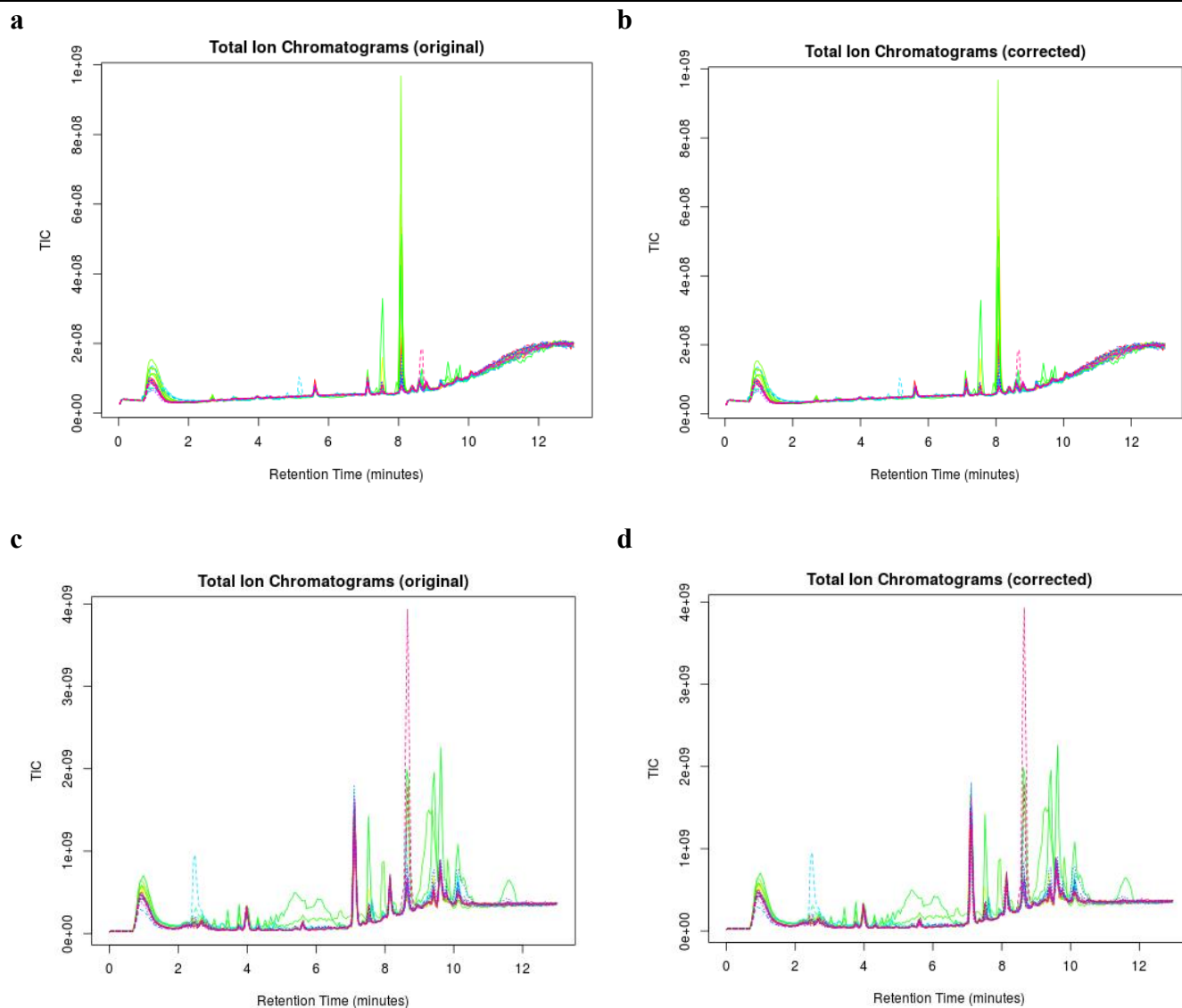
La elección de la concentración del Aceite Esencial (AE) *L. origanoides* para la extracción de metabolitos se fundamentó en los resultados experimentales sobre la evaluación de la formación de *biofilm*, obtenidos por Stefania Correa, estudiante de maestría en biología. En este sentido, se optó por una concentración de 125 $\mu\text{g/ml}$, la cual demostró una notable eficacia al inhibir el *biofilm* de *S. aureus*, alcanzando un porcentaje de inhibición del 86%.

3.1.1. Procesamiento de datos

Los datos obtenidos del UHPLC-ESI/Orbitrap-HRMS se procesaron en el software online XCMS, los resultados de software online XCMS permitieron obtener una matriz de datos de 2392 características de relación m/z (o *features*, que corresponden a posibles variables metabólicas) en modo de iones negativos y una matriz de datos 2458 características en modo de iones positivos.

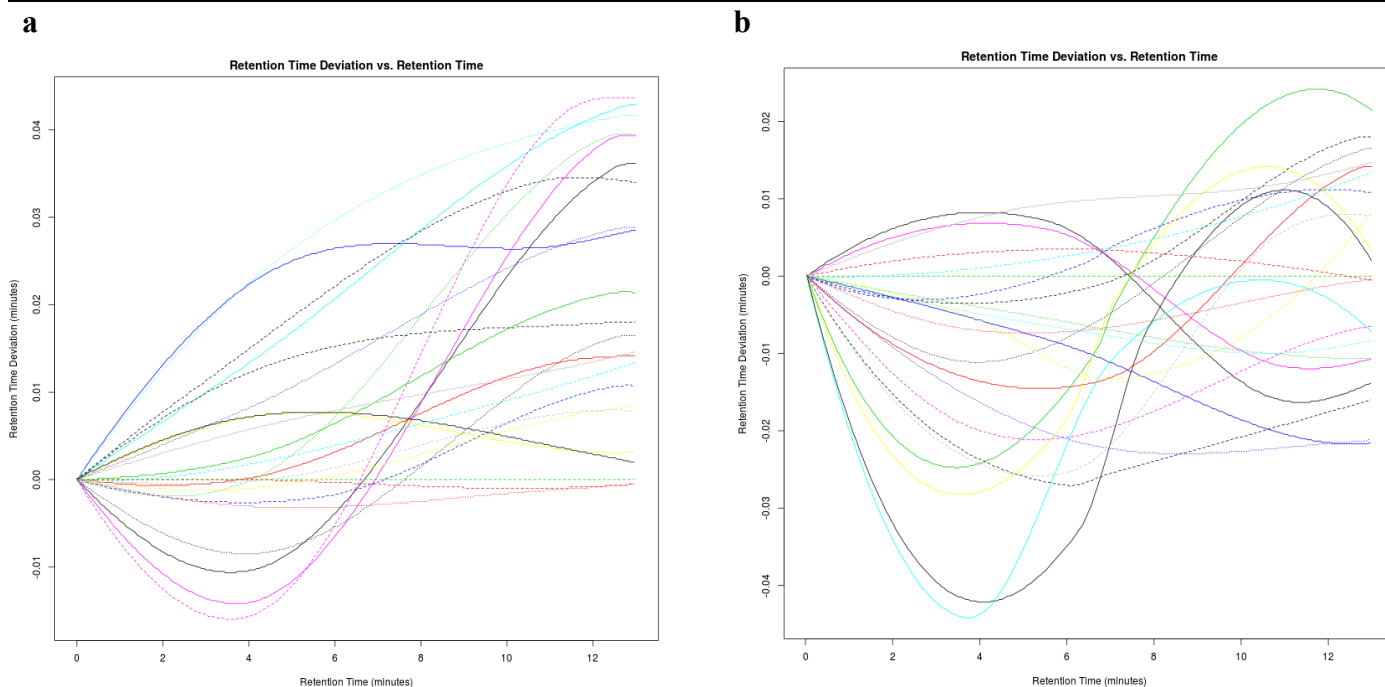
Esta herramienta permitió el alineamiento y la normalización de los cromatogramas de iones totales (TIC). El procesamiento de datos permitió obtener datos de alta calidad (obtención de datos significativos, datos comparables) para el posterior análisis estadístico. En líneas generales, se observó para cada estudio de multigrupo que el TIC original (Figura 3a, c) no mostró diferencias notorias con el TIC corregido (Figura 3b, d). Esto indica que las condiciones durante los análisis por cromatografía líquida fueron estables. Del mismo modo, como se muestra en la figura 4, la desviación en el tiempo de retención de los cromatogramas fue positiva para el estudio multigrupo en modo de adquisición de iones positivos y con un valor máximo de 0.04 (min) y, una desviación negativa para el modo de adquisición de iones negativo con un valor de máximo -0.04 (min). Los tiempos de desviación positivo implican que los compuestos dentro de una muestra están eluyendo de la columna cromatográfica más lento que el tiempo de retención medio y una desviación negativa implica que los compuestos dentro de una muestra están eluyendo más rápido que el tiempo de retención medio. Esto indica que los resultados son fiables y que las condiciones durante la ejecución de la cromatografía se mantuvieron estables.

Figura 3. Cromatograma de iones totales original y corregido para cada modo de adquisición de iones.



Nota. Para el modo de adquisición de iones negativos, (a) cromatogramas de iones totales, (b) cromatograma de iones totales corregido. Para modo de adquisición de iones positivos, (c) cromatogramas de iones totales, (d) cromatograma de iones totales corregido.

Figura 4. Desviación del tiempo de retención vs el tiempo de retención para cada modo de adquisición de iones.



Nota. (a) para el modo de adquisición de iones positivo, (b) para el modo de adquisición de iones negativo.

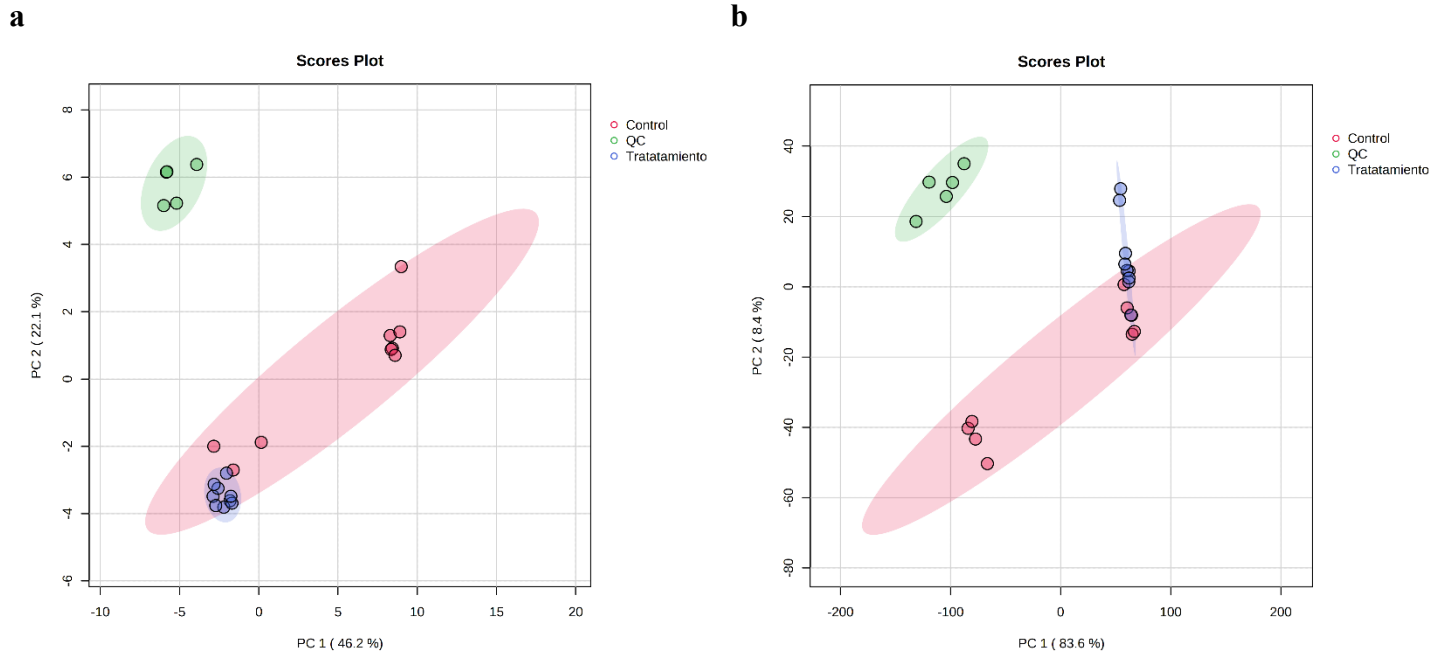
3.1.2. Validación del método analítico con las muestras de control de calidad (QC)

La evaluación de los estudios multigrupos con las muestras de control de calidad permitió comprobar la precisión del método analítico. Estas muestras de control de calidad son de importancia, dado que permiten garantizar que los resultados de los análisis posteriores sean significativos y consistentes. En ese contexto, del procesamiento de las matrices de datos originales, se obtuvieron dos matrices nuevas con 1215 características (o *features* correspondientes a las variables metabólicas) en modo de iones negativos y 1392 características en modo de iones positivos. Posteriormente, para verificar la validación del método se visualizó el comportamiento

de las muestras tratamiento, control y las de control de calidad en un análisis por componentes principales (PCA) (Figura 5).

Los análisis multigrupos permitieron establecer que el modelo estadístico aplicado es válido en todas las muestras analizadas, puesto que, al comparar las muestras del grupo control, grupo tratamiento y las muestras del control de calidad, se pudo establecer que las diferencias observadas se deben principalmente a un cambio en el perfil biológico y no variables aleatorias o instrumentales. De los diagramas PCA para ambos modos de adquisición en iones positivos (Figura 5a) y negativos (Figura 5b) se puede observar que las muestras de QC se encuentran agrupadas entre sí y que, además, se evidencia que estas no se encuentran superpuestas con las muestras de estudio (control y tratamiento). Los diagramas PCA muestran una varianza explicada de los dos componentes principales (PC1 y PC2) del 68.3 % para el modo de adquisición en iones positivo y 92% para el modo de adquisición en iones negativo. Los resultados obtenidos del estudio de las muestras de control de calidad (QC) indican que las diferencias biológicas determinadas en las muestras control vs tratamiento se deben principalmente a cambios en los perfiles metabólicos y no, a errores técnicos de reproducibilidad de los datos analíticos.

