

Estudio metabolómico de la acción de aceites esenciales de plantas medicinales aromáticas sobre la inhibición de *Quórum Sensing* y la formación de *biofilm* de bacterias patógenas

Marlon Yesid Cáceres Ortiz

Trabajo de grado para optar al título de Doctor en Ciencias Biomédicas

Directora

Claudia Cristina Ortiz López

Doctora en Biocatálisis

Codirectores

Elena Stashenko

Doctora en Química

Rodrigo Torres Saez

Doctor en Bioquímica y Biología Molecular

Universidad Industrial De Santander

Facultad de Salud

Escuela de Medicina

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Bucaramanga

2021

### **Dedicatoria**

A todas aquellas personas que desde el conocimiento y la pedagogía luchan cada día para construir un mundo sin cadenas, sin injusticias y en paz; especialmente a Noam Chomsky, Peter McLaren, Henry Giroux y Paulo Freire, mis motivadores de proyecto de vida.

A Mi madre, mi padre, mis hermanos y mi nueva familia conformada por mi esposa y mis pequeños Elliot y Soviet, son los principales merecedores de mi esfuerzo.

También dedico mi trabajo a todos mis educandos que con su espíritu de curiosidad científica me hacen creer en la posibilidad de tener un mundo mejor.

### **Agradecimientos**

A esa fuerza creadora celestial que cada día nos regala un nuevo día en este pequeño espacio de nuestra galaxia.

A mi familia por su apoyo incondicional, a mi esposa Lorena Rueda por todo su amor, paciencia y motivación en los momentos más difíciles de este proceso y a Elliot y Soviet por acompañarme en silencio durante todas las noches analizando y redactando este trabajo.

A la Dra. Claudia Cristina Ortiz López por su confianza, paciencia y enseñanzas en este proceso, que ha contribuido a que sea un profesional integral.

Al Dr. Rodrigo Torres por su apoyo incondicional y enseñanzas durante el desarrollo de este trabajo

A la Dra. Elena Stashenko, quien con su instrucción, paciencia y dedicación han logrado mi crecimiento personal y profesional.

Al Dr. William Hidalgo por su disposición desinteresada en el apoyo y asesoría en este trabajo, por su amistad y confianza

A mis compañeros del Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología por todos estos años de apoyo, motivación y amistad sincera: Jennifer Ruiz, Yuliany Guillín, Luis Acuña, Andrés Suarez, Andrés Martínez, y a los demás que saben que cuentan conmigo incondicionalmente.

A los profesores del posgrado y calificadores que una u otra forma aportaron en mi formación académica y científica.

A la Universidad Industrial de Santander y a MinCiencias por el apoyo económico para poder realizar el presente trabajo de tesis doctoral.

A todas las personas que me apoyaron.

*¡MUCHAS GRACIAS!*

**Tabla de contenido**

Abreviaturas y símbolos .....	16
Introducción .....	23
1. Estado de arte y marco de referencia .....	29
1.1. biofilms bacterianos .....	29
1.2. Quorum Sensing.....	35
1.3. Inhibición del Quorum Sensing .....	37
1.4. Compuestos de plantas medicinales con efecto antimicrobiano.....	39
1.5. Análisis metabolómico.....	43
1.6. Metabolómica microbiana .....	45
2. Evaluación de la actividad antibacteriana <i>in vitro</i> de diferentes aceites esenciales de plantas aromáticas en cultivos planctónicos de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 y <i>Salmonella entérica</i> Ser Enteritidis .....	47
2.1. Introducción .....	47
2.2. Materiales y métodos .....	50
2.2.1. Materiales.....	51
2.2.2. Obtención de aceites esenciales .....	53
2.2.3. Análisis de aceites esenciales por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	53
2.2.4. Determinación de la actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> de aceites esenciales frente a <i>Escherichia coli</i> O157:H7 y <i>Salmonella entérica</i> Ser Enteritidis .....	54
2.3. Resultados y discusión.....	55

2.3.1 Actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> de aceites esenciales frente a <i>Escherichia coli</i> O157:H7 y <i>Salmonella entérica</i> Ser Enteritidis .....	65
2.4. Conclusiones .....	82
3. Evaluación de inhibición de la formación de <i>biofilm</i> de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 y <i>Salmonella entérica</i> Ser Enteritidis tratadas con aceites esenciales de las familias verbenaceas, poaceae, lamiaceae y asteraceae. ....	84
3.1. Introducción .....	84
3.2 Materiales y métodos .....	90
3.2.1 Materiales.....	90
3.2.2 Métodos.....	92
3.3. Resultados y discusión.....	95
3.3.1. Determinación de la actividad antibiofilm <i>in vitro</i> de aceites esenciales frente a <i>Escherichia coli</i> O157:H7 y <i>Salmonella entérica</i> Ser Enteritidis .....	95
3.3.2. Evaluación del efecto de LTC II sobre <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076 mediante Análisis de Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).....	107
3.4. Conclusiones .....	109
4. Evaluación de la actividad <i>antiquorum sensing</i> de aceites esenciales de las familias verbenáceae, poaceae, lamiaceae y asteraceae sobre un modelo bacteriano gram negativo .....	110
4.1. Introducción .....	110
4.1.1. Relación entre <i>QS</i> y la formación de <i>biofilm</i> .....	111
4.1.2. El mecanismo de <i>QS</i> como objetivo terapéutico .....	113
4.1.3. Inhibidores del <i>QS</i> .....	115
4.2. Materiales y métodos .....	120

4.2.1. Materiales.....	120
4.2.2. Métodos.....	122
4.2.3. Determinación de la actividad <i>antiquorum sensing in vitro</i> .....	123
4.3. Resultados y discusión.....	124
4.3.1. Determinación de la actividad anti- <i>QS in vitro</i> .....	124
4.4. Conclusiones .....	130
5. Determinación de la actividad citotóxica en células eucariotas <i>in vitro</i> de los aceites esenciales con mayor actividad inhibitoria sobre el <i>biofilm</i> y <i>Quorum Sensing</i> de bacterias patógenas.....	132
5.1. Introducción .....	132
5.2. Materiales y métodos .....	135
5.2.1. Materiales.....	135
5.2.3. Métodos.....	136
5.2.4. Determinación de la actividad citotóxica <i>in vitro</i> .....	137
5.3. Resultados y discusión.....	138
5.3.1. Determinación de la actividad citotóxica <i>in vitro</i> .....	138
5.4. Conclusiones .....	142
6. Estudiar el posible mecanismo de acción del mejor aceite esencial sobre la formación del <i>biofilm</i> y la inhibición del <i>Quorum Sensing</i> de bacterias patógenas, utilizando análisis metabolómicos. ....	143
<b>6.1. Introducción .....</b>	<b>143</b>
6.1.1. Metabolómica no dirigida.....	144
6.1.2. Metabolómica dirigida .....	145
6.1.3. Metabolómica microbiana .....	145

6.1.4. Metabolómica del <i>biofilm</i> .....	148
6.1.5. Metabolómica del <i>quorum sensing</i> .....	150
6.2. Materiales y métodos .....	152
6.2.1. Materiales.....	152
6.2.2. Métodos.....	153
6.2.3. Extracción de metabolitos bacterianos.....	153
6.2.4. Análisis UHPLC-Orbitrap- MS .....	154
6.2.5. Procesamiento y análisis estadístico de datos obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS .....	156
6.3. Resultados y discusión.....	157
6.3.1. Análisis metabolómico del efecto del AE de LTC II sobre la formación del <i>biofilm</i> de <i>Salmonella enterica</i> Ser Enteritidis .....	158
6.3.2. Análisis metabolómico del efecto del AE de LTC II sobre la formación del <i>biofilm</i> de <i>Escherichia coli</i> O157.H7.....	173
6.3.3. Análisis metabolómico del efecto del AE de LTC II sobre la inhibición del <i>quorum sensing</i> de CV026 .....	191
6.4. Conclusiones .....	205
7. Recomendaciones .....	206
8. Referencias bibliográficas.....	208
9. Apéndices.....	284
10. Divulgación.....	310
10.1. Publicaciones científicas .....	310
10.2. Participación en Congresos.....	310

**Lista de tablas**

Tabla 1 .....	32
Genes involucrados en la formación y desarrollo del biofilm en <i>E. coli</i> O157:H7 (Sharma et al., 2016) .....	32
Tabla 2 .....	40
Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de distintos AE, frente a diferentes bacterias patógenas .....	40
Tabla 3 .....	56
Cantidad relativa (%) de los principales compuestos presentes en los 17 AE evaluados.....	56
Tabla 4. ....	65
Determinación de la CMI <sub>50</sub> y la CMB de los AE evaluados frente a <i>Escherichia coli</i> O157:H7 y <i>Salmonella Enteritidis</i> ATCC 13076 .....	65
Tabla 5 .....	87
Concentración Mínima Inhibitoria del biofilm (CMIB) de AE frente a diferentes microorganismos.....	87
Tabla 6 .....	96
Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del biofilm (CMIB) de los AE evaluados frente a <i>Escherichia coli</i> O157:H7 y <i>Salmonella Enteritidis</i> ATCC 13076.....	96
Tabla 7 .....	112
Genes de bacterias patógenas asociados con virulencia y formación del biofilm regulados por QS .....	112
Tabla 8 .....	119
Aceites esenciales con actividad inhibitoria del quorum sensing frente a diferentes microorganismos.....	119
Tabla 9 .....	125
Determinación de la CMI <sub>50</sub> y la CMB de los AE evaluados frente a CV026 .....	125
Tabla 10 .....	127
Evaluación de la actividad anti-QS de AE frente a CV026.....	127
Tabla 11 .....	139

Concentración Inhibitoria 50 (IC50) en mg/mL e índice de Selectividad (SI) de los aceites esenciales con mayor actividad biológica.....	139
Tabla 12 .....	165
Metabolitos (tentativamente identificados) significativamente alterados por el efecto del AE de LTC II sobre la formación del biofilm de Salmonella enterica Ser Enteritidis. ....	165
Tabla 13 .....	167
Principales rutas metabólicas afectadas por el AE de LTC II sobre la formación del biofilm de Salmonella enterica Ser Enteritidis.....	167
Tabla 14 .....	181
Metabolitos (tentativamente identificados) significativamente alterados por el efecto del AE de LTC II sobre la formación del biofilm de E. coli O157:H7.....	181
Tabla 15 .....	185
Principales rutas metabólicas afectadas por el AE de LTC II sobre la formación del biofilm de E. coli O157:H7.....	185
Tabla 16 .....	199
Metabolitos (tentativamente identificados) significativamente alterados por el efecto del AE de LTC II sobre la inhibición del QS de CV026 .....	199
Tabla 17 .....	201
Principales rutas metabólicas afectadas por el AE de LTC II sobre la inhibición del QS de CV026.....	201

**Lista de figuras**

Figura 1 .....	31
Etapas de formación de biofilm bacteriano .....	31
Figura 2 .....	51
Metodología para la determinación de la actividad antimicrobiana de los AE frente a las bacterias E. coli O157:H7 y S. Enteritidis ATCC 13076.....	51
Figura 3 .....	67
Actividad antibacteriana del AE de Tagetes lucida frente a E. coli O157:H7. Ensayo realizado por el método de microdilución en caldo a 37 °C durante 12 h con agitación a 200 rpm. ....	67
Figura 4 .....	70
Actividad antibacteriana del AE de Thymus vulgaris frente a E. coli O157:H7. Ensayo realizado por el método de microdilución en caldo a 37 °C durante 12 h con agitación a 200 rpm.....	70
Figura 5 .....	70
Actividad antibacteriana del AE de Thymus vulgaris frente a S. Enteritidis. Ensayo realizado por el método de microdilución en caldo a 37 °C durante 12 h con agitación a 200 rpm .....	70
Figura 6 .....	74
Actividad antibacteriana del AE de Cymbopogon martini frente a S. Enteritidis. Ensayo realizado por el método de microdilución en caldo a 37 °C durante 12 h con agitación a 200 rpm. ....	74
Figura 7 .....	75
Actividad antibacteriana del AE de Cymbopogon martini frente a E. coli O157:H7. Ensayo realizado por el método de microdilución en caldo a 37 °C durante 12 h con agitación a 200 rpm. ....	75
Figura 8 .....	78
Actividad antibacteriana del AE de LTC I frente a E. coli O157:H7. Ensayo realizado por el método de microdilución en caldo a 37 °C durante 12 h con agitación a 200 rpm .....	78
Figura 9 .....	78
Actividad antibacteriana del AE de LTC I frente a S. Enteritidis. Ensayo realizado por el método de microdilución en caldo a 37 °C durante 12 h con agitación a 200 rpm .....	78
Figura 10 .....	79

Actividad antibacteriana del AE de LTC II frente a <i>E. coli</i> O157:H7. Ensayo realizado por el método de microdilución en caldo a 37 °C durante 12 h con agitación a 200 rpm .....	79
Figura 11 .....	79
Actividad antibacteriana del AE de LTC II frente a <i>S. Enteritidis</i> . Ensayo realizado por el método de microdilución en caldo a 37 °C durante 12 h con agitación a 200 rpm .....	79
Figura 12 .....	92
Metodología para la determinación de la actividad antibiofilm de los aceites .....	92
Figura 13 .....	97
Actividad inhibitoria del biofilm del AE de LTC II a diferentes concentraciones subinhibitorias contra <i>E. coli</i> O157:H7 (barras negras) y <i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076 (barras grises) .....	97
Figura 14 .....	108
Imágenes de SEM de la formación del biofilm de <i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076 (A), y <i>E. coli</i> O157:H7 (C). Interrupción en la formación del biofilm de <i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076 (B) y <i>E. coli</i> O157:H7 (D), después del tratamiento con el AE de LTC II. Las imágenes .....	108
Figura 15 .....	122
Metodología para la determinación de la actividad anti-QS de los AE frente a la bacteria <i>Chromobacterium violaceum</i> CV026 .....	122
Figura 16 .....	137
Metodología para la determinación de la actividad citotóxica de los AE frente a la línea celular Vero .....	137
Figura 17 .....	158
Resultados de alineamiento y deconvolución de los cromatogramas del grupo control y tratamiento con LTC II sobre <i>Salmonella enterica</i> Ser <i>Enteritidis</i> para los datos obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS. ....	158
Figura 18 .....	160
Análisis de componentes principales (PCA) de los resultados obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS de muestras control (círculos en rojo) versus muestras con tratamiento (círculos en verde) en el enfoque dirigido A. Modo de ionización positiva y B. Modo de ion .....	160
Figura 19 .....	161
Relación de los cambios de expresión de metabolitos en la formación del biofilm de <i>Salmonella enterica</i> Ser <i>Enteritidis</i> en presencia del AE de LTC II usando el enfoque dirigido A. Modo de ionización positiva y B. Modo de ionización negativa. Las señales .....	161

Figura 20 .....	162
Análisis de componentes principales (PCA) de los resultados obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS de muestras control (círculos en rojo) versus muestras con tratamiento (círculos en verde). A. Modo de ionización positiva y B. Modo de ionización negativa.....	162
Figura 21 .....	163
Relación de los cambios de expresión de metabolitos en la formación del biofilm de Salmonella enterica Ser Enteritidis en presencia del AE de LTC II usando el enfoque no dirigido A. Modo de ionización positiva y B. Modo de ionización negativa.....	163
Figura 22 .....	168
Esquema general de las vías metabólicas afectadas por el AE de LTC II sobre la formación del biofilm de Salmonella enterica Ser Enteritidis .....	168
Figura 23 .....	174
Resultados de alineamiento y deconvolución de los cromatogramas del grupo control y tratamiento con LTC II sobre E. coli O157:H7 para los datos obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS. A. Modo de ionización positivo y B. Modo de ionización negativo.....	174
Figura 24 .....	176
Análisis de Componentes Principales (PCA) de los resultados obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS de muestras control (círculos en rojo) versus muestras con tratamiento (círculos en verde) en el enfoque dirigido.....	176
Figura 25 .....	177
Relación de los cambios de expresión de metabolitos en la formación del biofilm de E. coli O157:H7 en presencia del AE de LTC II en el enfoque dirigido.....	177
Figura 26 .....	178
Análisis de componentes principales (PCA) de los resultados obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS de muestras control (círculos en rojo) versus muestras con tratamiento (círculos en verde) en el enfoque no dirigido .....	178
Figura 27 .....	179
Relación de los cambios de expresión de metabolitos en la formación del biofilm de E. coli O157:H7 en presencia del AE de LTC II en el enfoque no dirigido. A. Modo de ionización positiva y B. Modo de ionización negativa.....	179
Figura 28 .....	186
Esquema general de las vías metabólicas afectadas por el AE de LTC II sobre la formación del biofilm de E. coli O157:H7.....	186

Figura 29 .....	192
Resultados de alineamiento y deconvolución de los cromatogramas del grupo control y tratamiento con LTC II sobre CV026 para los datos obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS. A. Modo de ionización positivo y B. Modo de ionización negativo .....	192
Figura 30 .....	193
Análisis de componentes principales (PCA) de los resultados obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS de muestras control (círculos en rojo) versus muestras con tratamiento (círculos en verde) en el enfoque no dirigido .....	193
Figura 31 .....	194
Relación de los cambios de expresión de metabolitos en la inhibición del QS de CV026 en presencia del AE de LTC II. A. Modo de ionización positiva y B. Modo de ionización negativa. ....	194
Figura 32 .....	196
Análisis de componentes principales (PCA) de los resultados obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS de muestras control (círculos en rojo) versus muestras con tratamiento (círculos en verde) en el enfoque no dirigido. ....	196
Figura 33 .....	197
Relación de los cambios de expresión de metabolitos en la inhibición del QS de CV026 en presencia del AE de LTC II en el modo de ionización positiva (A) y negativa (B). ....	197
Figura 34 .....	202
Esquema general de las vías metabólicas afectadas por el AE de LTC II sobre la inhibición del QS de CV026. ....	202

**Lista de apéndices**

Apéndice A .....	284
Listado de metabolitos utilizados en los análisis de metabolómica dirigida .....	284
Apéndice B.....	289
Análisis de Componentes Principales (PCA) de los resultados obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS de muestras de calidad, control y tratamiento en modo de ionización positiva y negativa. ....	289
Apéndice C.....	296
Análisis comparativo de los iones de fragmentación para los espectros teóricos y experimentales de los principales metabolitos detectados asociados con las rutas metabólicas estudiadas.....	296

**Abreviaturas y símbolos**

$\lambda$	Longitud de onda
<b>A</b>	
AE	Aceite esencial o aceites esenciales
AHL	N-Acil-homoserina lactona
AIP	Péptidos autoinductores
AIs	Autoinductores
ACN	Acetonitrilo
<b>B</b>	
Bap	Proteína asociada al <i>biofilm</i>
BHI	Infusión cerebro-corazón
<b>C</b>	
c-di-GMP	Ácido 3'-5'- diguanilato cíclico
CF	<i>Cymbopogon flexuosus</i>
CIF	Concentración Inhibitoria Fraccionaria
CM	<i>Cymbopogon martini</i>
CMB	Concentración Mínima Bactericida
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria

CMIB	Concentración Mínima Inhibitoria del <i>biofilm</i>
CMIQ	Concentración Mínima Inhibitoria del <i>quorum sensing</i>
CN	<i>Cymbopogon nardus</i>
CO	<i>Cananga odorata</i>
CS	<i>Citrus sinensis</i>
CV026	<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026
<b>D</b>	
DL <sub>50</sub>	Dosis media letal 50
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
<b>E</b>	
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	<i>Elettaria cardamomum</i>
EPS	Sustancias poliméricas extracelulares
EDA	Enfermedad diarreica aguda
<b>G</b>	
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GC/MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

**H**

HPLC Cromatografía líquida de alta eficiencia

**I****IC<sub>50</sub>** Concentración Inhibitoria 50**K***K. pneumoniae* *Klebsiella pneumoniae***L**LACA *Lippia alba*, Quimiotipo carvonaLACI *Lippia alba*, Quimiotipo citral

LB Luria Bertani

LOF *Lippia origanoides*, Quimiotipo Felandreno

LPS Lipopolisacáridos

LRI Índices de retención lineales

LTC I *Lippia origanoides*, Quimiotipo Timol-Carvacrol ILTC II *Lippia origanoides*, Quimiotipo Timol-Carvacrol II**M**

MS Espectrometría de masas, espectro de masas

MTT Sal de bromuro de 3-(4,5 dimetil tiazol -2 il)- 2,5- difenil tetrazolio

**O**

OMS Organización Mundial de la Salud

**P**

*P. aeruginosa* *Pseudomonas aeruginosa*

PMR Resonancia magnética de protones

**Q**

QQ *Quorum Quenching*

QS *Quorum Sensing*

**R**

RMN Resonancia magnética nuclear

RO *Rosmarinus officinalis*

RP-HPLC Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa

**S**

SEM Microscopia electrónica de barrido

*S. aureus* *Staphylococcus aureus*

*S. pneumoniae* *Staphylococcus pneumonia*

*S. Enteritidis* *Salmonella enterica* Serovariedad Enteritidis

SI Índice de selectividad

SO *Salvia officinalis*

SG	<i>Swinglea glutinosa</i>
SV	<i>Satureja viminea</i>
<b>T</b>	
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
TL	<i>Tagetes lucida</i>
TV	<i>Thymus vulgaris</i>
TEM	Microscopía de transmisión electrónica
<b>U</b>	
UFC	Unidades formadoras de colonia

## Resumen

**Título:** Estudio metabolómico de la acción de aceites esenciales de plantas medicinales aromáticas sobre la inhibición del *quorum sensing* y la formación de *biofilm* de bacterias patógenas<sup>1</sup>.

**Autor:** Marlon Yesid Cáceres Ortiz<sup>2</sup>

**Palabras clave:** Metabolómica, aceites esenciales, *quorum sensing*, *biofilm*, actividad antibacteriana.

### Descripción:

La prevalencia de la resistencia bacteriana a los fármacos antimicrobianos ha llevado a los investigadores a descubrir nuevos compuestos antimicrobianos sintéticos y/o naturales para tratar diversos patógenos multirresistentes. Los Aceites Esenciales (AE) extraídos de plantas aromáticas contienen una amplia diversidad de moléculas volátiles, que incluyen principalmente metabolitos secundarios, que poseen diferentes actividades biológicas. En la presente tesis doctoral se evaluó la actividad antibacteriana y antibiofilm frente a *Escherichia coli* O157.H7 y *Salmonella entérica* Ser Enteritidis ATCC 13076. Además, se analizó el efecto de los AE sobre el mecanismo de comunicación bacteriana *Quorum Sensing* en bacterias Gram negativas, utilizando la bacteria biorreportera *Chromobacterium violaceum* CV026. Posteriormente, se determinó la actividad citotóxica de los AE que presentaron mayor actividad biológica y se estudió el mecanismo de acción de estos compuestos vegetales frente a las bacterias utilizadas en el proyecto, con la ayuda de técnicas metabolómicas.

Los resultados sugieren que el AE de *Lippia origanoides* quimiotipo timol carvacrol II (LTC II) presentó la mayor actividad biológica frente a los microorganismos evaluados, con Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) de 0.37 mg/mL, Concentraciones Mínimas Bactericidas (CMB) de 0.75 mg/mL, Concentraciones Mínimas Inhibitorias del *Biofilm* (CMIB) de 0.19 mg/mL y Concentraciones Mínimas Inhibitorias del Quorum Sensing (CMIQ) de 0.2 mg/mL. Sumado a lo anterior, el AE de LTC II exhibió un Índice de Selectividad positivo, lo cual indica una mayor selectividad frente a los microorganismos en comparación con las células eucariotas. Finalmente, mediante el análisis metabolómico se determinó que el mecanismo de acción del AE frente a la inhibición del *biofilm* de los microorganismos evaluados se encuentra asociado principalmente con afectación a nivel del metabolismo energético, metabolismo de aminoácidos, ácidos nucleicos y poliaminas. Los resultados obtenidos permiten concluir que los AE constituyen una alternativa prometedora para ser utilizados como antibióticos contra diferentes bacterias patógenas.

---

<sup>1</sup> Tesis doctoral

<sup>2</sup> Facultad de Salud. Escuela de Medicina.

## Abstract

**Title:** Metabolomic study of the action of essential oils of aromatic medicinal plants on the inhibition of quorum sensing and the formation of biofilm of pathogenic bacteria<sup>3</sup>.

