

Análisis del efecto del aceite esencial *Lippia origanoides* sobre el crecimiento planctónico del *Staphylococcus epidermidis* mediante análisis metabólico

Karol Melissa Chanagá Paredes

Trabajo de Grado para Optar al Título de Química

Director

William Fernando Hidalgo Bucheli

Químico, Ph.D

Codirector

Marlon Yesid Cáceres Ortiz,

Microbiólogo, Ph.D

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Química

Bucaramanga

2023

### **Dedicatoria**

*A mi madre Alexandra, por ser la mujer más guerrera que he conocido, mi ejemplo de fuerza y tenacidad; por formarme y ser la persona que soy.*

*A mi padre Gerardo, quien me brindó sus consejos y apoyo incondicional durante estos años de formación.*

*A mi abuela Marina, por educarme, aconsejarme y brindarme su amor incondicional.*

*A mi hermana María Fernanda, ser mi motor de fuerza y acompañarme en mis momentos más difíciles.*

*A Fito y Chispas, por llegar a mi vida a estrenarme el corazón y llenar mi vida con pelos y mucho amor.*

*Y a todas las personas que luchan por sus sueños y no desisten hasta lograrlos.*

### **Agradecimientos**

A Dios por guiarme y darme la fuerza de voluntad para culminar este sueño.

A mi familia por ser mi mayor motivación y haberme brindado el apoyo incondicional durante el proceso y por ser el motor de mi vida.

A Leidy, Mafi, Melissa, Silvia, Bleidy y Hernán por acompañarme durante este proceso brindándome su amistad y apoyo.

A José por el amor, paciencia y comprensión en los momentos finales y difíciles de este proceso.

A los profesores William y Marlon, por permitirme hacer parte de este proyecto y el conocimiento brindado. En especial al profesor William, por la paciencia, por la disposición de ayuda y por seguir fomentando en mí el amor por la ciencia.

Al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, y al programa Bio-Reto XXI-15:50.

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

**¡GRACIAS TOTALES!**

**Tabla de Contenido**

	<b>Pág.</b>
<b>Introducción</b> .....	13
<b>1. Objetivos</b> .....	15
1.1 Objetivo General .....	15
1.2 Objetivos Específicos.....	15
<b>2. Marco referencial</b> .....	16
2.1 La microbiota de la piel .....	16
2.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	16
2.2.1 Mecanismos de resistencia de <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	17
2.3 Aceites esenciales .....	18
2.3.1 <i>Lippia origanoides</i> .....	19
2.4 Metabolitos secundarios.....	20
2.4.1 Carvacrol y timol .....	21
2.5 Metabolómica .....	23
2.5.1 Metabolómica no dirigida.....	24
<b>3. Antecedentes</b> .....	26
<b>4. Materiales y métodos</b> .....	30
4.1 Microorganismos y material vegetal.....	30
4.1.1 <i>S. epidermidis</i> ATCC 51625.....	30
4.1.2 Material vegetal y obtención de aceites esenciales.....	30

4.2 Determinación y evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de <i>Lippia origanoides</i> frente a las células planctónicas de <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	32
4.3 Extracción de metabolitos.....	32
4.4 Análisis por UHPLC-MS de los extractos metanólicos.....	33
4.5 Procesamientos y análisis de los datos.....	34
4.6 Identificación de los metabolitos y análisis de su expresión diferenciada.....	35
4.7 Determinación de las rutas metabólicas bacterianas afectadas por el aceite esencial .....	36
<b>5. Resultados</b> .....	<b>37</b>
5.1 Análisis metabolómico del efecto del aceite esencial <i>Lippia origanoides</i> sobre las células planctónicas de <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	37
5.2 Identificación de metabolitos y rutas metabólicas asociadas al efecto del aceite esencial <i>Lippia origanoides</i> sobre las células planctónicas de <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	44
<b>6. Discusión de resultados</b> .....	<b>52</b>
<b>7. Conclusión</b> .....	<b>55</b>
<b>8. Recomendaciones</b> .....	<b>56</b>
Referencias Bibliográficas .....	57
Apéndices.....	75

**Lista de Figuras**

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Representación esquemática de la superficie de las bacterias Gram-positivas .....	17
Figura 2. Producción de aceites esenciales mediante material vegetal .....	19
Figura 3. Estructura química del carvacrol .....	22
Figura 4. Estructura química del timol .....	22
Figura 5. Corrección de los cromatogramas ion totales en el procesamiento de datos .....	38
Figura 6. Gráficos de puntuación que representan los resultados de PCA con Control(antes), Tratamiento(después) y Calidad(QC) .....	39
Figura 7. Gráficos de puntuación que representan los resultados de PCA sin tratamiento (CTL) y con tratamiento (TTO) .....	40
Figura 8. Gráficos de puntuación que representan los resultados de PLS-DA sin tratamiento (CTL) y con tratamiento (TTO) .....	41
Figura 9. Volcano-plot de los metabolitos estadísticamente más significativos .....	42
Figura 10. Variables en la trayectoria (VIP) de los metabolitos estadísticamente más significativos .....	43
Figura 11. Gráfico del mapa de calor de los metabolitos estadísticamente más representativos después del tratamiento .....	48
Figura 12. Diagrama de bigotes de dos metabolitos estadísticamente significativos .....	49
Figura 13. Esquema de la ruta general de los metabolitos afectados después del tratamiento realizado a la bacteria .....	50

Figura 14. Cinética de crecimiento que presentan las células planctónicas de la bacteria *S. epidermidis* tratada con *L. origanoides*..... 75

**Lista de Tablas**

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Lista de picos representativos del espectro de masas de dos metabolitos estadísticamente representativos. ....	45
Tabla 2. Listado de posibles metabolitos estadísticamente más representativos después del tratamiento .....	46
Tabla 3. Principales constituyentes del AE de <i>L. organoides</i> quimiotipo timol y abundancia relativa .....	75
Tabla 4. Valores de p y clasificación de metabolitos putativamente identificados .....	76

### Lista de Apéndices

**Apéndice A.** Cinética de crecimiento de de *S. epidermidis* tratada con *L. origanoides* quimitipo timol (LOT-II)

**Apéndice B.** Principales constituyentes del AE *L. origanoides* quimitipo timol (LOT-II) y relativa abundancia.

**Apéndice C.** Valores de p de los metabolitos identificados implicados en rutas metabólicas de *S. epidermidis*

## Glosario

**CEU Mass mediator:** “base de datos de compuestos que recopila información de varias bases de datos”

**HMDB:** “base de datos en línea del metaboloma humano”

**KEGG:** “base de datos de genomas, rutas enzimáticas y químicos biológicos”

**UHPL-MS:** “cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a masas”

## Resumen

**Título:** Análisis del efecto del aceite esencial *Lippia origanoides* sobre el crecimiento planctónico del *Staphylococcus epidermidis* mediante análisis metabólico<sup>1\*</sup>

**Autor:** Karol Melissa Chanagá Paredes <sup>2\*</sup>

**Palabras Clave:** Actividad antimicrobiana, metabolitos secundarios, rutas metabólicas, resistencia bacteriana, UHPLC/MS.

**Descripción:** *Staphylococcus epidermidis* hace parte de las diez bacterias intrahospitalarias más frecuentes con resistencia a antibióticos actuales, debido a los distintos mecanismos de supervivencia que dicho microorganismo ha generado. Esta problemática se registra a nivel mundial, por lo que el estudio y validación de nuevos agentes antimicrobianos resulta necesario. De hecho, de estudios de alternativas antimicrobianas, en la última década, se han destacado los aceites esenciales, los cuales están constituidos por metabolitos secundarios que presentan una actividad antimicrobiana destacable y pueden afectar la integridad de los microorganismos patógenos, superando la resistencia bacteriana. En consecuencia, el presente proyecto buscó analizar el efecto del aceite esencial de *Lippia origanoides*, quimiotipo timol (LOT-II) sobre las rutas biosintéticas en el crecimiento planctónico de la bacteria *Staphylococcus epidermidis* ATCC 51625. Para ello, se realizó un análisis de cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplada con espectrometría de masas de alta resolución (UHPLC/HRMS) del crecimiento planctónico de *Staphylococcus epidermidis*. Para poder determinar las rutas metabólicas afectadas, se tomó un enfoque metabólico no dirigido y se utilizaron programas como XCMS, MetaboAnalyst y Xcalibur. La identificación presuntiva de metabolitos se logró por el software online CEU mass mediator junto con la base de datos MassBank, HMDB, ScinFinder-N y Pubchem. Finalmente, se pudo determinar que el aceite esencial *Lippia origanoides* presenta una actividad antimicrobiana en rutas importantes como lo es el ciclo del ácido tricarboxílico, metabolismo de las purinas, metabolismo de arginina y prolina y el metabolismo de la L-fenilalanina.

---

<sup>1\*</sup> Trabajo de Grado

<sup>2\*\*</sup> Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Química. Director: William Fernando Hidalgo Bucheli, Ph.D en Química. Codirector: Marlon Yesid Cáceres Ortiz, Ph.D en ciencias biomédicas

### Abstract

**Title:** Analysis of the effect of *Lippia origanoides* essential oil on the planktonic growth of *Staphylococcus epidermidis* through metabolomic analysis<sup>1\*</sup>

**Author:** Karol Melissa Chanagá Paredes <sup>2\*</sup>

**Key Words:** Antimicrobial activity, secondary metabolites, metabolic pathways, bacterial resistance, UHPLC/MS.

**Description:** *Staphylococcus epidermis* is one of the 10 most common antibiotic-resistant hospital-acquired bacteria. This is a worldwide recognized problem, therefore the analysis and validation of new antimicrobial agents is. In fact, in studies of antimicrobial alternatives, in the last decade, essential oils have been highlighted, which are made up of secondary metabolites that have remarkable antimicrobial activity and can affect the integrity of pathogenic microorganisms, overcoming bacterial resistance. Consequently, the effect of *Lippia origanoides*, thymol chemitype (LOT-II) essential oil on the biosynthetic pathways in the planktonic growth of *Staphylococcus epidermis* is analyzed on this project. For this, Ultra-High Efficiency Liquid Chromatography coupled with High Resolution Mass Spectrometry (UHPLC/HRMS) was used to elucidate the planktonic growth of *Staphylococcus epidermis* ATCC 51625. In order to determine the metabolic pathways affected, an untargeted metabolomic approach was taken and programs such as XCMS, MetaboAnalyst and Xcalibur were used. The presumptive identification of metabolites was carried out by the CEU mass mediator online software together with the MassBank, HMDB, ScinFinder-N and Pubchem database, it was found that *Lippia origanoides* essential oil exhibit antimicrobial activity involved in important pathways such as the tricarboxylic acid cycle, purine metabolism, arginine and proline metabolism, arginine, proline and L-phenylalanine metabolism.

---

<sup>1\*</sup> Undergraduate project

<sup>2\*\*</sup> Science Faculty. Chemistry School. Chemistry. Advisor: William Fernando Hidalgo Bucheli, Ph.D in Chemistry. Co-advisor: Marlon Yesid Cáceres Ortiz, Ph.D in biomedical sciences

### Introducción

La resistencia de los microorganismos a los antibióticos presenta una crisis alarmante en términos de salubridad, ya que cuentan con la capacidad de desarrollar más de un mecanismo de resistencia, que pueden ser transferidos entre bacterias de diferentes especies y los antibióticos conocidos son ineficaces en ciertos casos de infecciones (Schillaci *et al.*, 2017). Como consecuencia, se han llevado a cabo recientes investigaciones cuyo propósito es el estudio, desarrollo y validación de nuevos antibióticos o de nuevos agentes antimicrobianos. Sin embargo, han sido insuficientes debido a que la tasa de crecimiento de la resistencia de los microorganismos no disminuye (Petchiappan & Chatterji, 2017). Por ello, a nivel mundial se están buscando nuevas y posibles alternativas para poder afrontar esta problemática. Se requirieren esfuerzos en cada una de las líneas de la química y áreas relacionadas con la salud, que van desde la identificación de nuevas alternativas de antimicrobianos y antibacterianos, hasta una mejor política mundial en su administración y vigilancia (McCallum *et al.*, 2010).

Por consiguiente, surgen alternativas como el uso de aceites esenciales que se han catalogado como agentes antimicrobianos y antibacterianos. Esto gracias a que producen estrés oxidativo sobre procesos biológicos, alteraciones en la membrana citoplasmática, desequilibrio en las rutas biosintéticas, entre otros; llegando a frenar procesos de infección (Amorati *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2020). Estas características están asociadas principalmente por la presencia de metabolitos secundarios en las diferentes partes de la planta que se encargan de la prevención o control del estrés biótico y abiótico. Por tanto, para poder monitorear las distintas interacciones moleculares, seguidamente de las capacidades antimicrobianas que los aceites esenciales presentan respecto a un microorganismo, se utiliza un estudio integral de los metabolitos con innumerables

beneficios: la metabolómica. En este método se realiza un estudio sistemático de procesos únicos y específicos, permitiendo conocer el fenotipo con el que cuenta un organismo (Kochan *et al.*, 2019).

En este proyecto, se analizaron los efectos del aceite esencial de *Lippia origanoides* sobre las rutas metabólicas en la inhibición del crecimiento planctónico del *Staphylococcus epidermidis*. Para ello, se establecieron perfiles metabólicos del microorganismo en la etapa de crecimiento planctónico, a partir del efecto de la ausencia y presencia del tratamiento con el aceite esencial de *L. origanoides*. Además, fueron identificadas las rutas metabólicas afectadas como consecuencia de dicho tratamiento. En consecuencia, estos resultados permiten que se abra una puerta para futuros análisis, evaluaciones y creación de nuevos agentes antimicrobianos teniendo como base, productos naturales.

## 1. Objetivos

### 1.1 Objetivo General

Analizar el efecto del aceite esencial de *Lippia origanoides* sobre las rutas biosintéticas en el crecimiento planctónico del *Staphylococcus epidermidis*.

### 1.2 Objetivos Específicos

Establecer el perfil metabólico de *Staphylococcus epidermidis* en la etapa de crecimiento planctónico, con y sin tratamiento con el aceite esencial de *Lippia origanoides*.

Identificar los metabolitos y rutas metabólicas asociadas al efecto del aceite esencial de *L. origanoides* sobre el microorganismo de estudio.

## 2. Marco referencial

### 2.1. La microbiota de la piel

La piel es el órgano más grande en el cuerpo de los seres humanos, cuenta con tres tipos de capas: epidermis, dermis e hipodermis. Además, cuenta con tres tipos de zonas: sebáceas o grasas, húmedas y secas. En toda la piel se encuentra una serie de organismos que le permiten tener un equilibrio en la microbiota (Byrd *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2022). De esta manera, los microorganismos comensales que pueden encontrarse en la superficie de la piel pueden actuar como una barrera física en contra de patógenos extraños, evitando su colonización e invasión al ocupar nichos y competir por los nutrientes (Ito & Amagai, 2023, Scharschmidt & Fischbach, 2013).