Figura 5. Diagrama PCA multigrupo de muestras control, muestras tratamiento y muestras de control de calidad, (a) modo de iones positivos, (b) modo de iones negativos.



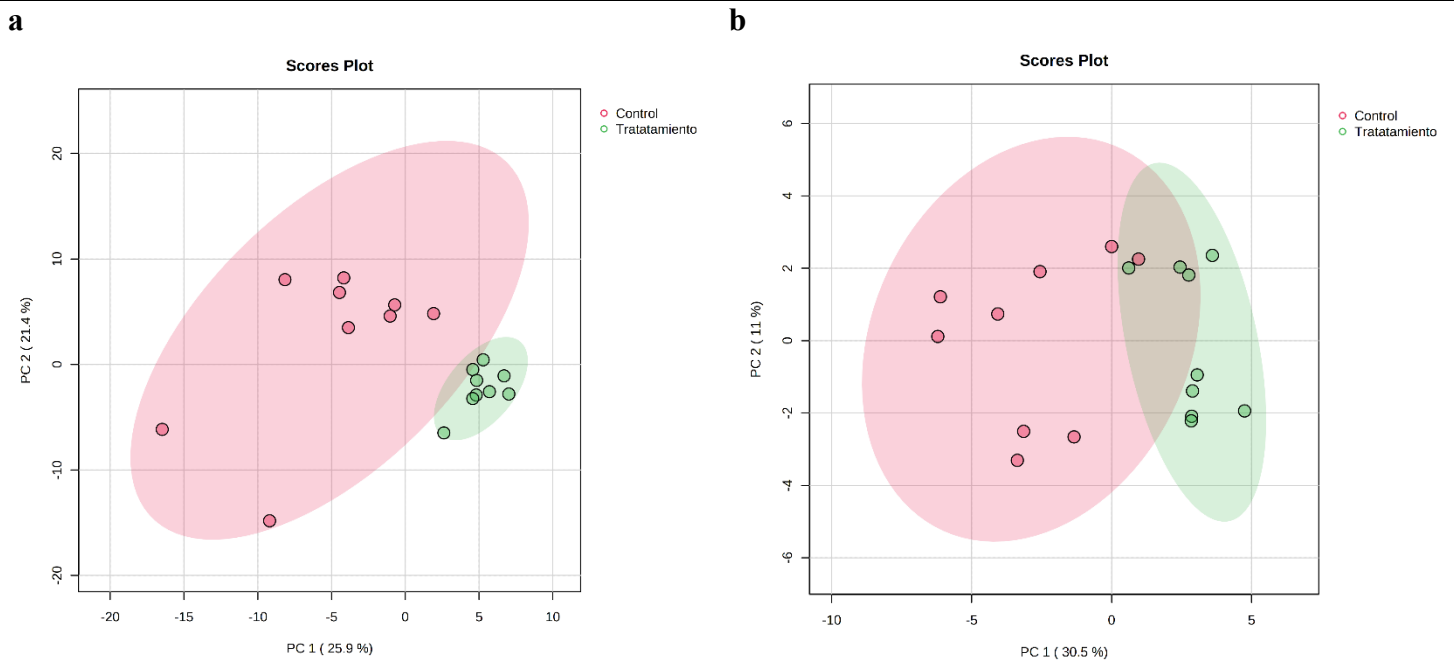
Nota. Las muestras de control se evidencian en color rojo, las muestras de tratamiento en color azul y las muestras de control de calidad (QC) en color verde.

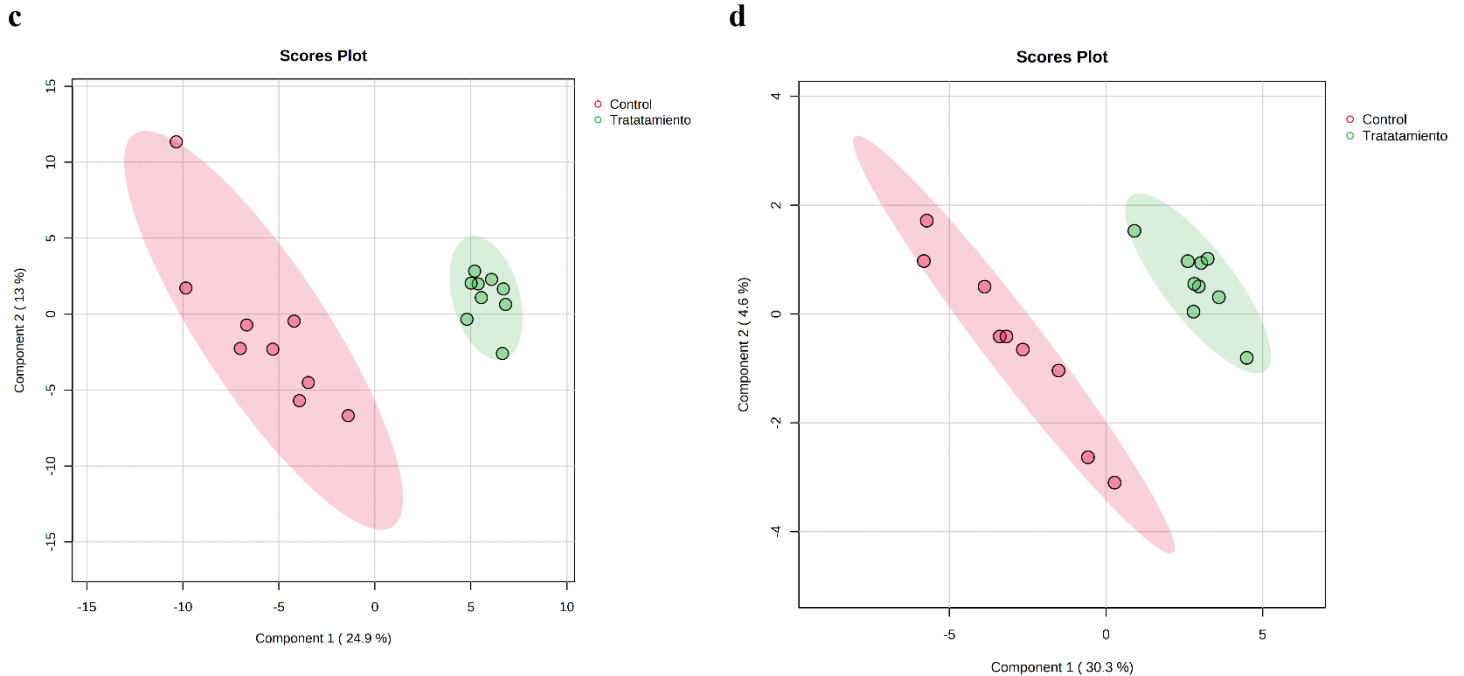
3.1.3. Análisis estadísticos uni- y multivariados

Los análisis multivariados permiten establecer relaciones que pueden existir entre un conjunto de datos, estas técnicas estadísticas permiten el análisis simultáneo de dos o más características. Con el fin de reducir la dimensionalidad y comparar las células sésiles no tratadas (control) y las células sésiles tratadas con el AE (tratamiento) para ambos modos de adquisición, se elaboró los gráficos de análisis de componentes principales PCA (Figura 6 a,b). Para el modo de iones positivos el PC 1 muestra una varianza explicada de 25.9% y PC 2 21.4%, y para el modo de iones negativos un PC 1 de 30.5% y un PC 2 un 11%. Para una mejor clasificación y discriminación de los datos se realizó el diagrama PLS-DA para ambos modos de adquisición. Esto con el objetivo de maximizar la covarianza entre las variables independientes y la variable

dependiente, y de esta manera observar diferencias entre los dos grupos (control y tratamiento) (Figura 6c, d). Los parámetros R^2 y Q^2 para el modo de adquisición de iones positivo mostró valores (0.99 y 0.80), y para el modo de iones negativo valores (0.99 y 0.69), respectivamente. Los valores de Q^2 se encuentran dentro del límite aceptable ($Q^2 > 0.5$) para evaluar la calidad del modelo en estudios metabolómicos, según lo mencionan varios autores (Szymańska *et al.*, 2012; Triba *et al.*, 2015). Los datos empleados para el PCA y PLS-DA fueron normalizados por suma. Estos resultados sugieren un buen ajuste del modelo, confiabilidad y predictibilidad de los datos. De igual forma, sugieren que realmente hay un efecto significativo del AE LOT-II sobre el metabolismo durante la formación del *biofilm* de *S. aureus*.

Figura 6. Análisis multivariado (PCA y PLS-DA) en modo de iones negativos y positivos para *S. aureus* durante la formación del *biofilm*.



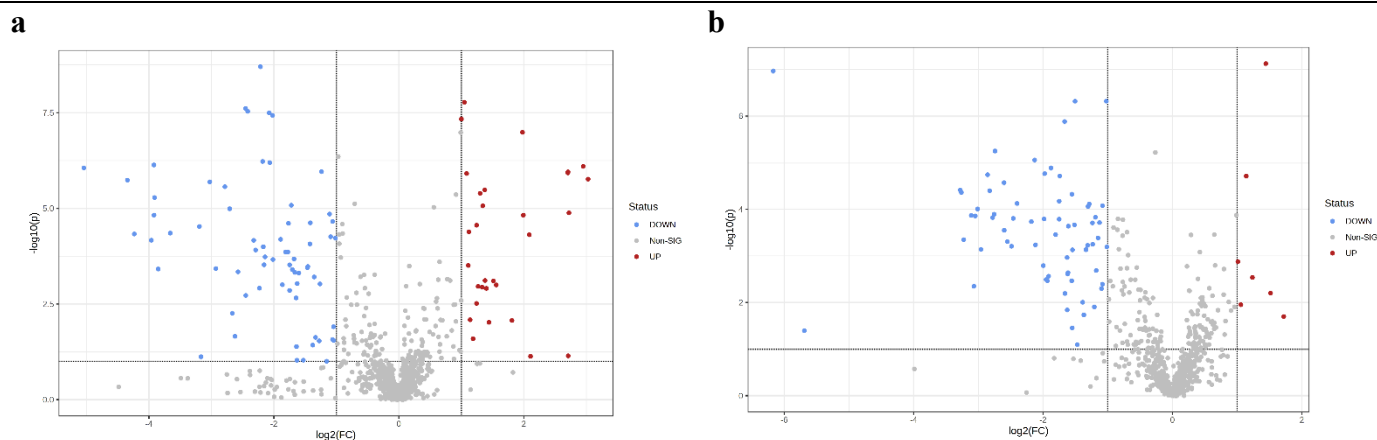


Nota. Representación de los diferentes perfiles metabólicos con y sin tratamiento con el aceite esencial *L. organoides* LOT II. (a y b) PCA en modo de iones positivo y negativo, respectivamente. (c y d) PLS-DA en modo de iones positivo y negativo, respectivamente. Control (color rojo) y tratamiento (color verde).

Los análisis univariados permiten comprender la distribución y las características de una variable específica. El análisis univariado volcano plot permite evaluar la diferencia relativa en la expresión entre dos condiciones o dos grupos, como el tratamiento de un fármaco versus el control, el volcano plot relaciona el valor p (p -value) y el valor Fold Change (FC), donde el valor p mide la significancia estadística y el valor FC la expresión de una característica. En la Figura 7 se representan los gráficos de volcán plot para ambos modos de adquisición, donde en la parte derecha encontramos aquellas variables metabólicas (características) del tratamiento que han sido moduladas positivamente (color rojo) y en la parte izquierda aquellas características moduladas negativamente (color azul). Del mismo modo, aquellas variables ubicadas en la parte superior

presentan un valor de p menor y, por tanto, son estadísticamente significativas. En ese contexto, observamos que la mayor parte del conjunto de características se encuentran modulado negativamente.

Figura 7. Análisis univariado Volcano Plot para cada modo de adquisición de iones.



Nota. Modos de adquisición de iones positivos (a) y negativo (b) de células sésiles. (tratamiento/control).

3.1.4. Identificación tentativa de metabolitos

La identificación tentativa de metabolitos se realizó de acuerdo con la importancia de las variables de proyección (VIP), con relaciones m/z estadísticamente significativos con $VIP > 1.5$. La identificación se realizó mediante el software CEU Mass mediator. Este programa permite llevar la identificación hasta el nivel 3 según el sistema propuesto por la sociedad de metabolómica. Para la identificación tentativa nivel 2, se tomaron los metabolitos encontrados en el nivel de identificación 3 y se compararon usando datos de la literatura de espectros de fragmentación (software online CFM-ID 4.0) con los obtenidos experimentalmente (Tabla 3, Tabla S2, Tabla S1).

Esta búsqueda permitió identificar tentativamente 52 metabolitos en el modo de iones positivo y 10 metabolitos en el modo de iones negativo. Entre los metabolitos identificados tentativamente se identificaron 27 metabolitos modulados positivamente y 35 metabolitos modulados negativamente para un total de 62 metabolitos alterados por efecto del tratamiento con el AE de *L. origanoides* (Tabla 3).

Tabla 3. Metabolitos identificados tentativamente de células sésiles tratadas con el AE LOT-II para *S. aureus*.