**Author:** Marlon Yesid Cáceres Ortiz<sup>4</sup>

**Keywords:** Metabolómic, essential oils, *quorum sensing*, *biofilm*, antibacterial activity.

### Description:

The prevalence of bacterial resistance to antimicrobial drugs has led researchers to discover new synthetic and / or natural antimicrobial compounds to treat various multi-resistant pathogens. Essential Oils (EO) extracted from aromatic plants contain a wide variety of volatile molecules, which mainly include secondary metabolites, which possess different biological activities. In the present doctoral thesis, the antibacterial and antibiofilm activity against *Escherichia coli* O157.H7 and *Salmonella enterica* Ser Enteritidis ATCC 13076 was evaluated. In addition, the effect of AE on the mechanism of bacterial communication Quorum Sensing in Gram negative bacteria was analyzed, using the bioreporting bacterium *Chromobacterium violaceum* CV026. Subsequently, the cytotoxic activity of the EOs with the highest biological activity was determined and the mechanism of action of these plant compounds against the bacteria used in the project was studied, with the help of metabolomic techniques.

The results suggest that the EO of *Lippia origanoides* chemotype thymol carvacrol II (LTC II) presented the highest biological activity against the microorganisms evaluated, with Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of 0.37 mg/mL, Minimum Bactericidal Concentrations (CMB) of 0.75 mg/mL, Minimum Inhibitory Concentrations of Biofilm (CMIB) of 0.19 mg/mL and Minimum Inhibitory Concentrations of Quorum Sensing (CMIQ) of 0.2 mg/mL. In addition to the above, the EO of LTC II exhibited a positive Selectivity Index, which indicates a greater selectivity against microorganisms compared to eukaryotic cells. Finally, by means of the metabolomic analysis it was determined that the mechanism of action of EO against the inhibition of the biofilm of the evaluated microorganisms is mainly associated with affectation at the level of energy metabolism, metabolism of amino acids, nucleic acids and polyamines. The results obtained allow us to conclude that EOs constitutes a promising alternative to be used as antibiotics against different pathogenic bacteria.

---

<sup>3</sup> Doctoral thesis

<sup>4</sup> Faculty of Health. School of Medicine.

Directora: Claudia Ortiz López Ph.D. Codirectora: Elena Stashenko Ph.D.

## Introducción

La resistencia a los agentes antimicrobianos constituye actualmente una amenaza para la salud pública mundial. La baja cantidad de antibióticos disponibles en el mercado, su uso indiscriminado en los tratamientos y el descenso en la cantidad de descubrimientos de nuevos agentes terapéuticos han llevado a una crisis de resistencia antibiótica durante las últimas décadas (Dugassa and Shukuri, 2017). Entre los factores que pueden contribuir a la resistencia bacteriana se encuentra la capacidad de las bacterias para formar *biofilm*, que son consorcios bacterianos con una matriz compleja de ADN, proteínas y polisacáridos (Koo *et al.*, 2017; Kamali *et al.*, 2020). La formación de *biofilms* representa más del 80% de las infecciones bacterianas en todo el mundo; además, presentan una importancia clínica relevante debido a que protegen al microorganismo y le permiten sobrevivir a ambientes hostiles obstaculizando la absorción de antibióticos y confiriéndoles resistencia (Peterson *et al.*, 2015). Por lo tanto, la inhibición de la formación del *biofilm* es uno de los principales desafíos en la terapia antibiótica actual (Gloag *et al.*, 2020).

Sumado a la formación de *biofilm*, las bacterias tienen la capacidad de comunicarse a través de *Quorum Sensing* (QS), un mecanismo de comunicación dependiente de la densidad bacteriana basado en la secreción de moléculas difusibles conocidas como autoinductores (Kai, 2018). El QS desempeña un papel importante en la inducción de la expresión génica para controlar diferentes comportamientos celulares como la bioluminiscencia, la secreción de factores de virulencia, el desarrollo de *biofilm* y la supervivencia a agentes antimicrobianos (Machado *et al.*, 2020; Prescott and Decho, 2020). La búsqueda de nuevos compuestos

terapéuticos que interfieran con el mecanismo de QS, también se ha convertido en un interesante foco de estudio para contrarrestar la resistencia bacteriana (Haque *et al.*, 2018). Es necesario ampliar nuestro conocimiento acerca del proceso de patogénesis y de los mecanismos de acción de los compuestos antimicrobianos a nivel molecular.

En los últimos años ha existido un gran avance en el desarrollo de la tecnología, relacionado con los equipos analíticos para la identificación y cuantificación de muchas moléculas. El uso de equipos avanzados de computación y el desarrollo de *softwares* y megabases, permiten el análisis de los datos generados. De esta manera se ha logrado el análisis de diferentes moléculas (ADN, ARN, proteínas y diversos metabolitos) y la creación de redes de interacción entre ellas para comprender mejor el funcionamiento de los sistemas biológicos (Frigolet *et al.*, 2017). Entre las tecnologías biológicas de alto rendimiento asociadas con la medición de las moléculas biológicas, se encuentra la **metabolómica**, entre otras ómicas. La metabolómica permite identificar y cuantificar metabolitos en muestras biológicas y, en consecuencia, determinar un perfil metabólico mediante tecnologías y plataformas para análisis de datos obtenidos que brindan información sobre el estado metabólico del sistema. La metabolómica resulta útil para inferir posibles mecanismos de acción de moléculas que inhiban procesos celulares en las bacterias, tales como el *biofilm* y el QS (Chen *et al.*, 2020).

Teniendo en cuenta los grandes impactos de la resistencia antimicrobiana en la vida del ser humano y los grandes avances tecnológicos para el estudio de los sistemas biológicos, durante los últimos años se vienen realizando estudios concentrados en la obtención de nuevos compuestos antimicrobianos, evaluando diferentes moléculas y mezclas ya existentes en la

naturaleza con actividad antimicrobiana. Además, se han desarrollado herramientas moleculares para el estudio de los mecanismos de acción de los antimicrobianos, y se persiguen dianas terapéuticas efectivas para el tratamiento de enfermedades infecciosas de alta prevalencia e infecciones sistémicas difíciles de tratar.

Entre los compuestos de origen natural, los aceites esenciales (AE) de plantas aromáticas medicinales han surgido como alternativa para el tratamiento de infecciones microbianas (Bhavaniramy *et al.*, 2019; Ćirić *et al.*, 2019; Erhabor, Erhabor and McGaw, 2019). Sin embargo, debido a la gran diversidad química de los componentes de los AE, es necesario identificar los quimiotipos más promisorios, las moléculas con efecto antibiótico y su posible mecanismo de acción; por ejemplo, en la inhibición de la formación de *biofilm* bacteriano mediante el bloqueo de la comunicación celular bacteriana.

Esta tesis doctoral se enfocó en el estudio de la actividad antibacteriana y *antibiofilm* de AE obtenidos de plantas en el nororiente colombiano, que fueron analizados y caracterizados en el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinas Tropicales (CENIVAM). Las siguientes bacterias del estudio se seleccionaron, porque representan un grave problema para la salud pública a nivel mundial debido a la resistencia que han desarrollado: *Escherichia coli* O157:H7 (*E. coli* O157:H7) y *Salmonella entérica* serovariedad Enteritidis (*S. Enteritidis*). Se analizó el efecto de los AE sobre el mecanismo de comunicación bacteriana QS en bacterias Gram negativas, utilizando la bacteria biorreportera *Chromobacterium violaceum* CV026. Se determinó la actividad citotóxica de los AE que presentaron mayor actividad biológica y se estudió el mecanismo de acción de estos

compuestos vegetales frente a las bacterias utilizadas en el proyecto, con la ayuda de diferentes técnicas metabolómicas.

La hipótesis de la presente investigación se basó en que los AE con actividad antimicrobiana sobre *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* Enteritidis, pueden constituir una alternativa para combatir el fenómeno de la resistencia bacteriana debido a la inhibición del *biofilm* y el *QS*.

El presente trabajo de investigación fue dividido en seis capítulos; a continuación, se presenta una breve descripción de cada uno de ellos:

En el **Capítulo 1** se presentan los antecedentes teóricos del problema, relacionado con la resistencia bacteriana y la capacidad de las bacterias para formar *biofilm* mediante mecanismos de comunicación como el *QS*. Se presentan los AE derivados de plantas medicinales como alternativa para obtener productos con actividad antibacteriana, *antibiofilm* y *antiQS*, y se aborda el tema del análisis metabolómico en bacterias y su importancia para el estudio de los posibles mecanismos de acción de diferentes moléculas naturales.

En el **Capítulo 2** se estudió el efecto de la composición de los AE (suministrados y caracterizados por el CENIVAM), sobre la actividad frente a *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* Enteritidis, utilizando la metodología de microdilución en caldo. Se obtuvieron los valores de Concentración Mínima Inhibitoria 50 (CMI50) y Concentración Mínima Bactericida (CMB), para seleccionar los AE con mayor actividad antibacteriana y determinar la concentración para evaluar su efecto *antibiofilm*.

En el **Capítulo 3** se determinó el efecto de los AE sobre la inhibición de la formación del *biofilm* de *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* Enteritidis, utilizando el método de tinción con cristal violeta descrito por O'Toole, con algunas modificaciones. También, se evidenciaron cambios en la arquitectura del *biofilm*, que se observaron utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM). Lo anterior permitió seleccionar los AE con mayor actividad inhibitoria del *biofilm*.

El **Capítulo 4** estuvo orientado hacia el análisis del efecto de los AE sobre el mecanismo de comunicación bacteriana *QS*, utilizando la bacteria biorreportera *Chromobacterium violaceum* CV026. Para el cumplimiento de este objetivo se determinó la CMI50 de los AE frente a CV026. Se cuantificó la inhibición del pigmento violaceína, indicador de la expresión del *QS* en el microorganismo, utilizando concentraciones subinhibitorias. Se seleccionó el AE con la mayor actividad inhibitoria del *QS*, para el estudio mediante análisis metabolómico del posible mecanismo de acción sobre la comunicación bacteriana basada en la secreción de moléculas autoinductoras.

En el **Capítulo 5** se evaluó la capacidad citotóxica de los AE con mayor actividad antimicrobiana, *antibiofilm* y *antiQS*. El ensayo de viabilidad celular se realizó sobre la línea celular Vero (células epiteliales normales de riñón de mono verde africano), utilizando el método colorimétrico de MTT [sal de bromuro de 3-(4,5 dimetil tiazol -2 il)- 2,5- difenil tetrazolio] descrito por Mosmann. Se seleccionaron los AE con mayor Índice de Selectividad (SI) frente a las cepas bacterianas evaluadas, en comparación con las células Vero.

En el **Capítulo 6** se realizó el estudio metabolómico del efecto del AE con mayor actividad biológica frente a *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis* y CV026, con el objetivo de determinar alteraciones en las concentraciones de metabolitos bacterianos y de analizar los efectos de estas modificaciones en las diferentes rutas metabólicas afectadas, lo que permitió inferir el posible mecanismo de acción del AE frente a las bacterias estudiadas.

## 1. Estado de arte y marco de referencia

### 1.1. *biofilms* bacterianos

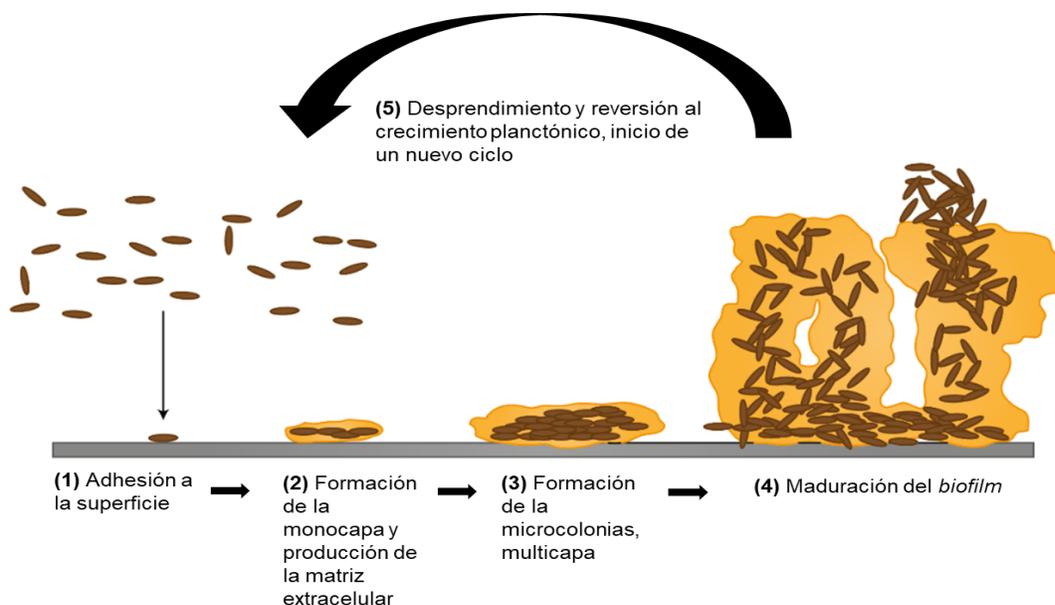
La necesidad de enfoques alternativos para luchar contra cepas resistentes se deriva del hecho que 16 millones de personas mueren anualmente a causa de enfermedades infecciosas. Cabe destacar, que más del 80% de las infecciones bacterianas en seres humanos involucran la formación de *biofilms*, una de las áreas en las que el comportamiento bacteriano puede ser mediado por QS, ocasionando un impacto relevante en el deterioro de alimentos, la acuicultura, la purificación del agua, entre otros (Yan and Bassler, 2019; Keren-Paz and Kolodkin-Gal, 2020).

El *biofilm* es una comunidad microbiana compuesta de células sésiles irreversiblemente unidas a un sustrato o a una interfaz incrustada en una matriz de polímero extracelular. La matriz extracelular está compuesta de sustancias sintetizadas por microorganismos que presentan una modificación del fenotipo, en relación con la velocidad de crecimiento y la transcripción de genes (Crabbé *et al.*, 2019; Fang, Park and Hong, 2020). De acuerdo con estudios recientes (Defoirdt, 2018; Vadakkan *et al.*, 2018), la formación del *biofilm* puede ser el producto de moléculas que actúan como segundos mensajeros, tales como el ácido 3'-5'- diguanilato cíclico (c-di-GMP) o ser el producto de un sistema de comunicación o señalización célula-célula denominado QS, el cual actúa como un auténtico lenguaje a través de señales químicas. Este sistema funciona a modo de “acuerdo” (*quorum*), entre las células bacterianas, para la activación o represión de genes específicos (entre ellos los que regulan la producción de *biofilm*), mediante la liberación y la detección de ciertas sustancias llamadas “autoinductores”. La regulación de los genes del QS durante el crecimiento del *biofilm* se debe a la acumulación de moléculas señal y se

define como el agrupamiento bacteriano dependiente de la comunicación intercelular (Saeki, Kobayashi and Nakazato, 2020).

Las células de un *biofilm* están embebidas en una matriz compuesta por un polímero extracelular, cuya densidad se encuentra entre  $10^4$  células/cm<sup>2</sup> y  $10^8$  células/cm<sup>2</sup>, siendo estos valores los que marcan la diferencia entre un *biofilm* visible y uno invisible. Los *biofilms* microbianos influyen en casi todos los aspectos de nuestras vidas, siendo relevantes en prácticas médicas, ecológicas, biotecnológicas e inclusive económicas (Wu, Cheng and Cheng, 2019; Kassing and van Hoek, 2020).

La formación del *biofilm* se puede dividir en cinco etapas: (1) Unión inicial reversible; (2) Formación de la monocapa y producción de la matriz extracelular; (3) Formación de microcolonias multicapa; (4) Maduración y (5) Dispersión. Como se muestra en la **Figura 1**, el contacto inicial de las bacterias planctónicas con la superficie es el punto de partida de la formación de *biofilm* y constituye la fase reversible del proceso; luego las bacterias comenzarán a formar una monocapa y a producir la matriz extracelular, la cual consta de polisacáridos extracelulares, proteínas estructurales, residuos celulares y ácidos nucleicos, que en conjunto se denominan Sustancias Poliméricas Extracelulares (EPS). En esta etapa tiene lugar la formación de microcolonias, que presentan un crecimiento significativo y también surge la comunicación célula-célula, conocida como detección del quorum o QS. Durante la fase de maduración, el *biofilm* se extiende de manera tridimensional y las uniones son irreversibles. En la etapa final o de dispersión, algunas células del *biofilm* maduro comienzan a desprenderse y diseminarse en el medio ambiente como células planctónicas para iniciar un nuevo ciclo de formación de *biofilm* (Verderosa, Totsika and Fairfull-Smith, 2019; Gloag *et al.*, 2020).

**Figura 1***Etapas de formación de biofilm bacteriano*

El *biofilm* de *E. coli* O157:H7 puede desarrollarse en cualquier entorno que tenga las condiciones adecuadas. Las superficies para la adhesión celular pueden ser abióticas como implantes médicos, acero inoxidable, vidrio, plástico, metal; o bióticas como células epiteliales y tejidos animales (Adator *et al.*, 2018). En *E. coli* O157:H7, los flagelos peritricos actúan como un mecanismo para la motilidad activa, aumentando la interacción entre el microorganismo y la superficie, y proporcionando el primer contacto entre la célula y la superficie de adhesión (Fouladkhah, Geornaras and Sofos, 2013).

Diferentes moléculas de bajo peso molecular como el c-di-GMP son responsables del cambio del estado planctónico a sésil; es así como la concentración de c-di-GMP disminuye en estado de motilidad y se incrementa durante la formación de *biofilm* (Ha and O'Toole, 2015; Ahmad *et al.*, 2020). Los organelos adhesivos como las fimbrias Tipo I y las fimbrias *curli* desempeñan un papel importante en la fijación irreversible de *E. coli* O157:H7 a la superficie.

Las fimbrias Tipo I son relevantes para la unión inicial del microorganismo a las superficies abióticas y están codificadas por el gen *fim*; por su parte, las fimbrias *curli* están codificadas por el gen *csg*, y constituyen las estructuras extracelulares que se unen a las proteínas de la matriz polimérica (Sharma *et al.*, 2016). Los genes asociados a la formación de *biofilm* en *E. coli* O157:H7 se encuentran reportados en la **Tabla 1**.

Después de que las células de *E. coli* O157:H7 se adhieren firmemente a la superficie, comienzan a agregarse a través de la interacción célula-célula; siendo los autotransportadores (para la interacción célula-célula) y los EPS (para la formación de la matriz) indispensables en la formación del *biofilm* (Achinas, Charalampogiannis and Euverink, 2019). El mecanismo de QS y los genes de resistencia al estrés juegan un rol fundamental en la constitución del *biofilm* maduro. El desprendimiento de las bacterias y su dispersión permiten la transmisión de la bacteria a un estado planctónico y su posterior colonización en un sitio diferente para dar origen a otro *biofilm*. El desprendimiento bacteriano puede ocurrir como resultado de la degradación enzimática de la matriz del *biofilm* y el bloqueo del QS como respuesta a cambios en el ambiente relacionados con los niveles de nutrición y el agotamiento de oxígeno por causas externas (Flemming *et al.*, 2016).

**Tabla 1**

*Genes involucrados en la formación y desarrollo del biofilm en E. coli O157:H7 (Sharma et al., 2016)*

<b>Gen</b>	<b>Proteína codificada</b>	<b>Función</b>	<b>Localización</b>
<i>csgD</i>	Proteína reguladora de la transcripción del operón <i>CsgBAC</i> .	Regula la producción de fimbrias curli y regula positivamente la	Membrana interna de la célula

		formación de <i>biofilm</i> y la regulación del estrés.	
<i>hha</i>	Proteína moduladora de la expresión de hemolisina HHA	Reprime la transcripción de genes de fimbrias, disminuyendo la formación de <i>biofilm</i> .	Citoplasma
<i>bcsA</i>	Subunidad catalítica de la celulosa sintasa	Cataliza la formación de celulosa, componente extracelular para la protección mecánica y química de la célula.	Membrana interna de la célula, proteína de membrana multipasa
<i>pgaC</i>	Poli- $\beta$ - 1,6-N-acetil-D- glucosamina sintasa	Síntesis del polímero PGA, ayudante en la adhesión del <i>biofilm</i> .	Membrana interna de la célula, proteína de membrana multipasa.
<i>fimB</i>	Proteína reguladora FimB	La proteína FimB, que regula la producción de fimbrias Tipo I	Citoplasma

Otro microorganismo con la capacidad de formar *biofilm* sobre superficies bióticas y abióticas es *Salmonella* Enteritidis, lo cual indica una distribución ubicua en el medio ambiente, incluida su presencia en agua, suelo e incluso en tejidos vegetales (González *et al.*, 2018; Merino *et al.*, 2019). Diferentes investigaciones han confirmado la colonización y formación de *biofilm* en cepas de *Salmonella* sobre superficies tan heterogéneas como plástico (Čabarkapa *et al.*, 2015; Borges *et al.*, 2018), caucho (Ariafar, Buzrul and Akçelik, 2016), vidrio (Leite *et al.*, 2017), acero inoxidable (Čabarkapa *et al.*, 2015) e incluso cemento (Korsch *et al.*, 2014).

La matriz extracelular del *biofilm* formado por *Salmonella* Enteritidis se compone principalmente de fibras *curli*, celulosa, proteína asociada al *biofilm* (Bap), cápsula de antígeno O y ADN extracelular. Las fibras *curli* median la adhesión y la invasión a la célula huésped, y son potentes inductores de la respuesta inflamatoria. La celulosa es un importante exopolisacárido, normalmente sintetizado en los *biofilm* de *Salmonella*, la producción de celulosa y fibras *curli* conduce a una matriz de células compactas envueltas en una red hidrófoba. En *Salmonella* Enteritidis, Bap es una proteína de superficie celular necesaria para la formación de *biofilm*, está codificada por el gen *bapA*, la expresión de este gen está coordinado con la de los genes que codifican las fibras *curli* y la celulosa a través de la acción del gen de la subunidad *curli* D (*csgD*). *Salmonella* Enteritidis produce una cápsula de antígeno O corregulada con la matriz extracelular asociada a fimbrias y celulosa. Aunque la cápsula del antígeno O no parece ser importante para el comportamiento multicelular, presenta un papel relevante en la adhesión y la persistencia ambiental (MacKenzie *et al.*, 2017).

La formación de *biofilm* en *Salmonella* Enteritidis se encuentra regulada principalmente por el gen regulador *csgD*, que activa la síntesis de la matriz polimérica extracelular ayudando a las células bacterianas en la transición del estado planctónico al estado multicelular (Liu *et al.*, 2014). Otra molécula relevante en la regulación del *biofilm* es el c-di-GMP cíclico, segundo mensajero bacteriano ubicuo y regulador clave en el paso de vida móvil a un estado sésil de *biofilm*. Los altos niveles intracelulares de c-di-GMP cíclico promueven la producción de la matriz extracelular para posteriormente formar el *biofilm* y, al mismo tiempo reprimir la motilidad; mientras que la disminución en los niveles de c-di-GMP cíclico se han asociado con la supresión de la matriz y la activación de la motilidad unicelular (Valentini and Filloux, 2016).

## 1.2. *Quorum Sensing*

El QS es un proceso de comunicación bacteriana célula-célula que se basa en la producción, secreción y detección de señales químicas llamadas autoinductores (AIs) para regular la expresión génica en respuesta a cambios en la densidad celular (Bettenworth *et al.*, 2019; Kalia *et al.*, 2019). El QS les permite a las bacterias comportarse como un grupo cohesivo y coordinar comportamientos colectivos, entre los cuales se destacan la formación de *biofilms*, luminiscencia, producción de antibióticos, expresión de factores de virulencia, producción de pigmentos y motilidad (Haque *et al.*, 2018; Antonioli *et al.*, 2019; Shaaban, Elgaml y Habib, 2019).

Cuando se alcanza una concentración umbral de los autoinductores, se activan receptores en las células bacterianas; estas señales químicas son importantes para el establecimiento de la infección y se han relacionado con la transición a un estado patológico (Hawver, Jung y Ng, 2016; Zhang *et al.*, 2019).

Los autoinductores pueden ser de diferentes tipos, siendo las N-acil homoserina lactonas (AHL), las más importantes y ampliamente estudiadas. Las AHL son producidas por más de 70 especies de bacterias Gram negativas. Entre ellas, se destacan las relacionadas con enfermedades en el ser humano: *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Clostridium difficile*, *Burkholderia cepacia* y *Escherichia coli*. Las AHL difunden a través de la membrana celular y se enlazan con proteínas reguladoras dentro de la célula, presentan una

estructura cíclica altamente conservada debido a que tienen el mismo residuo homoserin lactona. No obstante, difieren en las cadenas laterales acilo y en la sustitución del C3, del grupo carbonilo o hidroxilo (Papenfort, Bassler y Chase, 2017).