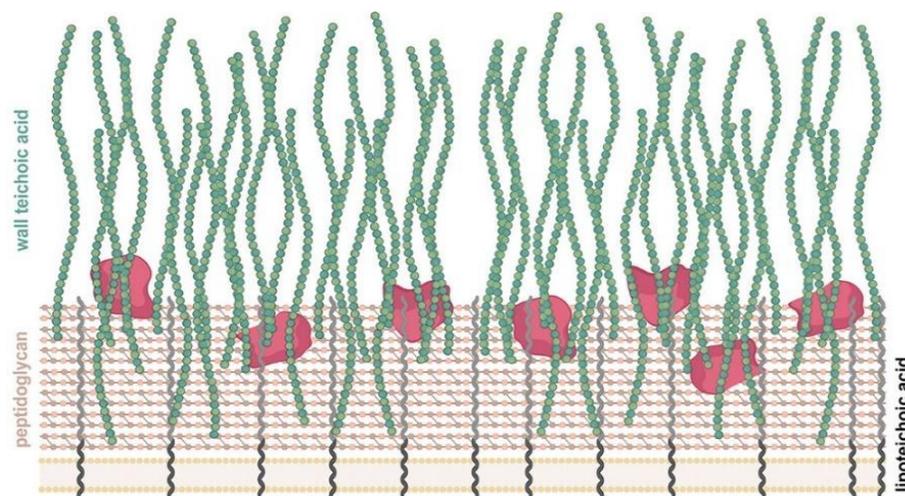
### 2.2 *Staphylococcus epidermidis*

*Staphylococcus epidermidis*, es un estafilococo coagulasa negativo (CoNS) y es un microorganismo comensal Gram-positivo, que suele encontrarse en la microbiota de la nariz y la piel. Se considera como un microorganismo benigno para el huésped (Becker *et al.*, 2014), ya que ayuda en el control de la microbiota de la piel humana y las membranas mucosas. Sin embargo, es una de las causas más frecuentes de infecciones nosocomiales, especialmente, cuando se trata de pacientes inmunocomprometidos (Siljamäki *et al.*, 2014). De hecho, esta bacteria es la responsable del 20 % de todas las infecciones que están relacionadas con dispositivos médicos ortopédicos y con alrededor del 50 % de las infecciones neonatales de aparición tardía (Mirzaei *et al.*, 2022). Además, según el informe presentado en el año 2019, por parte de Instituto Nacional de Salud, en Colombia, *S. epidermidis* hace parte de uno de los diez microorganismos reportados y se pueden asociar con procedimientos médico quirúrgicos. También, este microorganismo se localiza en la

UCI neonatal, pediátrica y de adultos, con porcentajes de 21,2 %, 5 % y 10 % respectivamente (Instituto Nacional de Salud, R. de C., 2019).

De hecho, la mayoría de las enfermedades causadas por *S. epidermidis* resultan ser de carácter crónico y ocurren como infecciones relacionadas con dispositivos médicos, como con infecciones de catéteres intravasculares o prótesis articulares (Zhang *et al.*, 2003). Esta capacidad se debe porque al ingresar el microbio a la circulación desde el sitio principal de la infección, el torrente sanguíneo la propaga a los órganos y tejidos apartados. Como consecuencia, ocasiona que el microbio se pueda adherir a sitios adicionales, con lo cual las células planctónicas puedan formar biofilm. Este último es un estado más virulento y difícil de combatir con antibióticos (Mirzaei *et al.*, 2022).

**Figura 1.** Representación esquemática de la superficie de las bacterias Gram-positivas



Nota. Tomado de Ferraro & Pires (2022, p.768)

### 2.2.1 Mecanismos de resistencia de *Staphylococcus epidermidis*

*S. epidermidis* cuenta con la capacidad de generar ciertas características que permiten la generación de algunos mecanismos de virulencia y resistencia. Por ejemplo, los ácidos teicoicos

(TA) son un tipo de mecanismos de virulencia. Son componentes característicos de este tipo de bacterias y tienen múltiples funciones en fisiología y patogenia (Keinhörster *et al.*, 2019).

Otro mecanismo que presenta este microorganismo es la proteína asociada a la acumulación (Aap). Esta es necesaria para la acumulación de *S. epidermidis* en las superficies, debido a que la Aap forma fibrillas poliméricas en las superficies de este microbio. Los aspectos mencionados contribuyen en gran medida en la adhesión, colonización e inflamación (Otto, 2012). De igual manera, la expresión de los genes del operón icaABCD es otro factor de virulencia en *S. epidermidis*, debido a que codifica la producción del polisacárido de adhesión intercelular (PIA), considerado el principal y mejor caracterizado polisacárido constituyente del biofilm en este microorganismo (Sánchez *et al.*, 2020).

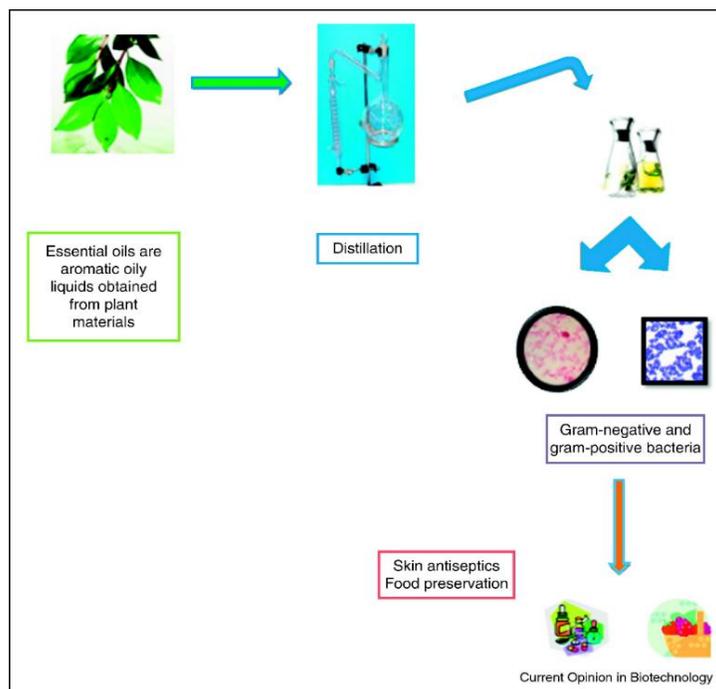
Finalmente, otra de las características preocupantes de este microbio, es la formación de colonias pequeñas (SCV). Estas presentan una pigmentación y una actividad hemolítica más baja. Además, presentan formación de biopelículas y una virulencia controlada. Sin embargo, cuando se exponen a ciertos nutrientes, cuentan con una mayor resistencia a los medicamentos y tasas de crecimientos (Fernández *et al.*, 2021).

### **2.3 Aceites esenciales**

Los aceites esenciales (AE) son sustancias con olores característicos, que son obtenidos de gran variedad de plantas naturales y de distintas partes, incluidos hojas, frutos, raíces y maderas (Phakawat T & Soottawat B, 2014). Suelen ser obtenidos mediante métodos de destilación, fermentación o de manera más frecuente se suele utilizar la destilación de vapor (Solórzano & Miranda, 2012).

Para la obtención de estos productos, se debe tener en cuenta que su calidad, cantidad y composición pueden verse afectados por factores externos como el clima, la edad y los nutrientes (Lisboa *et al.*, 2020). Algunos de los AE tienen la capacidad de ser antioxidantes, esto se debe principalmente a los componentes que presentan, como los terpenoides y los fenilpropanoides. Estos últimos hacen parte de los compuestos fenólicos que tienen la capacidad de frenar la oxidación aeróbica de la materia orgánica (Amorati *et al.*, 2013).

**Figura 2.** Obtención de aceites esenciales a partir de material vegetal



Nota. Tomado de Solórzano & Miranda (2012, p.137).

### 2.3.1 *Lippia origanoides*

Los aceites esenciales son altamente volátiles a temperatura ambiente. Se degradan fácilmente en presencia de oxígeno y luz. Presentan altas lipofilia que facilitan la interacción y las posibles afectaciones con funciones metabólicas, bioquímicas y fisiológicas (Mar *et al.*,

2018). Por ejemplo, un aceite esencial muy utilizado en Colombia es obtenido de la planta *Lippia origanoides*. Este pertenece a la familia *Verbanaceae*, que se encuentra compuesta por 75 géneros con alrededor de 3000 especies, de las cuales 200 pertenecen al género *Lippia* y se encuentran distribuidas alrededor de América Central, América del Sur y algunos países de África (Medeiros *et al.*, 2014).

Por otro lado, en el aceite esencial *Lippia origanoides* predominan dos quimiotipos: el timol y el carvacrol. Sin embargo, también es importante destacar que existen otros compuestos como el  $p$ -cimeno que se encuentran presentes en la composición de este AE (Santos *et al.*, 2023). Además, estos compuestos también denominados metabolitos secundarios le confieren al AE propiedades como repelente, antioxidante, antiviral y antimicrobiano (Vicuña *et al.*, 2010). De hecho, la última propiedad es de gran interés a nivel investigativo, pues se ha demostrado que presenta una considerable actividad antimicrobiana contra la bacteria *Staphylococcus epidermidis* (Cáceres *et al.*, 2020).

#### **2.4 Metabolitos secundarios**

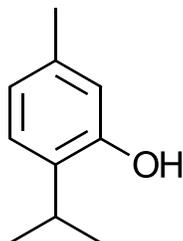
Las plantas sintetizan compuestos clave que les permiten cumplir con tareas esenciales como la reproducción, la ejecución de relaciones simbióticas y la supervivencia. Este tipo de sustancias cuentan con estructuras químicas complejas, baja masa molecular y distintos activos biológicos (Lisboa *et al.*, 2020). Son llamados metabolitos secundarios y, según su estructura, se pueden agrupar en tres clases químicas principales: terpenoides, alcaloides y compuestos fenólicos (Wu *et al.*, 2021).

Varios compuestos fenólicos de bajos pesos moleculares son compuestos volátiles que se pueden obtener en las plantas mediante distintos métodos de extracción como timol, carvacrol,  $p$ -

cimeno, guayacol, eugenol, entre otros. Son sustancias hidrofóbicas y su actividad antimicrobiana puede ser debida al carácter básico (Fontes *et al.*, 2018). De hecho, el  $\rho$ -cimeno, (1-metil-4-isopropil-benceno) es un monoterpeno aromático que se cataloga como precursor biológico del carvacrol y timol. La reacción ocurre cuando el  $\gamma$ -terpineno sufre una reacción de aromatización y se produce el  $\rho$ -cimeno, el cual mediante una reacción de hidroxilación produce los isómeros fenólicos de carvacrol y timol (Soleimani *et al.*, 2022). Además, gracias a los estudios realizados por (Ultee *et al.*, 2002) se conoce que  $\rho$ -cimeno perturba la integridad de la membrana citoplasmática de las bacterias, ya que cuenta con la capacidad de acumularse en la misma y generar separación entre los fosfolípidos provocando que surjan filtraciones por las cuales los iones pueden salir del interior de las células.

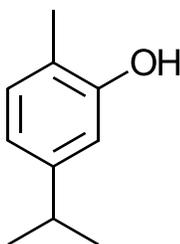
#### **2.4.1 Carvacrol y Timol**

El carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) es un metabolito que se encuentra en el aceite esencial de *Lippia organoides*. Es un fenol monoterpénico con una fuerte actividad antimicrobiana y antioxidante. Por ello, es muy conocido en la conservación de alimentos (Niza *et al.*, 2020). Además, presenta una considerable actividad antimicrobiana, esto es debido a que cuenta con la presencia del grupo hidroxilo. Este último, se encuentra en posición *-orto* con respecto al grupo metilo presente en el anillo aromático; es de destacar que esta disposición y sustituyentes son fundamentales para sus propiedades químicas, ya que le permiten ser eliminador de radicales libres y estabilizarse mediante resonancia. Se ha demostrado que la resonancia es beneficiosa para efectos antimicrobianos (Marchese *et al.*, 2018).

**Figura 3.** Estructura química del carvacrol

Nota. La figura muestra la estructura química del Timol, en donde se puede observar la presencia del grupo hidroxilo en posición *-orto*.

Por otro lado, el timol (2-isopropil-5-metilfenol), es uno de los compuestos mayoritarios en el aceite de *Lippia origanoides*. Es un terpenoide que cuenta con un grupo hidroxilo en posición *-meta* en el anillo fenólico. Además, se ha evidenciado que puede causar daños a nivel estructural y funciones de la membrana citoplasmática, haciendo que se pueda presentar permeabilidad y se pierdan macromoléculas y proteínas (Zhou W et al., 2019).

**Figura 4.** Estructura química del Timol

Nota. Elaboración propia

En realidad, los metabolitos de carvacrol y timol han demostrado ser potentes agentes antimicrobianos contra las bacterias. Uno de los posibles mecanismos de acción de estos dos compuestos es su naturaleza hidrófoba que puede afectar el crecimiento de los patógenos. Esta naturaleza hidrófoba permite que se puedan integrar en las membranas de las células de las

bacterias, ocasionando modificaciones en la función normal de dichas membranas (Kachur & Suntres, 2020). Además, como es mencionado por (Balahbib *et al.*, 2021), mediante diferentes estudios se ha podido evidenciar que la capacidad inhibitoria que presenta el carvacrol sobre los microorganismos aumenta con la presencia de  $\rho$ -cimeno. De esta manera, se ha podido evidenciar que estos metabolitos presentan actividad antimicrobiana sobre a las células en crecimiento planctónico y en las biopelículas de la *S. epidermidis* (Walsh *et al.*, 2019).

### **2.5 Metabolómica**

Con el propósito de conocer y entender de manera más específica los procesos celulares involucrados en los organismos se han utilizado técnicas analíticas como resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (MS), en conjunto con tratamientos informáticos de datos, este tipo de estudio se ha denominado metabolómica. De esta manera, estudio permite visualizar los distintos impactos funcionales que presentan los microorganismos, debido a que este estudio proporciona una evaluación más directa del fenotipo celular, además, es el más adecuado para la realización de controles cuantitativos y dinámicos de las variables en el metabolismo bacteriano bajo ciertas condiciones ambientales (Aros-Calt *et al.*, 2015). Así mismo, la metabolómica se clasifica en dos grandes enfoques, el primero de ellos es la metabolómica dirigida, que permite realizar estudios de cuantificación de determinados metabolitos concretos y conocidos; y el segundo enfoque es la metabolómica no dirigida permite realizar estudios que brindan fenotipos metabólicos (Guo *et al.*, 2021).

Por otro lado, cuando se utiliza espectrometría de masas (MS), se obtiene datos como tiempo de retención (tR) y relaciones  $m/z$ , los cuales brindan características propias de metabolitos que suelen estar relacionados con la expresión genética y la actividad celular (Kuehnbaum & Britz,

2013). Además, cuando se utiliza cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (UHPLC-MS), se pueden obtener cuantificaciones de datos metabolómicos, ya que permite identificar un alto número de metabolitos (Ashokan *et al.*, 2022). Sin embargo, es importante aclarar que no todos los metabolitos detectados están implicados en procesos biológicos ya que cerca del 95 % de los metabolitos son producidos a partir de degeneraciones, artefactos y contaminantes (Stancliffe & Patti, 2023).

### ***2.5.1 Metabolómica no dirigida***

El análisis metabolómico no dirigido es un análisis que intenta captar las señales de todos los metabolitos presentes en el metaboloma y se realiza por medio de una serie de análisis de datos uni y multivariados, los cuales permiten dilucidar los metabolitos que presentan alteraciones en los procesos biológicos que sufren los microorganismos (Vu *et al.*, 2019; Wilkinson & Friendly, 2009). La detección e identificación se realiza mediante las siguientes pruebas estadísticas:

- El análisis de componentes principales (PCA), es un análisis multivariado que sirve como primer enfoque para caracterizar la variación y separación en los conjuntos de datos metabolómicos.
- El análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), es otro análisis multivariado que sirve para identificar características de los datos que distinguen a los grupos experimentales. Cabe destacar que de este análisis se obtienen dos valores denominados  $R^2$  y  $Q^2$  permiten determinar la consistencia del modelo.
- El gráfico volcano plot, es un diagrama en cual se puede observar los metabolitos que fueron estadísticamente significativos.

- Valores de proyección (VIP), es una representación gráfica en la cual se observa la contribución de cada variable al modelo.
- Prueba T, es una prueba uni-variada que permite identificar si hay diferencias significativas entre las medias entre los grupos de estudio.
- Los gráficos del mapa de calor (*heatmap*, en inglés), en el cual se puede visualizar bidireccional la matriz de los datos.
- Fold change (FC), compara el valor absoluto del cambio entre las medias de los grupos con los que cuente el estudio.

### 3. Antecedentes

Desde el descubrimiento de los antibióticos y su época dorada, estos compuestos se han convertido en el arsenal para combatir los microorganismos patógenos. Sin embargo, con el transcurrir de los años los microorganismos han generado distintos métodos de supervivencia; logrando así que se genere una alarmante crisis de resistencia a nivel mundial (Schillaci *et al.*, 2017). De hecho, en las dos últimas décadas algunas bacterias que se consideraban como no patógenas, han cambiado su comportamiento y han despertado el interés científico, ya que están produciendo graves problemas de salubridad (Büttner *et al.*, 2015). Un claro ejemplo de esta problemática es la bacteria gram positiva *S. epidermidis*, que ha generado variaciones y ha llegado a presentar infecciones graves en ambientes intrahospitalarios (Severn & Horswill, 2023). De hecho, suele afectar a personas que cuentan con los siguientes factores: (a) sistema inmunológico comprometido, (b) ruptura de piel o mucosas y (c) presencia de dispositivos permanentes; este último factor suele proporcionar superficies que fácilmente son colonizadas por este microorganismo (Heilman *et al.*, 2019). Además, esta bacteria se suele encontrar en dos diferentes formaciones, células planctónicas y biopelículas, pero en estudios realizados se evidenció que las células planctónicas presentan interacciones funcionales más intensas y que procesos como el ciclo de TCA, la glucólisis y la generación de energía se ven favorecidos en esta clase de formación (Martínez *et al.*, 2021).