Metabolito identificado	Fórmula Química	Aducto	<i>m/z</i>	Δ ppm	<i>t_R</i> (min)	MA	M
1-metoxifenantreno	C ₁₅ H ₁₂ O	[M+NH ₄] ⁺	226.1224	3.28	7.04	+	↑
1-fenil-2-hexanona	C ₁₂ H ₁₆ O	[M+H] ⁺	177.1273	3.45	9.21	+	↑
Ácido L-argininosuccínico	C ₁₀ H ₁₈ N ₄ O ₆	[M+H] ⁺	291.1294	3.57	0.94	+	↑
Fenilacetaldehído	C ₈ H ₈ O	[M+H] ⁺	121.0650	3.15	9.21	+	↑
L-valina	C ₅ H ₁₁ NO ₂	[M+H] ⁺	118.0864	3.50	0.94	+	↑
Estearamida	C ₁₈ H ₃₇ NO	[M+H] ⁺	284.2945	2.97	9.66	+	↑
Urato-3-ribonucleósido	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₇	[M+H] ⁺	301.0793	2.78	1.58	+	↑
Ácido 11-amino-undecanoico	C ₁₁ H ₂₃ NO ₂	[M+H] ⁺	202.1800	3.27	1.79	+	↓
Ácido 5-amino-pentanoico	C ₅ H ₁₁ NO ₂	[M+Na] ⁺	140.0682	4.13	0.94	+	↓
Glicerol	C ₃ H ₈ O ₃	[M+Na] ⁺	115.0369	1.94	0.94	+	↓
2-(3-fenilpropil) piridina	C ₁₄ H ₁₅ N	[M+H] ⁺	198.1276	3.17	4.74	+	↑
Dodecanamida	C ₁₂ H ₂₅ NO	[M+H] ⁺	200.2008	3.13	8.29	+	↓
Pipericina	C ₂₂ H ₄₁ NO	[M+H] ⁺	336.3257	2.77	9.87	+	↑
Creatina	C ₄ H ₉ N ₃ O ₂	[M+H] ⁺	132.0768	3.65	11.19	+	↑
MG(i-18:0/0:0/0:0)	C ₂₁ H ₄₂ O ₄	[M+Na] ⁺	381.2970	2.72	9.76	+	↑
Ácido fenilacético	C ₈ H ₈ O ₂	[M+NH ₄] ⁺	154.0862	3.88	2.97	+	↓
D-glucosamina	C ₆ H ₁₃ NO ₅	[M+H] ⁺	180.0865	3.88	0.94	+	↓

Armillarina	C ₂₄ H ₃₀ O ₆	[M+H] ⁺	415.2110	2.58	7.62	+	↓
Ácido L-glutámico	C ₅ H ₉ NO ₄	[M+Na] ⁺	170.0422	4.04	0.89	+	↓
Espermidina	C ₇ H ₁₉ N ₃	[M+H] ⁺	146.1651	3.95	1.25	+	↓
Ácido fenilglioxílico	C ₈ H ₆ O ₃	[M+H] ⁺	151.0389	3.89	4.14	+	↑
Fosfocreatina	C ₄ H ₁₀ N ₃ O ₅ P	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	194.032	2.38	0.81	+	↓
Linoleamida	C ₁₈ H ₃₃ NO	[M+H] ⁺	280.2632	3.03	9.16	+	↓
Isopropilmaleato	C ₇ H ₁₀ O ₄	[M+H] ⁺	159.0651	3.68	4.68	+	↓
Ácido 9,10-epoxiesteárico	C ₁₈ H ₃₄ O ₃	[M+Na] ⁺	321.2398	2.30	8.78	+	↓
Fosfoserina	C ₃ H ₈ NO ₆ P	[M+Na] ⁺	207.9981	2.84	0.89	+	↓
Dihidrouracilo	C ₄ H ₆ N ₂ O ₂	[M+NH ₄] ⁺	132.0768	3.67	10.37	+	↓
N-butiril-L-homoserina lactona	C ₈ H ₁₃ NO ₃	[M+H] ⁺	172.0967	3.66	2.52	+	↓
7-hexadecenal	C ₁₆ H ₃₀ O	[M+H] ⁺	239.2367	3.14	9.41	+	↑
MG(16:0/0:0/0:0)	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	[M+H] ⁺	331.2839	2.72	9.41	+	↑
Ácido 10-oxo-nonadecanoico	C ₁₉ H ₃₆ O ₃	[M+H] ⁺	313.2733	2.94	9.41	+	↑
Ácido α-linolénico	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	[M+H] ⁺	279.2315	3.12	8.61	+	↓
Pantotenato	C ₉ H ₁₇ NO ₅	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	202.1073	3.23	2.86	+	↑
Ácido 5-oxo-heneicosanoico	C ₂₁ H ₄₀ O ₃	[M+H] ⁺	341.3046	2.78	9.21	+	↓
Ácido linoleil hidroxámico	C ₁₈ H ₃₃ NO ₂	[M+H] ⁺	296.2580	3.08	8.30	+	↓
Ácido 3-hidroxifenilacético	C ₈ H ₈ O ₃	[M+NH ₄] ⁺	170.0811	3.47	2.86	+	↑
1-metilpirrolinio	C ₅ H ₁₀ N	[M+Na] ⁺	107.0706	5.00	12.66	+	↓
Ser Arg Tyr	C ₁₈ H ₂₈ N ₆ O ₆	[M+H] ⁺	425.2140	1.93	8.62	+	↓
Pro Lys Asn	C ₁₅ H ₂₇ N ₅ O ₅	[M+H] ⁺	358.2078	3.53	0.99	+	↓
Ácido 2,4,12-octadecatrienoico isobutilamida	C ₂₂ H ₃₉ NO	[M+H] ⁺	334.3102	2.51	9.66	+	↑
CDP-ribitol	C ₁₄ H ₂₅ N ₃ O ₁₅ P ₂	[M+Na] ⁺	560.0643	2.71	0.89	+	↓
10-dodecen-1-ol	C ₁₂ H ₂₄ O	[M+NH ₄] ⁺	202.2164	3.42	6.87	+	↑
Dehidrofitoesfingosina	C ₁₈ H ₃₇ NO ₃	[M+H] ⁺	316.2843	2.87	8.75	+	↑

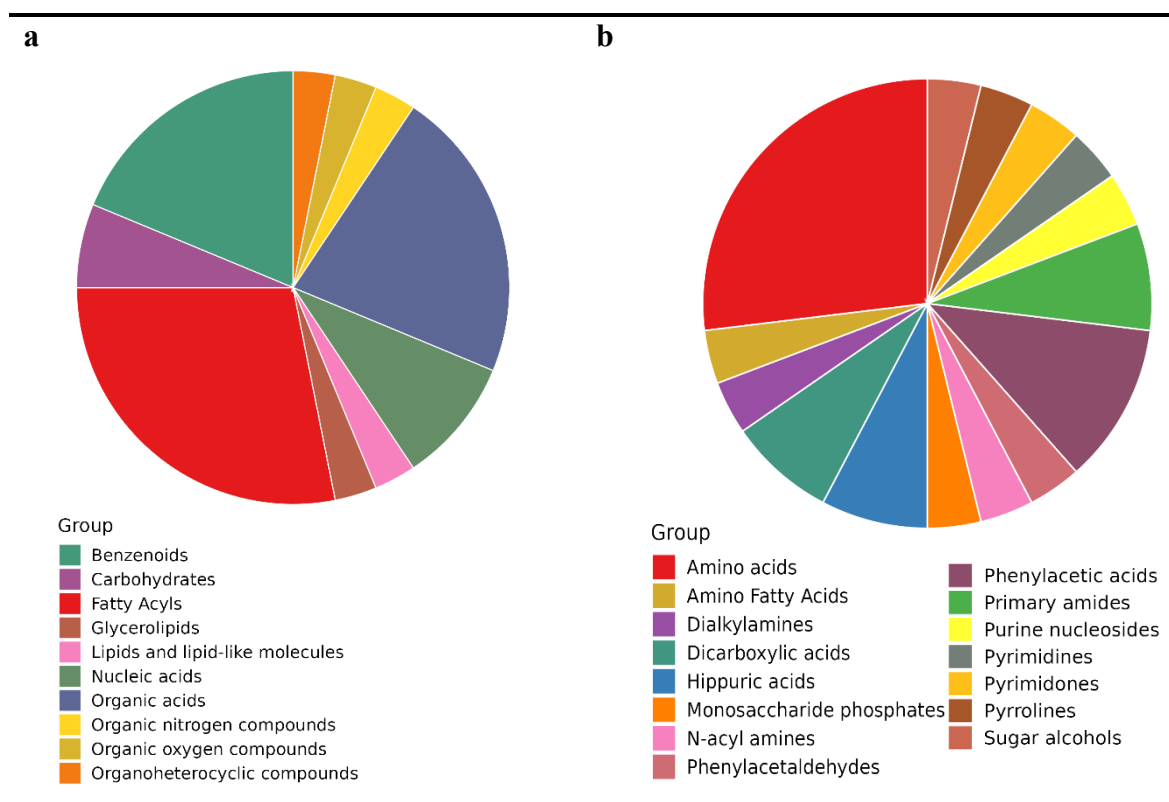
Ácido fosfohidroxipirúvico	C ₃ H ₅ O ₇ P	[M+2H] ⁺⁺	92.9961	4.06	0.11	+	↓
L-homofenilalanina	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	[M+H] ⁺	180.1018	3.49	3.75	+	↓
3-oxo-3-fenilpropanoato	C ₉ H ₈ O ₃	[M+Na] ⁺	165.0546	3.54	7.38	+	↓
L-lisina	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	129.1023	3.91	4.03	+	↓
Fosfato de N-metiletanolamina	C ₃ H ₁₀ NO ₄ P	[M+H] ⁺	156.0421	3.29	0.94	+	↓
Citosina	C ₄ H ₅ N ₃ O	[M+H] ⁺	112.0508	2.67	1.52	+	↑
3-hidroxibenzaldehído	C ₇ H ₆ O ₂	[M+H] ⁺	123.0442	3.34	7.38	+	↓
sn-glicero-3-fosfocolina	C ₈ H ₂₁ NO ₆ P	[M+2H] ⁺⁺	130.0629	1.75	0.89	+	↑
L-histidina	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	[M+H] ⁺	156.0766	4.19	0.89	+	↑
Ácido N-carbamoilglutámico	C ₆ H ₁₀ N ₂ O ₅	[(M-H)-H ₂ O] ⁻	171.0400	3.39	0.97	-	↓
Ácido octadecanedioico	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	[M-H] ⁻	313.2377	0.46	8.02	-	↓
Arg Arg Met	C ₁₇ H ₃₅ N ₉ O ₄ S	[M+Cl] ⁻	496.2240	3.84	10.84	-	↑
Ácido 3-oxohexadecanoico	C ₁₇ H ₃₂ O ₃	[(M+HCOO H)-H] ⁻	329.2326	0.75	7.19	-	↓
Oxaloglutarato	C ₇ H ₈ O ₇	[M-H] ⁻	203.0197	2.56	0.87	-	↓
Ácido 12-hidroxiestearico	C ₁₈ H ₃₆ O ₃	[M-H] ⁻	299.2585	0.56	8.92	-	↓
4-fosfopantoato	C ₆ H ₁₃ O ₇ P	[M-H] ⁻	227.0317	1.47	1.02	-	↓
Ácido 6-fosfogluconico	C ₆ H ₁₃ O ₁₀ P	[M-H] ⁻	275.0167	0.29	0.92	-	↑
Ácido 10-oxo-11-octadecenoico	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	[M-H] ⁻	295.2270	1.03	8.55	-	↓
Trp Arg Val	C ₂₂ H ₃₃ N ₇ O ₄	[M+Cl] ⁻	494.2276	1.27	9.94	-	↑

Nota. t_R: Tiempo de retención, MA: modo de adquisición de iones, M: modulación de metabolitos en el tratamiento.

Los metabolitos tentativamente identificados se pueden clasificar principalmente en la super clase como ácidos orgánicos, ácidos grasos y benzenoides (Figura 8). Estos se clasifican químicamente en la subclase como aminoácidos, dipéptidos, ácidos fenilpirúvicos derivados,

hidroxibenzaldehidos, pirrolinas, guanidinas, ácidos hipúricos, hidrocarburos alifáticos insaturados, entre otros (Figura 8). Como se observa en la clasificación estructural los metabolitos tentativamente en su mayoría son de carácter lipídico, entre los que destacan, el ácido linoleil hidroxámico, sn-glicero3-fosfocolina, glicerol y demás. El glicerol es un metabolito de importancia para la obtención de energía. Además, se ha relacionado con los ácidos teicoicos, los cuales están involucrados en la formación del *biofilm* de *S. aureus* (Gholami *et al.*, 2019); el metabolito sn-glicero3-fosfocolina es un fosfolípido de membrana de bacterias Grampositivas, este constituyente es de importancia para la estructura bacteriana de *S. aureus* (Gholami *et al.*, 2019; Mijiddorj *et al.*, 2019).

Figura 8. Clasificación química estructural de los metabolitos tentativamente identificado.



Nota. (a) Super clase (b) Subclase.

Siguiendo esta línea de pensamiento, al observar la Figura (8b), se nota que los aminoácidos y los péptidos constituyen una parte significativa de los metabolitos identificados de manera tentativa. El metabolismo de aminoácidos según lo mencionan (Rahman *et al.*, 2022) contribuye como fuente de energía durante la formación del *biofilm*. No obstante, este también permite que el microorganismo se adapte a las condiciones del entorno, incluyendo disponibilidad de nutriente y equilibrio redox. En esta categoría, cabe resaltar el ácido L-argininosuccínico el cual es precursor del fumarato en la vía del ácido tricarboxílico, este es un metabolito relacionado con la biosíntesis de la arginina. El metabolismo y biosíntesis de arginina juegan un papel importante en la síntesis de adhesina intercelular polisacárido, la cual está involucrado principalmente con la formación de *biofilm* (Zhu *et al.*, 2007).