Se han descubierto otras moléculas autoinducidas de bajo peso molecular como el ácido *cis*-11-metil-2-dodecanoico de *Xanthomonas campestris* (Ye *et al.*, 2020); la 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona de *Pseudomonas aeruginosa* (Lin *et al.*, 2018) y moléculas como la 2,5-dicetopiperazinas, asociadas con la comunicación interespecies de bacterias como *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. alcaligenes*, *Proteus mirabilis*, *Vibrio vulnificus* y *Citrobacter freundii* (Bridges and Bassler, 2019).

Las bacterias Gram positivas utilizan como moléculas de señalización pequeños péptidos modificados vía postraduccionales, llamados péptidos autoinducidos (AIP). Los AIP son a menudo elementos integrales de un sistema de transducción de señales de dos componentes de histidina quinasa (Haque *et al.*, 2018; Krzyżek, 2019). La secreción de los AIP se ve facilitada por un transportador de *cassette* de unión a ATP (ABC) asociado a la membrana. A medida que aumenta la densidad de población, los AIP se acumulan en el medio ambiente. Cuando se alcanza un nivel umbral, la unión de un AIP a un receptor inicia la activación de la quinasa del receptor por fosforilación en un residuo de histidina conservado (Lixa *et al.*, 2015; Banerjee y Ray, 2017). La quinasa receptora activada transfiere el grupo fosforilo a un residuo de aspartato conservado del regulador de respuesta intracelular que, a su vez, se activará y permitirá que se lleve a cabo el QS (Ziemichód y Skotarczak, 2017). Según la especie, la nomenclatura del mecanismo de QS puede ser diferente, debido a los genes y receptores involucrados. Por ejemplo, las especies de estafilococos emplean el sistema de detección de quórum *agr*, mientras

las especies de estreptococos usan el sistema de detección de quórum *ComX* y las especies de bacilos utilizan el sistema *Rap* (Verbeke *et al.*, 2017).

### **1.3. Inhibición del *Quorum Sensing***

Como consecuencia de la creciente resistencia bacteriana a los fármacos, ha surgido la necesidad de desarrollar agentes antimicrobianos que actúen sobre nuevos objetivos microbianos. La interrupción del QS se convierte en una alternativa para combatir la resistencia bacteriana. El proceso de QS puede ser interrumpido por alguno de los siguientes mecanismos: 1). Reducción en la actividad del receptor de la proteína AHL o de la enzima AHL sintasa; 2). Inhibición de la producción de moléculas señal del QS; 3). Degradación de la AHL; 4). Imitación de moléculas señal usando compuestos sintéticos como análogos de moléculas señal (Haque *et al.*, 2018; Gutiérrez-Pacheco *et al.*, 2019; Shaaban, Elgaml y Habib, 2019; Machado *et al.*, 2020; Paluch *et al.*, 2020).

Los inhibidores del QS pueden ser naturales o sintéticos; entre las principales ventajas de utilizar inhibidores del QS se encuentra el impacto mínimo sobre la microbiota comensal, inactivación rápida del objetivo, posibilidad de suplementación con antibióticos para incrementar la eficiencia, bloqueo de secreción de factores de virulencia y menor presión selectiva que los antibióticos. Lo anterior es debido a que el bloqueo de un factor de virulencia no afecta el crecimiento del microorganismo, y por tanto, no se favorece la evolución de resistencia bacteriana (Dickey, Cheung y Otto, 2017; Santhakumari y Ravi, 2019).

Para la selección de inhibidores del QS eficaces se ha propuesto que ellos deben cumplir mínimo los siguientes criterios: 1). Moléculas pequeñas con capacidad para reducir eficientemente la expresión de genes que regulan el QS; 2). Moléculas altamente específicas sobre un regulador del QS que no produzcan ningún efecto adverso en la bacteria o el hospedero; 3). Moléculas químicamente estables y resistentes a la degradación por los diferentes sistemas metabólicos del hospedero; 4). Moléculas que sean preferiblemente de mayor longitud que la del AHL (Asfour, 2018).

La búsqueda continua de nuevos agentes antimicrobianos se ha centrado en el uso de derivados de plantas como inhibidores del QS, debido a la similitud de su estructura con la de las señales de QS (AHL) y también a su capacidad para degradar los receptores de señal (Alibi, 2020). El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) producido por las plantas, actúa como un promotor de la degradación de moléculas de señalización AHL, y atenua el proceso infeccioso dependiente de QS (Nazzaro *et al.*, 2013; Dessaux y Faure, 2018). Otros compuestos de origen vegetal son los flavonoides, que exhiben actividad antioxidante, anti-inflamatoria y anticancerígena. Teniendo en cuenta los beneficios de los flavonoides, se ha evaluado el potencial de la naringenina, quercetina y apigenina; que han sido capaces de inhibir a HAI-1 o AI-2 mediado por bioluminiscencia en *Vibrio harveyi* BB886 y MM32 (Martín-Rodríguez *et al.*, 2015). Cabe mencionar que, aunque varios autores han demostrado la actividad antimicrobiana de diferentes derivados de plantas, aún no se han dilucidado completamente los mecanismos específicos de su acción.

#### 1.4. Compuestos de plantas medicinales con efecto antimicrobiano

Las plantas producen una gran diversidad de metabolitos secundarios con una función de protección contra predadores y patógenos microbianos. Algunos de estos metabolitos están también involucrados en mecanismos de defensa contra estrés abiótico (e.g, exposición a UV-B) en la interacción de las plantas con otros organismos (e.g, Atracción de polinizadores) (Khan *et al.*, 2013; Barbieri *et al.*, 2017; Othman, Sleiman y Abdel-Massih, 2019). Se piensa que 100 mil metabolitos secundarios han sido descubiertos en las plantas, la mayoría de ellos participan en sistemas de defensa química, que probablemente han aparecido como una respuesta de las plantas a interacciones con predadores durante millones de años de co-evolución (Mazid, Khan y Mohammad, 2011; Abdel lateif, Maghrabi y Eldeab, 2016; Mera, Falconí y Córdova, 2019).

Existen tres grupos principales de metabolitos secundarios: terpenos, fenilpropenoides y heterocompuestos con nitrógeno o azufre (Foroutan *et al.*, 2016). Entre los metabolitos secundarios, se conoce la composición de más 3000 AE, de los cuales, alrededor del 10% son comercialmente importantes y usados en la industria de fragancias (Kerekes *et al.*, 2015).

Los AE son aceites volátiles de mezclas complejas de metabolitos secundarios biosintetizados por plantas, son compuestos de bajo peso molecular, que incluyen terpenoides, compuestos aromáticos y alifáticos, formado a través de diferentes rutas biosintéticas (Shojaee-Aliabadi, Hosseini y Mirmoghtadaie, 2017; León-Méndez *et al.*, 2019; Rao, Chen y McClements, 2019).

La actividad antimicrobiana de los AE se atribuye principalmente a la presencia de fenilpropanoides, que son los componentes mayoritarios en la mayoría de AE extraídos de plantas medicinales (Imane *et al.*, 2020). Las interacciones entre diferentes compuestos pueden llevar a efectos antagonistas, aditivos o sinérgicos. Algunos estudios han demostrado que los AE tienen usualmente mayor actividad antibacteriana en comparación con la de la combinación de uno o varios componentes mayoritarios, lo que sugiere que los componentes minoritarios son críticos para la actividad sinérgica (Ouedrhiri *et al.*, 2017; Ayari *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2020).

La actividad antimicrobiana de los AE frente a bacterias patógenas ha sido ampliamente documentada (Sienkiewicz *et al.*, 2017; Houdkova *et al.*, 2018; Aleksic Sabo and Knezevic, 2019; Bouyahya *et al.*, 2019; Larrazabal-Fuentes *et al.*, 2019; Atif *et al.*, 2020; Esmael *et al.*, 2020; Snene *et al.*, 2020). En la **Tabla 2**, se resumen la información relacionada con la actividad antimicrobiana de diferentes AE frente a distintas bacterias de importancia clínica. El modo de acción específico de los AE aún no se ha dilucidado totalmente. Debido a lo anterior, se propone el uso de herramientas ómicas, i.e., la metabolómica, para conocer el efecto de los AE sobre el metabolismo bacteriano.

**Tabla 2**

*Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de distintos AE, frente a diferentes bacterias patógenas*

Aceite esencial	Microorganismo	CMI <sub>50</sub> , (mg/mL)	Referencia
<i>Archillea fragrantissima</i>	<i>S. aureus</i>	6.25	(S G Zeedan, 2014)
	<i>S. epidermidis</i>	12.5	
	<i>E. coli</i>	0.01	
<i>Origanum vulgare</i>	<i>E. coli</i>	1.6	(Martucci <i>et al.</i> , 2015)
	<i>S. aureus</i>	0.8	

<i>Lavandula officinalis</i>	<i>E. coli</i>	2	(Martucci <i>et al.</i> , 2015)
	<i>S. aureus</i>	1	
<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>E. coli</i>	10	(Figueroa-Lopez <i>et al.</i> , 2019)
	<i>S. aureus</i>	5	
<i>Camellia sinensis</i>	<i>E. coli</i>	160	(Figueroa-Lopez <i>et al.</i> , 2019)
	<i>S. aureus</i>	40	
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	<i>E. coli</i>	0.14	(Unlu <i>et al.</i> , 2010)
	<i>S. aureus</i>	0.56	
	<i>S. typhimurium</i>	0.56	
	<i>L. monocytogenes</i>	0.56	
<i>Psiadia arguta</i>	<i>S. aureus</i>	0.5	(Aumeeruddy-Elalfi, Gurib-Fakim y Mahomoodally, 2015)
	<i>E. faecalis</i>	8	
<i>Piper betle</i>	<i>S. aureus</i>	0.5	(Aumeeruddy-Elalfi, Gurib-Fakim y anMahomoodally, 2015)
	<i>P. vulgaris</i>	4	
	<i>K. pneumoniae</i>	4	
<i>Pimenta dioica</i>	<i>S. aureus</i>	1	(Aumeeruddy-Elalfi, Gurib-Fakim y Mahomoodally, 2015)
	<i>K. pneumoniae</i>	4	
	<i>E. faecalis</i>	2.5	
<i>Psiadia terebenthina</i>	<i>S. aureus</i>	0.5	(Aumeeruddy-Elalfi, Gurib-Fakim y Mahomoodally, 2015)
	<i>P. vulgaris</i>	8	
	<i>K. pneumoniae</i>	4	
<i>Foeniculum vulgare</i>	<i>E. coli</i>	1	(Al-Hadid, 2017)
	<i>S. aureus</i>	0.5	
	<i>S. typhi</i>	2	
<i>Daucus littoralis</i>	<i>E. coli</i>	40	(Yousefbeyk <i>et al.</i> , 2014)
	<i>S. aureus</i>	20	
	<i>C. albicans</i>	20	
<i>Ocimum basilicum</i>	<i>C. perfringens</i>	5	(Radaelli <i>et al.</i> , 2016)
<i>Pimpinella anisum</i>	<i>C. perfringens</i>	10	(Radaelli <i>et al.</i> , 2016)
<i>Origanum majorana</i>	<i>C. perfringens</i>	5	(Radaelli <i>et al.</i> , 2016)
<i>Thymus vulgaris</i>	<i>E. coli</i>	0.32	(Boskovic <i>et al.</i> , 2015)
	<i>S. Enteritidis</i>	0.32	
	<i>S. Typhimurium</i>	0.32	
<i>Eucaliptus globulus</i>	<i>E. coli</i>	32	(Luís <i>et al.</i> , 2016)
	<i>P. aeruginosa</i>	32	
	<i>K. pneumoniae</i>	16	
<i>Eucaliptus radiata</i>	<i>E. coli</i>	16	(Luís <i>et al.</i> , 2016)

	<i>K. pneumoniae</i>	16	
<i>Cuminum cyminum</i>	<i>B. subtilis</i>	1	(Hyldgaard, Mygind and Meyer, 2012)
<i>Ocimum gratissimum</i>	<i>E. coli</i>	6	(Hyldgaard, Mygind and Meyer, 2012)
	<i>S. aureus</i>	0.75	
<i>Origanum heracleoticum</i>	<i>S. Enteritidis</i>	0.078	(Čabarkapa <i>et al.</i> , 2019)
<i>Thymus serpyllum</i>	<i>S. Enteritidis</i>	0.31	(Čabarkapa <i>et al.</i> , 2019)
<i>Citrus paradisi</i>	<i>E. coli</i>	3.2	(Thielmann, Muranyi and Kazman, 2019)
	<i>S. aureus</i>	0.8	
<i>Laurus nobilis</i>	<i>E. coli</i>	0.8	(Thielmann, Muranyi and Kazman, 2019)
	<i>S. aureus</i>	0.8	
<i>Origanum majorana</i>	<i>E. coli</i>	0.8	(Thielmann, Muranyi and Kazman, 2019)
	<i>S. aureus</i>	0.4	
<i>Zingiber officinale</i>	<i>E. coli</i>	1.6	(Thielmann, Muranyi and Kazman, 2019)
	<i>S. aureus</i>	0.8	
<i>Nigella sativa</i>	<i>E. coli</i>	12.8	(Bereksi <i>et al.</i> , 2018)
	<i>S. aureus</i>	6.4	
	<i>P. aeruginosa</i>	12.8	
<i>Punica granatum</i>	<i>E. coli</i>	3.2	(Bereksi <i>et al.</i> , 2018)
	<i>S. aureus</i>	0.1	
	<i>P. aeruginosa</i>	6.4	
<i>Berberis vulgaris</i>	<i>E. coli</i>	6.4	(Bereksi <i>et al.</i> , 2018)
	<i>S. aureus</i>	0.4	
	<i>P. aeruginosa</i>	6.4	
<i>Salvia macrosiphon</i>	<i>S. aureus</i>	2,5	(Kariminik <i>et al.</i> , 2019)
	<i>L. monocytogenes</i>	5	
	<i>S. enterica</i>	5	
<i>Dracocephalum polychaetum</i>	<i>S. aureus</i>	5	(Kariminik <i>et al.</i> , 2019)
	<i>B. cereus</i>	0,6	
	<i>L. monocytogenes</i>	10	
	<i>S. enterica</i>	5	
<i>Origanum vulgare</i>	<i>S. aureus</i>	0.15	(Kariminik <i>et al.</i> , 2019)
	<i>B. cereus</i>	0.3	
	<i>L. monocytogenes</i>	0.3	
	<i>S. enterica</i>	0.6	
<i>Anethum graveolans</i>	<i>E. coli</i>	1.25	(Derakhshan, Navidinia y Ahmadi, 2018)
	<i>S. aureus</i>	0.62	
	<i>P. aeruginosa</i>	1.5	
	<i>V. cholerae</i>	0.7	

<i>Dalbergia pinnata</i>	<i>S. aureus</i>	0.78	(Zhou <i>et al.</i> , 2020)
	<i>S. pyogenes</i>	6.25	
	<i>C. albicans</i>	12.5	
<i>Cymbopogon shoenanthus</i>	<i>S. aureus</i>	1	(Bellik <i>et al.</i> , 2019)
	<i>L. monocytogenes</i>	10	
	<i>K. pneumoniae</i>	20	
<i>Satureja montana</i>	<i>E. coli</i>	0.22	(Santos <i>et al.</i> , 2019)
	<i>S. aureus</i>	0.15	
	<i>S. enterica</i>	0.25	
<i>Origanum compactum</i>	<i>P. amylolyticus</i>	0.62	(Ayari <i>et al.</i> , 2020)
	<i>B. cereus</i>	1.25	
<i>Citrus reticulata</i>	<i>P. amylolyticus</i>	5	(Ayari <i>et al.</i> , 2020)
	<i>B. cereus</i>	2.5	

### 1.5. Análisis metabolómico

En la microbiología moderna, la comprensión de los mecanismos de patogenicidad, virulencia y comunicación microbiana representan una oportunidad para desarrollar nuevos métodos para el tratamiento y diagnóstico de enfermedades. La interacción patógeno-hospedero es compleja, ya que intervienen múltiples genes y proteínas que permiten la invasión e inciden en la infección específica en el huésped. Los enfoques “ómicos” proveen una visión global de la expresión génica y metabolómica para comprender la patogénesis bacteriana (Khan *et al.*, 2019).

La metabolómica aborda los enfoques analíticos y la evaluación de datos para obtener información sobre un sistema biológico (Cambeiro-Pérez *et al.*, 2018; Jacyna, Kordalewska y Markuszewski, 2019); se puede considerar como el análisis cualitativo y cuantitativo de todos los metabolitos de bajo peso molecular (>400 Da) tanto intracelulares como extracelulares (D’Alvise *et al.*, 2014). A pesar de que los metabolitos primarios son importantes para la vida celular, también existe una amplia variedad de metabolitos secundarios. Por ejemplo, *S. cerevisiae* produce alrededor de 1000 metabolitos secundarios (Meinert *et al.*, 2013; Walker and Stewart,

2016; Krause *et al.*, 2018) o hasta 200.000 en plantas (Knee *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2018; Isah, 2019).

El metabolismo se puede dividir en diferentes rutas, entre las cuales se destacan el metabolismo de carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, xenobióticos, cofactores, vitaminas y síntesis de metabolitos secundarios. El análisis metabolómico permite estudiar los cambios en la abundancia de los metabolitos y relacionarlos con las rutas metabólicas correspondientes. Los metabolitos, a su vez, están directamente asociados con la actividad metabólica celular y sus productos finales pueden ser responsables de la patogenicidad y la enfermedad (Vincent *et al.*, 2016; Stokes *et al.*, 2019).

El análisis metabolómico es importante en el estudio de los microorganismos, debido a que los cambios en el metabolismo se pueden asociar con la virulencia y patogenicidad de un organismo (Mielko *et al.*, 2019). La estrategia analítica de la metabolómica puede ser dividida en dirigida y no dirigida. La metabolómica dirigida se emplea para apuntar a una ruta específica dentro de un sistema, limitándose a analizar un conjunto predeterminado de metabolitos, también, es utilizada para validar rutas biológicas concretas o confirmar metabolitos seleccionados en un estudio no dirigido (Nalbantoglu, 2019); la metabolómica no dirigida analiza los efectos químicos en la red de procesos metabólicos que permiten un conocimiento profundo y una comprensión mayor de las respuestas biológicas en una sola célula; además, proporciona datos cualitativos que permiten detectar metabolitos previamente desconocidos, su objetivo es medir cada metabolito presente; es importante mencionar que se encuentra limitada por los métodos de preparación de muestras, derivación y los equipos analíticos utilizados (Zampieri *et al.*, 2017; Cambeiro-Pérez *et al.*, 2018; Figueroa-Lopez *et al.*, 2019).

## 1.6. Metabolómica microbiana

Diferentes trabajos de investigación (Torres *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2019; Wong *et al.*, 2018; Lu *et al.*, 2019) han mostrado la aplicación de técnicas metabolómicas en el estudio del metabolismo celular bacteriano. Se destaca el estudio realizado por Torres y colaboradores en 2019, en el que, a partir de un estudio proteómico y metabolómico, los autores demostraron que una variante de colonia pequeña de *Staphylococcus aureus* (SCV), tenía la capacidad de resistir la acción del AE de árbol de té. En la de investigación Torres *et al.*, 2019, se logró explicar como el incremento en la concentración de aminoácidos en SCV representaba una fuente de carbono y energía que podía mantener el flujo de carbono a través del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) y, de esta manera, logró resistir el daño ocasionado a nivel de la glucólisis y de la enzima piruvato deshidrogenasa (Torres *et al.*, 2019).

En otro estudio, Zhou y colaboradores en 2019 realizaron un análisis metabolómico utilizando resonancia magnética de protones (PMR) para determinar los cambios globales de metabolitos en *Pseudomonas aeruginosa* PA01, después de su exposición a la hordenina, un inhibidor del QS. En la investigación, se identificaron 40 metabolitos que permitieron inferir que la hordenina alteraba los componentes y la permeabilidad de la membrana, disminuyendo el metabolismo energético y alterando el metabolismo de aminoácidos y nucleótidos, lo que finalmente atenuaba la patogenicidad de *P. aeruginosa* PA01 (Zhou *et al.*, 2019).

En los últimos años, se han llevado a cabo estudios metabolómicos para entender la

dinámica de formación del *biofilm* en los diferentes modelos bacterianos. Jian Wong *et al.*, en 2018, utilizando un enfoque metabolómico, analizaron las diferencias entre ocho cepas clínicas de *Helicobacter pylori* con respecto a su capacidad para formar *biofilm*; los resultados permitieron concluir que las cepas de *H. pylori* con menor capacidad para formar *biofilm* expresaban una mayor cantidad de metabolitos, y que las principales modificaciones en las cepas formadoras de *biofilm* se relacionaron con lípidos de membrana y metabolismo de prostaglandinas y folatos (Wong *et al.*, 2018). Haitao Lu *et al.*, en 2019, compararon mediante análisis metabolómico dirigido y no dirigido el comportamiento en estado planctónico y sésil de una cepa clínica de *E coli* uropatógena (UTI89), agente etiológico predominante de infecciones en el tracto urinario. En su investigación los autores determinaron 38 metabolitos diferenciales y asociaron los cambios en la formación del *biofilm* con el metabolismo de glicerolípidos, aminoácidos y carbohidratos (Lu *et al.*, 2019).

## **2. Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de diferentes aceites esenciales de plantas aromáticas en cultivos planctónicos de *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella entérica* Ser Enteritidis**

### **2.1. Introducción**

El incremento de la resistencia de las bacterias frente a los antibióticos convencionales ha suscitado una gran preocupación en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Diversos estudios se han dirigido a encontrar alternativas para combatir este fenómeno. Diferentes AE obtenidos de plantas vegetales, presentan actividad antibacteriana (Basavegowda, Patra y Baek, 2020;). Los AE constituyen sustancias volátiles obtenidas a partir de diferentes partes de la planta: flores, tallos, brotes, semillas, hojas, raíces, frutos, madera y corteza (Stashenko, Rui and Salgar, 2010). Los AE son producidos por la planta como metabolitos secundarios y se han relacionado con actividad antibacteriana, antifúngica y antiviral, asociados principalmente a la presencia de terpenos fenoles y aldehídos en su composición química (Raut and Karuppayil, 2014; Swamy, Akhtar and Sinniah, 2016). Además, se ha demostrado que los AE presentan actividades antioxidantes, insecticidas y repelentes (Ainane *et al.*, 2019).

La actividad antibacteriana de los AE varía según el tipo de bacteria y la composición del AE. En general, las bacterias Gram positivas presentan mayor susceptibilidad a compuestos antimicrobianos de los AE, en comparación con la de las bacterias Gram negativas; lo que se ha asociado a la falta de membrana externa en las bacterias Gram positivas (Shojaee 2017).

Se ha documentado que la actividad biológica de los AE se debe a altas concentraciones de ciertos compuestos químicos, pero también a las interacciones complejas entre todos los componentes del AE, lo que indica un posible efecto aditivo o sinérgico entre los constituyentes (Ferreira *et al.*, 2018). La potencia antimicrobiana de los AE se puede mejorar en combinación con otros agentes antimicrobianos. Se ha demostrado (Miladi *et al.*, 2017) que los AE con diferentes tipos de terpenoides pueden interactuar de tal manera que aumentan o reducen su efectividad antimicrobiana, generando cuatro posibles efectos: indiferente, aditivo, antagónico y sinérgico. El efecto de la interacción entre los compuestos antimicrobianos a menudo se expresa como Concentración Inhibitoria Fraccionaria (CIF), la cual se calcula en función de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$CIF_A = CMI_{A+B} / CMI_A$$

$$CIF_B = CMI_{B+A} / CMI_B$$

$$CIF \text{ (ÍNDICE)} = CIF_A + CIF_B$$

Donde A= Antimicrobiano A y B= Antimicrobiano B. El valor del índice de la CIF se interpreta teóricamente con un punto de corte de 1, de tal manera que valores cercanos a 1 indican un efecto aditivo, mientras valores por debajo y por encima de 1 corresponden a efectos sinérgicos y antagónicos, respectivamente. Sin embargo, la mayoría de las referencias utiliza un sistema común que interpreta los efectos de la siguiente manera:  $CIF \leq 0.5$  = sinérgico;  $CIF 0.5 - 4$  = aditivo y  $CIF \geq 4$  = antagónico (Hyldgaard 2012, Sanchez 2011, Xuejie xu 2018, Shang 2019).