Por otro lado, para su tratamiento se han utilizado distintas familias de antibióticos, por ejemplo, los  $\beta$ -lactámicos (oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina) cuentan con la capacidad de inhibir la síntesis de la pared bacteriana e inducir la muerte celular (Suárez & Gudiol, 2009); sin embargo con el tiempo se ha demostrado que el microorganismo ha generado

resistencia, la cual se debe principalmente por la producción de  $\beta$ -lactamasas, las cuales inhiben la acción o efecto que pudieran tener esta clase de antibióticos (Vermote & Van Calenbergh, 2017). Esto se debe al hecho que los microorganismos buscan estrategias para la supervivencia, en el caso *S. epidemidis* se evidencian células persistentes tanto en el crecimiento planctónico como en el biofilm; estas células persistentes resultan preocupantes ya que son las responsables de un porcentaje de los altos niveles de tolerancia a múltiples fármacos y exhiben una peculiaridad, debido a que no se multiplican ni mueren en presencia de antibióticos (Shapiro et al., 2011). De esta manera, la resistencia que este y otros microorganismos han generado a los antibióticos existentes hace de manera casi obligatoria que se busquen nuevas alternativas para mitigar la creciente crisis que estas producen (Petchiappan & Chatterji, 2017).

Por consiguiente, se han realizado estudios por cerca de casi dos décadas con aceites esenciales, que cuentan con metabolitos secundarios y se ha podido demostrar que presentan actividad antimicrobiana con una buena eficacia (Cristani *et al.*, 2007; Semeniuc *et al.*, 2017). Sobre todo, en bacterias gram positivas en las cuales se ha podido determinar que las moléculas hidrofóbicas que conforman los AE penetren fácilmente en las células bacteriana y puedan actuar en la pared celular y en el citoplasma (Nazzaro *et al.*, 2013). En concreto, existe un aceite esencial que ha generado gran interés científico, se trata de la especie vegetal *Lippia origanoides*, la cual se encuentra en el continente americano, especialmente en Centroamérica y Colombia, en este último específicamente en departamentos como la Guajira, Santander, entre otros. Su uso se debe a considerables beneficios, ya que se suele utilizar como condimento; para el tratamiento de enfermedades respiratorias, trastornos gastrointestinales y como antiséptico (Oliveira *et al.*, 2014).

Por otro lado, para la caracterización de estos AE se suelen utilizar la cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS), porque suele ser un método rápido y eficiente (Freitas *et al.*, 2018). De esta manera, se ha podido estimar que el AE de *Lippia origanoides*, cuenta con una composición química de 66,0 % de monoterpenos oxigenados; 20,7 % de hidrocarburos monoterpenicos; un 9,0 % de hidrocarburos sesquitérpicos y un 1,1 % de sesquiterpenos oxigenados (Oliveira *et al.*, 2007). De hecho, se pudo determinar que los compuestos mayoritarios con los que cuenta el aceite esencial son principalmente carvacrol y timol, con porcentajes de 38,6 y 18,5. Además, cuenta con la presencia de monoterpenos como  $\rho$ -cimeno (10,3%) y  $\gamma$ -terpineno (4,1%), así como el sesquiterpeno (*E*)-cariofileno (5,9%). Cabe resaltar que estas relaciones de compuestos pueden llegar a variar dependiendo de la región de procedencia, del método de extracción y de la parte de la planta, de la cual se está extrayendo el aceite esencial (Félix *et al.*, 2021).

Por otro lado (Fontes *et al.*, 2018) lograron demostrar que el metabolito secundario denominado carvacrol, tienen la capacidad de afectar la permeabilidad de la membrana citoplasmática de las bacterias gram-positivas; esto ocurre por la gran acumulación de moléculas que se encuentran en el interior de la membrana, aumentando de esta manera la permeabilidad iónica, que conlleva a la disipación del gradiente de electrones, lo cual eventualmente conduce a la permeabilidad de la membrana. Además, cabe destacar que el carvacrol, presenta una gran acción antimicrobiana respecto a microorganismos por que tiene la capacidad de realizar cambio de manera estructural y funcional en la membrana de estas, en donde logra ralentizar o inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos (Nostro *et al.*, 2007; Walsh *et al.*, 2019). De manera similar, el metabolito secundario denominado timol, que presenta una naturaleza hidrofóbica, logra

interactuar con la bicapa lipídica que poseen las membranas citoplasmáticas causando pérdida de integridad, logrando que se produzcan fugas de material celular como iones, ATP y ácido nucleico (Nostro *et al.*, 2007), lo cual a su vez tiene la facultad de estar vinculado con la muerte celular de los microorganismos. Además, se ha podido evidenciar que el metabolito  $\rho$ -cimeno, resulta contraproducente para las células de las bacterias, ya que por su naturaleza aromática se presente como un sustrato tóxico, ya que genera alteraciones en las membranas celulares, ácidos nucleicos y proteínas específicas para la bacteria, generando estrés, cambios morfológicos y eventualmente la muerte en la misma (Agulló L *et al.*, 2017).

Finalmente, para poder evidenciar las alteraciones que pueden ocasionar los metabolitos de los AE sobre las células de las bacterias se ha utilizado el análisis metabolómico global o no dirigido, el cual permite detectar, identificar y cuantificar las variaciones metabolómicas. De hecho, (Mohd *et al.*, 2022) ha evidenciado que realizar este análisis en bacterias brinda información sobre nuevos marcadores biológicos de diagnóstico y posibles compuestos con actividad antimicrobiana.

## **4. Materiales y métodos**

### **4.1. Microorganismo y material vegetal**

#### **4.1.1. *S. epidermidis* ATCC 51625**

Para este proyecto se empleó el microorganismo *Staphylococcus epidermidis* ATCC 51625, el cual fue adquirido del American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA) por la escuela de microbiología de la Universidad Industrial de Santander y para efectos de la ejecución del presente análisis fue donado al Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM). Los medios de cultivo de Caldo Soja Trypticaseína (TSB) se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Todos los ensayos biológicos se realizaron empleando agua MilliQ de resistividad 18.2  $\Omega$ , extraída del Equipo Smart 2 Pure (Thermo Fisher Scientific, MA, USA).

#### **4.1.2. Material vegetal y obtención de aceites esenciales.**

El aceite esencial de *Lippia origanoides*, que se empleó en el presente estudio, fue proporcionado por el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM), el cual fue previamente caracterizado, con el fin de conocer los metabolitos más abundantes presentes en el aceite.

El dimetil sulfóxido (DMSO) utilizando como disolvente del aceite esencial fue grado HPLC y se adquirió en Merck. Las microplacas de 96 pozos de polipropileno de fondo redondo con tapa marcan Biologix. El aceite esencial *Lippia origanoides* fue destilado y posteriormente caracterizado teniendo en cuenta la metodología sugerida por (Stashenko et al., 2010). Para ello, se requirió el uso de equipos tipo Clevenger, los cuales se encontraban acondicionados a un sistema de calentamiento por microondas Samsung MS-1242zk (Seúl, Corea, horno con potencia de salida de 1600 W y frecuencia de radiación de 2,4 GHz). Seguidamente, el aceite esencial fue secado

sobre sulfato de sodio anhidro, se pesó y se almacenó a 4 °C. Todas las hidrodestilaciones se realizaron 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). Se utilizaron una columna capilar apolar, DB-5MS, de 60 m x 0.25 mm (d.i.) x 0.25 µm (df), con fase estacionaria de 5%-fenil-poli (dimetilsiloxano), y una 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 (Stashenko et al., 2010) Los espectros de masas, corrientes iónicas totales (TIC) y de iones extraídos (EIC) se obtuvieron con un analizador cuadrupolar, por medio de barrido automático de radiofrecuencia (*full scan*) en el rango de masas de  $m/z$  40-350 (5.5 espectros/s). Los componentes de los aceites esenciales se identificaron por comparación de sus espectros de masas, obtenidos por GC-MS, e índices de retención lineales (LRI) en las dos columnas, polar y apolar, calculados con base en la serie homóloga de *n*-alcanos C9-C25 (Sigma-Aldrich, Milwaukee, Wisconsin, EE. UU.) y comparados con los de diferentes bases de espectros de masas (NIST, 2014 y Wiley, 2008) y datos de literatura científica.

Para la identificación confirmatoria de los componentes del aceite esencial, extracto o fracciones volátiles, se usaron las siguientes sustancias-patrón, adquiridas de Sigma-Aldrich (Milwaukee, Wisconsin, EE.UU.): Acetato de geranilo (98%), aromadendreno (97%), benzoato de bencilo, β-cariofileno (98.5%), 1,8-cineol (99%), pcimeno (99%), α-copaeno (90%), geraniol

(98%),  $\alpha$ -humuleno (96%), linalool (97%), (R)- (+)-limoneno (97%), trans-nerolidol (85%), óxido de cariofileno (95%),  $\alpha$ -pineno (98%). Todos los solventes empleados fueron de grado HPLC.

#### **4.2 Determinación y evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Lippia origanoides* frente a las células planctónicas de *Staphylococcus epidermidis***

La determinación de la actividad antimicrobiana se realizó mediante pruebas de inhibición de crecimiento bacteriano determinando la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) causada por el AE de *L. origanoides* en la bacteria *S. epidermidis* ATCC 51625. Para determinar el efecto antimicrobiano del AE se empleó el método de microdilución en caldo, estandarizado en el laboratorio, y la determinación de los valores de MIC se realizaron utilizando placas de 96 pozos de polipropileno y fondo plano.

Para evaluar la actividad antimicrobiana del aceite se preparó inicialmente un cultivo bacteriano en estado planctónico del microorganismo durante 24 h. Posteriormente, se verificó la viabilidad del cultivo y a partir de este se realizó un preinóculo de la bacteria en caldo Mueller Hinton (MH), durante 12 h a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una concentración bacteriana adecuada (entre  $10^5$  y  $10^6$  UFC/mL). Se realizó la cinética de crecimiento empleando microplacas que contengan 100  $\mu$ L del inóculo bacteriano junto con 100  $\mu$ L de diluciones seriadas a diferentes concentraciones del AE disueltas en dimetilsulfóxido (DMSO). Las mediciones del ensayo se realizaron durante ocho horas a 37 °C con una agitación de 200 rpm en un lector de microplaca ELISA (Biorad, Imarck, California, EE. UU), utilizando una longitud de onda de 595 nm.

#### **4.3 Extracción de metabolitos**

Para la extracción de metabolitos bacterianos se realizó un pre-inóculo de la bacteria como se explicó anteriormente. Posteriormente, se realizó la cinética de crecimiento y a la cuarta hora el

medio de cultivo fue retirado y el microorganismo aislado mediante centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos, seguidamente se adicionaron 500  $\mu$ L de agua peptonada al 0,1% (v/v) y se centrifugó nuevamente. Luego, se llevó a cabo la lisis química con metanol y acetonitrilo al 50% v/v, mediante sonicación utilizando un sonicador de punto Cole Parmer, con una metodología de trabajo con pulsos de 10 s en ON y 45 s en OFF por triplicado. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 12.000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante obtenido se transfirió a tubos Eppendorf de fondo en U, cuidando de no arrastrar los desechos celulares precipitados. Luego, los solventes fueron evaporados en un equipo Savant Speed Vac SPD120 (Thermo Fisher Scientific, Asheville, NC 28804, EE.UU) y las muestras fueron conservadas en un refrigerador a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, el residuo fue reconstituido en 300  $\mu$ L de una mezcla de metanol frío grado HPLC al 50% v/v, que contenía los estándares internos Z-GlyTyr-OH y cafeína, y fue almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis por UHPLC- MS. Finalmente, se prepararon muestras de control de calidad (QC, por sus siglas en inglés, Quality Control) a partir de las extracciones obtenidas, con el objetivo de garantizar que las diferencias obtenidas entre las muestras control y tratadas ocurre por cambios biológicos (Witting, 2013). Los ensayos fueron realizados por nonuplicado (n=9).

#### **4.4 Análisis por UHPLC-MS de los extractos metanólicos**

Se realizó un análisis de los metabolitos extraídos mediante 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). Además, el espectrómetro de masas se acopló a un Dionex<sup>TM</sup> Ultimate<sup>TM</sup> 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 termostatzada para la columna (TCC 3000). Se utilizó una columna Hypersil GOLD™ aQ (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, EUA; 100 × 2,1 mm, tamaño de partícula de 1,9 μm) en condiciones de funcionamiento de 30 °C. Así mismo, fue 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. Se utilizó como fase móvil ácido fórmico al 0.2% en agua (A) y ácido fórmico al 0.2 % en acetonitrilo (B). La condición inicial de gradiente fue la siguiente: 100 % de A cambiando linealmente a 100% de B en 8 min, se mantuvo constante 4 min, se regresó a 100 % A en 1 min y se mantuvo en equilibrio durante 3 min. El flujo de la fase móvil fue de 300 μL/min y el volumen de inyección, 1 μL. Por otro lado, la fragmentación que realizaron los iones positivos se realizó 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) y la fragmentación de los iones negativos fue realizada de igual manera. Para cada energía de colisión, se utilizó una resolución RFWHM de 35.000, usando AGC de 3x10<sup>6</sup> y un tiempo de inyección en la cámara C-trap de 50 ms. Todos los espectros de masas se obtuvieron en el rango de  $m/z$  50-750  $u$ .

#### **4.5 Procesamiento y análisis de los datos**

Para poder identificar los metabolitos bacterianos que se expresarán diferencialmente debido al tratamiento con el aceite esencial se llevará a cabo desde un enfoque metabólico no dirigido, para ello, los archivos de datos sin procesar se convirtieron a archivos de formato mzXML mediante la herramienta MSconvert (software ProteoWizard 3.0x) y se cargaron en la plataforma interactiva en línea XCMS versión 3.7.1 (Tautenhahn et al., 2012). La configuración de parámetros

para la alineación de cromatogramas y normalización de datos fue la siguiente: se ejecutó un análisis multigrupo en el modo centWave para la detección de características ( $\Delta = 5$  ppm, ancho de pico mínimo = 5 s y ancho de pico máximo = 20 s); la corrección del tiempo de retención se realizó con un método obiwrap (profStep = 1); y la alineación del cromatograma: mzwid = 0.025 y bw = 5).

De esta manera, se obtuvo como salida la matriz datos de los modos de adquisición de iones positivos (IP) y negativo (IN). Seguidamente, los datos de la matriz fueron filtrados de acuerdo con el coeficiente de variación (CV) de las muestras control de calidad (QC). Además, los datos que presentaron mayor coeficiente de variación ( $CV > 30\%$ ) y los datos repetidos fueron eliminados, con el propósito de disminuir el ruido de fondo.

#### **4.6 Identificación de los metabolitos y análisis de su expresión diferenciada**

Para la determinación de la identidad química de los metabolitos se llevó a cabo en el software MetaboAnalyst 5.0 (Pang et al., 2021), en donde se realizó la normalización de los datos y se obtuvieron los gráficos de análisis de componentes principales (PCA), análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), gráficos de volcano-plot y gráficos de las variables en la proyección (VIP) de los modos de adquisición de iones positivos (IP) y negativo (IN).

De hecho, el primer análisis realizado fue el análisis de componentes principales (PCA), este fue realizado para poder disminuir la dimensionalidad del conjunto, y poder determinar si existe separación entre las dos variables presentes en este estudio. Con el fin de observar mejor la separación de las variables y poder respaldar los resultados del PCA, se realizó un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). Después, las características más significativas ( $VIP > 1,5$ ) se filtraron utilizando el análisis de importancia de variables en la proyección (VIP) y se realizó un gráfico de volvano plot, para observar la dispersión de los datos

de los metabolitos significativamente tentativos. Adicionalmente, se realizó un gráfico de mapa de calor, con el fin de determinar patrones o grupos (clúster), un análisis del fold change (FC) para obtener una cuantificación relativa de los metabolitos, cuyos valores de 0-0.5 corresponden a metabolitos que presentaron un incremento en su concentración, y valores mayores de 2 indican metabolitos con disminución en su concentración. Luego, se realizó una prueba T para determinar la variación estadística de las medidas de los dos grupos y un volcano plot el cual permite relacionar la significancia estadística (valor P) frente a la magnitud del cambio (FC).