La modulación de los metabolitos relacionados con la formación del *biofilm* de *S. aureus* se observa en la Figura 9. El Hierarchical Clustering Heatmaps es una representación visual donde se destacan las intensidades relativas o concentraciones de las réplicas de dos o más conjunto de datos. Estos resultados muestran que 39 metabolitos en el tratamiento se encuentran modulados negativamente, entre los que destacan la fosfocreatina, dihidrouracilo, y el ácido L-glutámico. Este comportamiento se observa en los diagramas de caja de la Figura (10a, b, c). Del mismo modo, se observan 34 metabolitos en el tratamiento modulados positivamente, entre los que se destacan el ácido 6-fosfogluconico, L-valina, y el ácido L-argininosuccínico cuyos diagramas de caja se muestran en la Figura (10 d, e, f).

Los diagramas de cajas y bigotes son una representación graficas de la dispersión de los datos y de los valores atípicos, la caja representa el rango intercuartil (IQR) y los bigotes

representan los valores mínimos y máximos que no se consideran valores atípicos. En ese contexto, observamos, que el dihidrouracilo y la fosfocreatina presentan una mayor dispersión en el control, además de una distribución asimétrica, en contraste en el tratamiento, que presentan una menor distribución y más simetría.

Figura 9. Hierarchical Clustering Heatmaps de los metabolitos más representativos afectados en células sésiles después del tratamiento con el AE LOT-II.

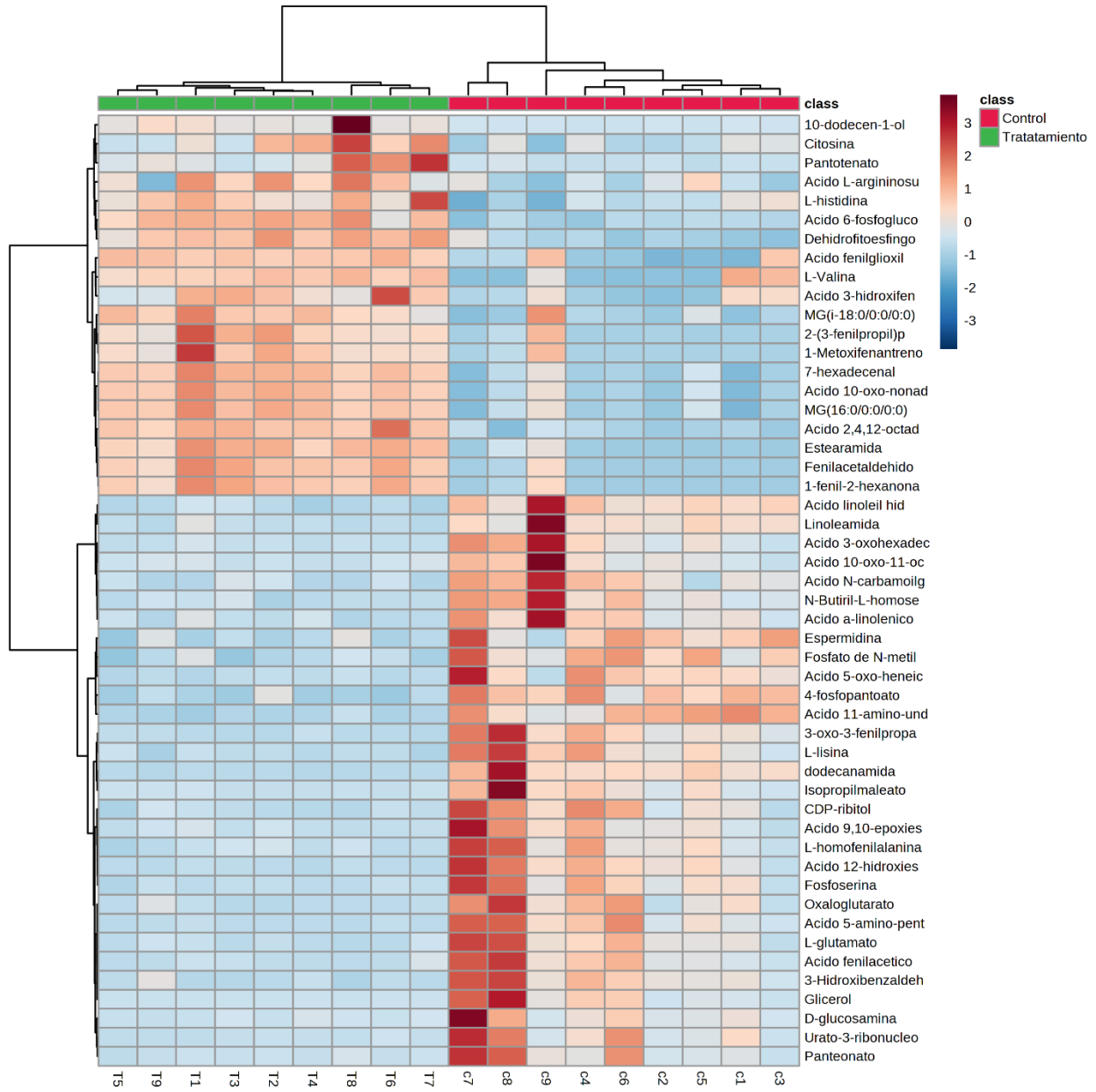
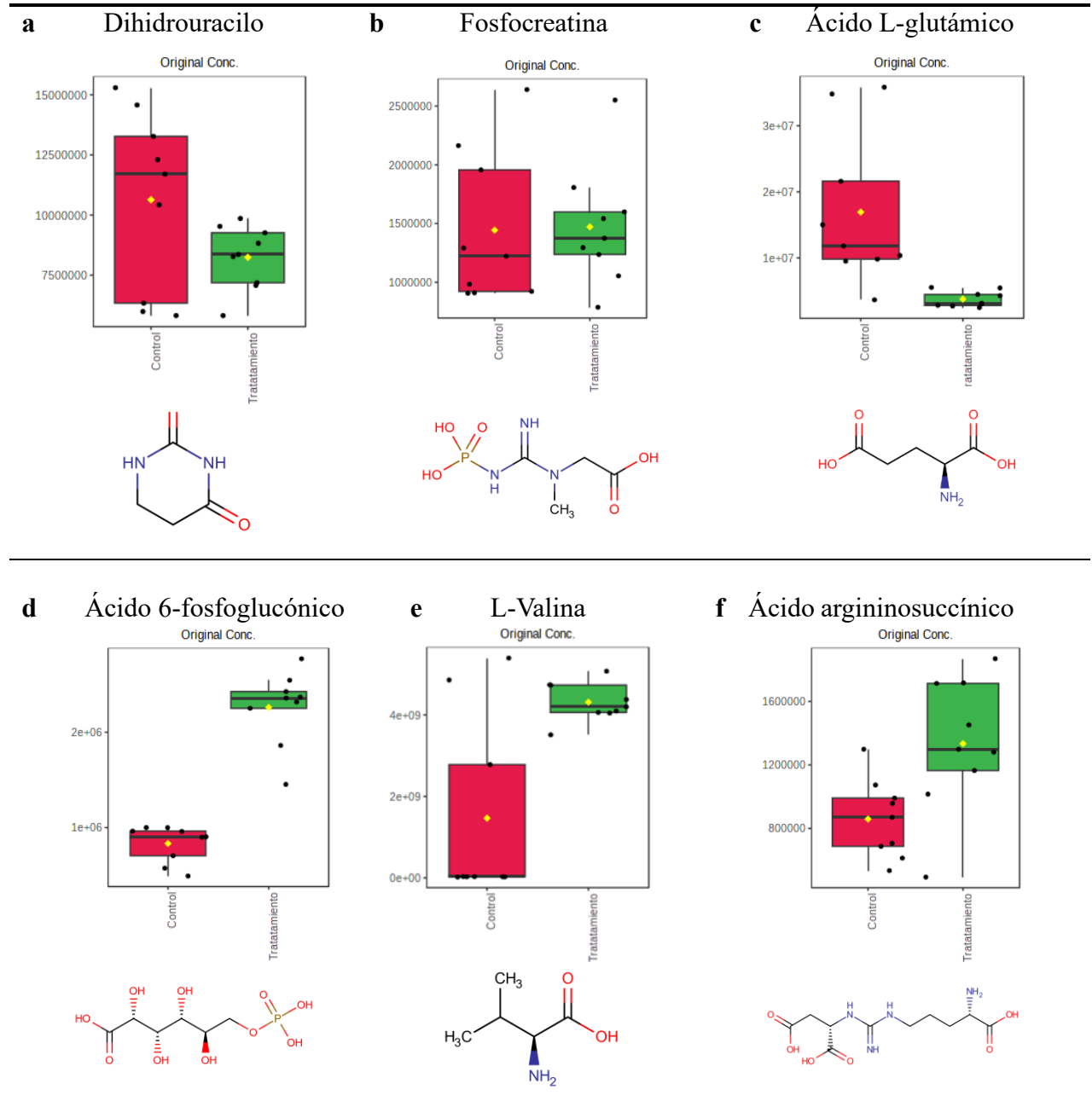


Figura 10. Diagrama de cajas y bigotes de algunos metabolitos representativos.



Nota. (a, b, c) metabolitos modulados negativamente, (d, e, f) metabolitos modulados positivamente.

3.1.5. Integración de vías metabólicas afectadas por el AE LOT-II sobre células sésiles de *S. aureus*.

El estudio del enriquecimiento de vías metabólicas proporcionó una visión más profunda de cómo el AE LTC-II afecta la formación del *biofilm* de *S. aureus*. Se identificaron un total de 9 vías metabólicas que se vieron significativamente influenciadas por este efecto (Tabla 4). Este análisis de vías metabólicas se llevó a cabo mediante la evaluación de metabolitos que mostraron diferencias significativas entre el grupo de control y el grupo de tratamiento, con un valor de $p < 0.05$, lo que resalta la relevancia de estas alteraciones en la respuesta biológica (Figura 11). Entre las vías metabólicas que destacan se encuentra, la biosíntesis de pantotenato y CoA, Metabolismo de arginina y prolina y el metabolismo de la fenilalanina. El pantotenato y la coenzima A (CoA), son componentes de importancia en varias vías metabólicas, la biosíntesis de estos es esencial para el crecimiento y supervivencia de la bacteria, por lo que un impacto en esta vía metabólica presenta una alteración en el metabolismo general de *S. aureus* (Khanppnavar *et al.*, 2019a; Liu *et al.*, 2014)

Tabla 4. Clasificación de metabolitos tentativamente identificados según el análisis de enriquecimientos de las vías KEEG.

Vías metabólicas	Total	Hits	Valor p	Metabolitos identificados
Metabolismo de arginina y prolina	38	4	9.47×10^{-4}	Creatina, espermidina, ácido L-glutámico, fosfocreatina
Biosíntesis de pantotenato y CoA	19	4	0.00137	Ácido pantoténico, dihidrouracilo, L-valina, pantotenato
Metabolismo de la β - alanina	21	3	0.00186	Dihidrouracilo, L-histidina, espermidina

Biosíntesis de aminoacil-ARNt	48	4	0.00231	L-histidina, L-valina L-lisina, ácido L-glutámico
Metabolismo de la fenilalanina	10	2	0.00615	Fenilacetaldehído, Ácido fenilacético
Biosíntesis de arginina	14	2	0.0121	Ácido L-glutámico ácido L-argininosuccínico
Metabolismo de histidina	16	2	0.0157	Ácido L-glutámico, L-histidina
Metabolismo de alanina, aspartato y glutamato.	28	2	0.0453	Ácido L-argininosuccínico, Ácido L-glutámico
Metabolismo del glutatión	28	2	0.0453	Ácido L-glutámico, espermidina

Figura 11. Análisis de enriquecimiento de los metabolitos significativos en el tratamiento que fueron modulados por el AE LOT-II en células de sésiles de *S. aureus*.