Los mecanismos de acción de los efectos antimicrobianos de los AE han sido investigados desde la perspectiva de las interacciones entre el AE y las diferentes dianas de los microorganismos evaluados. Aunque los mecanismos de acción no se comprenden completamente, se han reportado los efectos antibacterianos de los componentes mayoritarios de los AE. Se ha sugerido que los AE inhalados o aplicados en la piel, actúan a través de sus fracciones lipofílicas con los restos lipídicos de las membranas celulares y, por lo tanto, modifican la actividad de los canales de iones de calcio y potasio (Saad, 2013). Aplicados a una dosis determinada, los AE saturan las membranas, interactúan con las membranas celulares dependiendo de la estructura y propiedades fisicoquímicas de los componentes, alteran sistemas de transporte, enzimas y receptores celulares (Wibowo, 2020). Entre los efectos, también, se destacan cambios en la composición de los ácidos grasos de la membrana, disolución de canales en la bicapa de fosfolípidos, interferencia en la captación de glucosa e inhibición de la actividad enzimática bacteriana (Tae Jin Cho, 2020).

Se ha determinado que la actividad depende de la concentración de AE y sus componentes; en este contexto, una propiedad característica del grupo hidroxilo encontrado en la estructura del fenol, es su acidez. La presencia del grupo OH<sup>-</sup> en el anillo bencénico tiene un efecto significativamente mayor en comparación con el del hidroxilo presente en una cadena alifática. En el caso del carvacrol, fenol con actividad antimicrobiana, se ha sugerido que éste actúa como un transportador de membrana de cationes monovalente, intercambiando su protón del grupo hidroxilo con otro ion como el K<sup>+</sup>; el carvacrol no disociado (protonado) se difunde a través de la membrana citoplasmática hacia el citoplasma donde se disocia liberando su protón. Lo anterior, se basa en el flujo de salida de K<sup>+</sup> y la afluencia de H<sup>+</sup> observada en *Bacillus*

*cereus*, expuesto al carvacrol (Ultee 2002, Saad 2013).

Componentes como el cimeno no presentan las propiedades del carvacrol debido a que carecen del grupo hidroxilo; para este compuesto se ha observado que una gran acumulación de cimeno en la membrana puede provocar una expansión de la membrana que conduce a una difusión pasiva de iones entre los fosfolípidos expandidos. Sin embargo, la presencia del grupo fenólico parece ser más relevante para la actividad antimicrobiana que la expansión de la membrana y por lo tanto, su desestabilización; lo anterior ha sido confirmado con los resultados obtenidos con el mentol, el timol y el carvacrol.

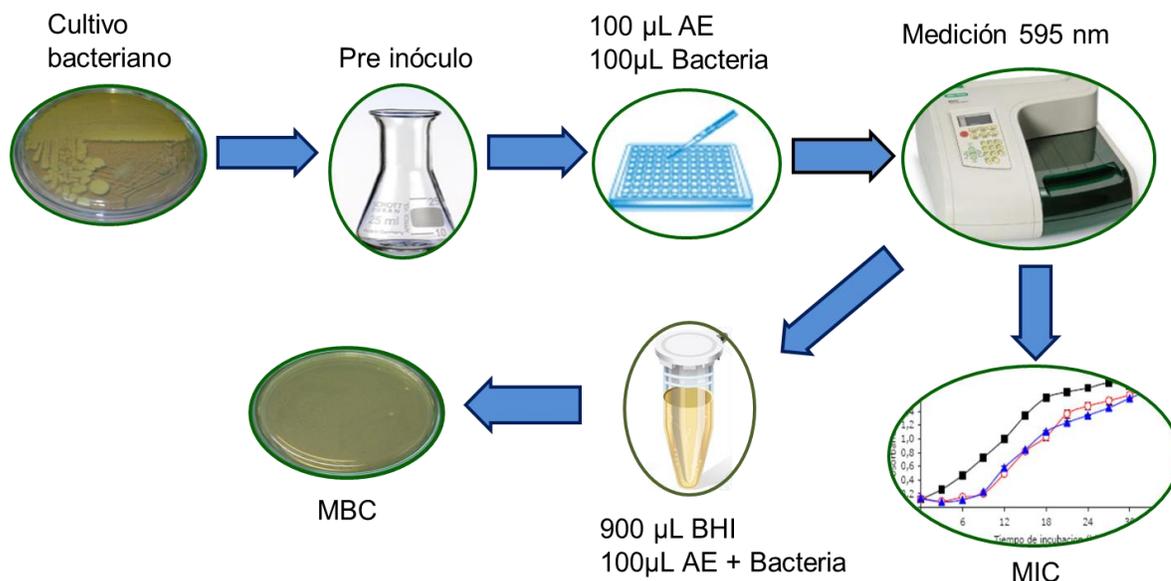
En el presente trabajo de investigación, se ha evaluado la actividad antimicrobiana de 17 AE contra las bacterias patógenas *E. coli* O157:H7 y *S. enterica* Ser Enteritidis ATCC 13076; los resultados obtenidos evidenciaron que los AE con mayor contenido de compuestos fenólicos como carvacrol y timol presentaron la mayor actividad antibacteriana.

## **2.2. Materiales y métodos**

Para realizar la evaluación de la actividad antibacteriana *In vitro* de diferentes AE de plantas aromáticas, en cultivos planctónicos de *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella entérica* Ser Enteritidis, se llevó a cabo la metodología que se describe en el siguiente esquema (véase **Figura 2**).

**Figura 2**

*Metodología para la determinación de la actividad antimicrobiana de los AE frente a las bacterias E. coli O157:H7 y S. Enteritidis ATCC 13076*



### 2.2.1. Materiales

En este estudio, se probaron 17 AE (**Tabla 3**) que fueron extraídos y caracterizados en el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales (CENIVAM), de la Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga, Colombia). La caracterización taxonómica de las plantas se realizó en el Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá, Colombia).

Los AE extraídos de las especies vegetales *Lippia alba*, Quimiotipo carvona; *L. alba*, Quimiotipo citral, *L. organoides*, Quimiotipo timol-carvacrol I, *L. organoides*, Quimiotipo

timol-carvacrol II y *L. origanoides*, Quimiotipo felandreno, se encuentran contemplados en el Contrato N°101 de acceso a recursos genéticos y productos derivados para investigación científica con fines de prospección biológica del Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible y CENIVAM, debido a que son especies vegetales nativas. El material vegetal y sus productos derivados pertenecen al Estado Colombiano, y su uso se regula a través a través del Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible.

Las demás especies vegetales utilizadas en este trabajo no requieren permiso de recolección, ni contrato de acceso a productos derivados debido a que son especies vegetales introducidas cultivadas en el Departamento de Santander, Colombia.

En relación con las bacterias estudiadas, la cepa de *E. coli* O157:H7 fue donada por el cepario de la Universidad Pontificia Javeriana de Colombia; *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 fue adquirida comercialmente con el proveedor Labcare; y *Chromobacterium violaceum* CV026, fue donada por el Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad de Santander.

Los medios de cultivo Luria Bertani (LB), Infusión Cerebro Corazón (BHI), peptona y agar bacteriológico fueron obtenidos de Oxoid (Hampshire, UK). El Dimetilsulfóxido (DMSO) utilizado como disolvente fue grado HPLC y adquirido en Merck (Darmstadt, Alemania). Las microplacas de 96 pozos de polipropileno de fondo plano con tapa fueron marca Biologix.

Todas las reacciones y ensayos de actividad antimicrobiana fueron realizados empleando agua MilliQ de resistividad 18.2  $\Omega$ , extraída del equipo de laboratorio Smart2 Pure de Thermo Scientific (Helsinki, Finlandia).

### **2.2.2. Obtención de aceites esenciales**

La extracción de los 17 AE se realizó en el CENIVAM, mediante hidrodestilación asistida por radiación de microondas en un equipo de destilación tipo *Clavenger* (Stashenko, Rui y Salgar, 2010). Todas las extracciones se hicieron por triplicado.

### **2.2.3. Análisis de aceites esenciales por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas**

El análisis de las muestras de aceites esenciales fue realizado en el CENIVAM. Las muestras se analizaron en un equipo *Agilent Technologies AT6890N Series Network System* (Palo Alto, California, EE.UU), acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5975 Inert XL*.

Los componentes de los AE 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 C<sub>9</sub>-C<sub>25</sub> (Sigma-Aldrich, Milwaukee, Wisconsin, EE. UU.) y comparados con los de diferentes bases de espectros de masas (Davies, Hons and Davies, 1993; Babushok, Linstrom y Zenkevich, 2011).

#### **2.2.4. Determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de aceites esenciales frente a *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* entérica Ser Enteritidis**

La determinación de la actividad antimicrobiana se llevó a cabo mediante pruebas de inhibición de crecimiento bacteriano, determinando la CMI y la CMB, utilizando como modelos de estudio las bacterias *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076.

Para determinar el efecto antimicrobiano de los AE se empleó el método de microdilución en caldo, estandarizado en el laboratorio (Cruz *et al.*, 2014). La estimación de los valores de CMI se realizó utilizando placas de 96 pozos de polipropileno y fondo plano; para evaluar la actividad frente a *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* Enteritidis se preparó un preinóculo de cada una de las bacterias en caldo LB durante 12 h a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una concentración bacteriana entre  $10^5$  y  $10^6$  UFC/mL. Posteriormente, se hizo el seguimiento de la cinética de crecimiento, empleando 100  $\mu$ L de este inóculo bacteriano y se dejó crecer durante 12 h, en las microplacas que previamente contenían diluciones seriadas de los AE disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO). Las concentraciones de AE probadas se encontraban entre 0.18 y 3 mg/mL; las placas se mantuvieron a 37 °C y una agitación de 200 rpm. Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro con lector de microplaca ELISA (Biorad, Imarck, California, EE.UU), utilizando una longitud de onda de 595 nm. La CMI se definió como la menor concentración de AE a la cual se produce una inhibición en el crecimiento de la bacteria. El valor CMI<sub>50</sub>, corresponde a las dosis que inhibe el 50% del crecimiento bacteriano.

Posterior a la cinética de crecimiento, se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L de cada pozo de la microplaca y se adicionó a tubos Eppendorf que contenían 900  $\mu$ L de medio BHI y se incubó a

37 °C durante 24 h. Luego, 10 µL de cada tubo se sembraron en placas de agar BHI con el fin de corroborar el efecto bactericida, el cual se evidenció en aquellas placas de agar BHI donde no hubo crecimiento de colonias bacterianas. El valor de la CMB se definió como la concentración para la cual el 100 % del crecimiento bacteriano fue inhibido en comparación con el control positivo de crecimiento de los microorganismos (sin tratamiento con los AE). Como control de inhibición bacteriana se utilizó el antibiótico ofloxacina (Merck, Darmstadt, Alemania).

### 2.3. Resultados y discusión

Se probaron 17 AE, previamente caracterizados en el CENIVAM. Se destacaron cinco AE que provienen de las siguientes especies vegetales nativas: *Lippia alba*, quimiotipo carvona, *L. alba*, quimiotipo citral, *L. origanoides*, quimiotipo felandreno, *L. origanoides*, quimiotipo timol-carvacrol I y *L. origanoides*, quimiotipo timol-carvacrol II.

En los AE se identificaron los terpenoides timol, limoneno, geranial, carvona, 1,8-cineol y geraniol. Así mismo, otros compuestos como el *trans*- $\beta$ -cariofileno (sesquiterpeno); estragol (fenilpropeno); y ésteres del ácido benzoico como el benzoato de bencilo también fueron detectados. En la **Tabla 3** se muestran los componentes mayoritarios de los AE evaluados.



<b>Butirato de linalilo</b>				9.90
<b>Acetato de terpenilo</b>				45.5
<b><i>cis</i>-Nerolidol</b>				3.10
<b>Limoneno</b>	29.0	3.90		57.5
<b><math>\beta</math>-Bourboneno</b>	2.40			
<b>Germacreno D</b>	12.2		15.4	
<b>Carvona</b>	31.3			
<b>Piperitenona</b>	1.50			
<b>Neral</b>	15.4	24.5		
<b>Geranial</b>	18.9	33.0		
<b>Citronelal</b>		11.6		
<b>2,6-Dimetil-2,6 octadieno</b>		6.10		
<b><math>\beta</math>-Citronelol</b>		16.9		
<b><math>\alpha</math>-Felandreno</b>			5.70	
<b><math>\alpha</math>-Humuleno</b>			6.20	9.80
<b><math>\alpha</math>-Pino</b>			12.7	2.60
<b>Canfeno</b>			7.70	
<b>Alcanfor</b>			14.8	8.50

<i>trans</i> - <b>Tujona</b>	20.4
<i>cis</i> - <b>Tujona</b>	5.80
<b>Germacreno B</b>	10.8
<i>trans</i> - <b>Nerolidol</b>	24.0
<b>1-Iso-4-metil 1- ciclohexano</b>	24.4
<b>Pulegona</b>	11.1
<i>cis</i> - <b>Pulegol</b>	7.10
<b>Benzoato de metilo</b>	3.70
<b>Acetato de bencilo</b>	10.3
<i>cis</i> - <b>acetato de cinnamilo</b>	5.40
<b>Benzoato de bencilo</b>	20.8
<b>Octanol</b>	2.10
<b>4-Terpineol</b>	1.70
<b>Valenceno</b>	1.60

LACA: *Lippia alba*, Quimiotipo carvona, LACI: *L. alba*, Quimiotipo citral, CN: *Cymbopogon nardus*, CM: *C. martini*, CF: *C. flexuosus*, LTC I: *L. origanoides*, Quimiotipo timol-carvacrol I, LTC II: *L. origanoides*, Quimiotipo timol-carvacrol II, LOF: *L. origanoides*, Quimiotipo felandreno, RO: *Rosmarinus officinalis*, SO: *Salvia officinalis*, SG: *Swinglea glutinosa*, TL: *Tagetes lucida*, TV: *Thymus vulgaris*, SV: *Satureja viminea*, CO: *Cananga odorata*, EC: *Elettaria cardamomum*, CS: *Citrus sinensis*.

*Lippia alba*, es una planta perteneciente a la familia de las Verbenáceas y presenta diferentes quimiotipos reportados en la literatura (Brigadeiro *et al.*, 2005; Lorenzo *et al.*, 2001; A.C. *et al.*, 2009); cada quimiotipo le confiere variadas actividades biológicas dependiendo de su composición química.

Brigadeiro *et al.*, en el año 2005, determinó tres quimiotipos de *L. alba* en diferentes zonas de Brasil, las cuales fueron clasificadas como I (citral), II (carvona) y III (linalol). Al comparar la composición química de la *L. alba*, quimiotipo citral reportada por Brigadeiro *et al.*, con la *L. alba*, quimiotipo citral, obtenida en el CENIVAM, se determinó que los dos componentes mayoritarios son iguales. Sin embargo, presentan diferentes concentraciones: geranial (33.9%) y neral (25.8%) en el estudio realizado por Brigadeiro *et al.*; mientras que para el quimiotipo estudiado en el CENIVAM, la cantidad relativa de geranial y neral fue de 18.9 y 15.4%, respectivamente. Lo anterior evidencia como una misma planta y un mismo quimiotipo puede presentar variaciones en su composición, dependiendo de las condiciones de cultivo, la zona geográfica, la edad y la genética de la planta, entre otros. Con respecto a *L. alba*, quimiotipo carvona, también se presentaron diferencias en los porcentajes de cantidad relativa

cuantificados en el estudio de Brigadeiro *et al.*, (carvona, 52.8% y limoneno, 16.98%) comparados con los determinados en este estudio (carvona, 31.3% y limoneno, 29%). Los diferentes quimiotipos de *L. alba* han sido estudiados también en Uruguay (Lorenzo *et al.*, 2001; A.C. *et al.*, 2009).

El AE de *Cymbopogon nardus*, contiene como componente mayoritario al geraniol (17.8%), el cual difiere del componente mayoritario para este aceite mostrado en otros estudios de la literatura. Saputra *et al.*, en 2020 reportó el carbamato de amonio (18.2%) como el componente mayoritario de *C. nardus*, mientras Wei *et al.*, encontró el citronelal (29.6%), al igual que Toledo *et al.*, (27.87%); es importante mencionar que en los tres estudios mencionados anteriormente también se demostraron diferentes valores de actividad antibacteriana, antifúngica, insecticida y repelente, lo cual evidencia cómo la diversidad de componentes y su contenido influyen en la actividad biológica del AE (Wei y Wee, 2013; De Toledo *et al.*, 2016; Saputra *et al.*, 2020).

En el caso del geraniol, un monoterpeno caracterizado por ser el componente mayoritario del AE de *C. martini*, conocido comúnmente como palmarrosa. Ha sido bastante estudiado por su amplio espectro de actividad antifúngica y antibacteriana (De Oliveira Pereira *et al.*, 2015; Ternus ZR, 2015); en este estudio, en el AE de *C. martini* se encontró 38.7% de geraniol, lo cual es similar a lo reportado por otros autores (Pinzón-Torres *et al.*, 2014; Gameda *et al.*, 2018).

El AE extraído de la planta aromática *C. flexuosus*, comúnmente llamada limoncillo, exhibió un 57.5% de citral (geranial y neral), siendo equivalente a lo reportado en los estudios de Han *et al* en 2017 y Adukwu *et al* en 2016; estos autores demostraron actividad antiinflamatoria,

antifúngica y antibacteriana en este AE. Actividad biológica que se debe principalmente al alto contenido de citral (Adukwu *et al.*, 2016; Han y Parker, 2017).

Otro AE ampliamente documentado en la literatura es el extraído de la planta aromática perteneciente a la familia de las Verbenáceas, *Lippia origanoides*, conocido también como “orégano de monte”, el cual es caracterizado por tener un contenido relativamente alto de AE en la planta (Sartoratto *et al.*, 2004). En Colombia, la presencia de *L. origanoides* ha sido documentada en áreas semiáridas de los departamentos de Santander y Boyacá, especialmente, en el cañón interandino del río Chicamocha, y también en Magdalena, Cauca y Nariño (Suárez G, Castillo y Chacón S, 2008; Stashenko, Rui y Salgar, 2010). Entre los principales componentes del AE de *L. origanoides* se destaca la presencia de timol, carvacrol y  $\rho$ -Cimeno a los cuales se les ha atribuido actividad antibacteriana, antifúngica, antiprotozoica, antigenotóxica y antioxidante (Escobar *et al.*, 2010; Vicuña, Stashenko y Fuentes, 2010; Bueno y Coy, 2011; Acosta *et al.*, 2019).

En la literatura se han publicado cinco quimiotipos diferentes de *L. origanoides*, que presentan distintas composiciones, siendo el timol y carvacrol, los componentes mayoritarios. Dicha composición varía de cosecha a cosecha, dependiendo de las condiciones climáticas, la fertilización y otras variables agrícolas (Stashenko, Rui y Salgar, 2010; Ribeiro *et al.*, 2014; Da Silva *et al.*, 2017). En el presente estudio, se evaluaron dos AE de *L. origanoides* con similitudes en sus tres componentes mayoritarios: timol, carvacrol y *trans*- $\beta$ -cariofileno. Sin embargo, debido a diferencias en la cantidad relativa de sus componentes mayoritarias, se han clasificado como *L. origanoides*, quimiotipo timol-carvacrol I (LTC I) y *L. origanoides*, quimiotipo timol-

carvacrol II (LTC II). Esta clasificación ya ha sido documentada en la literatura en una publicación (Marlon *et al.*, 2020). realizada con base en esta investigación.

Además de los quimiotipos LTC I y LTC II, también, se caracterizó el AE de *L. origanoides*, quimiotipo felandreno, el cual presentó similitud en la composición química publicada en la literatura (Ríos, Stashenko y Duque, 2017). Los constituyentes de este quimiotipo fueron los siguientes: 1,8-cineol, *trans*- $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno,  $\alpha$ -felandreno y  $\rho$ -cimeno principalmente.

Entre los AE extraídos y caracterizados en el CENIVAM, también, se encuentra el extraído a partir de *Rosmarinus officinalis*, conocida popularmente como romero. Esta planta pertenece a la familia *Labiadas* y es nativa del Mediterráneo. Diferentes estudios farmacológicos han demostrado su potencial analgésico, antiinflamatorio y antioxidante (Corrêa Dias *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2012; Akbari *et al.*, 2015; Takayama *et al.*, 2016), asociado principalmente a sus altas concentraciones en 1,8-cineol (eucaliptol), alcanfor y  $\alpha$ -pineno; lo anterior tiene similitud con lo obtenido en este estudio en el cual estos tres componentes constituyen el 45% del AE de *R. officinalis*. Los compuestos mayoritarios encontrados en este AE fueron la tujona, alcanfor, 1,8-cineol y  $\alpha$ -humuleno, que alcanzaron un 49.8% del AE. Estos compuestos están presentes de forma mayoritaria en otra labiada denominada *Salvia officinalis*, la cual se ha caracterizado por su amplia variedad de actividades biológicas, que incluyen efectos anticancerígenos, antiinflamatorios, antinociceptivos, antioxidantes, antimicrobianos, antioxidantes, hipoglucemiantes, hipolipidémicos, e incluso mediante ensayos clínicos se ha comprobado su acción en el mejoramiento de la memoria (Shafiee-Nick *et al.*, 2012; Dianat *et al.*, 2014; Gomar, Hosseini and Mirazi, 2014; de Oliveira *et al.*, 2016; Hasanein, Felehgari and

Emamjomeh, 2016; Pedro *et al.*, 2016; Ghorbani y Esmailizadeh, 2017; El Euch *et al.*, 2019; Khiya *et al.*, 2019).

El AE obtenido de *Swinglea glutinosa* contenía alto contenido de *trans-β*-cariofileno, asociado con propiedades anticancerígenas y analgésicas (Fidyt *et al.*, 2016); junto con *trans*-nerolidol y germacreno. A estos dos compuestos se les atribuye la actividad insecticida y repelente del AE (Wang *et al.*, 2015; Chan *et al.*, 2016).

En el AE de *Tagetes lucida*, el principal componente fue el estragol, con una cantidad relativa de 79.9%, lo cual lo hace diferir de otras especies del género *Tagetes* tales como *T. minuta*, *T. erecta* y *T. patula* (Salehi *et al.*, 2018). La concentración de estragol puede incluso alcanzar un 97.3% del AE, como lo han reportado Marotti y colaboradores (Marotti *et al.*, 2004). La presencia de estragol se ha correlacionado con propiedades antimicrobianas (Andrade *et al.*, 2015).

Otro de los AE que hacen parte de este estudio es el de *Thymus vulgaris*, comúnmente conocido como tomillo, el cual se caracteriza por un alto contenido de timol, sin embargo, la cantidad relativa de timol del AE obtenido a partir de *T. vulgaris* en el CENIVAM es menor (23%) en comparación con lo reportado en otros estudios, como los de Al-asmari *et al.*, Nikolic *et al.*, Pavela *et al.*, y Matiz *et al.*, que obtuvieron cantidades relativas de timol de 38.7%, 49.1%, 60.2% y 63.4%, respectivamente (Nikolić *et al.*, 2014; Matiz, Fuentes and Méndez, 2015; Al-Asmari *et al.*, 2017; Pavela and Sedlák, 2018). El timol (2-isopropil-5-metilfenol) es el principal monoterpeno fenólico presente en los AE aislados de plantas pertenecientes a la familia Lamiaceae (géneros *Thymus*, *Monarda*, *Origanum* y *Ocimum*) (Licata *et al.*, 2015). Entre las actividades biológicas asociadas al uso del timol se encuentran principalmente propiedades

antioxidantes, analgésicas, antinociceptivas, antiinflamatorias, antifúngicas, antibacterianas, *antibiofilm* y anticancerígenas (Mendes *et al.*, 2010; Peixoto-Neves *et al.*, 2010; Jesus *et al.*, 2015). Es importante destacar, que la actividad del AE no depende únicamente del componente mayoritario (en este caso timol); por lo tanto, la mayor cantidad relativa no garantiza la mayor actividad biológica del AE.

En el AE obtenido de *Satureja viminea* de la familia Labiadas, se encontraron altas concentraciones de 1-Isopropenil-4-metil-1-ciclohexano y pulegona. Estos compuestos fueron corroborados en el AE y los valores de cantidad relativa se correlacionaron con las escasas investigaciones realizadas en torno a la composición química y la actividad biológica del aceite de *Satureja viminea* (Tucker y Libbey, 2000; Vila, Clcció y Cañigüeral, 2000).

Entre los AE analizados en la presente investigación, el de la planta *Cananga odorata* se ha asociado en mayor proporción con efectos ansiolíticos (Tan *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016; N. Zhang *et al.*, 2018). Este efecto, se ha atribuido a la alta proporción de componentes bencílicos. El AE estudiado contenía 34.8% de derivados ésteres de los ácidos bencílicos y salicílico.