#### **4.7 Determinación de las rutas metabólicas bacterianas afectadas por el aceite esencial**

Finalmente, se realizó la identificación tentativa de los metabolitos estadísticamente significativos utilizando la base de datos CEU Mass Mediator versión 3.0 (<http://ceumass.eps.uspceu.es/>), la base de datos del metaboloma humano (<https://hmdb.ca/>), SciFinder-N (<https://scifinder-n.cas.org/>) MassBank (<https://massbank.eu/MassBank/>) y PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los análisis de vía y enriquecimiento se realizaron con MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>). Se integraron los resultados obtenidos y se construyeron las posibles rutas metabólicas afectadas a causa del efecto por el AE *Lippia origanoides*, con ayuda de herramientas bioinformáticas como MetaboAnalyst 5.0 y KEGG (Enciclopedia de genes y genomas de Kioto). El análisis fue realizado seleccionando la biblioteca apropiada para *Staphylococcus epidermidis*

## 5. Resultados

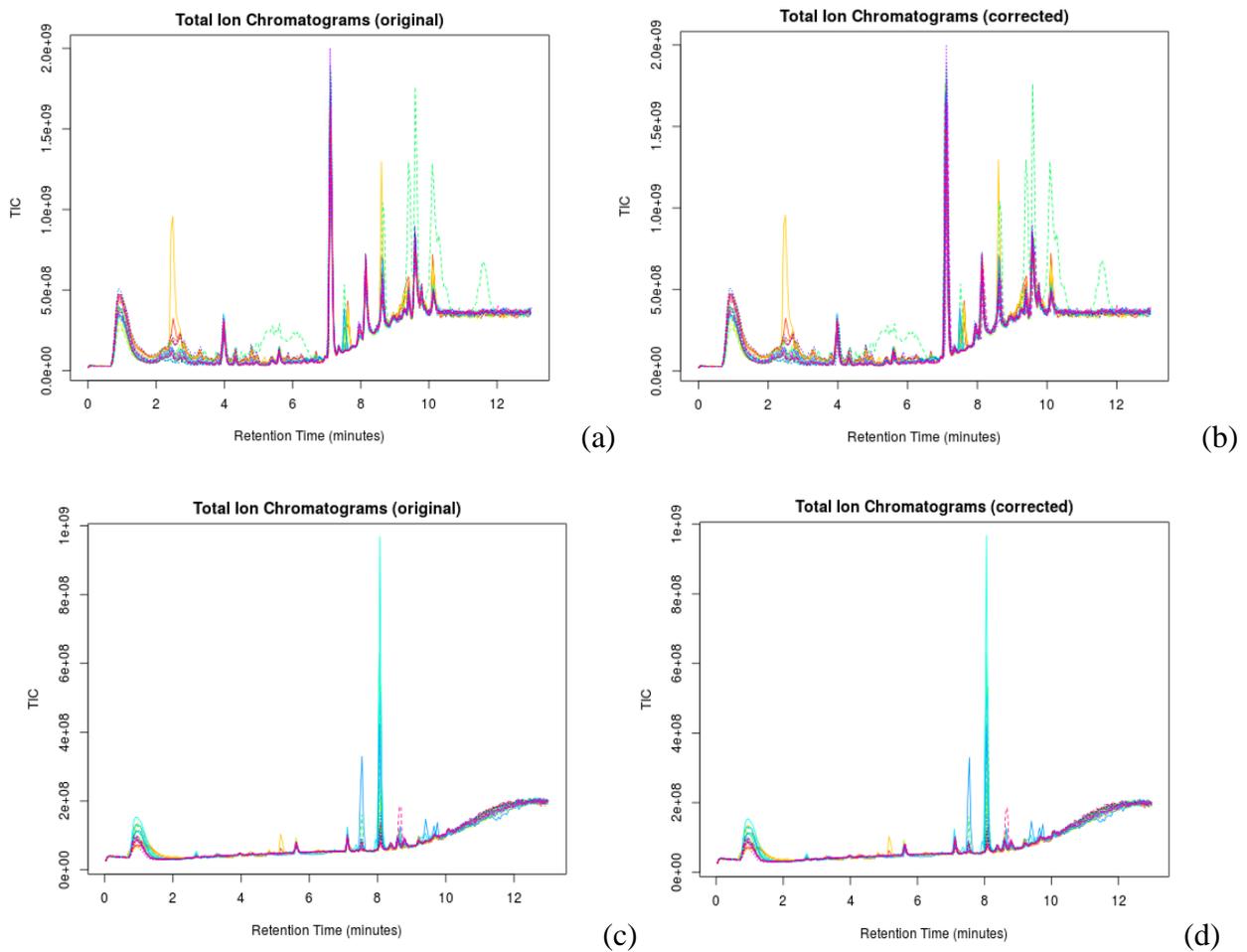
### 5.1 Análisis metabólico del efecto del AE *L. origanoides* sobre células planctónicas de *S. epidermidis*

Para iniciar el análisis metabólico se optó por una metodología no dirigida, con la cual se logró observar el efecto del AE de *L. origanoides* LOT-II sobre las células planctónicas de *S. epidermidis*. Se utilizó UHPLC-ESI-Orbitrap/HRMS que cuenta con modos de adquisición de iones positivos (IP) y negativo (IN).

Luego, se realizó un procesamiento de datos en el programa XCMS, el cual consistió en un análisis multigrupo en cada uno de los modos, cuyo resultado fue la alineación y corrección de los cromatogramas; en las figuras 5 se visualizan los cromatogramas original y corregido de los dos métodos de adquisición de iones. Adicionalmente, se obtuvo la salida de las matrices de datos con las intensidades de las características detectadas, la cual contó con 2.275 y 2.012 en datos en el modo de adquisición de iones negativo (IN).

Seguidamente, los datos de la matriz fueron filtrados para disminuir el ruido de fondo; esto se realizó mediante la determinación de la desviación media de los datos, cuyo valor máximo fue de 30 % y se eliminaron los datos repetidos. Después de esto, la matriz quedó conformada por 1.298 datos en el modo de adquisición de iones positivos (IP) y 998 datos en el modo de adquisición de iones negativo (IN).

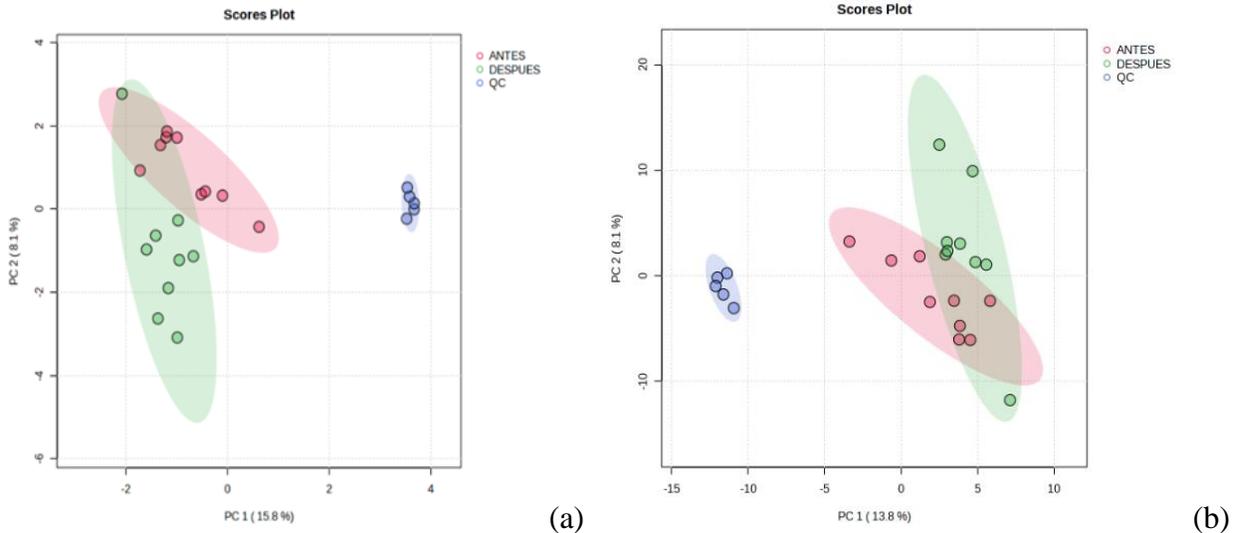
**Figura 5.** Corrección de los cromatogramas ion totales en el procesamiento de datos. Cromatograma del modo de adquisición de iones positivo (a) Original y (b) corregido. Cromatograma del modo de adquisición de iones negativos (c) original y (d) corregido.



Nota. Gráfica de la corrección de los cromatogramas ion totales para los modos de adquisición (PI) y (NI).

Seguidamente, las nuevas matrices de datos obtenidas se utilizaron para poder iniciar con los análisis, es así como se inició con el análisis de componentes principales (PCA) de las variables control (antes), tratamiento (después), y calidad (QC). Este análisis se realizó para disminuir la dimensionalidad del conjunto y verificar la reproducibilidad de adquisición de datos de alta calidad. De esta manera, como se observa en la figura 6, los datos la variable que calidad (QC) se encuentra agrupados, sin ninguna dispersión representativa, lo cual nos infiera que los datos obtenidos en el presente estudios son datos de alta calidad.

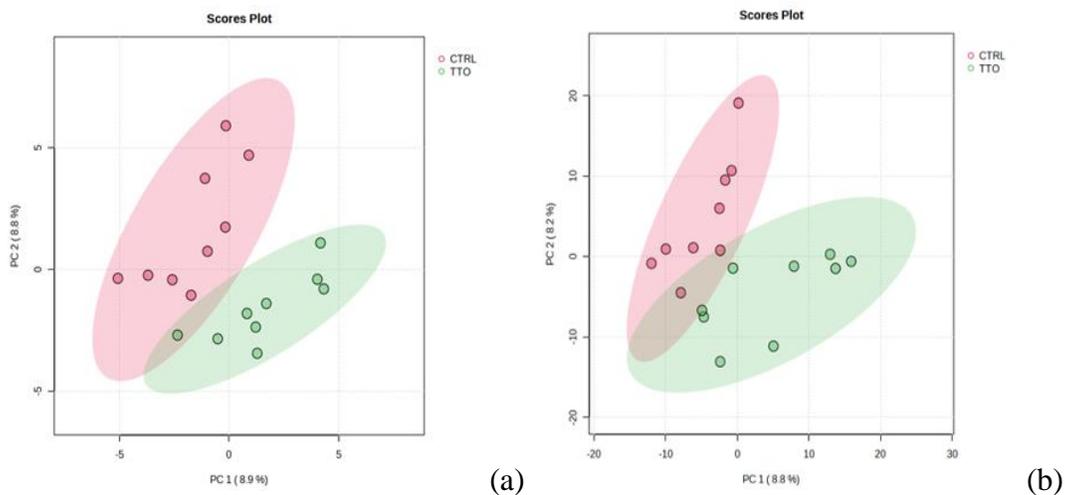
**Figura 6.** Gráficos de puntuación de los resultados de PCA con control (antes), tratamiento (después) y calidad (QC). (a) Modo de adquisición de iones positivos (IP) y (b) modo de adquisición de iones negativos (IN).



Nota. La figura representa el análisis de PCA basados en datos de LC/MS en células planctónicas de *S. epidermidis* para las tres variables control (antes), tratamiento (después), y calidad (Qc). Control (rojo), tratamiento (verde) y control de calidad (azul).

Por otro lado, se realizó una nueva matriz utilizando los datos de control (CTRL) y tratamiento (TTO), los cuales fueron normalizados con el fin de poder realizar otro análisis de PCA con estas variables. Este análisis se realizó para poder disminuir la dimensionalidad del conjunto y determinar si existe separación entre las dos variables presentes en este estudio. Como se puede observar en la Figura 7, (a) en el modo de adquisición de iones positivos (IP), se encontró una mejor separación de las variables, aunque la separación obtenida en los dos modos no cuenta con un comportamiento idóneo, ya que las variables no tuvieron una separación completa. Lo anterior, probablemente fue debido a que el análisis de PCA, se denomina “no supervisado”, lo cual significa que agrupa, asocia y reduce la dimensionalidad de los datos, que permiten la representación de datos.

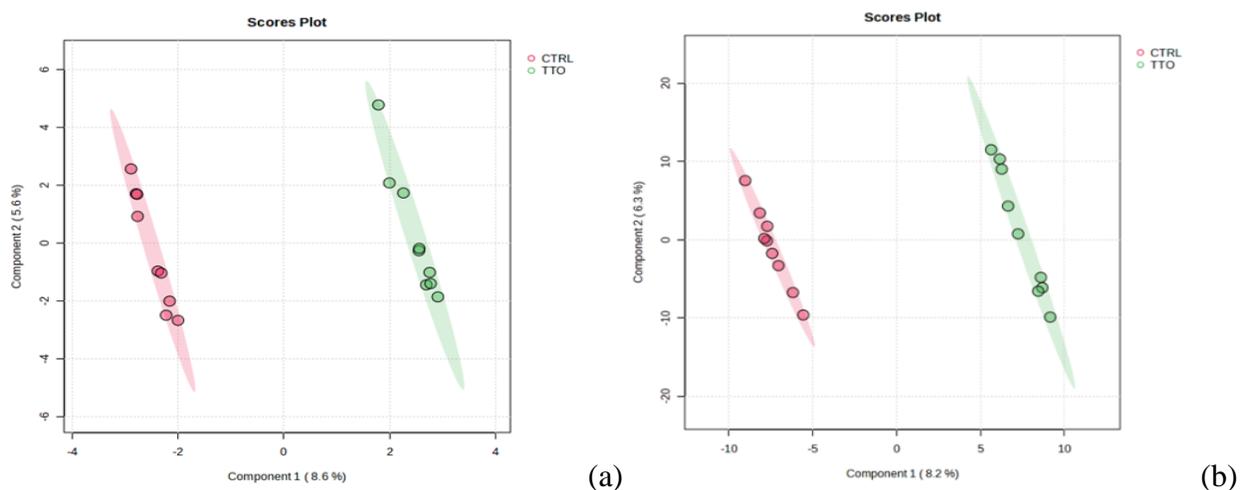
**FIGURA 7.** Gráficos de puntuación que representan los resultados de PCA sin tratamiento (CTRL) y con tratamiento (TTO). (a) Modo de adquisición de iones positivos (IP) y (b) modo de adquisición de iones negativos (IN).



Nota. La figura representa el análisis de PCA basados en datos de LC/MS en células planctónicas de *S. epidermidis* para las dos variables CTRL (rojo) y TTO (verde).

Sin embargo, para poder visualizar si existió una separación las dos componentes de control (CTRL) y tratamiento (TTO) se realizó el análisis de discriminantes de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), el cual es una versión "supervisada" del análisis de componentes principales, ya que reduce la dimensionalidad, pero sigue teniendo en cuenta las variables del conjunto, lo cual le permite realizar etiquetas de los mismos y en donde se pudo observar de manera clara una separación de las variables estudiadas en los dos modos de adquisición de iones. Además, para poder conocer la capacidad predictiva y discriminante en los dos modos se realizó una verificación cruzada, en donde se determinaron valores de  $R^2$  (0,99) y  $Q^2$  (0,70) en modo de adquisición de iones positivos (IP) y  $R^2$  (0,97) y  $Q^2$  (0,64) en modo de adquisición de iones negativos (IN). De esta manera, en la figura 8 podemos observar que este análisis si nos permitió visualizar la variabilidad y evaluar la capacidad discriminante y predictiva de los perfiles de los metabolitos estadísticamente significativos para los grupos de CTRL y TTO evaluados en este estudio.