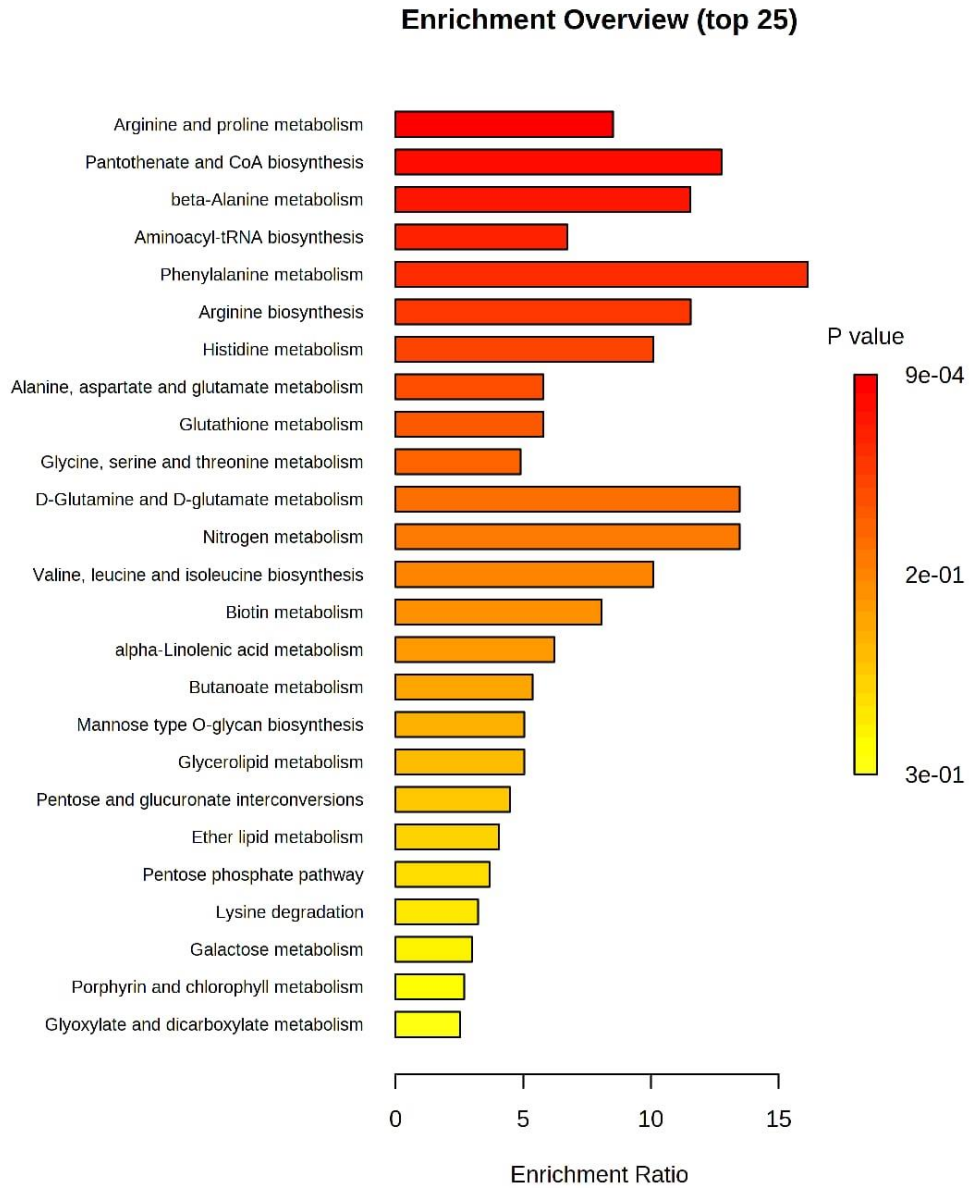
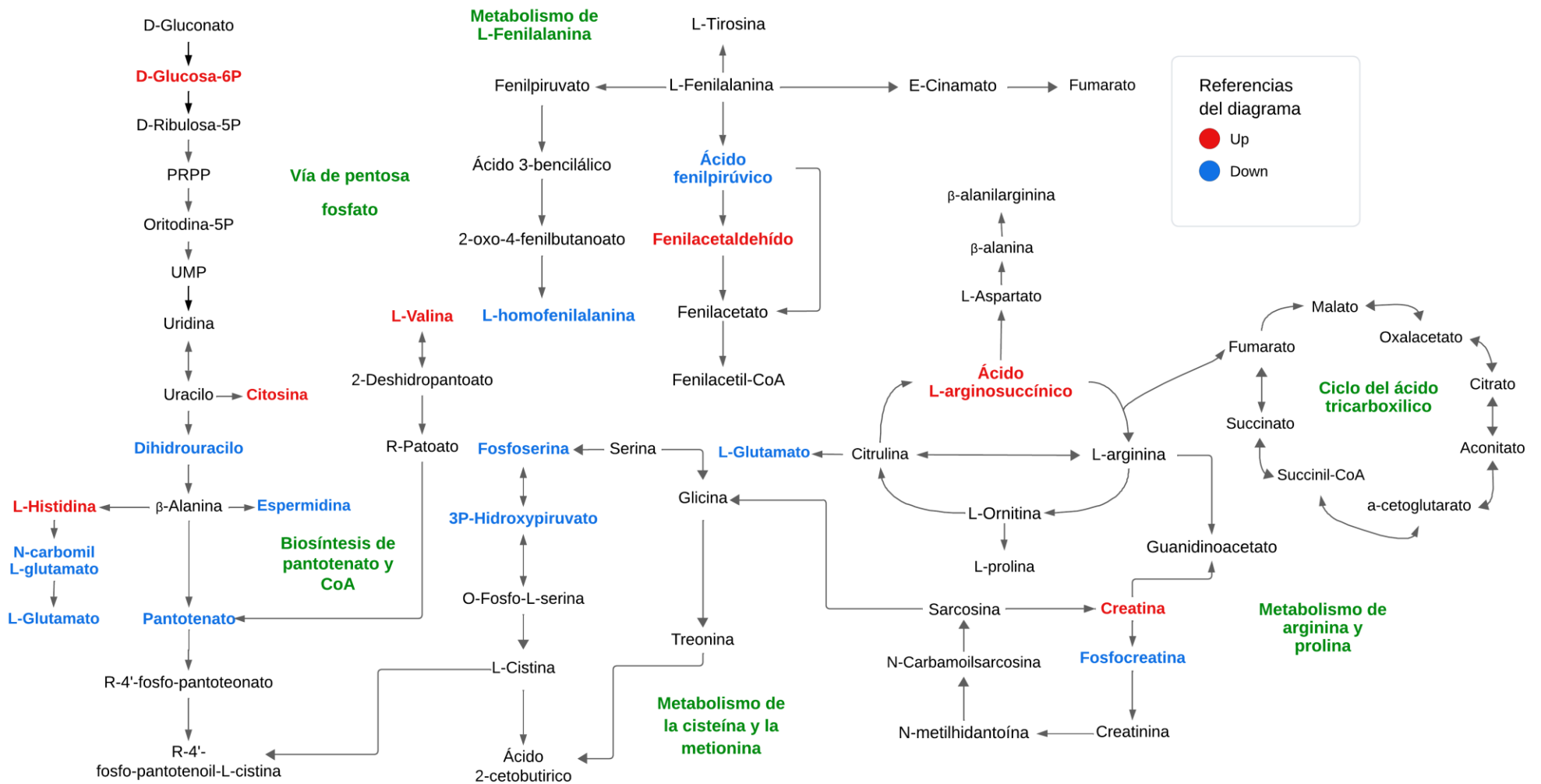


Figura 12. Esquema general de las principales vías metabólicas afectadas por el AE LOT-II sobre la formación del *biofilm* de *S. aureus*.



El aceite esencial LOT II probado en este estudio presentó un efecto inhibitorio contra la formación del *biofilm* de *S. aureus* ATCC 43300 según los resultados obtenidos por la estudiante de maestría en biología Stefania Correa, en el proyecto Macro de Colombia científica, donde a con una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ del AE inhibe más del 70% del *biofilm* (Tabla S3). Resultados similares fueron reportados por otros estudios llevados a cabo en el grupo de investigación GIBIM, donde se observó que el aceite esencial LTC II presentó sobre la formación de *biofilm* de *S. aureus* ATCC 29213 un efecto inhibitorio. Esto sugiere, que también existe una disminución en la densidad del *biofilm* tratado con el AE (Martínez *et al.*, 2021). Estudios previos han demostrado que los AE están relacionados con la inhibición de la matriz extracelular, que desempeña un papel crucial en la fase inicial de la formación del *biofilm*, ya que mejora la adhesión celular a la superficie (Guillín *et al.*, 2023). Además, se ha demostrado que los AE pueden inhibir la comunicación celular, lo que dificulta la formación del *biofilm* (Bouyahya *et al.*, 2019a; Kim *et al.*, 2017). Un posible mecanismo de acción del AE sobre la formación del *biofilm* involucra la inhibición de adhesinas y proteínas extracelulares. Las adhesinas son de importancias en las primeras etapas de la formación del *biofilm* ya que permiten a *S. aureus* unirse a superficies bióticas o abióticas. Por otro lado, las proteínas extracelulares le confieren a la matriz extracelular que sostiene el *biofilm* mayor resistencia (Wu *et al.*, 2021).

Las membranas de bacterias como *S. aureus* desempeñan un papel crucial como barreras selectivas que permite el paso de nutrientes, el anclaje de proteínas, la comunicación de celular, y protección (Bouyahya *et al.*, 2019b). Estas membranas proporcionan un ambiente adecuado para todos los procesos celulares y permiten el acceso a iones como potasio (K^+) y sodio (Na^+), los cuales son de importancia para la homeostasis iónica (Diao *et al.*, 2014). Los AE se caracterizan

por tener una alta hidrofobicidad. Cuando entran en contacto con las membranas celulares, los AE pueden hacerlas más permeables lo que permite la fuga de iones, ATP y ADN, fenómeno que se relaciona con la muerte celular, al debilitar la integridad celular y generar una respuesta de estrés (Dhifi *et al.*, 2016).

Además, se ha demostrado que los principales constituyentes del AE de *L. origanoides*, como el timol y el carvacrol presentan una mayor actividad *anti-biofilma* diferencia de los otros constituyentes (Borges *et al.*, 2017; Tarabily *et al.*, 2021). Un posible mecanismo de acción de estos metabolitos secundarios de plantas es inducir la liberación de lipopolisacáridos los cuales se integran dentro de las membranas y las alteran (Bhavaniramya *et al.*, 2019). Además, los AE ha demostrado reducir la fuerza protón motriz, de esta manera reduciendo la síntesis de ATP, y por tanto la concentración de ATP intracelular (Nazzaro *et al.*, 2013). Estudios recientes han demostrado que el efecto *anti-biofilm* y antibacteriano de AE no se atribuyen solamente a sus componentes principales, dado que este puede presentar un efecto sinérgico entre los constituyentes que se encuentran en menor proporción (Bouhtit *et al.*, 2021; Cav *et al.*, 2021). Es de resaltar, que los AE son más eficaces en bacterias Grampositivas como *S. aureus* considerando que estas presentan una capa de peptidoglucanos que se encuentra en la parte externa de la membrana celular (Burt, 2004).

Para analizar más profundamente los mecanismos subyacentes que respalden los efectos del AE LOT-II sobre la formación del *biofilm* de *S. aureus*, los estudios metabolómicos emergen como una herramienta poderosa que permiten dar una aproximación sobre cómo los AE interfieren con los procesos celulares y bioquímicos. En ese contexto, los resultados del análisis

metabolómico mostraron que los principales metabolitos diferenciales están involucrados principalmente con el metabolismo de aminoácidos; como el metabolismo de la fenilalanina, metabolismo de la prolina y arginina, y el metabolismo de β -alanina entre otros.

Estudios recientes han demostrado que el metabolismo de aminoácidos es de importancia para la formación del *biofilm* estafilocócico. Análisis del proteoma del *biofilm* de *S. aureus* han revelado las proteínas asociadas a la unión celular, como la síntesis de adhesinas intercelular de polisacárido y proteínas de unión al fibrinógeno se encuentran moduladas positivamente (Resch *et al.*, 2005, 2006). Los resultados metabólicos muestran que el ácido L-arginosuccínico se encuentra modulado positivamente (Figura 10), este metabolito es precursor en la producción del aminoácido L-arginina, el cual está relacionado con la formación de adhesinas. Además, es un precursor de importancia para la síntesis de óxido nítrico (NO) que se encuentra relacionado con la formación y la dispersión de *biofilm* (Ramírez *et al.*, 2014). El AE también presentó afectaciones en el metabolismo de la β -alanina, donde se observa que el metabolito dihidrouracilo, espermidina, precursores de la β -alanina se encuentran modulados negativamente, de igual forma, la L-valina se encuentra modulada positivamente. Estos metabolitos están también relacionados con la biosíntesis de pantotenato y CoA (Khanppnavar *et al.*, 2019b). En el metabolismo de la arginina y prolina, se encontró que la creatina se encuentra modulado positivamente y la fosfocreatina modulada negativamente, estos son precursores de la prolina. Estudios han demostrado que la prolina presenta un papel importante en la modulación del estrés osmótico y la señalización celular (Cleaver *et al.*, 2021). Además, este aminoácido sirve como fuente de energía y de nitrógeno, la inhibición del metabolismo de la prolina se ha relacionado como una disminución en la patogénesis de bacterias (Christgen & Becker, 2019).

El metabolismo de la fenilalanina se encontró afectado durante la formación del *biofilm* con metabolitos como la L-homofenilalanina y el ácido fenilacético modulados negativamente y el metabolito fenilacetaldehído modulado positivamente, en la biosíntesis de aminoacil-ARNt se encontraron los metabolitos L-histidina, L-valina modulados positivamente y los metabolitos L-lisina, ácido L-glutámico modulados negativamente. Del mismo modo, se encontró que en la vía de las pentosas fosfato, el metabolito ácido 6-fosfogluconico se encuentra modulado positivamente. Este metabolito es precursor del piruvato según la vía Entner-Doudoroff, esta vía es una alternativa para la degradación de glucosa en las bacterias y por tanto la obtención de energía (Wan *et al.*, 2018). En resumen, estudios recientes destacan la importancia del metabolismo de aminoácidos en la formación del *biofilm* estafilocócico.

Por otro lado, el metabolito CDP-ribitol (citidina difosfato ribitol) se encuentra modulado negativamente, el CDP-ribitol está relacionado con la biosíntesis de los ácidos teicoicos de pared, los cuales hacen parte de la pared celular de bacterias gram-positivas como *S. aureus*. El CDP ribitol es precursor para la polimerización del ribitol-fosfato, el cual es uno de los constituyentes de los ácidos teicoicos de pared (WTA) (Li *et al.*, 2021). El estudio realizado por Hou y colaboradores (2022) determinó que la disminución en los WTA afecta la etapa inicial en la adhesión para la formación del *biofilm* (Hou *et al.*, 2022). Un posible mecanismo de acción del AE se asocia a la producción inducida de la GlpQ (glicerofosfodiesterasa), una enzima hidrolizante de WTA y secretada por *S. aureus*.

El AE de *L. origanoides* presento un efecto negativo en la pared del celular de *S. aureus* durante la formación del *biofilm*, al modular negativamente los componentes principales de los

ácidos teicoicos como el glicerol y el CDP-ribitol, los cuales se encuentran en la pared celular y son de importancia en la etapa inicial de la adherencia del microorganismo a la superficie. Además, este estudio también mostro la modulación de algunos aminoácidos como el glutamato y la lisina que se encuentran unidos al polímero N-Acetilmurámico, el cual es componente principal de los peptidoglicanos que conforman la pared celular. Es de esta manera, que el posible blanco del AE de *L. origanoides* durante la formación del *biofilm* es la pared celular, además de inhibir la síntesis de adhesinas las cuales son de importancia para colonizar superficies.