El acetato de terpenilo fue el componente abundante en el AE extraído de la planta *Elettaria cardamomum*. Esta composición se correlaciona con otros estudios reportados en la literatura (Morsy, 2015; Masoumi-Ardakani *et al.*, 2016). Cabe destacar, que la acción del AE de *Elettaria cardamomum* se ha relacionado con efectos anticancerígenos (Elguindy *et al.*, 2016), antioxidantes (Olivero-Verbel *et al.*, 2014), antimicrobianos (Abdullah *et al.*, 2017) e insecticida (Abbasipour *et al.*, 2011).

El AE extraído de *Citrus sinensis* (familia Rutaceae), conocido comúnmente como naranja dulce, se caracteriza por tener altas concentraciones del monoterpeno llamado limoneno, que se encuentra en un 57.5% en el aceite extraído y caracterizado en el CENIVAM. El anterior resultado es muy similar a lo reportado en la literatura (Azar *et al.*, 2011; González-Mas *et al.*, 2019). Con referencia a la actividad biológica del AE de *C. sinensis*, es relevante mencionar sus propiedades antibacterianas (Kaviya *et al.*, 2011; Arooj, Dar and Samra, 2014), antifúngicas (Taylor *et al.*, 2013), antiparasitarias (Bagavan *et al.*, 2011), antiproliferativas (Genovese *et al.*, 2014), antioxidante (Barreca *et al.*, 2014) e insecticida (Karamaouna *et al.*, 2013).

### 2.3.1 Actividad antimicrobiana *in vitro* de aceites esenciales frente a *Escherichia coli*

#### O157:H7 y *Salmonella entérica* Ser Enteritidis

Se evaluó la actividad antibacteriana de 17 AE frente a *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076. Los ensayos de actividad antibacteriana se realizaron utilizando el método de microdilución en caldo, para la determinación de la CMI y la CMB. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 4**.

#### Tabla 4.

*Determinación de la CMI<sub>50</sub> y la CMB de los AE evaluados frente a Escherichia coli O157:H7 y Salmonella Enteritidis ATCC 13076*

Código	Aceite esencial	<i>E. coli</i> O157:H7		<i>S. Enteritidis</i>	
		CMI <sub>50</sub> (mg/mL)	CMB (mg/mL)	CMI <sub>50</sub> (mg/mL)	CMB (mg/mL)

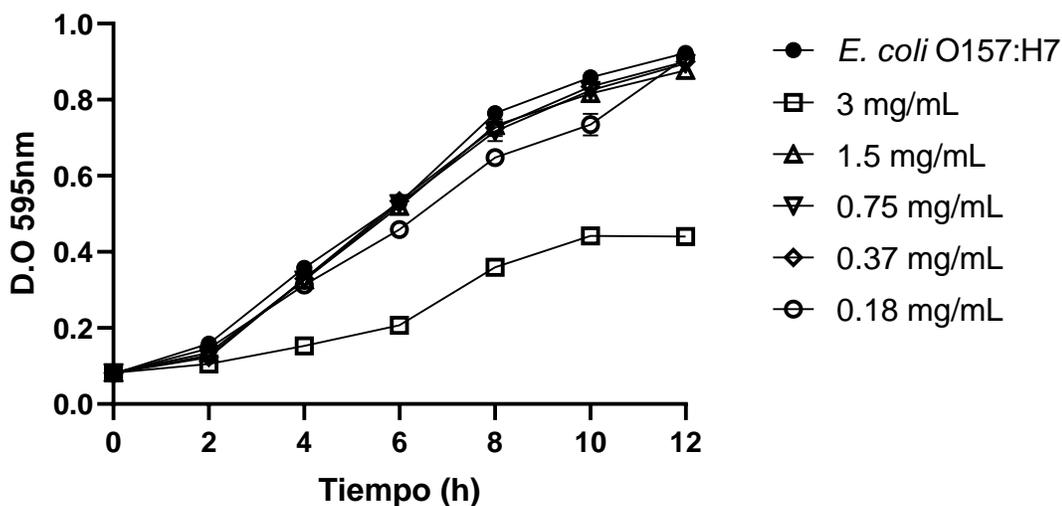
<b>LACA</b>	<i>Lippia alba</i> (carvona)	>3	>3	>3	>3
<b>LACI</b>	<i>L. alba</i> (citral)	>3	>3	>3	>3
<b>CN</b>	<i>Cymbopogon</i> <i>nardus</i>	>3	>3	>3	>3
<b>CM</b>	<i>C. martini</i>	3 ±0.14	>3	0.75 ±0.09	1.5 ±0.12
<b>CF</b>	<i>C. flexuosus</i>	>3	>3	>3	>3
<b>LTC I</b>	<i>L. origanoides</i> (timol-carvacrol I)	0.75 ±0.10	1.5 ±0.22	0.75 ±0.12	1.5 ±0.15
<b>LTC II</b>	<i>L. origanoides</i> (timol-carvacrol II)	0.37 ±0.03	0.75 ±0.03	0.37 ±0.04	0.75 ±0.08
<b>LOF</b>	<i>L. origanoides</i> (felandreno)	>3	>3	>3	>3
<b>RO</b>	<i>Rosmarinus</i> <i>officinalis</i>	>3	>3	>3	>3
<b>SO</b>	<i>Salvia officinalis</i>	>3	>3	>3	>3
<b>SG</b>	<i>Swinglea glutinosa</i>	>3	>3	>3	>3
<b>TL</b>	<i>Tagetes lucida</i>	3 ±0.21	>3	>3	>3
<b>TV</b>	<i>Thymus vulgaris</i>	0.75 ±0.02	1.5 ±0.12	0.75 ±0.05	1.5 ±0.20
<b>SV</b>	<i>Satureja viminea</i>	>3	>3	>3	>3
<b>CO</b>	<i>Cananga odorata</i>	>3	>3	>3	>3
<b>CS</b>	<i>Citrus sinensis</i>	>3	>3	>3	>3
<b>EC</b>	<i>Elettaria</i> <i>cardamomum</i>	>3	>3	>3	>3

Entre los AE que mostraron efecto antibacteriano se encuentra el extraído de la planta *Tagetes lucida*, el cual presentó actividad antimicrobiana únicamente frente a *E. coli* O157:H7, con una CMI<sub>50</sub> de 3 mg/mL, como se muestra en la **Figura 3**. Es importante resaltar, que el efecto antibacteriano frente a *E. coli* O157:H7 obtenido con el AE de *Tagetes lucida* no ha sido reportado en la literatura. Por lo tanto, este estudio es pionero en demostrar la capacidad inhibitoria de este aceite frente a *E. coli* O157:H7. Entre los escasos reportes de actividad antibacteriana de *Tagetes lucida* frente *E. coli*, se encontró un estudio en el que se usaba el

extracto vegetal (Cáceres *et al.*, en 1990). En este caso, los autores realizaron la evaluación de 84 extractos de plantas medicinales utilizadas tradicionalmente en Guatemala y se obtuvieron zonas de inhibición mayores de 8 mm, utilizando el extracto etanólico, frente a las enterobacterias *Escherichia coli*, *Salmonella Enteritidis*, *S. Typhi*, *Shigella dysenteriae* y *S. flexneri* (Caceres *et al.*, 1990). Por otra parte, Capunzo *et al.*, en 2003, demostró el efecto antibacteriano frente a *E. coli* ATCC 25922 de *Tagetes lucida*, utilizando un extracto en cloroformo a una concentración de 0,45 mg/mL (Capunzo *et al.*, 2003).

### Figura 3

Actividad antibacteriana del AE de *Tagetes lucida* frente a *E. coli* O157:H7. Ensayo realizado por el método de microdilución en caldo a 37 °C durante 12 h con agitación a 200 rpm.



En la presente investigación, los resultados obtenidos de actividad antibacteriana del AE de *Tagetes lucida*, permiten inferir que la actividad biológica puede deberse en gran medida al efecto combinado de sus dos componentes principales: estragol y  $\beta$ -mirceno, los cuales representan el 80.8% del AE; la actividad antibacteriana del estragol se ha evaluado en diferentes estudios en los cuales ha sido extraído de diferentes plantas como *Ocimum basilicum*, *Pimenta racemosa* y *Croton zehntneri* (Bagamboula, Uyttendaele y Debevere, 2004; Andrade *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2016). Sin embargo, el único estudio en el que el estragol tuvo efecto inhibitorio sobre modelos bacterianos Gram negativos fue el realizado por Song *et al.*, en 2016, obteniendo mínimas reducciones en el crecimiento bacteriano a partir de una concentración de 2.5 mg/mL. Se ha reportado que la baja actividad inhibitoria del estragol frente a bacterias Gram negativas, puede estar relacionada con la capa externa de lipopolisacárido de estas bacterias, que les confiere un carácter hidrofílico en la superficie y dificulta la penetración de sustancias hidrofóbicas como el estragol (Dorman y Deans, 2000).

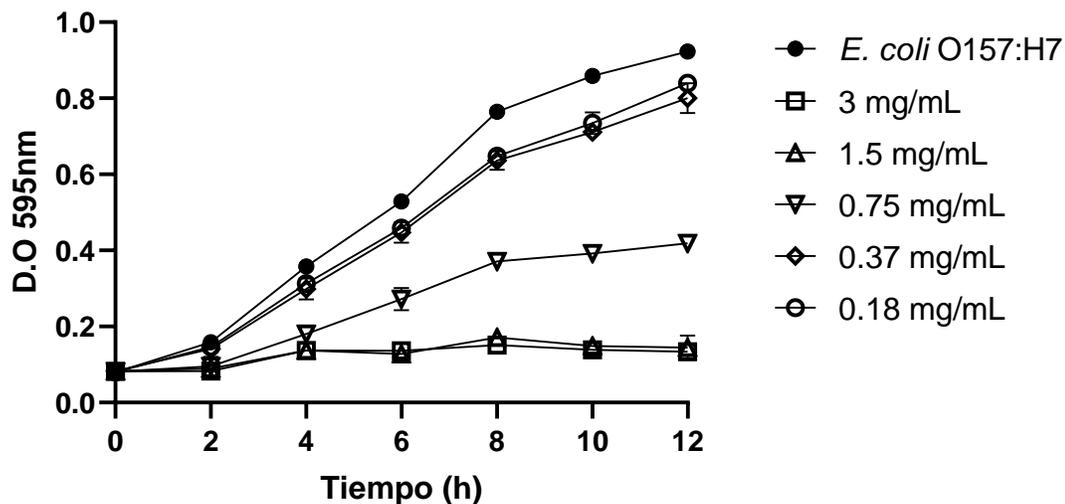
Por otra parte, el  $\beta$ -mirceno no presentó efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli*. Este resultado coincide con lo publicado por Koutsoudaki *et al.*, 2005. En este estudio, los autores obtuvieron  $\beta$ -mirceno a partir del AE de *Pistacia lentiscus*. En este caso, comprobaron halos de inhibición únicamente frente a la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* (Koutsoudaki, Krsek and Rodger, 2005). En un estudio reciente, Amado *et al.*, (2019) demostraron el efecto del  $\beta$ -mirceno sobre la fluidez, la estabilidad y la morfología de diversos modelos de monacapa y bicapa lipídica. Esto plantea que el posible mecanismo de acción del compuesto esté relacionado con la disrupción de las membranas lipídicas (Amado *et al.*, 2019). Sin embargo, el  $\beta$ -mirceno y el estragol no presentan un efecto significativo, cuando se encuentran de forma individual, frente a bacterias Gram negativas, sugiriendo que la acción antibacteriana del AE de *Tagetes lucida*

depende de la combinación del  $\beta$ -mirceno y el estragol, pudiendo existir un efecto aditivo o sinérgico con el restante 19.2% del compuesto. Otro de los AE que presentó actividad antimicrobiana fue el extraído de *Thymus vulgaris*, comúnmente conocido como tomillo, cuyo componente principal es el timol. Este AE exhibió actividad inhibitoria frente a *E. coli* O157:H7 y *S. Enteritidis* ATCC 13076 con una CMI<sub>50</sub> de 0,75 mg/mL y una CMB de 1.5 mg/mL, tal como se muestra en las **Figuras 4 y 5**.

El AE de *Thymus vulgaris* estudiado, contenía 23 % de timol y presentó una CMI<sub>50</sub> 0.75 mg/mL frente a *E. coli* O157:H7, como ya se mencionó. Este valor fue ligeramente superior al obtenido por Rota *et al.*, (2008) quienes evaluaron la actividad antimicrobiana de tres AE de plantas aromáticas del género *Thymus*, con 57.7% de timol, frente a diez bacterias patógenas, incluida *E. coli* O157:H7. En este caso, determinaron una CMI de 0.5 mg/mL (Rota *et al.*, 2008). En otro estudio similar, los autores determinaron una CMI del AE de *T. vulgaris* frente a *E. coli*, de 9.3 mg/mL (Zantar *et al.*, 2015), siendo un valor 12.4 veces mayor, que el obtenido en la presente investigación. Cabe mencionar, que el AE de Zantar *et al.*, contenía carvacrol y no contenía timol. En otra investigación, Puskarova *et al.*, (2017) demostraron una CMI del AE de *T. vulgaris* frente a *E. coli* y *Salmonella* de 1.25 mg/mL, siendo dos veces mayor que el resultado obtenido en esta investigación (Puškárová *et al.*, 2017).

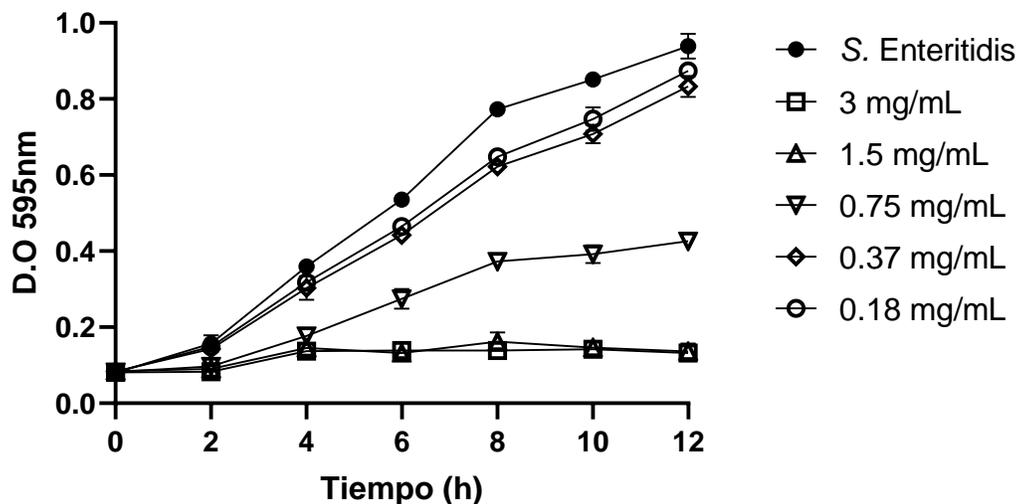
**Figura 4**

*Actividad antibacteriana del AE de Thymus vulgaris frente a E. coli O157:H7. Ensayo realizado por el método de microdilución en caldo a 37 °C durante 12 h con agitación a 200 rpm*



**Figura 5**

*Actividad antibacteriana del AE de Thymus vulgaris frente a S. Enteritidis. Ensayo realizado por el método de microdilución en caldo a 37 °C durante 12 h con agitación a 200 rpm*



Entre los estudios de actividad inhibitoria del AE de *Thymus vulgaris* frente a *S. Enteritidis* se destaca el llevado a cabo por Solarte *et al.*, (2017) en el que los autores evaluaron la actividad antimicrobiana de este AE frente a 83 cepas de *Salmonella*, teniendo como resultado una CMI promedio de 0.62 mg/mL, frente a las cepas evaluadas (Solarte *et al.*, 2017); el AE utilizado en la investigación de Solarte *et al.*, contenía 46.9% de timol, lo cual equivale a más de dos veces la cantidad de timol determinada en el AE de tomillo evaluado en la presente investigación. Sin embargo, es importante subrayar que el efecto antibacteriano no sólo depende del componente mayoritario del AE.

El modo de acción de los AE extraídos de plantas se ha asociado principalmente con toxicidad a nivel de la membrana celular, debido a que los componentes característicamente hidrofóbicos del AE se acumulan en la superficie de la membrana celular afectando su estructura y función (Lambert *et al.*, 2001). Las bacterias Gram negativas parecen ser menos susceptibles a la acción de los AE debido a la membrana externa que rodea la pared celular, la cual restringe la difusión de compuestos hidrófobos a través de su capa de lipopolisacárido; por lo general, la actividad antibacteriana de los AE se atribuye principalmente a los componentes fenólicos; sin embargo, se han reportado estudios en los cuales la acción de todos los componentes del aceite presentan mayor actividad antibacteriana que la combinación de sus componentes mayoritarios aislados, lo cual indica que los componentes minoritarios son importantes para la actividad biológica del AE (Burt, 2004).

En relación con las diferencias en los porcentajes de timol para los AE de *T. vulgaris* de diferente origen, las variaciones de concentración se pueden atribuir a factores como la edad de la planta, parte de la planta de la cual se extrae el aceite, etapa del desarrollo, lugar del cultivo,

período de la cosecha y quimiotipo presente; todo esto influye en la vía biosintética de la planta y, por lo tanto, en la composición relativa de los componentes de su AE (Viuda-Martos *et al.*, 2011).

El timol representa uno de los terpenoides más estudiados en los últimos años debido a sus diferentes propiedades biológicas y a su uso en la Industria alimentaria y cosmética (Nazzaro *et al.*, 2013; Wińska *et al.*, 2019). Sin embargo, la mayor proyección en el uso del timol se centra en el campo farmacéutico, especialmente, por la aparición y propagación de bacterias multirresistentes y la urgente necesidad de descubrir compuestos antimicrobianos; en este sentido, numerosos estudios han demostrado la actividad antifúngica y antimicrobiana del timol, lo cual también se evidenció en esta investigación en los AE de *T. vulgaris*, *Lippia origanoides* quimiotipo timol-carvacrol I (LTC I) y *L. origanoides* quimiotipo timol-carvacrol II (LTC II) (Pan *et al.*, 2014; Džamić *et al.*, 2015; Epps *et al.*, 2015; Kifer, Mužinić y Klaric, 2016; Shu, Sun y Zhang, 2016).

Uno de los posibles mecanismos de acción que se han planteado para el timol, hace referencia a que este fenol monoterpénico tiene la capacidad para desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram negativas, liberando lipopolisacárido e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática (Lambert *et al.*, 2001; de Souza *et al.*, 2010); debido a lo anterior, Ferreira *et al.*, (2016) probaron el efecto del timol sobre monocapas lípidicas y analizaron la interacción entre el timol y el lípido dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). Los resultados permitieron demostrar que el timol disminuye la elasticidad superficial y cambia la morfología del DPPC, evidenciando de esta manera, el ingreso del compuesto en los lípidos de membrana (Ferreira *et al.*, 2016).

Recientemente, Al-Kandari *et al.*, en 2019, expuso una cepa de *E. coli* a timol en diferentes concentraciones subletales. Después de 16 rondas de exposición se analizaron los cambios en el microorganismo mediante Microscopía de Barrido Electrónico (SEM, por sus siglas en inglés) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Lo anterior permitió sugerir un efecto del timol a nivel de la permeabilidad e integridad de la membrana, al igual que un incremento en los aminoácidos de la familia del lactato y del ácido láctico, lo que indicó un cambio en la respiración celular y en la fermentación (Al-Kandari *et al.*, 2019).

Es importante tener en cuenta la actividad biológica de los demás componentes del AE de *Thymus vulgaris*. El segundo componente más abundante en el AE fue el  $\rho$ -cimeno (20%); sus propiedades biológicas son amplias, entre ellas se destacan efectos antioxidantes, antiinflamatorios, anticancerígenos, ansiolíticos y antimicrobianos (Quintans-júnior *et al.*, 2013; De Santana *et al.*, 2015). Esta última propiedad ha sido evaluada por diferentes autores y se ha determinado que el  $\rho$ -cimeno no es el principal compuesto que confiere la actividad antimicrobiana a los AE, más específicamente, se ha demostrado que es menos eficiente como agente antimicrobiano que el timol. Sin embargo, se ha reportado que el  $\rho$ -cimeno mejora la actividad de otros agentes antimicrobianos como el carvacrol, el 4-terpineol y la nisina, ejerciendo un efecto sinérgico cuando se combina con éstos (Rattanachaikunsopon y Phumkhachorn, 2010; Bukvički *et al.*, 2014; Andrade-Ochoa *et al.*, 2015).

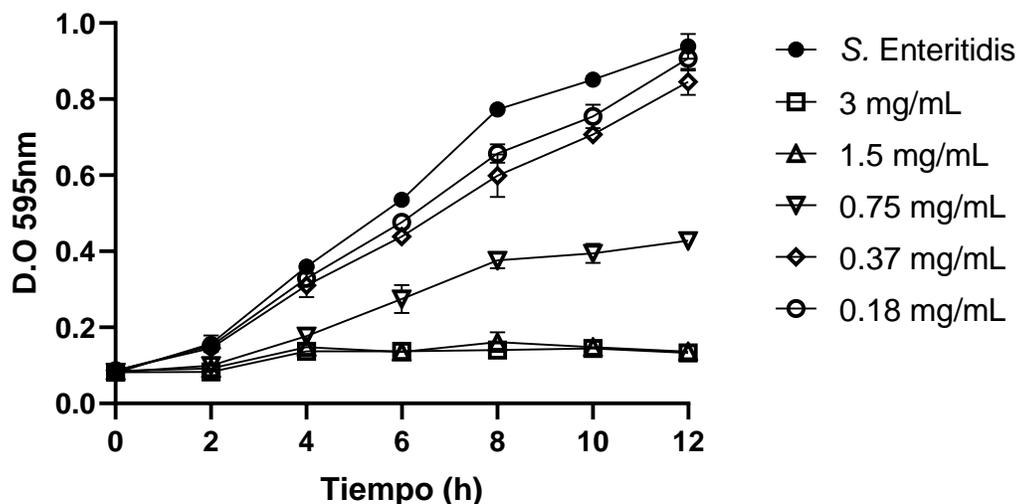
Los otros dos componentes presentes en el AE de *Thymus vulgaris*, en igual cantidad relativa (9.5%), son el  $\gamma$ -terpineno y el *trans*- $\beta$ -cariofileno, a lo cuales se les ha demostrado actividad antimicrobiana, pero a concentraciones inhibitorias mayores en comparación a las del timol y carvacrol (Öztürk *et al.*, 2009; Giweli *et al.*, 2012).

Lo anterior evidencia la complejidad en la composición de los AE y cómo se hace necesario el estudio del mecanismo de acción de los diversos componentes mayoritarios y minoritarios individualmente y en conjunto para comprender el efecto que produce el AE sobre el metabolismo y la estructura de las células bacterianas.

Otro de los AE en el cual se evidenció actividad antimicrobiana fue *Cymbopogon martini*, el cual tuvo mayor actividad inhibitoria frente a *S. Enteritidis* con una  $CM_{50}$  de 0.75 mg/mL y una CMB de 1.5 mg/mL, como se ilustra en la **Figura 6**.

**Figura 6**

*Actividad antibacteriana del AE de Cymbopogon martini frente a S. Enteritidis. Ensayo realizado por el método de microdilución en caldo a 37 °C durante 12 h con agitación a 200 rpm.*

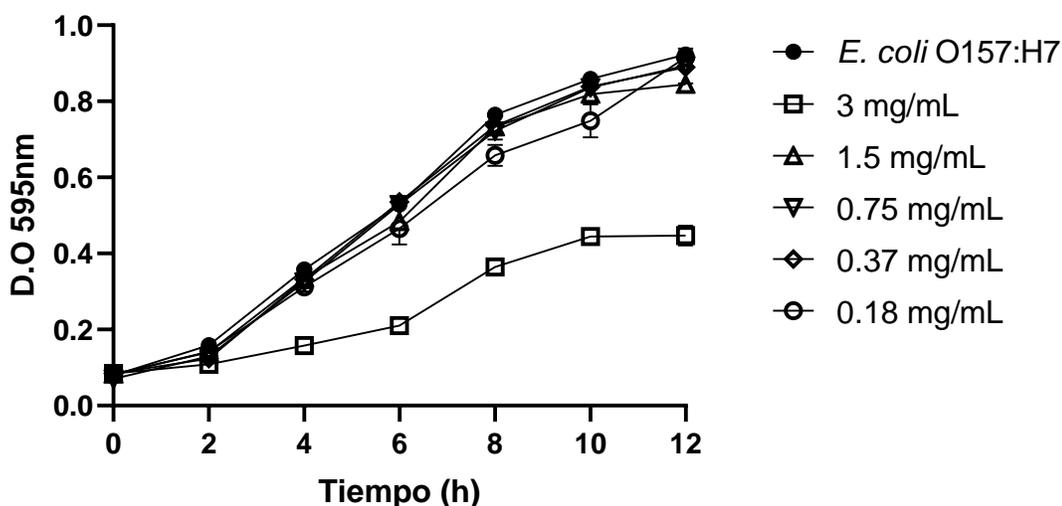


La actividad inhibitoria del AE de *C. martini* frente a *E. coli* O157:H7 fue inferior a la obtenida frente a *S. Enteritidis*, con una  $CM_{50}$  de 3 mg/mL y una CMB por encima de 3 mg/mL.