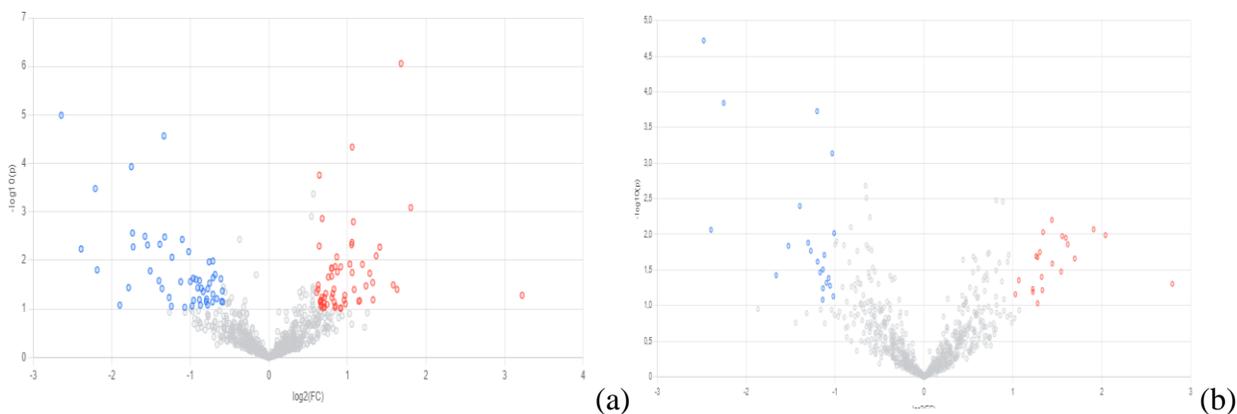
**FIGURA 8.** Gráficos de puntuación que representan los resultados de PLS-DA con tratamiento (TTO) y sin tratamiento (CTRL). (a) Modo de adquisición de iones positivos (IP) y (b) modo de adquisición de iones negativos (IN).



Nota. La figura representa el análisis PLS-DA basados en datos de LC/MS en células planctónicas de *S. epidermidis* para las dos variables CTRL (rojo) y TTO (verde).

Seguidamente, para observar la significancia de los diferentes metabolitos estadísticamente significativos se realizó un volcano plot. En la figura 9, se presentan los gráficos de los modos de adquisición de iones positivos (IP) y de iones negativos (IN), en los cuales se puede observar la dispersión de los datos de los metabolitos significativamente posibles, el color azul indica regulados negativamente y el color rojo indica regulados positivamente. De esta manera, en el modo de adquisición de iones positivos (IP), del total de los metabolitos estadísticamente significativos 24 fueron modulados negativamente y 21 positivamente. Por otro lado, en el modo de adquisición de iones negativos (IN), 21 fueron modulados negativamente y 20 positivamente.

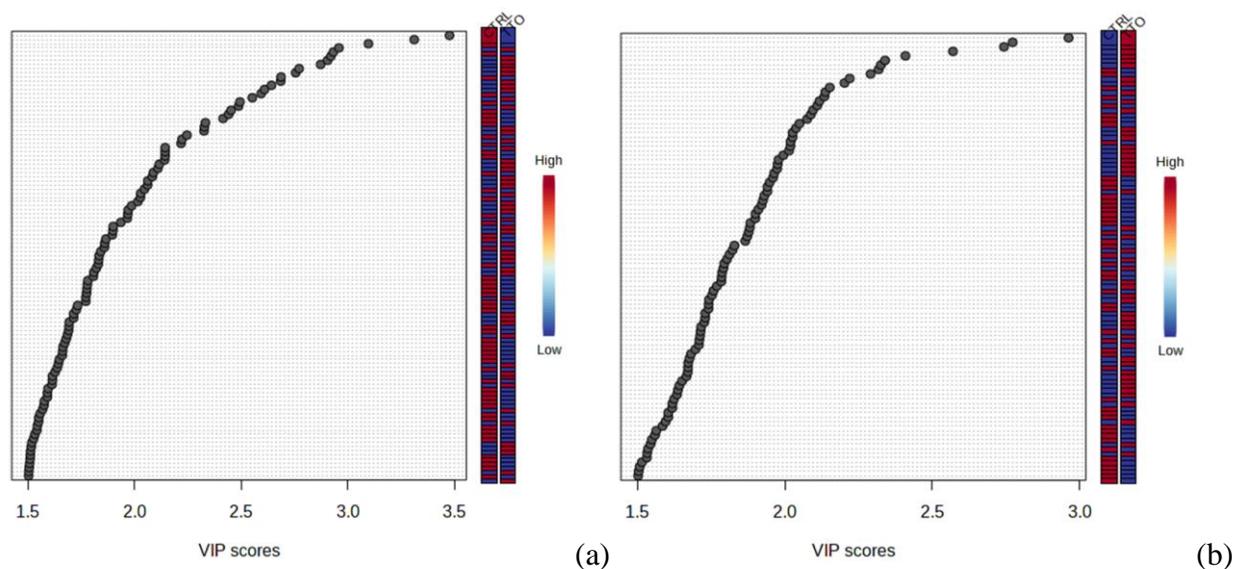
**FIGURA 9.** Gráfico de Volcano-plot de los metabolitos estadísticamente significativos identificados. (a) Modo de adquisición de iones positivos (IP) y (b) modo de adquisición de iones negativos (IN).



Nota. El color azul indica metabolitos regulados negativamente; el color rojo indica los metabolitos regulados positivamente.

Finalmente, se realizó la visualización de las variables en la proyección (VIP) para estimar la importancia de cada metabolito en la proyección utilizada en el modelo PLS-DA, en el cual se tomaron en cuenta los valores están por encima de un valor de 1,5, que se considera significativo para el modelo. En la figura 10, se puede observar que en modo de adquisición de iones positivos (IP) se pudieron evidenciar 107 características y en el modo de adquisición negativo (IN) se obtuvieron 94 características, los cuales fueron los responsables de la separación del análisis de PLS-DA.

**FIGURA 10.** Variables en la proyección (VIP) de los metabolitos estadísticamente significativos identificados. (a) Modo de adquisición de iones positivos (IP) y (b) modo de adquisición de iones negativos (IN).



Nota. El color azul indica metabolitos regulados negativamente; el color rojo indica los metabolitos regulados positivamente.

## **5.2 Identificación de metabolitos y rutas metabólicas asociadas al efecto del AE *Lippia organoides* sobre células planctónicas de *S. Epidermidis***

Para poder determinar las rutas metabólicas que presentaron afectación estadísticamente significativa con el tratamiento realizado, se tomaron los metabolitos estadísticamente significativos de *S. epidermidis* después del tratamiento con el AE *L. organoides* que se pudieron obtener con la ayuda de las variables en la proyección (VIP). Las relaciones masa carga de los metabolitos significativos junto con el tiempo de retención de cada uno de estos fueron llevados a la base de datos en línea CEU MASS mediator, en donde se realizó una búsqueda avanzada por lotes que permitió obtener un listado posible de los presuntos compuestos estadísticamente significativos y se realizó la identificación de estos mediante comparación de sus espectros de masas, iones fragmento y tiempos de retención. Además, se consultaron y corroboraron en bases de datos (HMDB, SciFinder, PubChem) y literatura, logrando de esta manera obtener la identidad tentativa de los metabolitos estadísticamente significativos.

De hecho, con la intención de poder dilucidar la identificación de los metabolitos estadísticamente significativos, en la tabla 1 se presentan las señales representativas del espectro de masas reportado en la literatura y base de datos HMDB y el espectro de masas experimental que fue obtenido para dos relaciones masa carga de 132,0678 y 184,0732.

Después de realizada la debida identificación con la metodología explicada anteriormente, se pudo seleccionar de la lista de candidatos los compuestos creatina y triptofol, con pesos moleculares correspondientes a 131,0689 g/mol y 161,0835 g/mol, cuyos aductos fueron H y Na, respectivamente.

**TABLA 1.** Lista de señales representativas del espectro de masas de dos metabolitos estadísticamente significativos.

Relación $m/z$	Espectro de masas reportado	Espectro de masas experimental
<b>132,0768</b>	<b>40eV</b>	<b>40eV</b>
	82,8000	82,9453
	72,9000	72,9377
	69,1000	68,0705
	58,9000	58,9432
	55,2000	NA
	<b>30eV</b>	<b>30eV</b>
	114,8000	114,0916
	90,2000	NA
	83,1000	83,0860
	69,0000	69,9978
	55,2000	NA
	<b>20eV</b>	<b>20eV</b>
	115,0000	NA
	97,1000	97,1015
	90,0000	90,0177
	69,3000	NA
	59,3000	NA
<b>184,0732</b>	<b>40eV</b>	<b>40eV</b>
	130,0649	130,0629
	115,0560	115,0544
	103,0541	103,0546
	91,0538	91,0546
	65,0386	65,0392
	<b>20eV</b>	<b>20eV</b>
	130,0652	120,0628
	104,0480	104,0425
	91,0541	91,0548
	<b>10eV</b>	<b>10eV</b>
	145,0905	145,1089

Nota. Lista de señales representativas del espectro reportado en la literatura y base de datos, y el experimental de dos metabolitos estadísticamente representativos del espectro de masas que fueron obtenidas del análisis metabólico después del tratamiento con el AE de *L. origanoides* sobre las células planctónicas de *S. epidermidis*.

De esta manera, se pudieron encontrar un total de 29 posibles candidatos de metabolitos estadísticamente significativos, de los cuales 24 pertenecían al modo de adquisición de iones positivos (IP) y 5 al modo de adquisición de iones negativos (IN). Adicionalmente, de los 29 posibles candidatos de metabolitos estadísticamente significativos se evidencia que 11 estuvieron modulados negativamente y 18 positivamente. Los resultados mencionados se muestran en la tabla 1, en la que se presentan el nombre del posible metabolito, la numeración, la modulación de los metabolitos en el control (CTL) y tratamiento (TTO), los tiempos de retención, el comportamiento de la concentración ([]score) y el modo de adquisición de cada uno de los metabolitos estadísticamente significativos.

**TABLA 2.** Listado de posibles metabolitos estadísticamente significativos identificados después de realizar el tratamiento.

#	Posible metabolito	CTL	TTO	[] SCORE	tR(min)	Mod o
1	Ácido 2Z-dodecenoico	Alto	Bajo	Disminuyó	8,59	(+)
2	Éter metílico de timol	Bajo	Alto	Incrementó	6,99	(+)
3	L-Lixonato	Bajo	Alto	Incrementó	5,37	(+)
4	Isochavicol	Bajo	Alto	Incrementó	5,35	(+)
5	4-hidroxicinamoil agmatina	Bajo	Alto	Incrementó	5,35	(+)
6	Piridoxina	Bajo	Alto	Incrementó	1,85	(+)
7	Taurina	Alto	Bajo	Disminuyó	0,89	(+)
8	2-Metil-3-n-amil-pirrol	Alto	Bajo	Disminuyó	5,92	(+)
9	Fluoreno	Alto	Bajo	Disminuyó	3,37	(+)

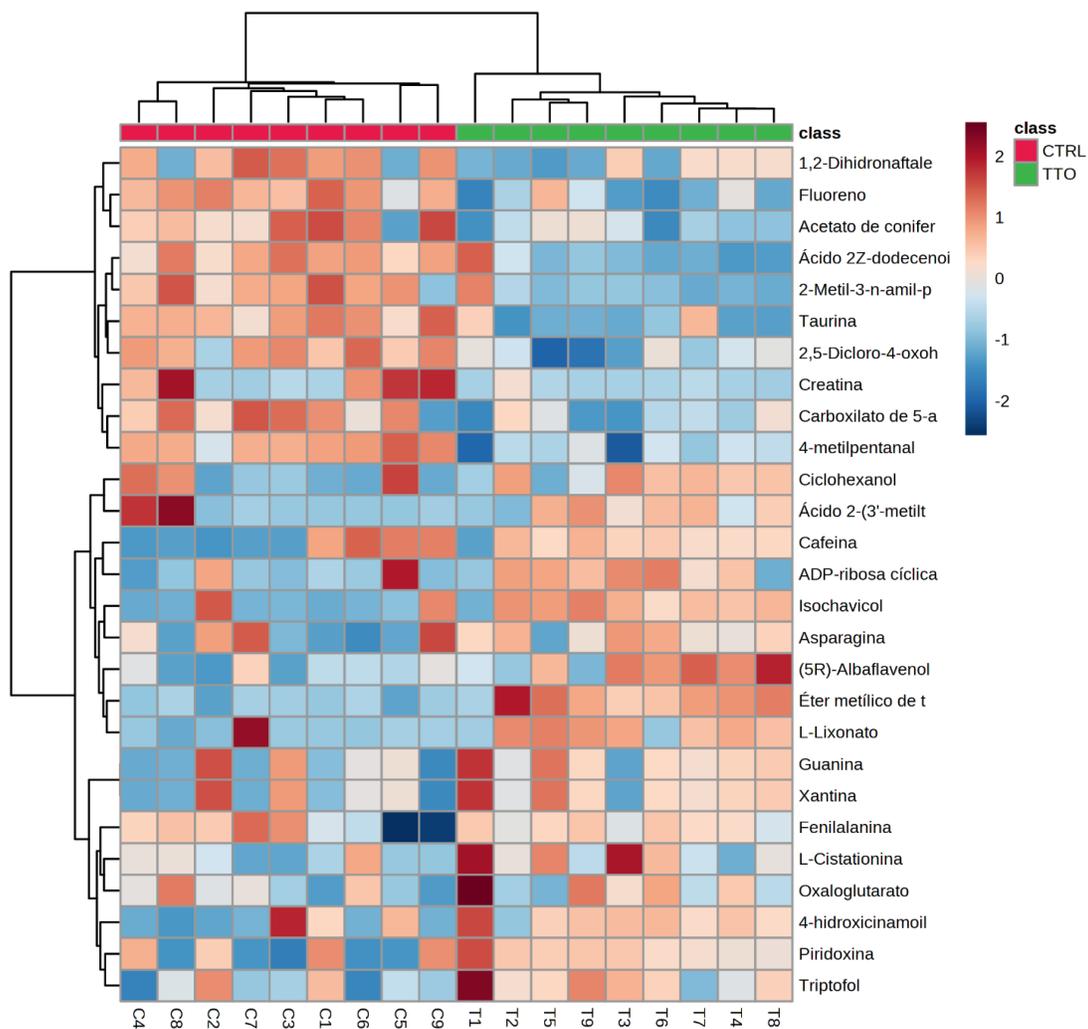
10	Ciclohexanol	Bajo	Alto	Incrementó	12,91	(+)
11	Cafeína	Bajo	Alto	Incrementó	3,98	(+)
12	(5R)-Albaflavenol	Bajo	Alto	Incrementó	8,61	(+)
13	Creatina	Alto	Bajo	Disminuyó	7,81	(+)
14	Triptofanol	Bajo	Alto	Incrementó	0,94	(+)
15	Guanina	Bajo	Alto	Incrementó	1,42	(+)
16	1,2-Dihidronaftaleno-1,2-diol	Alto	Bajo	Disminuyó	6,54	(+)
17	Carboxilato de 5-amino-4-imidazol	Alto	Bajo	Disminuyó	0,67	(+)
18	Acetato de coniferilo	Alto	Bajo	Disminuyó	6,69	(+)
19	9,10-Epoxi-18-hidroxiestearato	Bajo	Alto	Incrementó	8,92	(+)
20	2,5-Dicloro-4-oxohex-2-enodioato	Alto	Bajo	Disminuyó	7,20	(+)
21	Ácido 2-(3'-metiltio) propilmálico	Bajo	Alto	Incrementó	7,13	(+)
22	5-Cloro-2-hidroxi-p-benzoquinona	Alto	Bajo	Disminuyó	0,06	(+)
23	Xantina	Bajo	Alto	Incrementó	1,42	(+)
24	Asparagina	Bajo	Alto	Incrementó	9,94	(+)
25	L-Cistationina	Bajo	Alto	Incrementó	0,89	(-)
26	L-Fenilalanina	Bajo	Alto	Incrementó	9,09	(-)
27	4-metilpentanal	Alto	Bajo	Disminuyó	8,91	(-)
28	ADP-ribosa cíclica	Bajo	Alto	Incrementó	2,25	(-)
29	Oxaloglutarato	Bajo	Alto	Incrementó	0,87	(-)

Nota. Listado de posibles metabolitos estadísticamente significativos identificados después de realizado el tratamiento con el AE de *L. origanoides* sobre las células planctónicas de *S. epidermidis*.