4. Conclusiones

El aceite esencial de *L. origanoides* LOT II presentó un efecto inhibitorio durante la formación del *biofilm* de *S. aureus*. Un posible mecanismo de acción del AE se asocia principalmente a afectaciones en el metabolismo de aminoácidos, como por ejemplo el metabolismo de la prolina y arginina, metabolismo de la β -alanina, y metabolismo de L-fenilalanina, los cuales son de importancia para la síntesis de adhesinas, estas permiten adherirse a superficies biótica o abióticas. También, se observaron afectaciones sobre la biosíntesis del pantotenato y en el metabolismo de glicerofosfolípidos. Además, otro posible mecanismo de acción del AE, se debe a que este puede difundirse sobre la matriz extracelular, la cual está compuesta de polisacáridos y por tanto desestabilizarla, asimismo afectar la pared celular, lo cual modula a la baja precursores importantes de la pared celular como el CDP-ribitol y el glicerol. Los resultados obtenidos, nos brindan una aproximación sobre el modo de acción del AE sobre la formación del *biofilm* de *S. aureus* y promueven el estudio de posibles dianas terapéuticas con el objetivo de contrarrestar la generación de patógenos multirresistentes.

Referencias Bibliográficas

- Aires-de-Sousa, M. (2017). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among animals: current overview. *Clinical Microbiology and Infection*, 23(6), 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.11.002>
- Algburi, A., Comito, N., Kashtanov, D., Dicks, L. M. T., & Chikindas, M. L. (2016). Control of *biofilm* formation: antibiotics and beyond. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(3). <https://doi.org/10.1128/AEM.02508-16>
- Algharib, S. A., Dawood, A., & Xie, S. (2020). Nanoparticles for treatment of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *Drug Delivery*, 27(1), 292–308. <https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1724209>
- Arientová, S., & Holub, M. (2021). Clinical management of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Casopis Lekarů Ceskych*, 160(4).
- Aros-Calt, S., Castelli, F. A., Lamourette, P., Gervasi, G., Junot, C., Muller, B. H., & Fenaille, F. (2019). Metabolomic investigation of *Staphylococcus aureus* antibiotic susceptibility by liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1871, 279–293. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8814-3_18
- Aros-Calt, S., Muller, B. H., Boudah, S., Ducruix, C., Gervasi, G., Junot, C., & Fenaille, F. (2015). Annotation of the *Staphylococcus aureus* metabolome using liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry and application to the study of methicillin resistance. *Journal of Proteome Research*, 14(11), 4863–4875. <https://doi.org/10.1021/ACS.JPROTEOME.5B00697>

- Astagneau, P., & Ambrogi, V. (2014). Infecciones nosocomiales e infecciones asociadas al tratamiento médico. *EMC - Tratado de Medicina*, 18(2), 1–7. [https://doi.org/10.1016/S1636-5410\(14\)67522-X](https://doi.org/10.1016/S1636-5410(14)67522-X)
- 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>
- Ben Abdallah, F., Lagha, R., & Gaber, A. (2020). Biofilm inhibition and eradication properties of medicinal plant essential oils against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Pharmaceuticals*, 13(11). <https://doi.org/10.3390/ph13110369>
- Bhavaniramy, S., Vishnupriya, S., Al-Aboody, M. S., Vijayakumar, R., & Baskaran, D. (2019). Role of essential oils in food safety: antimicrobial and antioxidant applications. *Grain & Oil Science and Technology*, 2(2), 49–55. <https://doi.org/10.1016/J.GAOST.2019.03.001>
- Boles, B. R., & Horswill, A. R. (2008). agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLOS Pathogens*, 4(4), e1000052. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1000052>
- Borges, A., Lopez-Romero, J. C., Oliveira, D., Giaouris, E., & Simões, M. (2017). Prevention, removal and inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* biofilms using selected monoterpenes of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, 123(1), 104–115. <https://doi.org/10.1111/JAM.13490>
- Bouhdid, S., Abrini, J., Amensour, M., Zhiri, A., Espuny, M. J., & Manresa, A. (2010). Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Cinnamomum verum* essential oil. *Journal of Applied Microbiology*, 109(4), 1139–1149. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2010.04740.X>

- Bouhtit, F., Najar, M., Moussa Agha, D., Melki, R., Najimi, M., Sadki, K., Boukhatem, N., Bron, D., Meuleman, N., Hamal, A., Lagneaux, L., Lewalle, P., & Merimi, M. (2021). New anti-leukemic effect of carvacrol and thymol combination through synergistic induction of different cell death pathways. *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 410, 26(2), 410. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26020410>
- Bouyahya, A., Abrini, J., Dakka, N., & Bakri, Y. (2019a). 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>
- Bouyahya, A., Abrini, J., Dakka, N., & Bakri, Y. (2019b). 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>
- 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>
- 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). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040147>
- Cajka, T., & Fiehn, O. (2016). Toward merging untargeted and targeted methods in mass spectrometry-based metabolomics and lipidomics. *Analytical Chemistry*, 88(1), 524–545. <https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.5B04491/>

- Camacho-Cruz, J., Gutiérrez, I. F., Brand-López, K., Sosa-Rodríguez, Y. A., Vásquez-Hoyos, P., Gómez-Cortés, L. C., Romero-Higuera, L. N., Rojas-Rojas, D. P., Ortiz-Mendez, C. A., Camacho-Moreno, G., Wilches-Cuadros, M. A., Hernandez-Vargas, J. C., Velandia-Páez, J. P., Mancera-Gutiérrez, L. A., Palacios-Ariza, M. A., & Beltrán-Higuera, S. J. (2022). Differences between methicillin-susceptible versus methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in pediatrics: multicenter cohort study conducted in Bogotá, Colombia, 2014-2018. *Pediatric Infectious Disease Journal*, *41*(1), 12–19. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000003349>
- Camargo Rubio, R. D. (2023). Bioética prescripción antibiótica y resistencia bacteriana. *Acta Colombiana de Cuidado Intensivo*. <https://doi.org/10.1016/J.ACCEI.2023.04.010>
- Cava-Roda, R., Taboada-Rodríguez, A., López-Gómez, A., Martínez-Hernández, G. B., & Marín-Iniesta, F. (2021). Synergistic antimicrobial activities of combinations of vanillin and essential oils of *cinnamon bark, cinnamon leaves, and cloves*. *Foods 2021, Vol. 10, Page 1406*, *10*(6), 1406. <https://doi.org/10.3390/FOODS10061406>
- Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, *61*(1), 28–40. www.medigraphic.com/patologiaclinicawww.medigraphic.org.mx
- Chambers, M. C., MacLean, B., Burke, R., Amodei, D., Ruderman, D. L., Neumann, S., Gatto, L., Fischer, B., Pratt, B., Egertson, J., Hoff, K., Kessner, D., Tasman, N., Shulman, N., Frewen, B., Baker, T. A., Brusniak, M. Y., Paulse, C., Creasy, D., ... Mallick, P. (2012). A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nature Biotechnology 2012 30:10*, *30*(10), 918–920. <https://doi.org/10.1038/nbt.2377>

- Chen, Y., Li, E. M., & Xu, L. Y. (2022). Guide to metabolomics analysis: a bioinformatics workflow. *Metabolites* 2022, Vol. 12, Page 357, 12(4), 357. <https://doi.org/10.3390/METABO12040357>
- Cheung, G. Y. C., Bae, J. S., & Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688>, 12(1), 547–569. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688>
- Cheung, G. Y. C., Wang, R., Khan, B. A., Sturdevant, D. E., & Otto, M. (2011). Role of the accessory gene regulator agr in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Infection and Immunity*, 79(5), 1927–1935. https://doi.org/10.1128/IAI.00046-11/SUPPL_FILE/MICROARRAYRESULTS.XLS
- Choueiry, F., Xu, R., & Zhu, J. (2022). Adaptive metabolism of *staphylococcus aureus* revealed by untargeted metabolomics. *Journal of Proteome Research*, 21(2), 470–481. <https://doi.org/10.1021/ACS.JPROTEOME.1C00797/>
- Christgen, S. L., & Becker, D. F. (2019). role of proline in pathogen and host interactions. <https://doi.org/10.1089/ARS.2017.7335> <https://Home.Liebertpub.Com/Ars>, 30(4), 683–709. <https://doi.org/10.1089/ARS.2017.7335>
- Cleaver, L. M., Moazzez, R. V., & Carpenter, G. H. (2021). evidence for proline utilization by oral bacterial *biofilms* grown in saliva. *Frontiers in Microbiology*, 11, 619968. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.619968/BIBTEX>
- Cui, H., Zhang, C., Li, C., & Lin, L. (2020). Inhibition mechanism of *cardamom* essential oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* *biofilm*. *LWT*, 122. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109057>
- Cui, L., Hou, J., Fang, J., Lee, Y. H., Costa, V. V., Wong, L. H., Chen, Q., Ooi, E. E., Tannenbaum, S. R., Chen, J., & Ong, C. N. (2017). serum metabolomics investigation of humanized mouse

- model of dengue virus infection. *Journal of Virology*, 91(14), 386–403.
https://doi.org/10.1128/JVI.00386-17/SUPPL_FILE/ZJV999182727S1.PDF
- Defoirdt, T. (2013). Antivirulence therapy for animal production: filling an arsenal with novel weapons for sustainable disease control. *PLOS Pathogens*, 9(10), e1003603.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1003603>
- Desam, N. R., Al-Rajab, A. J., Sharma, M., Mylabathula, M. M., Gowkanapalli, R. R., & Albratty, M. (2019). Chemical constituents, in vitro antibacterial and antifungal activity of *Mentha × Piperita* L. (peppermint) essential oils. *Journal of King Saud University - Science*, 31(4), 528–533. <https://doi.org/10.1016/J.JKSUS.2017.07.013>
- Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W. (2016). essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: a critical review. *Medicines* 2016, Vol. 3, Page 25, 3(4), 25. <https://doi.org/10.3390/MEDICINES3040025>
- 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>
- Donlan, R. M. (2001). *Biofilm* formation: A clinically relevant microbiological process. *Clinical Infectious Diseases*, 33(8), 1387–1392. <https://doi.org/10.1086/322972/2/33-8-1387-TBL002.GIF>
- Dunphy, L. J., Grimes, K. L., Wase, N., Kolling, G. L., & Papin, J. A. (2021). Untargeted metabolomics reveals species-specific metabolite production and shared nutrient consumption by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *MSystems*, 6(3).
<https://doi.org/10.1128/MSYSTEMS.00480-21/S>

- Elhaik, E. (2022). Principal Component Analyses (PCA)-based findings in population genetic studies are highly biased and must be reevaluated. *Scientific Reports 2022 12:1*, 12(1), 1–35. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14395-4>
- El-Tarabily, K. A., El-Saadony, M. T., Alagawany, M., Arif, M., Batiha, G. E., Khafaga, A. F., Elwan, H. A. M., Elnesr, S. S., & E. Abd El-Hack, M. (2021). Using essential oils to overcome bacterial *biofilm* formation and their antimicrobial resistance. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(9), 5145–5156. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2021.05.033>
- Fechter, P., Caldelari, I., Lioliou, E., & Romby, P. (2014). Novel aspects of RNA regulation in *Staphylococcus aureus*. *FEBS Letters*, 588(15), 2523–2529. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2014.05.037>
- Foster, T. J. (2019). The mscramm family of cell-wall-anchored surface proteins of gram-positive cocci. *Trends in Microbiology*, 27(11), 927–941. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2019.06.007>
- Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K., & Höök, M. (2013). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Microbiology 2013 12:1*, 12(1), 49–62. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3161>
- Fux, C. A., Wilson, S., & Stoodley, P. (2004). Detachment characteristics and oxacillin resistance of *Staphylococcus aureus biofilm* emboli in an in vitro catheter infection model. *Journal of Bacteriology*, 186(14). <https://doi.org/10.1128/JB.186.14.4486-4491.2004>
- Gherardi, G., Di Bonaventura, G., & Savini, V. (2018). Staphylococcal taxonomy. *pet-to-man Travelling Staphylococci: A World in Progress*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813547-1.00001-7>
- Gholami, S. A., Goli, H. R., Haghshenas, M. R., & Mirzaei, B. (2019). Evaluation of polysaccharide intercellular adhesion (pia) and glycerol teichoic acid (gly-ta) arisen

- antibodies to prevention of *biofilm* formation in *staphylococcus aureus* and *staphylococcus epidermidis* strains. *BMC Research Notes*, 12(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/S13104-019-4736-8/>
- Giesbrecht, P., Kersten, T., Maidhof, H., & Wecke, J. (1998). Staphylococcal Cell Wall: Morphogenesis and Fatal Variations in the Presence of Penicillin. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(4), 1371–1414. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.4.1371-1414.1998/7ABEEEECC282B/>
- Gil-De-La-Fuente, A., Godzien, J., Saugar, S., Garcia-Carmona, R., Badran, H., Wishart, D. S., Barbas, C., & Otero, A. (2019a). CEU Mass Mediator 3.0: a metabolite annotation tool. *Journal of Proteome Research*, 18(2), 797–802. <https://doi.org/10.1021/ACS.JPROTEOME.8B00720/>
- Gil-De-La-Fuente, A., Godzien, J., Saugar, S., Garcia-Carmona, R., Badran, H., Wishart, D. S., Barbas, C., & Otero, A. (2019b). CEU Mass Mediator 3.0: A Metabolite Annotation Tool. *Journal of Proteome Research*, 18(2), 797–802. <https://doi.org/10.1021/ACS.JPROTEOME.8B00720/>
- Golonka, E., Filipek, R., Sabat, A., Sinczak, A., & Potempa, J. (2004). Genetic characterization of staphopain genes in *Staphylococcus aureus*. *Biological Chemistry*, 385(11), 1059–1067. <https://doi.org/10.1515/BC.2004.137/MACHINEREADABLECITATION/RIS>
- 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>

- Gordon, C. P., Williams, P., & Chan, W. C. (2013). Attenuating *Staphylococcus aureus* virulence gene regulation: A medicinal chemistry perspective. In *Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 56, Issue 4, pp. 1389–1404). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/jm3014635>
- Guijas, C., Montenegro-Burke, J. R., Warth, B., Spilker, M. E., & Siuzdak, G. (2018). Metabolomics activity screening for identifying metabolites that modulate phenotype. *Nature Biotechnology* 2018 36:4, 36(4), 316–320. <https://doi.org/10.1038/nbt.4101>
- Guillín, Y., Cáceres, M., Stashenko, E. E., Hidalgo, W., & Ortiz, C. (2023). Untargeted metabolomics for unraveling the metabolic changes in planktonic and sessile cells of *salmonella enteritidis* ATCC 13076 after treatment with *lippia origanoides* essential oil. *Antibiotics*, 12(5), 899. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS12050899/S1>
- Guo, N., Bai, X., Shen, Y., & Zhang, T. (2023). Target-based screening for natural products against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(14), 2216–2230. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1972280>
- Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J., & Wang, Y. (2020). prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 107. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.00107/BIBTEX>
- Haag, A. F., Fitzgerald, J. R., & Penadés, J. R. (2019). *Staphylococcus aureus* in animals . *Microbiology Spectrum*, 7(3). <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.GPP3-0060-2019/>
- Hakim, M. L., Susilowati, S., Effendi, M. H., Tyasningsih, W., Sugihartuti, R., Chusniati, S., & Witaningrum, A. M. (2020). The effectiveness of antibacterial essential oil of cinnamon (*Cinnamomum burmannii*) on *Staphylococcus aureus*. *Ecology, Environment and Conservation*, 26.