Los resultados de actividad antimicrobiana del AE de *C. martini* frente a *E. coli* O157:H7 se muestran en la **Figura 7**.

**Figura 7**

*Actividad antibacteriana del AE de Cymbopogon martini frente a E. coli O157:H7. Ensayo realizado por el método de microdilución en caldo a 37 °C durante 12 h con agitación a 200 rpm.*



Los resultados de actividad antibacteriana del AE de *C. martini*, conocido popularmente como aceite de palmarrosa, se deben principalmente a su alto contenido de geraniol, que varía entre 70 y 80%. Además, el geraniol le confiere a la planta de palmarrosa su característico olor a rosa cítrico con matices afrutados y cerosos (Murbach Teles Andrade *et al.*, 2014). El AE de *C. martini* presentó una cantidad relativa de 38.7% de geraniol, lo cual está por debajo de los pocos estudios que evalúan la actividad antibacteriana de este aceite frente a *E. coli* O157:H7 y *S. Enteritidis* (Duarte *et al.*, 2007; Thielmann, Muranyi and Kazman, 2019), y podría explicar el menor efecto inhibitorio que se obtuvo. En el estudio de Duarte *et al* (2007), se evaluaron 13

serotipos diferentes de *E. coli*, se obtuvieron diferentes valores de CMI que variaron entre 0.1 y 0.5 mg/mL, pero ninguno de los serotipos evaluados correspondió a uno enterohemorrágico. Por lo tanto, dependiendo del serotipo evaluado, el valor del CMI puede variar.

Con respecto al efecto inhibitorio obtenido con el AE de *C. martini* frente a *S. Enteritidis*, el valor determinado fue mayor que el reportado en la literatura frente a esta misma bacteria por Teles *et al.*, (2014) quienes determinaron CMI de 0.5 mg/mL. Incluso, estos autores midieron el efecto antibacteriano del geraniol puro, y la CMI alcanzada fue 10 veces menor que el reportado por el AE, reforzando la teoría de que en el caso de *C. martini*, una buena parte del efecto antimicrobiano y antifúngico depende de su componente mayoritario, geraniol.

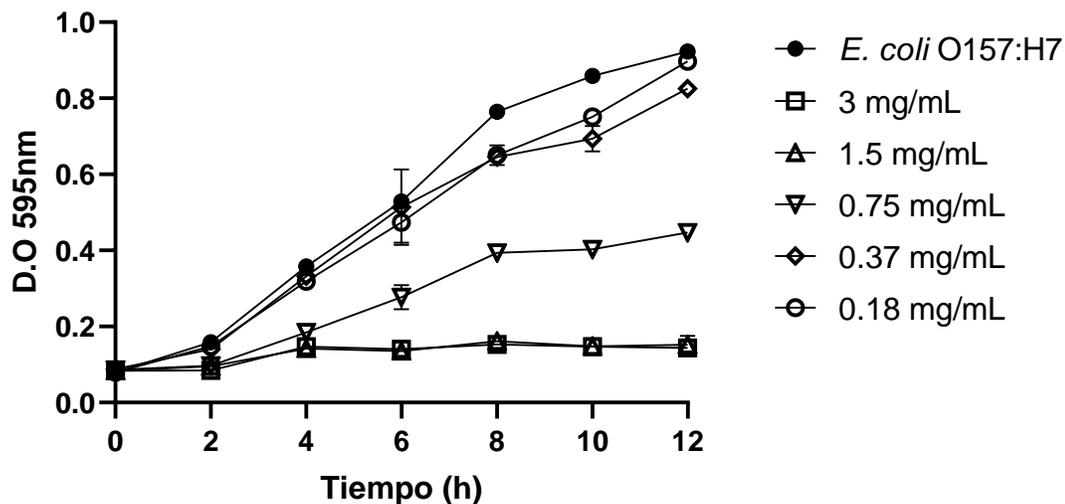
El geraniol es un compuesto con pocos efectos adversos, el cual ejerce diversas actividades regulando principalmente la expresión de proteínas. Esto sugiere que el geraniol puede convertirse en un compuesto importante para tratar diferentes enfermedades (Galle *et al.*, 2014; Queiroz *et al.*, 2017). Adicionalmente, el geraniol ha sido asociado a efectos citotóxicos sobre células cancerígenas, efectos antiinflamatorios, antioxidantes, antifúngicos, antinociceptivos y antimicrobianos; lo anterior evidencia la variedad de posibles efectos que pueden derivarse del AE de *C. martini* (Leite *et al.*, 2015; El-Bassossy, Elberry and Ghareib, 2016).

Los AE extraídos de *Lippia origanoides* quimiotipo timol-carvacrol I (LTC I) y *L. origanoides* quimiotipo timol-carvacrol II (LTC II) también presentaron efecto antibacteriano frente a *E. coli* O157:H7 y *S. Enteritidis* ATCC 13076. El mayor efecto antibacteriano entre los 17 AE evaluados fue el obtenido con el AE de LTC II.

Los AE de LTC I y LTC II presentan similitudes en su composición, como se evidenció en la **Tabla 3**, pero difieren en la actividad antimicrobiana. Mientras el AE de LTC I tiene una  $CMI_{50}$  de 0.75 mg/mL y una CMB de 1.5 mg/mL frente a los dos microorganismos evaluados (**Figuras 8 y 9**), los resultados del AE LTC II indican una actividad antimicrobiana dos veces mayor (**Figuras 10 y 11**).

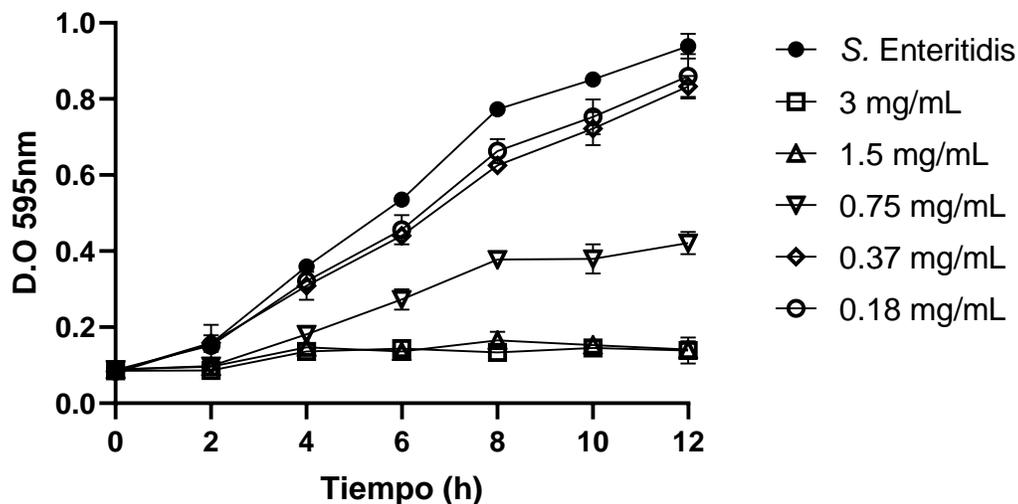
**Figura 8**

*Actividad antibacteriana del AE de LTC I frente a E. coli O157:H7. Ensayo realizado por el método de microdilución en caldo a 37 °C durante 12 h con agitación a 200 rpm*



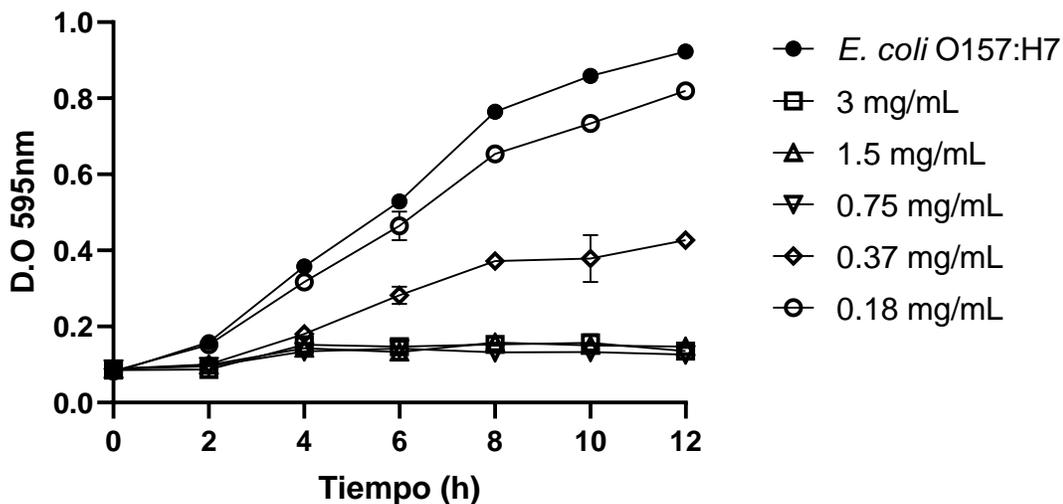
**Figura 9**

*Actividad antibacteriana del AE de LTC I frente a S. Enteritidis. Ensayo realizado por el método de microdilución en caldo a 37 °C durante 12 h con agitación a 200 rpm*



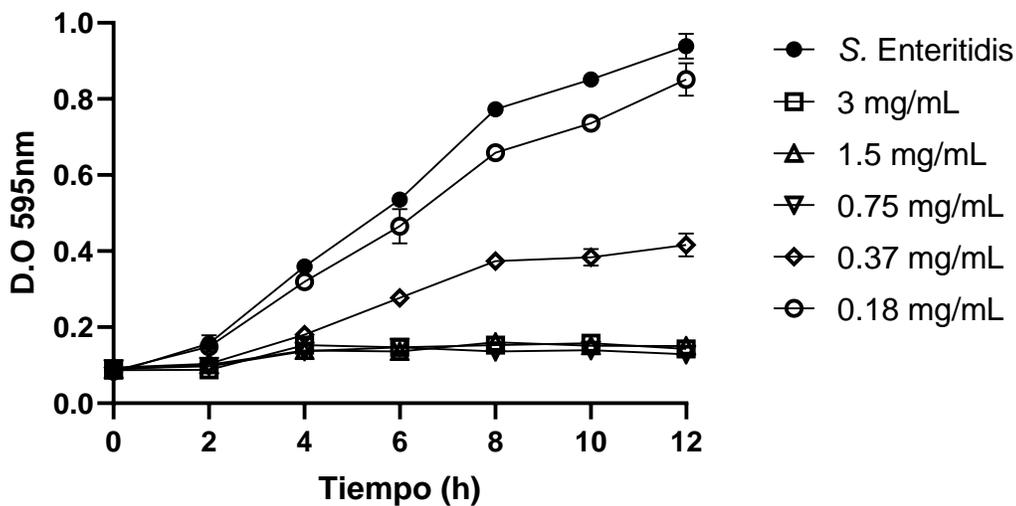
**Figura 10**

*Actividad antibacteriana del AE de LTC II frente a E. coli O157:H7. Ensayo realizado por el método de microdilución en caldo a 37 °C durante 12 h con agitación a 200 rpm*



**Figura 11**

*Actividad antibacteriana del AE de LTC II frente a S. Enteritidis. Ensayo realizado por el método de microdilución en caldo a 37 °C durante 12 h con agitación a 200 rpm*



Los resultados de actividad antibacteriana de los dos componentes principales de los AE de LTC I y LTC II, timol y carvacrol, han sido ampliamente documentados debido a que también se encuentran haciendo parte de otras plantas medicinales. Sin embargo, los estudios de actividad antibacteriana sobre *E. coli* y *Salmonella* Enteritidis, específicamente, con el AE de *L. origanoides* son escasos, debido a que es una planta nativa que se localiza en su mayoría en regiones de Colombia y Brasil. Entre los estudios que han analizado la actividad antibacteriana de *L. origanoides* se destaca el de Sarrazin *et al.*, (2015), en el cual se evaluó la influencia de la variación estacional en el rendimiento, la composición y la actividad antimicrobiana del AE de *L. origanoides* ubicado en el Amazonas brasileiro; las mediciones se llevaron a cabo cada mes durante un año, lo cual permitió concluir que los tres parámetros medidos en la investigación fueron mínimamente influenciados por los cambios climáticos (Sarrazin, Leomara Andrade Da Silva, *et al.*, 2015). Es importante resaltar, que el AE extraído de *L. origanoides*, obtenido en el estudio de Sarrazin *et al.*, tiene un porcentaje aproximado de 43.5% de carvacrol y un 10.7% de timol, lo cual es inverso a la cantidad relativa de estos fenoles determinada en la presente investigación. En este caso, las cantidades relativas de timol y carvacrol fueron de 22.1 y 32.7 %, respectivamente, para las especies de LTC I y LTC II. Con respecto a la actividad antimicrobiana reportada por Sarrazin *et al.*, frente a *E. coli*, esta varió en los doce meses de medición entre 0.15 y 0.31 mg/mL, lo cual es similar a lo determinado en esta investigación para el AE de LTC II. Sin embargo, para el caso de la actividad bactericida, se logró una CMB de 0.75 mg/mL, siendo un 70% menor que el publicado por los otros autores.

En otro estudio realizado también en Brasil, Pinto *et al.*, determinaron la CMI de diferentes extractos de *L. origanoides* frente a modelos bacterianos Gram positivos, Gram negativos y levaduras; la mayor actividad antimicrobiana que obtuvieron frente a *E. coli*

CCMB261 fue de 0.658 mg/mL utilizando la fracción en acetato de etilo y diclorometano (Pinto *et al.*, 2013). Estos valores son mayores que los encontrados en el presente estudio para el AE de LTC II.

El componente mayoritario del AE de LTC I y LTC II fue el timol, pero debido a que ya fue tratado cuando se discutieron los resultados del AE de *Thymus vulgaris*, entonces se abordará el carvacrol y sus interacciones con componentes minoritarios, lo cual puede desencadenar sinergia y sea la posible causa de que el AE de LTC II presente mayor efecto antibacteriano que el de LTC I. Al igual que la actividad del timol, se ha inferido que la acción del carvacrol se debe a la capacidad para distribuirse en las membranas biológicas y permeabilizarlas, lo que altera el gradiente de iones (Burt, 2004). Sin embargo, la hidrofobicidad solamente no garantiza el efecto citotóxico, la presencia de un grupo hidroxilo libre y un sistema de electrones distribuidos es vital para la actividad antibacteriana (Ultee, Bennik and Moezelaar, 2002). También se ha demostrado en el modelo Gram positivo *Bacillus cereus* que el carvacrol reduce el potencial de la membrana citoplasmática, disminuye el pH intracelular e inhibe la síntesis de ATP, estimulando finalmente la fuga de potasio (Ultee, Bennik and Moezelaar, 2002). Por otra parte, Epstein *et al.*, plantearon que el potasio actúa como una molécula de señalización citoplasmática que activa o induce enzimas que dan como resultado el incremento de la osmolaridad celular (Epstein, 2003).

Recientemente, Kahn *et al.*, (2020), evaluaron el mecanismo de acción del carvacrol frente a *E. coli* uropatógena y lograron demostrar que el carvacrol induce un aumento en la muerte celular bacteriana, debido a una mayor despolarización de la membrana y una explosión oxidativa elevada en *E. coli*. El carvacrol también indujo la liberación de ADN celular, proteínas

e iones de potasio de las células bacterianas y redujo tanto el número de *E. coli* en los ensayos de invasión contra los macrófagos como los niveles de las proteínas inflamatorias TNF- $\alpha$  y COX-2. Además, descubrieron que el carvacrol inhibe la actividad de la enzima  $\beta$ -lactamasa (*in vitro*), lo que fue respaldado por los resultados *in silico*. En general, los hallazgos de este estudio sugieren que el carvacrol tiene un potencial antimicrobiano significativo contra *E. coli* uropatógena (Khan *et al.*, 2020).

Para entender mejor la acción del AE de LTC II se debe analizar la sinergia que se ha demostrado entre el *p*-cimeno, el cual se encuentra en un 1.1% en el aceite y los componentes mayoritarios. La prueba de la actividad biológica baja del *p*-cimeno se ha informado previamente en ensayos contra *Mycobacterium tuberculosis*, *S. aureus* (MRSA), *Haemophilus influenzae*, *Salmonella enterica* serovar Typhi y *Vibrio cholerae*; sin embargo, en mezcla con otros metabolitos como carvacrol y timol, parece aumentar la inhibición bacteriana, probablemente, por un mecanismo sinérgico (Rattanachaikunsopon y Phumkhachorn, 2010; Li *et al.*, 2014; Andrade-Ochoa *et al.*, 2015; Marchese *et al.*, 2017). Por lo tanto, los resultados obtenidos permiten inferir que la actividad antibacteriana más alta presentada por el AE de LTC II se debe principalmente al efecto resultante de la interacción entre componentes mayoritarios y minoritarios, ocasionando un efecto inhibitorio sobre *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 por medio de un mecanismo de acción que se dilucidará más adelante por técnicas metabolómicas.

## 2.4. Conclusiones

- El AE de *Lippia origanoides*, quimiotipo timol-carvacrol II, presentó la mayor actividad antibacteriana frente a las bacterias *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella entérica* Ser Enteritidis con una MIC<sub>50</sub> de 0,37 mg/mL y una MBC de 0.75 mg/ML, entre los 17 AE estudiados.

- Los aceites que presentaron mayor actividad antibacteriana se caracterizaron por tener entre sus componentes mayoritarios fenoles monoterpénicos como el timol y el carvacrol.

### **3. Evaluación de inhibición de la formación de *biofilm* de *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella entérica* Ser Enteritidis tratadas con aceites esenciales de las familias verbenaceae, poaceae, lamiaceae y asteraceae.**

#### **3.1. Introducción**

Los *biofilms* bacterianos son comunidades bien estructuradas de células bacterianas, adheridas a superficies bióticas o abióticas. Los *biofilms*, se encuentran embebidos en una matriz de exopolisacáridos (EPS) sintetizados por los microorganismos (Khatoon *et al.*, 2018). La organización en *biofilm* le confiere protección a las bacterias frente a situaciones adversas como disminución de nutrientes, desecación, ataques del sistema inmunitario del huésped y tratamiento antibiótico (Ćirić *et al.*, 2019).

Basado en la evidencia obtenida en estudios recientes, los principales mecanismos por los cuales las bacterias asociadas en *biofilm* sobreviven a la presencia de antibióticos se describen a continuación:

- Barrera de difusión del EPS: La matriz de EPS secretada por las células bacterianas constituye una barrera para la penetración de agentes antimicrobianos, lo anterior puede ser el resultado de la arquitectura compleja del *biofilm*, la degradación antibiótica, quelación e inactivación de los antibióticos mediada por oxidación. Estos procesos reducen la efectividad de los antibióticos promoviendo así la selección de células resistentes dentro del *biofilm*, las cuales podrán evadir el estrés antibiótico (Flemming *et al.*, 2016).

- Transferencia horizontal de genes de resistencia: El aumento en la densidad celular y la competencia genética constituyen un ambiente físico que favorece el contacto directo

de célula a célula y la acumulación de ADN extracelular. Lo anterior, mejora la absorción de marcadores de resistencia antibiótica entre células mediante transferencia horizontal de genes (Hall and Mah, 2017). La conjugación bacteriana es el mecanismo más común de transferencia horizontal de genes, el cual ha sido documentado ampliamente en bacterias como *E. coli*, *P. putida*, *S. enterica*, *H. influenzae* y *V. cholerae* (Tran and Boedicker, 2017; Rendueles *et al.*, 2018; Sun, 2018; Hegstad *et al.*, 2020).

- Velocidad específica de crecimiento lenta: La limitación de nutrientes en el *biofilm* conduce a una velocidad específica de crecimiento lenta, a inanición bacteriana y a un estado de latencia metabólica que contribuye a la tolerancia a los agentes antimicrobianos (Stewart, 2015). Por otro lado, en el *biofilm*, el número de células bacterianas en fase estacionaria aumenta significativamente, al igual que su tolerancia a los antibióticos; lo cual depende principalmente de la actividad metabólica de la célula frente a los compuestos antimicrobianos (Hall and Mah, 2017; Cabral, Wurster and Belenky, 2018). Sumado a lo anterior, la velocidad específica de crecimiento lenta conduce a un estado de no esporulación, es decir, un estado viable pero no cultivable, conocido como VBNC; en el cual el organismo no puede crecer en los medios de cultivo enriquecidos, al mismo tiempo que mantiene parámetros de viabilidad como la respiración, la presencia de ARNr y la integridad de la membrana plasmática (Dong *et al.*, 2020). Se ha documentado que en el estado VBNC, patógenos como *E. faecalis*, *S. epidermidis*, *H. pylori*, *M. tuberculosis* y *H. influenzae* son resistentes a la acción de los antimicrobianos (L. Li *et al.*, 2014).

- Latencia fisiológica de células persistentes: los *biofilms* contienen una pequeña fracción de la población bacteriana que exhibe una mayor tolerancia a biocidas y sustancias

antimicrobianas, conocidas como “células persistentes”; las cuales sobreviven fácilmente a un ataque antibiótico, porque inducen alteraciones en el sitio diana del antibiótico (Ling *et al.*, 2015). La tolerancia a múltiples fármacos en las células persistentes es un fenómeno fenotípico que permite una selección de mutantes que han adquirido resistencia. A medida que disminuye la presión antibiótica dentro del *biofilm*, las células persistentes dan lugar a una población bacteriana que es tan susceptible como la original. Por lo tanto, las células persistentes se han asociado con la persistencia de infecciones bacterianas relacionadas con la presencia de *biofilms in vivo* (Wood, 2017).

- *Quorum sensing*: el *QS* es un proceso de comunicación bacteriana en el cual las bacterias regulan la expresión de ciertos genes en respuesta a los cambios en la densidad celular. Como resultado, se presentan diferentes modificaciones fenotípicas en las bacterias, entre las cuales se destacan la capacidad para formar *biofilm* y la expresión de factores de virulencia (Jiang *et al.*, 2019; Pena *et al.*, 2019). El *QS* se ha asociado al desarrollo adecuado de la arquitectura de la matriz de EPS, ya que la deficiencia en el *QS* se correlaciona con un *biofilm* estructuralmente delgado y con menor producción de EPS (Singh *et al.*, 2017).

- Cambios en la morfología celular mediados por estrés: las células embebidas en el *biofilm* enfrentan continuamente estrés debido a deficiencias nutricionales, modificación de pH y acumulación de sustancias tóxicas. Las bacterias tienen la capacidad innata de contrarrestar el estrés cambiando su morfología y fisiología celular, lo cual disminuye la sensibilidad frente a agentes antimicrobianos (Novović *et al.*, 2018). La resistencia a los antibióticos en el *biofilm* también está mediada por mecanismos genéticos que son específicos del fenotipo expresado en el *biofilm* y, por lo tanto, se encuentran ausentes en las células planctónicas. Uno de esos

mecanismos es la expresión del gen *ndvB*, que codifica para la enzima glucosiltransferasa que cataliza la síntesis de glucanos cíclicos periplásmicos  $\beta$ - (1->3); estos glucanos promueven la resistencia bacteriana al secuestrar antibióticos en el periplasma, lejos de sus objetivos celulares. La transcripción de *ndvB* depende del factor sigma RpoS, el cual regula la expresión de otros 50 genes responsables de la tolerancia al estrés y de reordenamientos fisiológicos y metabólicos (Jakubowski and Walkowiak, 2015; Silva *et al.*, 2018; Lories *et al.*, 2020).

Teniendo en cuenta lo anterior, surge la necesidad de encontrar compuestos que inhiban la formación del *biofilm* en bacterias patógenas; entre estos compuestos, los AE han demostrado un gran potencial para prevenir la formación y dispersión del *biofilm*, por lo tanto, constituyen una alternativa al uso de antibióticos convencionales.

En la **Tabla 5** se muestran una recopilación de los estudios más relevantes sobre la acción de AE frente al *biofilm* de bacterias patógenas.