Seguidamente, se realizaron mapas de calor de las dos variables de control (CTL) y tratamiento (TTO) de los modos de adquisición de iones positivos (IP) y de iones negativos (IN), para poder visualizar el comportamiento de los metabolitos y comprobar la distribución de estos. En la figura 11, se observa el gráfico de mapas de calor, en el cual se puede evidenciar que de los metabolitos estadísticamente significativos estuvieron cinco negativamente y veinticuatro

positivamente por el tratamiento con el AE. Los metabolitos restantes que no se presentaron en el mapa, se presume que no fueron estadísticamente significativos.

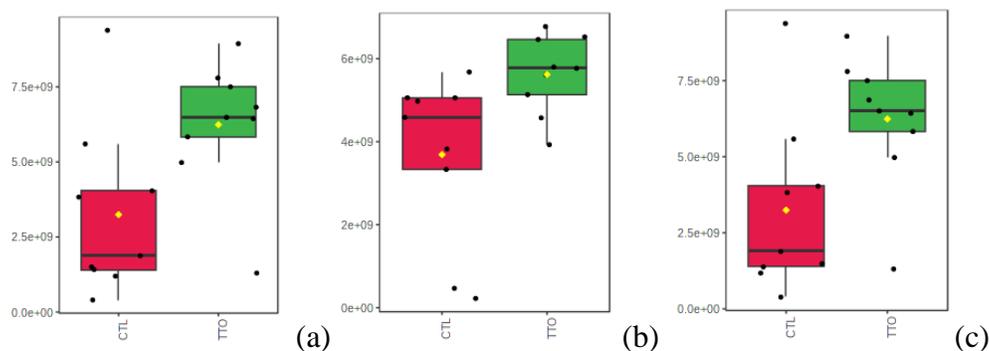
**FIGURA 11.** Gráfico del mapa de calor de los metabolitos estadísticamente más representativos después del tratamiento. Fila: metabolitos; columnas: muestras.



Nota. La figura representa el mapa de calor de los metabolitos presuntamente estadísticamente más representativos después del tratamiento que se encontraron implicados en las células planctónicas de *S. epidermidis* después del tratamiento con el AE *L. organoides*.

Por otro lado, para poder visualizar el cambio de concentraciones de las células planctónicas de *S. epidermidis* después del tratamiento con el AE *L. origanoides*, se realizaron unos diagramas de bigotes, con los cuales se pudo observar la distribución de la concentración de cinco metabolitos estadísticamente significativos. En la figura 12, se observa que la concentración después del tratamiento con el AE aumento de manera significativa en la *guanina*, *L-fenilalanina* y *xantina*.

**FIGURA 12.** Diagrama de bigotes de dos metabolitos estadísticamente significativos. (a) *Guanina*, (B) *L-fenilalanina* y (c) *xantina*.

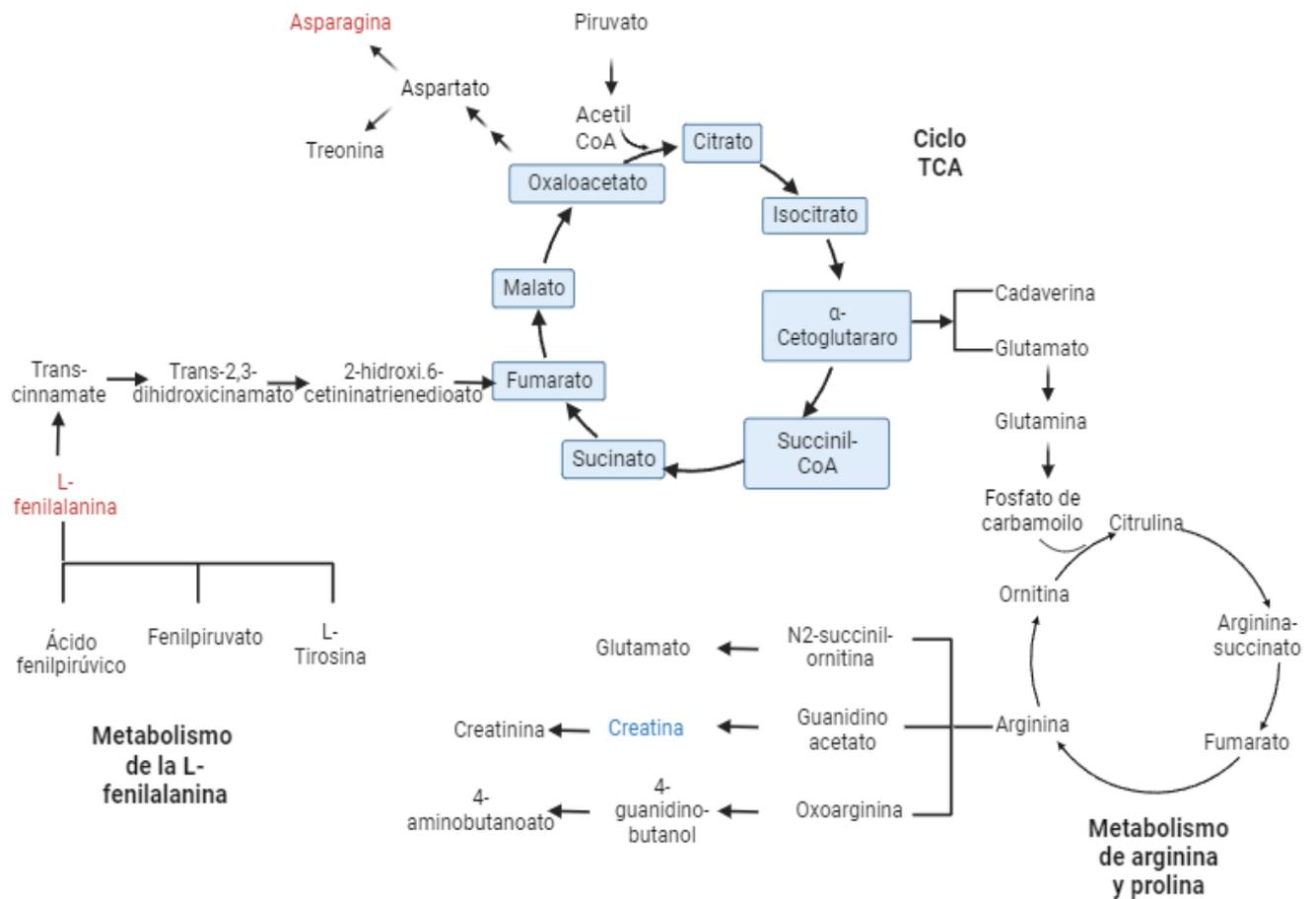


Nota. Diagrama de bigotes de metabolitos estadísticamente significativos que se encontraron implicados en las células planctónicas de *S. epidermidis* después del tratamiento con el AE *L. origanoides*. CTL (rojo) y TTO (verde).

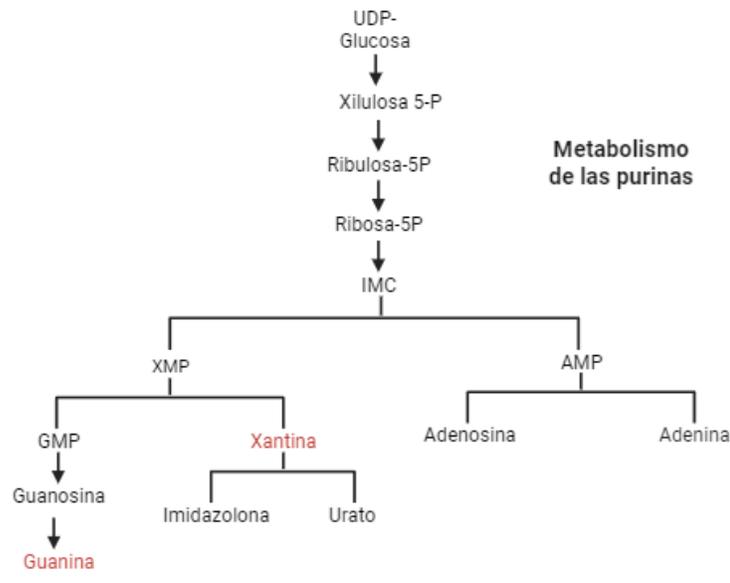
De igual forma, con el propósito de visualizar y comprender el cambio de las rutas metabólicas afectadas, se realizó una inspección de los metabolitos estadísticamente significativos y se corroboró la interacción de cada uno de ellos en la base de datos KEGG. En total, 4 vías metabólicas se vieron presuntamente comprometidas por el tratamiento realizado con el AE en las células planctónicas de *S. epidermidis* ( $p < 0,5$ ) (ver apéndice C). De esta manera, se pudo determinar que la aspargina, L-fenilalanina, xantina, guanina y creatina fueron los metabolitos

estadísticamente significativos y están implicados en las rutas metabólicas afectadas por acción del AE se encuentra el metabolismo de las purinas, el metabolismo de la arginina y la prolina, el ciclo CTA y el metabolismo de la L-fenilalanina. En la Figura 13 representa una descripción general de estas rutas metabólicas.

**FIGURA 13.** Esquema de las rutas generales de los metabolitos afectados después del tratamiento realizado a la bacteria. (a) Metabolismo de la L-fenilalanina, ciclo TCA y metabolismo de la arginina y prolina. (b) Metabolismo de la arginina.



(a)



Nota. Esquema de la rutas generales de los metabolitos afectados por el tratamiento con el AE de *L. origanoides* de las células planctónicas de *S. epidermidis*. Los metabolitos rojos fueron modulados positivamente y los azules negativamente.

El color azul indica metabolitos regulados negativamente; el color rojo indica los metabolitos regulados positivamente.

## 6. Discusión de los resultados

Este estudio evaluó el efecto antimicrobiano del AE de *L. origanoides* sobre el crecimiento de células planctónicas de la bacteria *S. epidermidis* mediante el análisis de metabolómica no dirigida, para iniciar cabe resaltar que los datos de la cinética de crecimiento se obtuvieron gracias a estudios realizados por (Cáceres *et al.*, 2020), cuyos resultados fueron compartidos con el propósito de complementar este análisis (ver apéndice A.). De esta manera, se seleccionó una CMI de 0,3 mg/mL de *S. epidermidis*, resulta importante destacar que se utilizó una concentración menor que la MIC50 para poder utilizarlo como indicador de la actividad biológica y poder comprender mejor las respuestas metabólicas del microorganismo por acción del AE. De la misma manera, el AE de *L. origanoides* que se utilizó fue seleccionado gracias a estudios realizados por (Cáceres *et al.*, 2023); ellos pudieron determinar que el AE que presentaba mejor actividad antimicrobiana fue *L. origanoides*, quimitipo *timol* “LOT-II” y cuya composición química se presenta en el apéndice B. De hecho, en la revisión realizada por (Dhifi *et al.*, 2016) se menciona, que las composiciones y estructuras químicas que presentan los AE son muy importantes porque afectan de manera significativa su modo de acción en relación con su actividad antibacteriana, el quimiotipo más efectivo y los metabolitos de los cuales están compuestos los diferentes AE presentes en la naturaleza.

En consecuencia, el mecanismo antibacteriano que presentan los AE en los microorganismos patógenos es de gran interés, por ello se han realizado estudios sobre la interacción entre distintas familias de bacteria y según menciona (Chouhan *et al.*, 2017; Hammer & Heel, 2012), las bacterias gram positivas se ven más afectadas por este tipo de compuestos hidrófobos que llegan a la membrana celular y pueden alterar los lípidos que se encuentra en la superficie

produciendo permeabilidad, considerando este suceso como el primer paso para la fuga de componentes vitales para el funcionamiento de la célula bacteriana y en grandes cantidades puede causar la muerte de los microorganismos patógenos

Por otro lado, la metodología de análisis metabolómico no dirigido utilizada en el presente estudio brinda grandes ventajas en términos de identificación y selección de metabolitos que son basados en una relación masa-carga ( $m/z$ ) específica, la cual se obtiene gracias a la espectrometría de masas. Sumado a esto, estos metabolitos pueden estar involucrados en rutas metabólicas como lo menciona (Rinschen *et al.*, 2019), las cuales determinan las distintas reacciones químicas que se pueden presentar alrededor de las células de los microorganismos. De esta manera, después de evidenciar la afectación en las rutas biosintéticas de las células planctónicas de *S. epidermidis* después del tratamiento con el AE *L. origanoides* es muy probable que haya existió una vulnerabilidad en la membrana celular y cuyo resultado sea la afectación en 4 rutas metabólicas relacionadas con la supervivencia de este patógeno, las rutas fueron metabolismo de las purinas, el metabolismo de la arginina y la prolina, el ciclo CTA y el metabolismo de la L-fenilalanina.

De igual forma, se conoce que la activación/inactivación del ciclo del TCA tiene un papel inhibidor sobre la síntesis de factores de virulencia en estafilococos. De hecho, en el caso de la activación del ciclo del TCA se produce especies reactivas de oxígeno (ROS) que contribuyen a la susceptibilidad a los antibióticos. Adicionalmente, el aumento de la actividad del ciclo del TCA también puede conducir a la acumulación de citrato, lo que conduce a la formación de radicales de hidroxilo que dañan el ADN y otras moléculas. Adicionalmente, la activación del ciclo de TCA inhibe concomitantemente la transcripción del operón *icaADBC* y la formación de biopelículas (Martinez *et al.*, 2021).

Por otro lado, se conoce que la biosíntesis de purinas está asociada con la supervivencia en condiciones de estrés. Adicionalmente, se conoce que las purinas son sustratos importantes para la síntesis de ADN y, por lo tanto, alterarán los procesos de reparación del ADN, lo que nos infiere que un aumento indica que la bacteria se encuentre tratando de reparar su material genético ante posibles daños causados por estrés. Además, las purinas son compuestos iniciales para la síntesis de GTP y, por lo tanto, desempeñan un papel importante en la producción de energía en la regulación del crecimiento celular (Yee *et al.*, 2015). De hecho, cuando se observa acumulación de metabolitos en el ciclo de TCA y del metabolismo de las purinas, se podría inferir que la bacteria se encuentra generando energía para mantener la homeostasis celular, ya que rutas como la biosíntesis de aminoácidos estaba siendo afectada por el tratamiento del AE (Guillín *et al.*, 2023).

Finalmente, se ha podido evidenciar una posible alteración en el metabolismo de la arginina y prolina lo cual genera una afectación en la producción de prolina, dicho aminoácido se encuentra relacionado como fuente de energía y protección, ya que permite que las células utilicen la prolina como fuente de carbono y nitrógeno, lo que ayuda en la biosíntesis de proteínas y responder al estrés y las necesidades energéticas (Christgen & Becker, 2019; Goswami *et al.*, 2022). De esta manera podemos observar, que las tres vías metabólicas que fueron afectadas después del tratamiento con el aceite esencial están implicadas con la producción de energía y reparación del ADN.

## 7. Conclusiones

El aceite esencial *L. origanoides* LOT II con presentó probable efecto inhibitorio de las células en crecimiento plantónico de *S. epidermidis* con CMI de 0,3 mg/mL, el cual se pudo evidenciar con el uso del análisis metabólico no dirigido, en donde se determinaron los metabolitos afectados después del tratamiento con el AE y se observó una posible perturbación en metabolitos como xantina, guanina, *L*-fenilalanina, aspargina y creatina, los cuales se encuentran relacionados en mecanismos celulares que son esenciales para la bacteria y su supervivencia, dichos mecanismos son el metabolismo de las purinas, el metabolismo de la arginina y la prolina, el ciclo CTA y el metabolismo de la *L*-fenilalanina de *S. epidermidis*. Los resultados obtenidos, nos brindan un acercamiento del modo de acción del AE *L. origanoides* sobre las células en crecimiento plantónico de *S. epidermidis* y promueven el estudio de posibles dianas terapéuticas con el objetivo de contrarrestar la generación de patógenos multirresistentes.