- Hernandes, C., Pina, E. S., Taleb-Contini, S. H., Bertoni, B. W., Cestari, I. M., Espanha, L. G., Varanda, E. A., Camilo, K. F. B., Martinez, E. Z., França, S. C., & Pereira, A. M. S. (2017a). Lippia origanoides essential oil: an efficient and safe alternative to preserve food, cosmetic and pharmaceutical products. *Journal of Applied Microbiology*, 122(4), 900–910. <https://doi.org/10.1111/JAM.13398>
- Hernandes, C., Pina, E. S., Taleb-Contini, S. H., Bertoni, B. W., Cestari, I. M., Espanha, L. G., Varanda, E. A., Camilo, K. F. B., Martinez, E. Z., França, S. C., & Pereira, A. M. S. (2017b). Lippia origanoides essential oil: an efficient and safe alternative to preserve food, cosmetic and pharmaceutical products. *Journal of Applied Microbiology*, 122(4), 900–910. <https://doi.org/10.1111/JAM.13398>
- Hobley, L., Harkins, C., Macphee, C. E., & Stanley-Wall, N. R. (2015). Giving structure to the *biofilm* matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiology Reviews*, 015, 649–669. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv015>
- Hou, T., Sana, S. S., Li, H., Xing, Y., Nanda, A., Netala, V. R., & Zhang, Z. (2022). Essential oils and its antibacterial, antifungal and anti-oxidant activity applications: A review. In *Food Bioscience* (Vol. 47). <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101716>
- Hou, W., Kang, S., Chang, J., Tian, X., & Shi, C. (2022). correlation analysis between glpq-regulated degradation of wall teichoic acid and *biofilm* formation triggered by lactobionic acid in *staphylococcus aureus*. *Foods*, 11(21). <https://doi.org/10.3390/foods11213438>
- Huang, Z., & Wang, C. (2022). A review on differential abundance analysis methods for mass spectrometry-based metabolomic data. *Metabolites 2022*, Vol. 12, Page 305, 12(4), 305. <https://doi.org/10.3390/METABO12040305>

- Hurtado Cantos, N., Orellana B, P., & Andrade Tacuri, C. (2021). Detección de genes que codifican hemolisinas en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en pantallas de teléfonos móviles de estudiantes de último año de odontología en Cuenca-Ecuador, 2020-2021. *Revista de La Asociación Dental Mexicana*, 78(6), 332–338. <https://doi.org/10.35366/102974>
- Jayasena, D. D., & Jo, C. (2013). Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 34(2), 96–108. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2013.09.002>
- Kamali, E., Jamali, A., Ardebili, A., Ezadi, F., & Mohebbi, A. (2020). Evaluation of antimicrobial resistance, *biofilm* forming potential, and the presence of *biofilm*-related genes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Research Notes*, 13(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/S13104-020-4890-Z/FIGURES/2>
- Karaman, M., Bogavac, M., Radovanović, B., Sudji, J., Tešanović, K., & Janjušević, L. (2017). *Origanum vulgare* essential oil affects pathogens causing vaginal infections. *Journal of Applied Microbiology*, 122(5), 1177–1185. <https://doi.org/10.1111/JAM.13413>
- Khanppnavar, B., Chatterjee, R., Choudhury, G. B., & Datta, S. (2019a). Genome-wide survey and crystallographic analysis suggests a role for both horizontal gene transfer and duplication in pantothenate biosynthesis pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1863(10), 1547–1559. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2019.05.017>
- Khanppnavar, B., Chatterjee, R., Choudhury, G. B., & Datta, S. (2019b). Genome-wide survey and crystallographic analysis suggests a role for both horizontal gene transfer and duplication in pantothenate biosynthesis pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1863(10), 1547–1559. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2019.05.017>

- Kim, M. K., Zhao, A., Wang, A., Brown, Z. Z., Muir, T. W., Stone, H. A., & Bassler, B. L. (2017). Surface-attached molecules control *Staphylococcus aureus* quorum sensing and *biofilm* development. *Nature Microbiology* 2017 2:8, 2(8), 1–12. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.80>
- Lei, T., Wang, L., Chen, C., & Ji, Y. (2014). Metabolomic investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1085, 251–258. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-664-1_15
- Li, F. K. K., Gale, R. T., Petrotchenko, E. V., Borchers, C. H., Brown, E. D., & Strynadka, N. C. J. (2021). Crystallographic analysis of TarI and TarJ, a cytidylyltransferase and reductase pair for CDP-ribitol synthesis in *Staphylococcus aureus* wall teichoic acid biogenesis. *Journal of Structural Biology*, 213(2). <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2021.107733>
- Liu, X., Hu, Y., Pai, P. J., Chen, D., & Lam, H. (2014). Label-free quantitative proteomics analysis of antibiotic response in *Staphylococcus aureus* to oxacillin. *Journal of Proteome Research*, 13(3), 1223–1233. https://doi.org/10.1021/PR400669D/SUPPL_FILE/PR400669D_SI_003.XLSX
- Loaiza Oliva, M., Morales Uchima, S. M., Puerta Suárez, J., Mesa Arango, A. C., & Martínez Pabón, M. C. (2023). *Lippia origanoides* derivatives in vitro evaluation on polymicrobial *biofilms*: *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Candida albicans*. *Archives of Oral Biology*, 148, 105656. <https://doi.org/10.1016/J.ARCHORALBIO.2023.105656>
- Luo, M., Yin, Y., Zhou, Z., Zhang, H., Chen, X., Wang, H., & Zhu, Z. J. (2023). A mass spectrum-oriented computational method for ion mobility-resolved untargeted metabolomics. *Nature Communications* 2023 14:1, 14(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37539-0>

- 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), 1474. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10121474/S1>
- Meidania, N., & Pratiwi, J. N. (2020). potensi daun serai sebagai terapi komplementer pada selulitis. *Jurnal Penelitian Perawat Profesional*, *2*(2). <https://doi.org/10.37287/jppp.v2i2.90>
- Mijiddorj, B., Matsuo, Y., Sato, H., Ueda, K., & Kawamura, I. (2019). a comparative study on interactions of antimicrobial peptides l- and d-phenylseptin with 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine. *Applied Sciences* 2019, Vol. 9, Page 2601, *9*(13), 2601. <https://doi.org/10.3390/APP9132601>
- Mohammed, A. A., Hussein, N. R., Arif, S. H., & Daniel, S. (2020). Surgical site infection among patients with *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *International Journal of Surgery Open*, *24*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.IJSO.2020.02.005>
- Mulcahy, M. E., & McLoughlin, R. M. (2016). host–bacterial crosstalk determines *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization. *Trends in Microbiology*, *24*(11), 872–886. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2016.06.012>
- Namivandi-Zangeneh, R., Yang, Y., Xu, S., Wong, E. H. H., & Boyer, C. (2019). *Antibiofilm Platform based on the Combination of Antimicrobial Polymers and Essential Oils*. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01278>
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals* 2013, Vol. 6, Pages 1451-1474, *6*(12), 1451–1474. <https://doi.org/10.3390/PH6121451>

- Nitulescu, G., Nicorescu, I. M., Olaru, O. T., Ungurianu, A., Mihai, P., Zanfirescu, A., Nitulescu, G. M., & Margina, D. (n.d.). *Molecular Docking and Screening Studies of New Natural Sortase A Inhibitors*. <https://doi.org/10.3390/ijms18102217>
- 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. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.46804-0/CITE/REFWORKS>
- Novick, R. P. (2003). Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Molecular Microbiology*, *48*(6), 1429–1449. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.2003.03526.X>
- O'Toole, G. A. (2011). Microtiter dish *biofilm* formation assay. *journal of visualized experiments* : *JoVE*, *47*. <https://doi.org/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. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab382>
- Patti, G. J., Yanes, O., & Siuzdak, G. (2012). Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2012 *13*:4, *13*(4), 263–269. <https://doi.org/10.1038/nrm3314>
- Pestaña, M. Í., Pérez-García, A., & Abad, R. F. (2022). Infecciones relacionadas con cuidados sanitarios. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, *13*(56), 3267–3276. <https://doi.org/10.1016/J.MED.2022.05.010>

- Pinto, R. M., Lopes-De-Campos, D., Martins, M. C. L., Van Dijck, P., Nunes, C., & Reis, S. (2019). Impact of nanosystems in *Staphylococcus aureus* biofilms treatment. *FEMS Microbiology Reviews*, *43*(6), 622–641. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUZ021>
- Pongbangli, N., Oniem, N., Chaiwarith, R., Nantsupawat, T., Phrommintikul, A., & Wongcharoen, W. (2021). Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal carriage and surgical site infection rate among patients undergoing elective cardiac surgery. *International Journal of Infectious Diseases*, *106*, 409–414. <https://doi.org/10.1016/J.IJID.2021.03.024>
- Pynnonen, M., Stephenson, R. E., Schwartz, K., Hernandez, M., & Boles, B. R. (2011). hemoglobin promotes *Staphylococcus aureus* nasal colonization. *PLOS Pathogens*, *7*(7), e1002104. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1002104>
- Qi, Y., Hou, J., Zhao, Y., Song, W., Wang, L., Chen, H., & Chen, G. (2023). An inhibitory effect of schisandrone on α -hemolysin expression to combat methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *39*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/S11274-022-03442-X/>
- Qiu, J., Luo, M., Dong, J., Wang, J., Li, H., Wang, X., Deng, Y., Feng, H., & Deng, X. (2011). Menthol diminishes *Staphylococcus aureus* virulence-associated extracellular proteins expression. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *90*(2), 705–712. <https://doi.org/10.1007/S00253-011-3122-9/>
- Rahman, M. A., Amirkhani, A., Parvin, F., Chowdhury, D., Molloy, M. P., Deva, A. K., Vickery, K., & Hu, H. (2022). One Step Forward with Dry Surface *Biofilm* (DSB) of *Staphylococcus aureus*: tmt-based quantitative proteomic analysis reveals proteomic shifts between dsb and hydrated *biofilm*. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(20), 12238. <https://doi.org/10.3390/IJMS232012238/S1>

- Ramírez-Mata, A., Fernández-Domínguez, I. J., Nuñez-Reza, K. J., Xiqui-Vázquez, 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. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70079-3](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70079-3)
- Rao, S., Linke, L., Magnuson, R., Jaunch, L., & Hyatt, D. R. (2022). Antimicrobial resistance and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* collected from livestock, poultry and humans. *One Health*, 15, 100407. <https://doi.org/10.1016/J.ONEHLT.2022.100407>
- Reisdorph, N. A., Walmsley, S., & Reisdorph, R. (2019). a perspective and framework for developing sample type specific databases for lc/ms-based clinical metabolomics. *Metabolites 2020, Vol. 10, Page 8, 10(1)*, 8. <https://doi.org/10.3390/METABO10010008>
- Resch, A., Leicht, S., Saric, M., Pásztor, L., Jakob, A., Götz, F., & Nordheim, A. (2006). Comparative proteome analysis of *Staphylococcus aureus* biofilm and planktonic cells and correlation with transcriptome profiling. *Proteomics*, 6(6), 1867–1877. <https://doi.org/10.1002/PMIC.200500531>
- Resch, A., Rosenstein, R., Nerz, C., & Götz, F. (2005). Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2663–2676. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2663-2676.2005>
- Rios, L., Lopera, G., Caicedo, R., Granda, F., Montoya, A., Restrepo, G., & Suárez, R. (2007). extracción y caracterización de aceite de cardamomo (*Elettaria cardamomum*) Año, 74.
- Ruiz Quiroz, J. R., & Salazar Salvatierra, M. E. (2021). Composición química y actividad antibacteriana de los aceites esenciales de citrus paradisi, juglans neotropica diels, schinus

- molle y tagetes elliptica smith. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 87(3).
<https://doi.org/10.37761/rsqp.v87i3.350>
- Ruiz-Duran, J., Torres, R., Stashenko, E. E., & Ortiz, C. (2023). Antifungal and antibiofilm activity of colombian essential oils against different candida strains. *Antibiotics*, 12(4), 668.
<https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS12040668/S1>
- Ruiz-Perez, D., Guan, H., Madhivanan, P., Mathee, K., & Narasimhan, G. (2020). So you think you can PLS-DA? *BMC Bioinformatics*, 21(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S12859-019-3310-7/FIGURES/6>
- Sakr, A., Brégeon, F., Mège, J. L., Rolain, J. M., & Blin, O. (2018). *Staphylococcus aureus* nasal colonization: An update on mechanisms, epidemiology, risk factors, and subsequent infections. *Frontiers in Microbiology*, 9(OCT), 415974.
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02419/BIBTEX>
- Salek, R. M., Steinbeck, C., Viant, M. R., Goodacre, R., & Dunn, W. B. (2013). The role of reporting standards for metabolite annotation and identification in metabolomic studies. *GigaScience*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/2047-217X-2-13/2656130>
- Sansone, S. A., Schober, D., Atherton, H. J., Fiehn, O., Jenkins, H., Rocca-Serra, P., Rubtsov, D. V., Spasic, I., Soldatova, L., Taylor, C., Tseng, A., & Viant, M. R. (2007). Metabolomics standards initiative: Ontology working group work in progress. *Metabolomics*, 3(3).
<https://doi.org/10.1007/s11306-007-0069-z>
- 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 origanoides kunth*. *Molecules* 2015,

Vol. 20, Pages 1860-1871, 20(2), 1860–1871.