**Tabla 5**

*Concentración Mínima Inhibitoria del biofilm (CMIB) de AE frente a diferentes microorganismos*

<b>Aceite esencial</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>CMIB (mg/mL)</b>	<b>Referencia</b>
<i>Origanum vulgare</i>	<i>S. pyogenes</i>	0.50	(Wijesundara y Rupasinghe, 2018)
<i>Salvia officinalis</i>	<i>S. pyogenes</i>	0.50	(Wijesundara y Rupasinghe, 2018)
<i>Menthae piperitae</i>	<i>S. aureus</i>	0.12	(Kang <i>et al.</i> , 2019)
<i>Citrus medica</i>	<i>S. typhimurium</i>	0.75	(H. Zhang <i>et al.</i> , 2019)
	<i>S. aureus</i>	0.75	
<i>Cinnamomum</i>	<i>L. monocytogenes</i>	0.5	(Kerekes <i>et al.</i> ,

<i>zeylanicum</i>	<i>P. putida</i>	0.12	2019)
	<i>S. aureus</i>	0.20	
<i>Thymus vulgaris</i>	<i>E. coli</i>	0.50	(Kerekes <i>et al.</i> ,
	<i>L. monocytogenes</i>	1	2019)
	<i>P. putida</i>	10	
	<i>S. aureus</i>	0.40	
<i>Origanum majorana</i>	<i>E. coli</i>	0.25	(Kerekes <i>et al.</i> ,
	<i>L. monocytogenes</i>	2	2019)
	<i>P. putida</i>	1	
	<i>S. aureus</i>	1.60	
<i>Citrus reticulata</i>	<i>S. epidermidis</i>	0.59	(Aumeeruddy-
	<i>E. coli</i>	0.54	Elalfi <i>et al.</i> ,
			2018)
<i>Psiadia arguta</i>	<i>S. epidermidis</i>	0.22	(Aumeeruddy-
	<i>E. coli</i>	0.09	Elalfi <i>et al.</i> ,
			2018)
<i>Psiadia terebenthina</i>	<i>S. epidermidis</i>	0.11	(Aumeeruddy-
	<i>E. coli</i>	0.13	Elalfi <i>et al.</i> ,
			2018)
<i>Plectranthus amboinicus</i>		0.12	(Vasconcelos <i>et</i>
	<i>S. aureus</i>		<i>al.</i> , 2017)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>S. aureus</i>	25	(Jardak <i>et al.</i> ,
			2017)
<i>Ocimum basilicum</i>	<i>V. cholerae</i>	2.50	(Snoussi <i>et al.</i> ,
	<i>V. vulnificus</i>	5	2016)
	<i>V. parahaemolyticus</i>	2.50	
<i>Petroselinum crispum</i>	<i>V. cholerae</i>	11.25	(Snoussi <i>et al.</i> ,
	<i>V. vulnificus</i>	11.25	2016)
	<i>V. parahaemolyticus</i>	5.62	
<i>Satureja montana</i>	<i>S. Typhimurium</i>	1.15	(Miladi <i>et al.</i> ,
			2016)
<i>Thymus vulgaris</i>	<i>S. Typhimurium</i>	2.78	(Miladi <i>et al.</i> ,
			2016)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>S. Typhimurium</i>	29.35	(Miladi <i>et al.</i> ,
			2016)
<i>Campomanesia aurea</i>	<i>L. monocytogenes</i>	0.40	(Kuhn <i>et al.</i> ,
	<i>S. aureus</i>	0.40	2019)
	<i>S. Enteritidis</i>	0.40	
<i>Syzygium aromaticum</i>	<i>S. aureus</i>	0.10	(Budri <i>et al.</i> ,
			2015)
<i>Cinnamomum</i>	<i>S. aureus</i>	0.10	(Budri <i>et al.</i> ,
<i>zeylanicum</i>			2015)
<i>Dodartia orientalis</i>	<i>S. aureus</i>	0.50	(Wang <i>et al.</i> ,
	<i>E. coli</i>	1	2017)

	<i>S. Enteritidis</i>	2	
<i>Citrus reticulata</i>	<i>P. aeruginosa</i>	2	(Luciardi <i>et al.</i> , 2016)
<i>Origanum heracleoticum</i>	<i>S. Enteritidis</i>	1	(Čabarkapa <i>et al.</i> , 2019)
<i>Thymus vulgaris</i>	<i>S. Enteritidis</i>	1	(Čabarkapa <i>et al.</i> , 2019)
<i>Thymus serpyllum</i>	<i>S. Enteritidis</i>	2	(Čabarkapa <i>et al.</i> , 2019)
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	<i>Enterococcus spp</i>	7.60	(Quendera, Barreto y Semedo-Lemsaddek, 2019)
	<i>Aeromonas spp</i>	7.60	
<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Enterococcus spp</i>	7.60	(Quendera, Barreto y Semedo-Lemsaddek, 2019)
	<i>Aeromonas spp</i>	3.80	
<i>Citrus paradisi</i>	<i>P. aeruginosa</i>	0.50	(Luciardi <i>et al.</i> , 2020)
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	<i>S. aureus</i>	0.25	(Firmino <i>et al.</i> , 2018)
	<i>S. epidermidis</i>	0.50	
<i>Cinnamomum cassia</i>	<i>S. aureus</i>	0.25	(Firmino <i>et al.</i> , 2018)
	<i>S. epidermidis</i>	0.50	
<i>Allium sativum</i>	<i>S. aureus</i>	5	(Mohsenipour y Hassanshahian, 2015)
	<i>B. cereus</i>	5	
	<i>S. pneumoniae</i>	5	
	<i>P. aeruginosa</i>	5	
	<i>E. coli</i>	5	
	<i>K. pneumoniae</i>	5	
<i>Mentha piperitae</i>	<i>S. aureus</i>	3.10	(Bazargani and Rohloff, 2016)
	<i>E. coli</i>	6.30	
<i>Coriandrum sativum</i>	<i>S. aureus</i>	0.80	(Bazargani and Rohloff, 2016)
	<i>E. coli</i>	1.60	
<i>Pimpinella anisum</i>	<i>S. aureus</i>	3.10	(Bazargani and Rohloff, 2016)
	<i>E. coli</i>	12.50	
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	<i>S. aureus</i>	0.20	(Dalla Costa, Moura y Millezi, 2019)
	<i>L. monocytogenes</i>	0.78	
	<i>P. aeruginosa</i>	0.78	

## 3.2 Materiales y métodos

### 3.2.1 Materiales

En relación con las bacterias estudiadas, la cepa de *Escherichia coli* O157:H7 fue donada por el cepario de la Universidad Pontificia Javeriana de Colombia. *Salmonella entérica* Ser Enteritidis ATCC 13076 fue adquirida comercialmente.

Los siguientes son los 17 AE extraídos y caracterizados en el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales (CENIVAM), de la Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga, Colombia):

*Lippia alba*, Quimiotipo carvona (LACA)

*L. alba*, Quimiotipo citral (LACI)

*Cymbopogon nardus* (CN)

*C. martini* (CM)

*C. flexuosus* (CF)

*L. origanoides*, Quimiotipo timol-carvacrol I (LTC I)

*L. origanoides*, Quimiotipo timol-carvacrol (LTC II)

*L. origanoides*, Quimiotipo felandreno (LOF)

*Rosmarinus officinalis* (RO)

*Salvia officinalis* (SO)

*Swinglea glutinosa* (SG)

*Tagetes lucida* (TL)

*Thymus vulgaris* (TV)

*Satureja viminea* (SV)

*Cananga odorata* (CO)

*Citrus sinensis* (CS)

*Elettaria cardamomum* (EC)

Los medios de cultivo Luria Bertani (LB), caseína hidrolizada, Infusión Cerebro Corazón (BHI), peptona, agar bacteriológico, fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), fosfato dipotásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) y el sulfato de amonio ( $\text{NH}_4\text{SO}_4$ ) fueron obtenidos de Oxoid (Hampshire, UK). El Dimetilsulfóxido (DMSO) grado HPLC, el cristal violeta y el ácido acético fueron adquiridos en Merck (Darmstadt, Alemania). Las microplacas de 96 pozos de poliestireno de fondo curvo fueron marca Biologix.

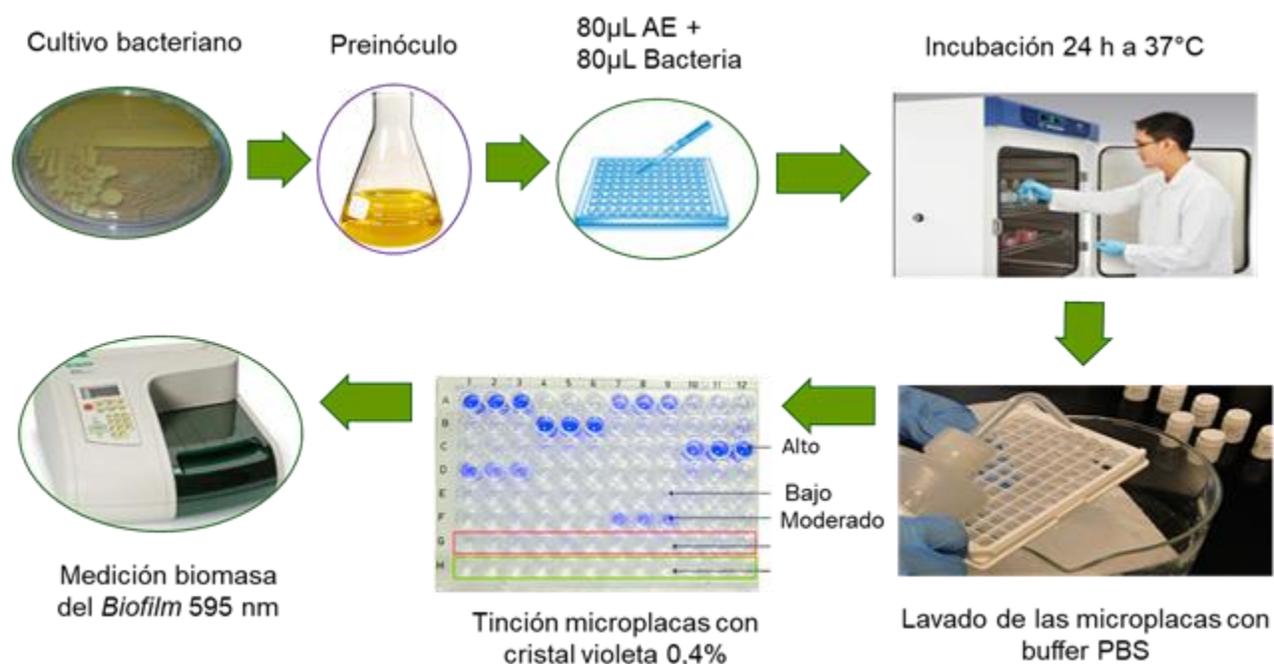
Todas las reacciones y ensayos de actividad *antibiofilm* fueron realizados empleando agua MilliQ de resistividad 18.2  $\Omega$ , extraída del equipo de laboratorio Smart2 Pure de Thermo Scientific (Helsinki, Finlandia).

### 3.2.2 Métodos

Para realizar la evaluación de la actividad antibiofilm *In vitro* de diferentes AE de plantas aromáticas, en cultivos de *E. coli* O157:H7 y *Salmonella enterica* Ser Enteritidis ATCC 13076, se utilizó la metodología desarrollada por O'Toole con algunas modificaciones (O'Toole 2011), descrita en la **Figura 12**.

**Figura 12**

*Metodología para la determinación de la actividad antibiofilm de los aceites*



**3.2.2.1. Determinación de la actividad antibiofilm *In vitro*.** La evaluación de la actividad antibiofilm *In vitro* de los AE frente a *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 se llevó a cabo de acuerdo con el método de tinción en cristal violeta desarrollado por O'Toole, con algunas modificaciones (O'Toole, 2010). Los ensayos experimentales de inhibición del biofilm se realizaron utilizando microplacas de cloruro de polivinilo (PVC) de 96 pozos con fondo redondo.

Para determinar la actividad antibiofilm de los AE frente a *E. coli* O157:H7, se preparó un preinóculo del microorganismo en caldo LB durante 12 h a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una concentración bacteriana de  $10^5$  -  $10^6$  UFC/mL. Para el caso de *Salmonella* Enteritidis ATCC13076, se mantuvieron las mismas condiciones de cultivo mencionadas anteriormente; la única modificación fue el uso del medio de cultivo M63 enriquecido con casaminoácidos, en lugar de LB. Posteriormente, 80 µL del inóculo bacteriano respectivo fueron adicionados a la microplaca de PVC junto con AE (80 µL) a concentraciones subinhibitorias (subCMI) de las obtenidas con cada AE frente a *E. coli* O157:H7 y *S. Enteritidis* ATCC 13076 (Véase capítulo 2). El microorganismo creciendo en ausencia de AE se utilizó como control negativo de inhibición. Las microplacas fueron incubadas a 37 °C por 24 h sin agitación. Luego, las microplacas se lavaron tres veces con *buffer* fosfato pH 7 con el fin de remover las células planctónicas. Seguidamente, 160 µL de cristal violeta al 0.4% fue adicionado a cada uno de los pozos durante 15 min. El exceso de cristal violeta se retiró realizando tres lavados consecutivos con *buffer* fosfato pH 7 y se agregaron 160 µL de ácido acético al 30%, para remover el colorante adherido. El contenido de cada pozo fue transferido a una nueva microplaca de fondo plano para cuantificar la absorbancia utilizando una longitud de onda  $\lambda = 595$  nm en un lector de microplaca ELISA (Biorad, imarck).

El porcentaje de inhibición de la formación del *biofilm* se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de Inhibición} = \frac{\text{Abs control positivo} - \text{Abs experimental}}{\text{Abs control positivo}} \times 100$$

La cuantificación de las células del *biofilm* se realizó mediante recuento en placa. Para esto, se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de un cultivo bacteriano *overnight* diluido 1:10 ( $\sim 1 \times 10^8$  UFC/mL) en medio fresco a una microplaca que contenía 100  $\mu\text{L}$  de AE en concentraciones subinhibitorias. Las microplacas se incubaron durante 24 h a 37 °C. Trascurrido el tiempo, las células planctónicas se eliminaron, se lavó la microplaca con *buffer* fosfato 1 mM pH 7. Luego, se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de *buffer* fosfato 1 mM pH 7 y se removió el *biofilm* utilizando espátulas estériles. El recuento de placas se realizó en medios de cultivo Müller-Hinton (MH) mediante diluciones seriadas. Las placas se incubaron durante 12 h a 37 °C. Posteriormente, se realizó el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC/mL) (Kart, Yabanoglu and Nemutlu, 2020).

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) para comparar entre los grupos tratados y sin tratar con el AE. Las diferencias con un valor de  $p < 0.05$  fueron considerados como significativos.

**3.2.2.2. Evaluación del efecto de LTC II sobre *E. coli* O157:H7 y *S. Enteritidis* ATCC 13076 mediante análisis de microscopia electrónica de barrido.** Para visualizar el efecto del AE sobre *S. Enteritidis* ATCC 13076 y *E. coli* O157:H7 se realizó un análisis por

microscopia electrónica de barrido (SEM). El *biofilm* fue formado en cupones de vidrio de 1x1.5 cm durante 24 h a 37 °C. Para esto, se agregó el inóculo bacteriano  $\sim 10^5$ - $10^6$  UFC/mL a un vial que contenía los cupones de vidrio esmerilado, medio de cultivo y el AE en concentraciones subinhibitorias. Los cupones fueron lavados tres veces con *buffer* fosfato 0.1 mM pH 7, para eliminar las células planctónicas. El proceso de fijación de la muestra se realizó con glutaraldehído al 2.5% (v/v) por 60 min, y la deshidratación, con un gradiente de isopropanol [10-95% (v/v)] por 10 min a temperatura ambiente (Fischer *et al.*, 2013). Finalmente, los cupones fueron observados en un microscopio electrónico Quanta 650 FEG (FEI), y se tomaron las micrografías en un detector de imágenes Everhart Thornley detector ETD.

### 3.3. Resultados y discusión

#### 3.3.1. Determinación de la actividad antibiofilm *in vitro* de aceites esenciales frente a *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* entérica Ser Enteritidis

La evaluación de la actividad antibiofilm de los 17 AE se realizó sobre las bacterias *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* Enteritidis ATCC13076. Se utilizaron concentraciones subinhibitorias para evaluar cada AE (véase capítulo 2), garantizando que se estaba inhibiendo el *biofilm* y no el crecimiento bacteriano planctónico. Los resultados obtenidos del efecto inhibitorio del *biofilm* de los AE se presentan en la **Tabla 6**.

**Tabla 6**

*Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del biofilm (CMIB) de los AE evaluados frente a Escherichia coli O157:H7 y Salmonella Enteritidis ATCC 13076.*

Código	Aceite esencial	<i>E. coli</i> O157:H7		<i>S. Enteritidis</i>	
		CMIB (mg/mL)	INHIBICIÓN (%)	CMIB (mg/mL)	INHIBICIÓN (%)
LACA	<i>Lippia alba</i> (carvona)	3	10.80	3	12.50
LACI	<i>L. alba</i> (citral)	3	7.80	3	9.60
CN	<i>Cymbopogon nardus</i>	3	17.3	3	8.70
CM	<i>C. martini</i>	1.5	52.4	0.5	62.5
CF	<i>C. flexuosus</i>	3	24.7	3	14.10
LTC I	<i>L. origanoides</i> (timol-carvacrol I)	0.37	68.4	0.37	61.3
LTC II	<i>L. origanoides</i> (timol-carvacrol II)	<b>0.19</b>	<b>75.3</b>	<b>0.19</b>	<b>65.6</b>
LOF	<i>L. origanoides</i> (felandreno)	3	25.1	1.5	64.3
RO	<i>Rosmarinus officinalis</i>	3	29.4	3	13.6
SO	<i>Salvia officinalis</i>	3	23.4	3	5.60
SG	<i>Swinglea glutinosa</i>	3	16.9	3	8.40
TL	<i>Tagetes lucida</i>	1.5	45.9	1.5	67.0
TV	<i>Thymus vulgaris</i>	0.37	71.0	0.37	64.5
SV	<i>Satureja viminea</i>	3	17.7	3	5.90
CO	<i>Cananga odorata</i>	3	8.70	3	8.50
CS	<i>Citrus sinensis</i>	3	28.1	3	23.8
EC	<i>Elettaria cardamomum</i>	3	40.7	3	35.9

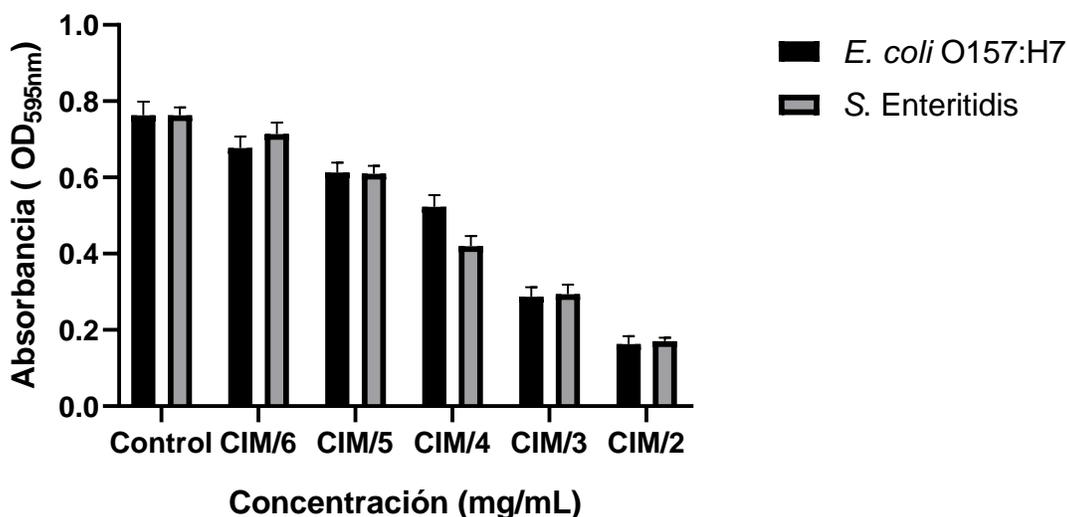
Los mejores resultados se obtuvieron con el AE de *Lippia origanoides*, quimiotipo Timol-Carvacrol II (LTC II), el cual presentó la mayor actividad inhibitoria del *biofilm* de *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 a una concentración de 0.19 mg/mL. Además

del AE de LTC II, los AE de *L. origanoides* quimiotipo Timol-Carvacrol I (LTC I), *Thymus vulgaris* (TV), *Cymbopogon martini* (CM), *L. origanoides*, quimiotipo felandreno (LOF) y *Tagetes lucida* (TL) presentaron porcentajes de inhibición del *biofilm* mayores de 50% frente a las bacterias del estudio a las concentraciones evaluadas.

La inhibición del *biofilm* a concentraciones subinhibitorias fue directamente proporcional a la concentración evaluada en cada uno de los microorganismos, como se muestra en la **Figura 13**.

**Figura 13**

*Actividad inhibitoria del biofilm del AE de LTC II a diferentes concentraciones subinhibitorias contra E. coli O157:H7 (barras negras) y S. Enteritidis ATCC 13076 (barras grises)*



Los resultados obtenidos con LTC II se deben a que este fue el AE con mayor contenido de timol y carvacrol (51.5%). Entre los efectos inhibitorios del *biofilm* asociados a estos dos componentes se destacan los siguientes: inhibición del *quorum sensing*, lo cual disminuye la expresión de factores de virulencia y la adherencia bacteriana a diferentes superficies (Burt,

Victoria T A Ojo-Fakunle, *et al.*, 2014), actividad inhibitoria de la ATPasa que ocasiona un colapso de la fuerza motriz de protones y una disminución de energía en forma de ATP y bloqueo del flujo de sustancias de la célula en *S. Enteritidis* de manera dependiente a la concentración de timol y carvacrol (Miladi *et al.*, 2016). Sin embargo, los componentes presentes en menor cantidad también tienen actividad biológica demostrada (Agulló *et al.*, 2017; Azizan *et al.*, 2017; Lagha *et al.*, 2019). Debido a lo anterior, se han llevado a cabo investigaciones para evaluar el efecto sinérgico en la inhibición del *biofilm* de estos componentes entre sí y frente a antibióticos convencionales; Miladi *et al* demostraron el efecto sinérgico del timol, carvacrol, eugenol,  $\rho$ -cimeno y  $\gamma$ -terpineno en combinación con la tetraciclina para inhibir el *biofilm* de patógenos orales, tales como *S. aureus*, *S. mutans*, *S. constelatus*, y *E. faecium* (Miladi *et al.*, 2017). Veras *et al.*,(2012), evaluaron el efecto sinérgico entre el timol con el carvacrol, *trans*- $\beta$ -cariofileno,  $\rho$ -cimeno y 1,8-cineol, frente a patógenos Gram positivos, y observaron un incremento en su actividad biológica (Veras *et al.*, 2012). Jamali *et al.* (2017), demostraron que la combinación de los AE de *Thymus leptobotrys*, *T. ciliatus* y *T. pallidus*, ricos en carvacrol, timol,  $\rho$ -cimeno y  $\gamma$ -terpineno combinados con el antibiótico cefixima tenían efecto sinérgico frente a *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* y *Bacillus cereus* (Alaoui Jamali *et al.*, 2017).

La actividad *antibiofilm* de diferentes AE con cantidades relativas altas de timol y carvacrol ha sido evaluada por varios autores. Cabarkapa *et al.* (2019), analizaron el efecto *antibiofilm* de cuatro AE ricos en timol y carvacrol frente a *S. Enteritidis*; los resultados indicaron una relación entre la cantidad de timol y carvacrol en el AE y la actividad inhibitoria del *biofilm* de *S. Enteritidis*, de tal manera, que el AE de *Origanum heracleoticum* con 71.6% de timol-carvacrol, presentó la mayor actividad *antibiofilm*, con una CMIB de 0.039 mg/mL,

seguido de *O. vulgare* (63.6% timol-carvacrol) con una CMIB de 0.078 mg/mL, el AE de *Thymus vulgaris* (60.0% timol-carvacrol) presentó una CMIB de 0.15 mg/mL; la menor actividad inhibitoria del *biofilm* la presentó el AE de *T. serpyllum* (40.4% timol-carvacrol) con una CMIB de 0.31 mg/mL (Čabarkapa *et al.*, 2019). Estos resultados se correlacionan con las CMIB obtenidas en el presente estudio, debido a que el AE de LTC II, con una cantidad de timol-carvacrol más alta (51.5%) presentó la mayor actividad antibiofilm (CMIB de 0.19 mg/mL), en comparación con el AE de LTC I, (CMIB, 32.8 mg/mL). Es importante aclarar que el mecanismo de acción específico de cada uno de los AE con actividad antibiofilm no ha sido totalmente dilucidado.