## 8. Recomendaciones

Se recomienda la evaluación de ensayos enzimáticos para confirmar la presencia y la concentración de los metabolitos estadísticamente significativos identificados en el presente estudio. Adicionalmente, Con el fin de determinar la actividad antimicrobiana que presentan las células planctónicas de la bacteria *S. epideridimis* se sugiere que sean tratadas con diferentes concentraciones de la MIC del AE de *L. origanoides* quimiotipo *timol* (LOT-II). Seguidamente, llevar a cabo estudios de metabolómica no dirigida y conocer los metabolitos estadísticamente significativos e indagar en las respectivas rutas metabólicas en las cuales se encuentran implicados cada uno. Posteriormente, realizar un análisis metabolómico con enfoque dirigido para poder confirmar los metabolitos implicados en rutas metabólicas que sean esenciales para el funcionamiento y virulencia de *S. epideridimis*. Finalmente, se sugiere realizar estudios proteómicos transcriptómicos para integrar la información obtenida por metabolómica.

**Referencias**

- Acharya Y., Bhattacharyya S., Dhanda G., and Haldar J. (2022). Emerging Roles of Glycopeptide Antibiotics: Moving beyond Gram-Positive Bacteria. *ACS Infectious Diseases*. Pages 1-28. DOI: 10.1021/acsinfecdis.1c00367
- Acosta C., de Oliveira G., de Souza E., Cardoso M., Espínola C. and Franco O. (2020). Effects of Antibiotic Treatment on Gut Microbiota and How to Overcome Its Negative Impacts on Human Health. *ACS Infectious Diseases*. Pages 2544-2559. DOI: 10.1021/acsinfecdis.0c00036
- Agulló L., Romero M., Domenech M., Seeger M. (2017). *p*-Cymene Promotes Its Catabolism Through the *p*-Cymene and the *p*-Cumate Pathways, Activates a Stress Response and Reduces the Biofilm Formation in *Burkholderia xenovorans* LB400. *PLOS ONE*. 12(1): e0169544. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169544>
- Ahmed F., Yan B., Zhao J., Zhang H., and Chen W. (2020). Technology Untargeted Metabolomics Reveals Metabolic State of *Bifidobacterium Bifidum* in the Biofilm and Planktonic States. *Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108772>
- Ammons M., Tripet B., Carlson R., Kirker K., Gross M., Stanisich J., and Copié V. (2014). Quantitative NMR Metabolite Profiling of Methicillin-Resistant and Methicillin Susceptible *Staphylococcus aureus* Discriminates between Biofilm and Planktonic Phenotypes. *Journal of Proteome Research*. 13 (6). Pages 2973-2985. DOI: 10.1021/pr500120c
- Amorati R., Foti M., and Valgimigli L. (2013). Antioxidant Activity of Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (46). Pages 10835-10847. DOI: 10.1021/jf403496k

- Aros-Calt S., Muller B., Boudah S., Ducruix C., Gervasi G., Junot C., and 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*. Pages 4863-4875. DOI: 10.1021/acs.jproteome.5b00697.
- Ashokan M., Rana E., Sneha K., Namith C., Naveen GS., Azharuddin N., Elango K., Jeyakumar S., and Ramesha KP. (2022). Metabolomics—a Powerful Tool in Livestock Research. *Animal Biotechnology*. DOI: 10.1080 /10495398.2022.2128814
- Balahbib A., Omari N., Hachlafi N., Lakhdar F., Menyiy N., Salhi N., Mrabti H., Bakrim S., Zengin G., Bouyahya A. (2021). Health Beneficial and Pharmacological Properties of *p*-Cymene. *Food and Chemical Toxicology*. Volume 153. 112259. ISSN 0278-6915. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112259>.
- Becker K., Heilmann C., Peters G. (2014). Coagulase-Negative *Staphylococci*. *Clinical Microbiology Reviews*. 870-926. V 27. 4. doi:10.1128/cmr.00109-13.
- Blaskovich M., Hansford K., Butler M., Jia Z., Mark A., and Cooper M. (2018). Developments in Glycopeptide Antibiotics. *ACS Infectious Diseases*. Pages 715-735. DOI: 10.1021/acsinfecdis.7b00258
- Büttner H., Mack D., Rohde H. (2015). Structural Basis of *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Formation: Mechanisms and Molecular Interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 5. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2015.00014> . DOI=10.3389/fcimb.2015.00014

- Cáceres M., Hidalgo W., Stashenko E., Torres R., & Ortiz C. (2023). Metabolomic Analysis of the Effect of *Lippia origanoides* Essential Oil on the Inhibition of Quorum Sensing in *Chromobacterium violaceum*. *Antibiotics*, 12(5), 814. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12050814>
- Cáceres M., Hidalgo W., Stashenko E., Torres R., and Ortiz C. (2020). Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Anti-Biofilm and Anti-Quorum Sensing Activities against Pathogenic Bacteria. *Antibiotics*, 9(4), 147. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics9040147>
- Chatzimitakos T. and Stalikas C. (2016). Qualitative Alterations of Bacterial Metabolome after Exposure to Metal Nanoparticles with Bactericidal Properties: A Comprehensive Workflow Based on 1H NMR, UHPLC-HRMS, and Metabolic Databases. *Journal of Proteome Research*. Pages 3322-3330. DOI: 10.1021/acs.jproteome.6b00489
- Choueiry F., Xu R., and Zhu J. (2022). Adaptive Metabolism of *Staphylococcus aureus* Revealed by Untargeted Metabolomics. *Journal of Proteome Research* 21 (2). Pages 470-481. DOI: 10.1021/acs.jproteome.1c00797
- Chouhan S., Sharma K., & Guleria S. (2017). Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines*, 4(3), 58. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/medicines4030058>
- Christgen, S. L., & Becker, D. F. (2019). Role of Proline in Pathogen and Host Interactions. *https://Home.Liebertpub.Com/Ars*, 30(4), 683–709. <https://doi.org/10.1089/ARS.2017.7335>

- Cristani M., D'Arrigo M., Mandalari G., Castelli F., Sarpietro M., Micieli D., Venuti V., Bisignano G., Saija A., and Trombetta D. (2007) Interaction of Four Monoterpenes Contained in Essential Oils with Model Membranes: Implications for Their Antibacterial Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. DOI: 10.1021/jf070094x
- Deusenbery C, Wang Y, and Shukla A. (2021). Recent Innovations in Bacterial Infection Detection and Treatment. *ACS Infectious Diseases*. Pages 695-720. DOI:10.1021/acsinfecdis.0c00890
- 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*. 3(4). 25. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/medicines3040025>
- Félix G., Soto C., Nava E., and Lugo E. (2021). Principal Metabolites in Extracts of Different Plants Responsible for Antibacterial Effects. *Chemical Research in Toxicology* 34 (9). Pages 1970-1983. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.1c00161
- Fernández D., Colín C., Hernández M., López L., and Franco R. (2021). *Staphylococcus epidermidis* Small Colony Variants, Clinically Significant Quiescent Threats for Patients With Prosthetic Joint Infection. *Microbes and Infection*. Volume 23. Issues 9–10. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2021.104854>.
- Ferraro N. and Pires M. (2022). Genetic Determinants of Surface Accessibility in *Staphylococcus aureus*. *Bioconjugate Chemistry*. Pages 767-772. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.2c00173
- Fontes P., Parreira L., Campos P., Henriques S., Mesquita J., Vidal A., Rodrigues T., Ribeiro M., Martins P., de Oliveira C., Alvarenga E., and Menini L. (2018). Semisynthetic Phenol

- Derivatives Obtained from Natural Phenols: Antimicrobial Activity and Molecular Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Pages 323-330. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b04418
- Freitas J., Alves E., Silva L., Zocolo G., de Brito E., Gramosa N. (2018). Chemometric Analysis of NMR and GC Datasets for Chemotype Characterization of Essential Oils from Different Species of *Ocimum*. *Talanta*. Volume 180. Pages 329-336. ISSN 0039-9140. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.12.053>.
- Goswami G., Hazarika D. J., Chowdhury N., Bora S., Sarmah U., Naorem R., Boro R., & Barooah M. (2022). Proline Confers Acid Stress Tolerance to *Bacillus megaterium* G18. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12709-0>
- Guillín Y., Cáceres M., Stashenko E., Hidalgo W., & Ortiz C. (2023). Untargeted Metabolomics for Unraveling the Metabolic Changes in Planktonic and Sessile Cells of *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 after Treatment with *Lippia organoides* Essential Oil. *Antibiotics*, 12(5), 899. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics12050899>
- Guimaraes S., Guimarães G., Vicco D., Barreto J., Morais G., Oliveira D., Celano R., Campone L., Piccinelli A., and Rastrelli L. (2017). Counter-current Chromatography With Off-line Detection by Ultra high Performance Liquid Chromatography/high Resolution Mass Spectrometry in the Study of the Phenolic Profile of *Lippia organoides*. *Journal of Chromatography A*. Volume 1520. Pages 83-90. ISSN 0021-9673. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.09.004>.

- Guo R., Luo X., Liu J., Lu H. (2021). Mass spectrometry Based Targeted Metabolomics Precisely Characterized New Functional Metabolites That Regulate Biofilm Formation in *Escherichia coli*. *Analytica Chimica Acta*. Volume 1145. Pages 26-36. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.12.021>.
- Hammer K., Heel K. (2012). Use of Multiparameter Flow Cytometry to Determine the Effects of Monoterpenoids and Phenylpropanoids on Membrane Polarity and Permeability in *Staphylococci* and *Enterococci*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Volume 40. Issue 3. 2012. Pages 239-245. ISSN 0924-8579. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.05.015>.
- Heilmann C. , Ziebuhr W., Becker K. (2019). Are Coagulase-negative *Staphylococci* Virulent?. *Clinical Microbiology and Infection*. Volume 25, Issue 9. Pages 1071-1080. ISSN 1198-743X. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.11.012>.
- Horai H., Arita M., Kanaya S., Nihei Y., Ikeda T., Suwa K., ... Nishioka, T. (2010). MassBank: a Public Repository for Sharing Mass Spectral Data for Life Sciences. *Journal of Mass Spectrometry*. Pages 703–714. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jms.1777>  
<https://doi.org/10.1016/j.hermed.2022.100604>.
- Huan T., Forsberg E., Rinehart D., Johnson C., Ivanisevic J., Benton H., Fang M., Aisporna A., Hilmers B., Poole F., Thorgersen M., Adams M., Krantz G., Fields M., Robbins P., Niedernhofer L., Ideker T., Majumder E., Wall J., Rattray N., Goodacre R., Lairson L., Siuzdak G. (2017). Systems Biology Guided by XCMS Online Metabolomics. *Nat Methods* 14. 461–462. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4260>

- Instituto Nacional de Salud, R. de C. (2019). Infecciones Asociadas a la Atención en Salud. Epidemiología de Las Infecciones Asociadas a La Atención En Salud.
- Kachur K. and Suntres Z. (2020) The antibacterial Properties of Phenolic Isomers, Carvacrol and Thymol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Pages 3042-3053. DOI:10.1080/10408398.2019.1675585
- Keinhörster D., George S., Weidenmaier C., Wolz C. (2019). Function and Regulation of *Staphylococcus aureus* Wall Teichoic Acids and Capsular Polysaccharides. *International Journal of Medical Microbiology*. Volume 309. Issue 6. 2019. 151333. ISSN 1438-4221. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2019.151333>.
- Kochan K., Nethercott C., Perez D., Jiang J, Peleg A., Wood B., and Heraud P. (2019). Detection of Antimicrobial Resistance-Related Changes in Biochemical Composition of *Staphylococcus aureus* by Means of Atomic Force Microscopy-Infrared Spectroscopy. *Analytical Chemistry*. Pages 15397-15403. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b01671
- Kuehnbaum N. and Britz P. (2013). New Advances in Separation Science for Metabolomics: Resolving Chemical Diversity in a Post-Genomic Era. *Chemical Reviews*. Pages 2437-2468. DOI: 10.1021/cr300484s
- Leonard A., Petrie L., and Cox G.. Bacterial Anti-adhesives: Inhibition of *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization. *ACS Infectious Diseases*. 5 (10). Pages 1668-1681. DOI: 10.1021/acsinfecdis.9b00193
- Lim A., Vincent I., Barrett M., and Gilbert I. (2019). Small Polar Hits against *S. aureus*: Screening, Initial Hit Optimization, and Metabolomic Studies. *ACS Omega*. Pages 19199-19215. DOI: 10.1021/acsomega.9b02507

- Limongi R., Barros A., de Oliveira C., Motta I., and Eleamen E. (2022). Nanotechnology as a Tool to Improve the Biological Activity of Carvacrol: A Review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. Volume 76. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103834>
- Lindsay J and Holden M. (2004). *Staphylococcus aureus*: Superbug, Super Genome?, *Trends in Microbiology*. Volume 12. Issue 8. Pages 378-385. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.06.004>.
- Lisboa C., Melo E., Demuner A., da Silva L., Carneiro A., Coelho A. (2020). Chemical Composition of *Lippia origanoides* Kunt. and *Ocimum gratissimum* L. Essential Oils Stored at -20 °C. *Industrial Crops and Products*. Volume 151. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112485>.
- Mar J., Silva L., Azevedo S., França L., Goes A., dos Santos A., Bezerra J., Nunomura R., Machado M., and Sanches E. (2018). *Lippia origanoides* Essential Oil: An Efficient Alternative to Control *Aedes aegypti*, *Tetranychus urticae* and *Cerataphis lataniae*. *Industrial Crops and Products*. Pages 292-297. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.033>.
- Marchese A., Arciola C., Barbieri R., Silva A., Nabavi S., Tsetegho A., Izadi M., Jafari N., Suntar I., Daglia M., Nabavi S. (2017). Update on Monoterpenes as Antimicrobial Agents: A Particular Focus on *p*-Cymene. *Materials*, 10(8), 947. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/ma10080947>
- Marchese A., Arciola C., Coppo E., Barbieri R., Barreca D., Chebaibi S., Sobarzo E., Nabavi S., Nabavi S. and Daglia M. (2018). The Natural Plant Compound Carvacrol as an

- Antimicrobial and Anti-biofilm Agent: Mechanisms, Synergies and Bio-inspired Anti-infective Materials. *Biofouling*. Pages 630-656. DOI:10.1080/08927014.2018.1480756
- Martínez S., Peralta H., Betanzos G., Chavez L., Rodríguez S., Cancino M., Cancino J. (2021). Proteomic Comparison of Biofilm vs. Planktonic *Staphylococcus epidermidis* Cells Suggests Key Metabolic Differences Between These Conditions. *Research in Microbiology*. Volume 172, Issue 2. 103796. ISSN 0923-2508. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2020.103796>.
- McCallum N., Berger-Bächli B., Senn M. (2010). Regulation of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*. Volume 300, Issues 2–3. Pages 118-129. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.08.015>.
- Medeiros H., Cerqueira F., Pereira A., Arcanjo D., Cavalcanti B., Pereira A. Melo H., Alves R., Oliveira T., Freire M., Lopes A., and Dantas J. (2014). Phytochemical Prospection and Modulation of Antibiotic Activity In Vitro by *Lippia origanoides* H.B.K. in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2014/305610>
- Medeiros H., de Lima I., Nunes K., Reis L., de Almeida R., Cavalcanti B., Melo H., Lira A., Freire M., Lopes A., and Dantas J. (2014). Effect of *Lippia origanoides* H.B.K. Essential Oil in the Resistance to Aminoglycosides in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Integrative Medicine*. Volume 6, Issue 5. Pages 560-564. ISSN 1876-3820. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2014.03.011>.
- Mirzaei R., Alikhani M., Arciola R., Sedighi I., Yousefimashouf R., and Bagheri K. (2022). Prevention, Inhibition, and Degradation Effects of Melittin Alone and in Combination with

- Vancomycin and Rifampin Against Strong Biofilm Producer Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. Volume 147. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112670>
- Mohd K., Mahamad M., Abdul N., Hashim Y., Abdullah M. Azizan K., (2022). Bacterial Metabolomics: Sample Preparation Methods. *Biochemistry Research International*. <https://doi.org/10.1155/2022/9186536>
- Nazzaro F., Fratianni F., De Martino L., Coppola R., & De Feo V. (2013). Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451–1474. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/ph6121451>
- Niza E., Božik M., Bravo I., Clemente P., Lara A., Juan A., Klouček P., and Moreno C. (2020). PEI-coated PLA Nanoparticles to Enhance the Antimicrobial Activity of Carvacrol. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127131>.
- Nostro A., Sudano A., Bisignano G., Marino A., Cannatelli A., Pizzimenti F., Cioni P., Procopio F., and Blanco A. (2007). Effects of Oregano, Carvacrol and Thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Biofilms. *Journal of Medical Microbiology*. Pages 519-523. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46804-0>
- Oliveira D., Leitão G., Bizzo H., Lopes D., Alviano D., Alviano C., Leitão S. (2007). Chemical and Antimicrobial Analyses of Essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. *Food Chemistry*, Volume 101, Issue 1. Pages 236-240, ISSN 0308-8146. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.022>.