<https://doi.org/10.3390/MOLECULES20021860>

Savage, V. J., Chopra, I., & O’Neill, A. J. (2013). *Staphylococcus aureus* biofilms promote horizontal transfer of antibiotic resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(4), 1968–1970. <https://doi.org/10.1128/AAC.02008-12/>

Schelli, K., Rutowski, J., Roubidoux, J., & Zhu, J. (2017). *Staphylococcus aureus* methicillin resistance detected by HPLC-MS/MS targeted metabolic profiling. *Journal of Chromatography B*, 1047, 124–130. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2016.05.052>

Schelli, K., Zhong, F., & Zhu, J. (2017a). Comparative metabolomics revealing *Staphylococcus aureus* metabolic response to different antibiotics. *Microbial Biotechnology*, 10(6), 1764–1774. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12839>

Schelli, K., Zhong, F., & Zhu, J. (2017b). Comparative metabolomics revealing *Staphylococcus aureus* metabolic response to different antibiotics. *Microbial Biotechnology*, 10(6), 1764–1774. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12839>

Schilcher, K., & Horswill, A. R. (2020a). Staphylococcal *biofilm* development: structure, regulation, and treatment strategies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 84(3). <https://doi.org/10.1128/MMBR.00026-19/>

Schilcher, K., & Horswill, A. R. (2020b). staphylococcal *biofilm* development: structure, regulation, and treatment strategies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 84(3). <https://doi.org/10.1128/MMBR.00026-19/>

Schrimpe-Rutledge, A. C., Codreanu, S. G., Sherrod, S. D., & McLean, J. A. (2016). Untargeted metabolomics strategies—challenges and emerging directions. *Journal of the American*

- Society for Mass Spectrometry*, 27(12), 1897–1905. <https://doi.org/10.1007/S13361-016-1469-Y/>
- Silva, L. N., Zimmer, K. R., Macedo, A. J., & Trentin, D. S. (2016). Plant natural products targeting bacterial virulence factors. In *Chemical Reviews* (Vol. 116, Issue 16, pp. 9162–9236). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00184>
- Smith, C. A., Want, E. J., O’Maille, G., Abagyan, R., & Siuzdak, G. (2006). XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical Chemistry*, 78(3), 779–787. <https://doi.org/10.1021/AC051437Y/>
- Smith, T. C. (2015). Livestock-Associated *Staphylococcus aureus*: the united states experience. *PLOS Pathogens*, 11(2), e1004564. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1004564>
- Sogin, E. M., Puskás, E., Dubilier, N., & Liebeke, M. (2019). Marine metabolomics: a method for nontargeted measurement of metabolites in seawater by gas chromatography–mass spectrometry. *MSystems*, 4(6). https://doi.org/10.1128/MSYSTEMS.00638-19/SUPPL_FILE/MSYSTEMS.00638-19-S0001.PDF
- Somerville, G. A., Beres, S. B., Fitzgerald, J. R., DeLeo, F. R., Cole, R. L., Hoff, J. S., & Musser, J. M. (2002). In vitro serial passage of *Staphylococcus aureus*: Changes in physiology, virulence factor production, and agr nucleotide sequence. *Journal of Bacteriology*, 184(5), 1430–1437. <https://doi.org/10.1128/JB.184.5.1430-1437.2002/>
- Somerville, G. A., & Proctor, R. A. (2009). At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in staphylococci. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(2), 233–248. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00005-09/>

- Stashenko, E. E., Martínez, J. R., Durán, D. C., Córdoba, Y., & Caballero, D. (2014). Estudio comparativo de la composición química y la actividad antioxidante de los aceites esenciales de algunas plantas del género *Lippia* (Verbenaceae) cultivadas en Colombia. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 38(0), 89–105. <https://doi.org/10.18257/RACCEFYN.156>
- 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. <https://doi.org/10.1002/JSSC.200900452>
- Stashenko, E. E., Martínez, J. R., Ruíz, C. A., Arias, G., Durán, C., Salgar, W., & Cala, M. (2010b). *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. *Journal of Separation Science*, 33(1), 93–103. <https://doi.org/10.1002/JSSC.200900452>
- Steinhaus, N., Al-talib, M., Ive, P., Boyles, T., Bamford, C., Davies, M. A., Mendelson, M., & Wasserman, S. (2018). The management and outcomes of *Staphylococcus aureus* bacteraemia at a South African referral hospital: A prospective observational study. *International Journal of Infectious Diseases*, 73, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.06.004>
- Stensen, D. B., Cañadas, R. A. N., Småbrekke, L., Olsen, K., Nielsen, C. S., Svendsen, K., Hanssen, A. M., Ericson, J. U., Simonsen, G. S., Bongo, L. A., & Furberg, A.-S. (2022). Social network analysis of *Staphylococcus aureus* carriage in a general youth population. *International Journal of Infectious Diseases*, 123, 200–209. <https://doi.org/10.1016/J.IJID.2022.08.018>

- 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. <https://doi.org/10.1007/S11306-007-0082-2/METRICS>
- Surewaard, B. G. J., Thanabalasuriar, A., Zeng, Z., Tkaczyk, C., Cohen, T. S., Bardoel, B. W., Jorch, S. K., Deppermann, C., Bubeck Wardenburg, J., Davis, R. P., Jenne, C. N., Stover, K. C., Sellman, B. R., & Kubes, P. (2018). α -Toxin induces platelet aggregation and liver injury during *staphylococcus aureus* sepsis. *Cell Host & Microbe*, 24(2), 271-284.e3. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2018.06.017>
- Szymańska, E., Saccenti, E., Smilde, A. K., & Westerhuis, J. A. (2012). Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. *Metabolomics*, 8(Suppl 1), 3. <https://doi.org/10.1007/S11306-011-0330-3>
- Tan, L., Li, S. R., Jiang, B., Hu, X. M., & Li, S. (2018). Therapeutic targeting of the *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator (agr) system. *Frontiers in Microbiology*, 9(JAN), 55. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.00055/BIBTEX>
- Tautenhahn, R., Patti, G. J., Rinehart, D., & Siuzdak, G. (2012). XCMS online: A web-based platform to process untargeted metabolomic data. *Analytical Chemistry*, 84(11), 5035–5039. <https://doi.org/10.1021/AC300698C/>
- Triba, M. N., Le Moyec, L., Amathieu, R., Goossens, C., Bouchemal, N., Nahon, P., Rutledge, D. N., & Savarin, P. (2015). PLS/OPLS models in metabolomics: the impact of permutation of

- dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters. *Molecular BioSystems*, 11(1), 13–19. <https://doi.org/10.1039/C4MB00414K>
- Turi, K. N., Romick-Rosendale, L., Ryckman, K. K., & Hartert, T. V. (2018). A review of metabolomics approaches and their application in identifying causal pathways of childhood asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(4), 1191–1201. <https://doi.org/10.1016/J.JACI.2017.04.021>
- Turner, R. D., Vollmer, W., & Foster, S. J. (2014). *MicroReview Different walls for rods and balls: the diversity of peptidoglycan*. <https://doi.org/10.1111/mmi.12513>
- Tyll, T., Bílková, M., Revinová, A., Müller, M., Čurdová, M., Zlámal, M., & Holub, M. (2015). Toxic shock syndrome. *Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie*, 64(4). <https://doi.org/10.53126/mebxxiv027>
- Vermote, A., & van Calenbergh, S. (2017). small-molecule potentiators for conventional antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *ACS Infectious Diseases*, 3(11), 780–796. <https://doi.org/10.1021/ACSINFECDIS.7B00084/>
- Vista do Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão*. (n.d.). Retrieved November 20, 2022, from <https://revistas.ufg.br/fen/article/view/8011/5794>
- Wahab, N. Z. A., Ja'afar, N. S. A., & Ismail, S. B. (2022). Evaluation of antibacterial activity of essential oils of melaleuca cajuputi powell. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 16(1), 549–556. <https://doi.org/10.22207/JPAM.16.1.52>
- Wan, N., Wang, H., Ng, C. K., Mukherjee, M., Ren, D., Cao, B., & Tang, Y. J. (2018). Bacterial metabolism during *biofilm* growth investigated by¹³C tracing. *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV), 404160. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02657/BIBTEX>

- Wang, F., Liigand, J., Tian, S., Arndt, D., Greiner, R., & Wishart, D. S. (2021). CFM-ID 4.0: More accurate esi-ms/ms spectral prediction and compound identification. *Analytical Chemistry*, 93(34), 11692–11700. <https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.1C01465/>
- Wang, M., Buist, G., & van Dijk, J. M. (2022). *Staphylococcus aureus* cell wall maintenance – the multifaceted roles of peptidoglycan hydrolases in bacterial growth, fitness, and virulence. *FEMS Microbiology Reviews*, 2022, 1–19. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUAC025>
- Wang, X., Shen, Y., Thakur, K., Han, J., Zhang, J. G., Hu, F., & Wei, Z. J. (2020). Antibacterial activity and mechanism of ginger essential oil against *escherichia coli* and *staphylococcus aureus*. *Molecules* 2020, Vol. 25, Page 3955, 25(17), 3955. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25173955>
- Waters, E. M., Rowe, S. E., O’Gara, J. P., & Conlon, B. P. (2016). convergence of *staphylococcus aureus* persister and *biofilm* research: can *biofilms* be defined as communities of adherent persister cells? *plos Pathogens*, 12(12), e1006012. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1006012>
- Willems, R. J. L., Hanage, W. P., Bessen, D. E., & Feil, E. J. (2011). Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), 872–900. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2011.00284.X>
- Wu, S. C., Liu, F., Zhu, K., & Shen, J. Z. (2019). natural products that target virulence factors in antibiotic-resistant *staphylococcus aureus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(48), 13195–13211. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05595>
- Wu, S., Zhang, J., Peng, Q., Liu, Y., Lei, L., & Zhang, H. (2021). the role of *staphylococcus aureus* yycfg in gene regulation, *biofilm* organization and drug resistance. *Antibiotics* 2021, Vol. 10, Page 1555, 10(12), 1555. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10121555>

- Xia, G., Kohler, T., & Peschel, A. (2010). The wall teichoic acid and lipoteichoic acid polymers of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(2–3), 148–154. <https://doi.org/10.1016/J.IJMM.2009.10.001>
- Xu, M., Zhong, F., & Zhu, J. (2017a). Evaluating metabolic response to light exposure in *Lactobacillus* species via targeted metabolic profiling. *Journal of Microbiological Methods*, 133, 14–19. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2016.12.008>
- Xu, M., Zhong, F., & Zhu, J. (2017b). Evaluating metabolic response to light exposure in *Lactobacillus* species via targeted metabolic profiling. *Journal of Microbiological Methods*, 133, 14–19. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2016.12.008>
- Yang, H., Wang, M., Yu, J., & Wei, H. (2015). Aspartate inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters*, 362(7), 25. <https://doi.org/10.1093/FEMSLE/FNV025>
- Yarwood, J. M., & Schlievert, P. M. (2003). Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(11), 1620–1625. <https://doi.org/10.1172/JCI20442>
- Ythier, M., Resch, G., Waridel, P., Panchaud, A., Gfeller, A., Majcherczyk, P., Quadroni, M., & Moreillon, P. (2012). Proteomic and transcriptomic profiling of *Staphylococcus aureus* surface LPXTG-proteins: Correlation with agr genotypes and adherence phenotypes. *Molecular and Cellular Proteomics*, 11(11), 1123–1139. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.014191>
- Zhang, A., Sun, H., & Wang, X. (2012). Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for disease: A systematic review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404(4), 1239–1245. <https://doi.org/10.1007/S00216-012-6117-1/METRICS>

- Zhang, Q., Ma, R., Tian, Y., Su, B., Wang, K., Yu, S., Zhang, J., & Fang, J. (2016). Sterilization Efficiency of a Novel Electrochemical Disinfectant against *Staphylococcus aureus*. *Environmental Science and Technology*, 50(6), 3184–3192. <https://doi.org/10.1021/ACS.EST.5B05108/>
- Zheng, J., Shang, Y., Wu, Y., Wu, J., Chen, J., Wang, Z., Sun, X., Xu, G., Deng, Q., Qu, D., & Yu, Z. (2021). Diclazuril inhibits *biofilm* formation and hemolysis of *staphylococcus aureus*. *ACS Infectious Diseases*, 7(6), 1690–1701. <https://doi.org/10.1021/ACSINFECDIS.1C00030/>
- Zhu, Y., Weiss, E. C., Otto, M., Fey, P. D., Smeltzer, M. S., & Somerville, G. A. (2007). *Staphylococcus aureus biofilm* metabolism and the influence of arginine on polysaccharide intercellular adhesin synthesis, *biofilm* formation, and pathogenesis. *Infection and Immunity*, 75(9), 4219–4226. <https://doi.org/10.1128/IAI.00509-07/>