- Oliveira D., Leitão G., Fernandes P., Leitão S. (2014). Ethnopharmacological Studies of *Lippia origanoides*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. Volume 24, Issue 2. Pages 206-214. ISSN 0102-695X. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.03.001>.
- Otto M. (2012). Molecular Basis of *Staphylococcus epidermidis* Infections. *Semin Immunopathol* . Pages 201–214. <https://doi-org.bibliotecavirtual.uis.edu.co/10.1007/s00281-011-0296-2>
- Pang Z., Chong J., Zhou G., de Lima D., Chang L., Barrette M., Gauthier C., Jacques P., Li S., & Xia J. (2021). MetaboAnalyst 5.0: Narrowing the Gap Between Raw Spectra and Functional Insights. *Nucleic Acids Research*. 49(W1). W388–W396. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab382>
- Petchiappan A., and Chatterji D. (2017). Antibiotic Resistance: Current Perspectives. *ACS Omega* 2 (10). Pages 7400-7409. DOI: 10.1021/acsomega.7b01368.
- Phakawat T., Soottawat B. (2014). Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science*. R1231-R1249. V 79. N 7. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12492>
- Pi Y., Chen W., and Ji Q. (2020). Structural Basis of *Staphylococcus aureus* Surface Protein SdrC. *Biochemistry*. Pages 1465-1469. DOI: 10.1021/acs.biochem.0c00124
- Proestos C., Chorianopoulos N., Nychas G., & Komaitis M. (2005). RP-HPLC Analysis of the Phenolic Compounds of Plant Extracts. Investigation of Their Antioxidant Capacity and Antimicrobial Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 (4), 1190-1195. DOI: 10.1021/jf040083t

- Rinschen M., Ivanisevic J., Giera M. Siuzdak G. (2019). Identification of Bioactive Metabolites Using Activity Metabolomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20. 353–367. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0108-4>
- Sánchez A., Benito N., Rivera A., García L., Miró E., Mur I., González Y., Gutiérrez C., Horcajada J., Espinal P., and Navarro F. (2020). Pathogenesis of *Staphylococcus Epidermidis* in Prosthetic Joint Infections: Can Identification of Virulence Genes Differentiate Between Infecting and Commensal Strains?. *Journal of Hospital Infection*. Volume 105. Issue 3. Pages 561-568. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.04.026>
- Santos F., Reis R., Souza A., Canuto K., Brito E., Castro K., Diniz F. (2023). Chemical Composition and Biological Activities of the Essential Oils from *Lippia Alba* and *Lippia Organoides*. *Anais Da Academia Brasileira De Ciências*. 95(1). e20220359. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202320220359>
- Scheltema R.A, Jankevics, A., Jansen R. C., Swertz, M. A., and Breitling R. (2011). PeakML/mzMatch: A File Format, Java Library, R Library, and Tool-chain for Mass Spectrometry Data Analysis. *Analytical Chemistry*. Pages 2786–2793. <https://doi.org/10.1021/ac2000994>
- Schillaci D., Spanò V., Parrino B., Carbone A., Montalbano A., Barraja P., Diana P., Cirrincione G., and Cascioferro S. (2017). Pharmaceutical Approaches to Target Antibiotic Resistance Mechanisms. *Journal of Medicinal Chemistry* 60 (20). Pages 8268-8297. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00215
- Selvaraj A., Valliammai A., Muthuramalingam P., Priya A., Suba M., Ramesh M., and Pandian S. (2020). Carvacrol Targets SarA and CrtM of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

- to Mitigate Biofilm Formation and Staphyloxanthin Synthesis: An In Vitro and In Vivo Approach. ACS Omega. Pages 31100-31114. DOI: 10.1021/acsomega.0c04252
- Semeniuc C., Pop C., Rotar A. (2017). Antibacterial Activity and Interactions of Plant Essential Oil Combinations Against Gram-positive and Gram-negative Bacteria. Journal of Food and Drug Analysis. Volume 25. Issue 2. Pages 403-408. ISSN 1021-9498. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.06.002>.
- Severn M., Horswill A. (2023). *Staphylococcus Epidermidis* and its Dual Lifestyle in Skin Health and Infection. Nat Rev Microbiol 21, 97–111. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00780-3>
- Shapiro J., Nguyen V., and Chamberlain N. (2011). Evidence for Persisters in *Staphylococcus Epidermidis* RP62a Planktonic Cultures and Biofilms. Journal of Medical Microbiology. Pages 950-960. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.026013-0>
- Shengzhe Zhou, Yifan Rao, Jia Li, Qiaoyi Huang, Xiancai Rao. (2022). *Staphylococcus aureus* Small-colony Variants: Formation, Infection, and Treatment. Microbiological Research. Volume 260. 127040. ISSN 0944-5013. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127040>.
- Siljamäki P., Varmanen P., Kankainen M., Sukura A., Savijoki K., and Nyman T. (2014). Comparative Exoprotein Profiling of Different *Staphylococcus epidermidis* Strains Reveals Potential Link between Nonclassical Protein Export and Virulence. Journal of Proteome Research. Pages 3249-3261. DOI: 10.1021/pr500075j
- Silva E., Ribeiro R., Barbosa E., Gonçalves G., Mano V., Pereira A., and de Lima L. (2018). *Lippia origanoides* Kunth. Essential Oil Loaded in Nanogel Based on the Chitosan and *p*-

- coumaric Acid: Encapsulation Efficiency and Antioxidant Activity. *Industrial Crops and Products*. Pages 85-94. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.074>.
- Soleimani M., Arzani A., Arzani V., Roberts T. (2022). Phenolic Compounds and Antimicrobial Properties of Mint and Thyme. *Journal of Herbal Medicine*. Volume 36. ISSN 2210-8033.
- Solórzano F., and Miranda M. (2012). Essential Oils From Aromatic Herbs as Antimicrobial Agents. *Current Opinion in Biotechnology*. Volume 23. Pages 136-141. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.005>.
- Stancliffe E. & Patti G. (2023). PeakDetective: A Semisupervised Deep Learning-Based Approach for Peak Curation in Untargeted Metabolomics Analytical Chemistry. *95 (25)*. 9397-9403. DOI: 10.1021/acs.analchem.3c00764
- Stashenko E., Martínez J., Ruíz C., Arias G., Durán C., Salgar W., & Cala M. (2010). *Lippia Origanoides* Chemotype Differentiation Based on Essential Oil GC-MS and Principal Component Analysis. *Journal of Separation Science*, 33(1), 93–103. DOI: <https://doi.org/10.1002/jssc.200900452>
- Suárez C., and Gudiol F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 27(2). Pages 116–129. DOI: 10.1016/j.eimc.2008.12.001
- Sumner L., Lei Z., Nikolau B., Saito K., Roessner U., and Trengove, R. (2014). Proposed Quantitative and Alphanumeric Metabolite Identification Metrics. *Metabolomics*. Pages 1047–1049. <https://doi.org/10.1007/s11306-014-0739-6>
- Tautenhahn R., Patti G., Rinehart D., & Siuzda G. (2012). XCMS Online: A WebBased Platform to Process Untargeted Metabolomic Data. *Analytical Chemistry*. 84(11). 5035–5039. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac300698c>

- Theodoridis G. A., Gika H. G., and Wilson I. D. (2013). LC-MS-Based Nontargeted Metabolomics. *Metabolomics in Practice*. Pages 93–115. <https://doi.org/doi:10.1002/9783527655861.ch5>
- Thielmann J., Muranyi P., and Kazman P. (2019). Screening Essential Oils for their Antimicrobial Activities Against the Foodborne Pathogenic Bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Heliyon*. Volume 5. Issue 6. ISSN 2405-8440. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01860>.
- Ultee A., Bennik M. & Moezelaar A. (2002). The phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol is Essential for Action Against the Food-borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1561-1568. 68. 4. doi:10.1128/AEM.68.4.1561-1568.2002
- Vermote A., and Calenbergh S. (2017). Small-Molecule Potentiators for Conventional Antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *ACS Infectious Diseases* 3 (11). Pages 780-796. DOI: 10.1021/acsinfecdis.7b00084
- Vicuña G., Stashenko E., and Fuentes J. (2010). Chemical Composition of the *Lippia origanoides* Essential Oils and their Antigenotoxicity Against Bleomycin-induced DNA Damage. *Fitoterapia*. Volume 81, Issue 5. Pages 343-349. ISSN 0367-326X. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.10.008>.
- Vu T., Siemek P., Bhinderwala F., Xu Y., and Powers P. (2019). Evaluation of Multivariate Classification Models for Analyzing NMR Metabolomics Data. *Journal of Proteome Research* 18 (9). 3282-3294. DOI: 10.1021/acs.jproteome.9b00227

- Walsh D., Livinghouse T., Goeres D., Mettler M., and Stewart P. (2019). Antimicrobial Activity of Naturally Occurring Phenols and Derivatives Against Biofilm and Planktonic Bacteria. *Frontiers in Chemistry*. Volume 7. DOI=10.3389/fchem.2019.00653
- Wang L., Wang M., Zeng X., Zhang Z., Gong D., and Huang Y. (2016). Membrane Destruction and DNA Binding of *Staphylococcus aureus* Cells Induced by Carvacrol and Its Combined Effect with a Pulsed Electric Field. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Pages 6355-6363. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b02507
- Wang L., Zhang Z., Zeng, X. Gong, Wang D., Sheng M. (2017). Combination of Microbiological, Spectroscopic and Molecular Docking Techniques to Study the Antibacterial Mechanism of Thymol against *Staphylococcus aureus*: Membrane Damage and Genomic DNA Binding. *Anal Bioanal Chem* 409. 1615–1625. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-0102-z>
- Wilkinson L. & Friendly M. (2009) The History of the Cluster Heat Map, *The American Statistician*, 63:2, 179-184, DOI: 10.1198/tas.2009.0033
- Witting M. (2013). Host - Pathogen Metabolomics of *Pseudomonas Aeruginosa* Infection Models. (Doctoral dissertation, München, Technische Universität München, Diss., 2013).
- Wu T., Kerbler S., Fernie A., and Zhang Y. (2021). Plant Cell Cultures as Heterologous Biofactories for Secondary Metabolite Production. *Plant Communications*. Volume 2, Issue 5. 100235. ISSN 2590-3462. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2021.100235>.
- Xu Z., Cave R., Chen L., Yangkyi T., Liu Y., Li K., Meng G., Niu K., Zhang W., Tang N., Shen J., and Mkrтчyan H. (2020). Antibiotic Resistance and Molecular Characteristics of Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* Recovered from Hospital Personnel in

- China. Journal of Global Antimicrobial Resistance. Pages 195-201.  
<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.02.013>
- Xu Z., Mkrtychyan H., and Cutler R. (2015). Antibiotic Resistance and MecA Characterization of Coagulase-negative *staphylococci* Isolated From three Hotels in London, UK. *Frontiers in Microbiology*. 6. 10.3389/fmicb.2015.00947
- Yee R., Cui P., Shi W., Feng J., & Zhang, Y. (2015). Genetic Screen Reveals the Role of Purine Metabolism in *Staphylococcus aureus* Persistence to Rifampicin. *Antibiotics*. 4(4). 627–642. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics4040627>
- Yu Z., Tang J., Khare T., Kumar V. (2020). The Alarming Antimicrobial Resistance in ESKAPEE Pathogens: Can Essential Oils Come to the Rescue?. *Fitoterapia*. Volume 140. 104433. ISSN 0367-326X. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104433>.
- Zakaria L., Sahli F., Laouar H., Olowo A., Nkuimi J., & Maggi F. (2020). Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from the Algerian Endemic *Origanum glandulosum* Desf. against Multidrug-Resistant Uropathogenic *E. coli* Isolates. *Antibiotics*, 9(1), 29. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics9010029>
- Zhang Y., Ren S., Li H., Wang Y., Fu G., Yang J., Qin Z., Miao Y., Wang W., Chen R., Shen Y., Chen Z., Yuan Z., Zhao G., Qu D., Danchin A. and Wen Y. (2003), Genome-based Analysis of Virulence Genes in a Non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* Strain (ATCC 12228). *Molecular Microbiology*. Pages 1577-1593. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03671.x>
- Zhou J., Muhammad J., Sun B., Yang R., Wadood A., Wang J., and Jia A. (2019). Metabolomic Analysis of Quorum Sensing Inhibitor Hordenine on *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied*

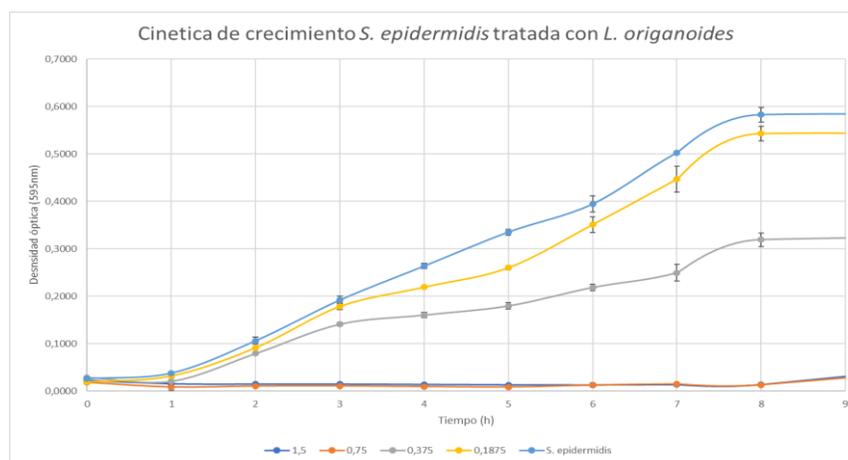
Microbiology and Biotechnology. Pages 6271–6285. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09878-w>

Zhou W., Wang Z., Mo H., Zhao Y., Li H., Zhang H., Hu L., and Zhou X. (2019). Thymol Mediates Bactericidal Activity against *Staphylococcus aureus* by Targeting an Aldo–Keto Reductase and Consequent Depletion of NADPH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67 (30). Pages 8382–8392. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b03517

## Apéndices

### Apéndice A. Cinética de crecimiento de *S. epidermidis* tratada con *L. origanoides*.

Figura 14. Cinética de crecimiento que presenta las células planctónicas de la bacteria *S. epidermidis* tratada con *L. origanoides* (0,1875, 0,375, 0,75 y 1,5 mg/mL).



**Apéndice B.** Principales constituyentes del AE *L. origanoides* quimitipo timol y abundancia relativa (%).

Tabla 3. Principales constituyentes del AE de *L. origanoides* quimitipo timol y abundancia relativa.

Código	Especie de planta	Número de Herbario	Compuestos principales (>1%)
LOT-II	<i>L. origanoides</i> H.B.K Thymolchemotype	Herbarium UIS 22036	Timol (71,7%), <i>p</i> -cimeno (10,5%), carvacrol (4,4%), $\beta$ -mirceno (2,1%), $\gamma$ -terpineno (2,0%), óxido de cariofileno (1,6%), metil timil éter (0,9%), trans- $\beta$ -cariofileno (0,9%), humuleno epóxido II (0,7%) y terpinen-4-ol (0,7%).

**Apéndice C.** Valores de p de los metabolitos implicados en rutas metabólicas de *S. epidermidis*.

Tabla 4. Valores de p y clasificación de metabolitos putativamente identificados.

Metabolitos identificados	Valor de P	Ruta Metabólica
Asparag	3.14E-3	Ciclo TCA
L-fenilalanina	3.56E-2	Síntesis de L-fenilalanina
Xantina	1.13E-2	Metabolismo de las purinas
Guanina	1.32E-2	Metabolismo de las purinas
Creatina	1.17E-2	Metabolismo de arginina y prolina