Otro de los AE que presentaron una importante actividad antibiofilm frente a *E. coli* O157:H7 y *S. Enteritidis* ATCC 13076 fue LTC I, el cual redujo la formación del *biofilm* de estos dos microorganismos en más del 61%, a una CMIB de 0.37 mg/mL. Es importante destacar, que el timol y el carvacrol representan los componentes mayoritarios de este AE, con una cantidad relativa conjunta de 32.8%. Las actividades antibiofilm de estos dos componentes ya han sido ampliamente reportadas en la literatura (Khan *et al.*, 2017; Kissels, Wu y Santos, 2017; Memar *et al.*, 2017; Marchese *et al.*, 2018; Trevisan *et al.*, 2018; Kachur and Suntres, 2019; Walsh *et al.*, 2019). Debido a lo anterior, se puede inferir que la actividad reportada por el AE de LTC I se correlaciona en gran medida con su concentración de timol y carvacrol; no obstante, el *trans*- $\beta$ -cariofileno, metil timil éter, acetato de timilo y *p*-cimeno han sido encontrados como componentes en AE que exhiben actividad antibiofilm frente a diversos microorganismos (Chang *et al.*, 2013; Agulló *et al.*, 2017; Azizan *et al.*, 2017; Jardak *et al.*, 2017), lo cual sugiere que la presencia de estos componentes en LTC I pueden tener un efecto

relevante en la actividad biológica evaluada.

Entre los estudios realizados sobre el orégano, se destaca el de Zapién-Chavarría *et al.*, quienes analizaron el efecto del orégano mexicano sobre la formación del *biofilm* de diferentes aislados clínicos de *E. coli*. En total, evaluaron tres AE de orégano: dos quimiotipos de *Lippia berlandieri* y uno de *Polimntha longiflora*; estos AE difieren en sus proporciones de timol y carvacrol. Sin embargo, los tres AE exhibieron una CMIB de 0.5 mg/mL (Zapién-Chavarría *et al.*, 2019). Esta concentración fue superior a la obtenida en nuestro estudio con el AE de LTC I (CMIB de 0.37 mg/mL frente a *E. coli* O157:H7).

Con relación a la inhibición del *biofilm* de *Salmonella*, Soni *et al.* (2013), evaluaron el efecto del AE de orégano sobre superficies que contenían *biofilms* de *Salmonella* Typhimurium, los resultados indicaron que a concentraciones comprendidas entre 0.25 y 0.5 mg/mL se presentaron reducciones del *biofilm* mayores del 60% (Soni *et al.*, 2013); este resultado es similar al obtenido en esta investigación, en la cual se obtuvo una CMIB de 0.37 mg/mL.

Entre los AE que presentaron actividad inhibitoria del *biofilm* sobre *E. coli* O157:H7 y *S. Enteritidis* ATCC 13076 se encuentra el AE de *Thymus vulgaris*, que presentó una CMIB de 0.37 mg/mL frente a los dos microorganismos, con reducciones mayores del 64%. El posible mecanismo de inhibición del *biofilm* del AE de *Thymus vulgaris* se ha asociado con cambios en la estructura de la membrana y la pared bacteriana, debido a la alteración de la permeabilidad y respiración celular, fuga de potasio de las células, efectos sobre el potencial de membrana, cambios en el gradiente de pH y producción de ATP (O'Bryan *et al.*, 2015).

En un estudio realizado por Flores-encarnación *et al.* (2018), se determinó el efecto

antibiofilm del AE de *Thymus vulgaris* frente a *E. coli* uropatógena; la inhibición reportada se asoció con la disminución en la producción de exopolisacárido del microorganismo, se alcanzó una CMIB de 0.4 mg/mL (Flores-Encarnacion *et al.*, 2018). Kerekes *et al.* en 2019 evaluaron la actividad inhibitoria del biofilm de *E. coli*, utilizando el AE de *Thymus vulgaris* y su principal componente timol; los resultados reportados mostraron una CMIB de 0.34 mg/mL, para el AE, y una CMIB de 0.14 mg/mL, para el timol (Kerekes *et al.*, 2019). Los resultados de los estudios anteriores son similares a los obtenidos en este estudio frente a la inhibición del biofilm de *E. coli*, en el cual se alcanzó una CMIB de 0.37 mg/mL. Otras investigaciones han evaluado el efecto de extractos de *Thymus vulgaris* sobre la formación del biofilm de *E. coli*, reportando CMIB superiores a 5 mg/mL, que son 10 veces más altas que las publicadas para los AE (Gonçalves, Bottaro and Nilson, 2011; Mohsenipour and Hassanshahian, 2015).

Referente a la inhibición de la formación del biofilm de *S. Enteritidis* por el AE de *Thymus vulgaris*, Cabarkapa *et al.*, reportaron una CMIB de 0.078 mg/mL con una reducción en la formación del biofilm superior del 60% (Cabarkapa *et al.*, 2015); concentración inferior al reportado en el presente estudio. Los resultados obtenidos por Cabarkapa *et al.*, se relacionan con la composición del AE, debido a la ausencia de componentes con actividad antibiofilm como el carvacrol, el cual hace parte de los componentes mayoritarios de los AE con mayor actividad inhibitoria del biofilm de la presente investigación (Trevisan *et al.*, 2018).

Entre los AE de los cuáles no existen publicaciones sobre su actividad antibiofilm frente a *S. Enteritidis*, se destaca el de *L. origanoides* quimiotipo, felandreno (LOF), que a una CMIB de 1.5 mg/mL, inhibió el 64.3% del biofilm de *S. Enteritidis*. Este AE no presenta un componente mayoritario con una cantidad relativa superior al 12%, lo cual permite sugerir que la actividad

biológica obtenida tiene más relación con el efecto combinatorio de todos sus componentes, que con la acción del componente mayoritario. Entre los componentes del AE de LOF se encuentran el 1,8-cineol (11.6%), *trans*- $\beta$ -cariofileno (10.4%),  $\alpha$ -humuleno (6.2%), *p*-cimeno (5.7%) y  $\alpha$ -felandreno (5.7%) (**Tabla 3**).

Referente al *trans*- $\beta$ -cariofileno, además de estar presente en el AE de LOF, es un componente de ocho de los AE estudiados, como se muestra en la **Tabla 3** del presente estudio, incluyendo los AE de *Thymus vulgaris*, LTC I y II, con la mayor actividad inhibitoria sobre el *biofilm* de *E. coli* O157:H7 y *S. Enteritidis*; sin embargo, en su cantidad relativa no supera el 10%, a diferencia de AE de *Swinglea glutinosa*, que presenta una cantidad relativa de 36.6%. Sin embargo, el AE presenta reducciones muy bajas en la inhibición de la formación del *biofilm* del 17% de *E. coli* O157:H7 y *S. Enteritidis*.

En este sentido, la actividad inhibitoria del *trans*- $\beta$ -cariofileno sobre el *biofilm* de bacterias Gram negativas fue reportado por Azizan *et al.*, en 2017. En su investigación, se demostró la inhibición de los patógenos Gram negativos *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* utilizando una CMIB de 1.25 mg/mL para los tres patógenos (Azizan *et al.*, 2017). Aunque no existen estudios sobre la actividad específica del *trans*- $\beta$ -cariofileno sobre el *biofilm* de las bacterias analizadas en el estudio, se puede inferir que este componente presenta algún efecto sobre la estructura de las bacterias Gram negativas.

Por otra parte, el  $\alpha$ -felandreno representa el componente menos estudiado entre los encontrados en el AE de LOF, no se han documentado estudios sobre su actividad antibacteriana ni *antibiofilm* de la molécula individual, lo anterior puede deberse a que no supera el 1% de

cantidad relativa en la mayoría de los AE en los cuales se ha reportado su presencia (Bazargani y Rohloff, 2016).

A diferencia del  $\alpha$ -felandreno, el  $\rho$ -cimeno representa uno de los componentes más comunes entre los AE con actividad biológica demostrada (Swamy, Akhtar y Sinniah, 2016; Peng *et al.*, 2018; Bouyahya *et al.*, 2019; Lagha *et al.*, 2019). Entre los efectos biológicos de los AE que contienen  $\rho$ -cimeno se destacan la acción antimicrobiana (Yang, Chao y Liu, 2014; Mitropoulou *et al.*, 2015), antifúngica (Kedia *et al.*, 2014; Aznar *et al.*, 2015), *antibiofilm* (Agulló *et al.*, 2017) y antiinflamatoria (Conte *et al.*, 2017). El posible mecanismo de acción de este componente, que representa el 5.7% del AE de LOF, se ha asociado con reducción en el potencial de membrana y perturbación de la bicapa lipídica (Marchese *et al.*, 2017). Sin embargo, la actividad biológica del  $\rho$ -cimeno como molécula independiente es baja en comparación con los fenoles monoterpénicos timol y carvacrol (Cristani *et al.*, 2007). Miladi *et al.* (2017), demostraron el efecto sinérgico entre el  $\rho$ -cimeno y la tetraciclina en la inhibición del *biofilm* de *S. aureus*, obteniendo una CMIB de 4  $\mu\text{g/mL}$  (Miladi *et al.*, 2017). Con base en lo anterior, se puede inferir que la combinación entre las actividades biológicas de los componentes de LOF da como resultado la actividad *antibiofilm* sobre *S. Enteritidis*, hasta el momento no reportada en la literatura.

Otro AE que tuvo efecto inhibitorio sobre la formación del *biofilm* de *S. Enteritidis* fue el extraído de *Cymbopogon martini*, con reducción en la formación del *biofilm* en 62.5% a una concentración de 0.5 mg/mL. Este AE tiene geraniol como su componente mayoritario a una cantidad relativa de 38.7%.

El geraniol ( $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$ ) es un monoterpénol alifático, su presencia ha sido documentada en

los AE de *Cymbopogon martini* (Kakaraparthi *et al.*, 2015), *Pelargonium graveolans* (Essid *et al.*, 2017), *Rosa damascena*, *Rosa centifolia* (Labadie *et al.*, 2015) y *C. nardus* (De Toledo *et al.*, 2016). Diferentes estudios han demostrado la actividad antimicrobiana del geraniol frente a cepas de *E. coli*, obteniendo CMI entre 0.6 mg/mL y 1.38 mg/mL (Ilić *et al.*, 2014; Tomadoni *et al.*, 2015; Guimarães *et al.*, 2019); también se ha documentado el efecto antibacteriano del geraniol sobre *S. Enteritidis* a una CIM de 2.8 mg/mL (Ilić *et al.*, 2014). Sin embargo, aún no se ha publicado en la literatura el efecto del geraniol frente al *biofilm* de *E. coli* y *S. Enteritidis*, ni tampoco el efecto inhibitorio del *biofilm* del AE de *C. martini* contra estos dos microorganismos, lo cual evidencia la pertinencia del presente estudio en la búsqueda de nuevos candidatos con efecto antibiofilm sobre bacterias patógenas.

El efecto del geraniol sobre la formación del *biofilm* se ha investigado en modelos bacterianos Gram positivos como *S. aureus* y *S. epidermidis*, con reducciones del 99% a una concentración de 1 mg/mL en el caso de *S. aureus*, e inhibiciones del *biofilm* del 93% a concentraciones de 0.25 mg/mL frente a *S. epidermidis* (Kannappan *et al.*, 2017; Pontes *et al.*, 2019). Se ha determinado el efecto antibacteriano de este monoterpenol en combinación con diferentes antibióticos; Rosato *et al.* (2007), evaluaron la interacción entre el geraniol y la norfloxacina sobre la actividad antimicrobiana frente a *B. cereus* y *S. aureus*, demostrando la existencia de un efecto sinérgico en esta combinación (Rosato *et al.*, 2007). Adicionalmente, Ilić *et al.* (2014), también han reportado el efecto sinérgico del geraniol en combinación con cloranfenicol contra los bacilos Gramnegativos *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* y *K. pneumoniae* (Ilić *et al.*, 2014). Lo anterior sugiere la necesidad de realizar ensayos de actividad sinérgica entre el AE de *C. martini* y diferentes antibióticos, con el propósito de mejorar las

actividades biológicas demostradas.

Según los resultados presentados en la **Tabla 6**, la cantidad relativa de geraniol en el AE se encuentra directamente relacionada con la actividad *antibiofilm* frente a *S. Enteritidis*. Lo anterior se evidencia debido a que el AE de *C. martini* presentó la mayor cantidad relativa de eugenol (38.7%) y fue el único que exhibió propiedades *antibiofilm*; a diferencia de los AE con menor cantidad relativa de geraniol, como los AE de *C. nardus* (17.8%), *C. flexuosus* (7.9%) y *Lippia alba* quimiotipo citral (6.1%), que redujeron *biofilm* en menos del 15% a la mayor concentración evaluada (3 mg/mL). Los demás componentes presentes en el AE de *C. martini*, también han exhibido actividad *antibiofilm*; Prakash *et al.* (2019), determinaron la actividad *antibiofilm* sobre *S. Typhimurium* del linalol encapsulado en nanoemulsiones (Prakash *et al.*, 2019); en otro estudio realizado por Kacaniova *et al.* (2020), se demostró el efecto inhibitorio sobre el *biofilm* de *B. subtilis* y *S. maltophiila* del AE de *Coriandrum sativum*, cuyos componentes mayoritarios fueron linalol y acetato de geraniol, que representaron el 72.98% de su composición total (Kačániová *et al.*, 2020).

El análisis de los resultados de actividad *antibiofilm* del AE de *C. martini* permiten inferir que la acción biológica de este AE se debe a la interacción entre sus componentes mayoritarios y minoritarios, entre los cuales se encuentra el geraniol, el linalol y el acetato de geraniol.

La determinación del efecto del AE de *Tagetes lucida* sobre la formación del *biofilm* de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, mostró una reducción de la formación de *biofilm* del 67% a una concentración de 1.5 mg/mL. Los estudios acerca del efecto inhibitorio del *biofilm* de AE y extractos derivados de plantas del género *Tagetes* son muy escasos; entre estos se destaca el trabajo de Romero *et al.* (2016), que evaluaron el efecto de extractos de plantas del género

*Tagetes* sobre el *biofilm* de *Staphylococcus sp*, y obtuvieron una reducción del 60% a una concentración de 50 µg/mL (Romero *et al.*, 2016). Por otra parte, Souza *et al.* (2016), probaron el efecto inhibitorio del AE de *T. erecta* sobre el *biofilm* de *Candida tropicalis*, y reportaron efectos inhibitorios a concentraciones de 0.5 mg/mL (Souza *et al.*, 2016). Los componentes mayoritarios reportados del AE de *Tagetes erecta* son dihidrotagetona, piperitona y terpinoleno (Marotti *et al.*, 2004; Armas *et al.*, 2012), los cuales difieren de los obtenidos en el AE de *T. lucida*, los cuales fueron estragol y β-mirceno.

El efecto inhibitorio del AE de *T. lucida* sobre el *biofilm* de *Salmonella* Enteritidis no ha sido reportado en la literatura científica, lo cual demuestra que, aunque en los últimos años se han incrementado las investigaciones sobre actividad biológica de compuestos naturales, aún existen efectos biológicos de diferentes compuestos vegetales por descubrir. La actividad biológica obtenida del AE de *T. lucida* puede ser producto de la interacción de sus componentes principales estragol (79.9%) y β-mirceno (0.9%). Con referencia a la actividad biológica del estragol, Marotti *et al.* (2004), demostraron el efecto antimicrobiano limitado del estragol sobre cepas bacterianas de *S. sonnei* y *S. flexneri* (Marotti *et al.*, 2004). En un estudio posterior, Andrade *et al.* (2015), evaluaron el efecto antimicrobiano del AE de *Croton zehntneri* frente a *S. aureus*, *B. subtilis*, *B.cereus*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*; obtuvieron CMI inferiores a 100 µg/mL, la actividad biológica exhibida se asoció con el efecto de la interacción de sus componentes con el compuesto principal estragol (84.7%) (Andrade *et al.*, 2015). La evaluación de la actividad antimicrobiana del β-mirceno frente a *B. cereus*, *S. Typhimurium*, *S. aureus* y *E. coli* ha permitido determinar que el β-mirceno no posee actividad antimicrobiana por sí sólo, por lo tanto, requiere de la interacción con otros componentes presentes en el AE para ejercer una

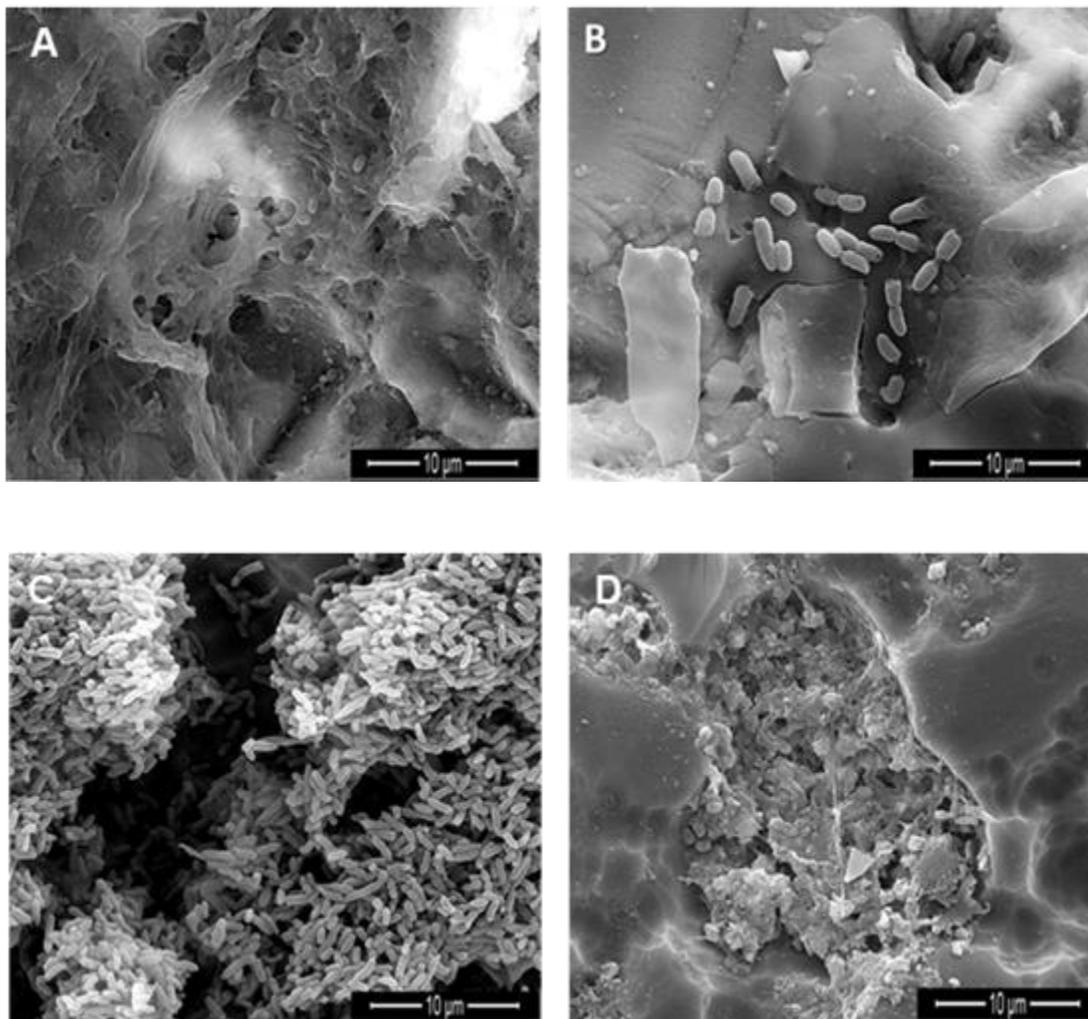
actividad biológica, en este sentido, la inhibición de la formación de *biofilm* de *S. Enteritidis*.

### **3.3.2. Evaluación del efecto de LTC II sobre *E. coli* O157:H7 y *S. Enteritidis* ATCC 13076 mediante Análisis de Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)**

Mediante SEM se analizó el efecto del AE de LTC II sobre la estructura del *biofilm* de *S. Enteritidis* ATCC 13076 y *E. coli* O157:H7. El análisis por SEM permitió identificar las capas del *biofilm* formadas por *S. Enteritidis* ATCC 13076 (**Figura 14 A**) y *E. coli* O157:H7 (**Figura 14 C**) después de crecer durante 24 h sin tratamiento con AE (Control), de igual manera, se observó la interrupción de la actividad celular y de la integridad estructural del *biofilm* de *S. Enteritidis* ATCC 13076 (**Figura 14 B**) y *E. coli* O157:H7 (**Figura 14 D**) a las concentraciones subinhibitorias evaluadas. Los resultados obtenidos se correlacionan con los ensayos de inhibición del *biofilm* reportados anteriormente.

**Figura 14**

Imágenes de SEM de la formación del biofilm de *S. Enteritidis* ATCC 13076 (A), y *E. coli* O157:H7 (C). Interrupción en la formación del biofilm de *S. Enteritidis* ATCC 13076 (B) y *E. coli* O157:H7 (D), después del tratamiento con el AE de LTC II. Las imágenes



Los resultados obtenidos coinciden con los reportados por Oh *et al.* (2017), quienes realizaron un estudio de imágenes por SEM para evaluar el efecto antibiofilm de los AE de orégano y tomillo sobre *E. coli* y *Salmonella spp.* Los resultados permitieron determinar que los AE producen una disminución en las capas del *biofilm* y en la rugosidad del mismo, dando por resultado un *biofilm* delgado y liso con menos densidad bacteria (Oh *et al.*, 2017). Kerekes *et al.*

(2019), evaluaron el efecto de los AE de *Cinnamomum zeylanicum*, *Origanum majorana* y *Thymus vulgaris* sobre la estructura del *biofilm* de bacterias patógenas, entre las cuales se destaca *E. coli*. Los resultados obtenidos por SEM mostraron que la interacción de los AE con *E. coli* produce la desaparición de la estructura tridimensional del *biofilm* incrustada en la matriz de exopolisacárido, dando como resultado estructuras simplificadas con microcolonias bacterianas anexas (Kerekes *et al.*, 2019); estos resultados son congruentes con los obtenidos por SEM en esta investigación.

### 3.4. Conclusiones

- El AE de *L. origanoides* quimiotipo timol-carvacrol II presentó la mayor actividad antibiofilm frente a las bacterias *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella entérica* Ser Enteritidis, con una CMIB de 0.19 mg/mL
- Los AE con mayor actividad antibiofilm se caracterizaron por tener entre sus componentes a monoterpenos con actividad biológica comprobada, tales como carvacrol, timol, *trans*- $\beta$ -cariofileno,  $\gamma$ -terpineno y  $\rho$ -cimeno.
- El AE de LTC II afecta la integridad estructural del exopolisacárido del *biofilm* de *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella entérica* Ser Enteritidis, inhibiendo la arquitectura del *biofilm* y contribuyendo a su erradicación según los resultados de análisis por SEM.

#### **4. Evaluación de la actividad *antiquorum sensing* de aceites esenciales de las familias verbenáceae, poaceae, lamiaceae y asteraceae sobre un modelo bacteriano gram negativo**

##### **4.1. Introducción**

El *quorum sensing* (QS) es un mecanismo de comunicación bacteriana dependiente de la densidad celular, el cual implica la producción de moléculas de señalización extracelular llamadas autoinductores (Castillo-Juárez *et al.*, 2015). El QS no sólo les permite a las bacterias exhibir un comportamiento social, también influye en la patogenicidad y en la expresión de factores de virulencia (Piewngam *et al.*, 2020). La producción de estos factores de virulencia se ha asociado con un incremento en la resistencia bacteriana y un aumento de la competencia genética (Wang, Payne y Bentley, 2020). Entre las bacterias Gram positivas, se ha demostrado que en patógenos tales como *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* y *Enterococcus faecalis*, el QS es el principal responsable de la expresión de factores de virulencia como moléculas de adhesión, hemolisinas, toxinas, fosfolipasas y proteasas (Rutherford y Bassler, 2012; Yu *et al.*, 2017; Paulander *et al.*, 2018; Stępień-Pyśniak *et al.*, 2019). De manera similar, en bacterias Gram negativas como *P. aereginosa* y *Vibrio cholerae*; la producción de factores de virulencia como pirocianina, proteasas, polisacáridos extracelulares, toxinas, ramnolípidos y alginatos son regulados por un complejo mecanismo de QS (Myszka *et al.*, 2016; Newman, Floyd y Fothergill, 2017; Gorelik *et al.*, 2019).

#### 4.1.1. Relación entre *QS* y la formación de *biofilm*

La detección de las acil homoserina lactona (AHL), la activación de los reguladores de respuesta y la amplificación de señales de *QS* conducen a cambios en la expresión génica que pueden afectar muchos procesos celulares, incluidos la formación del *biofilm*. Estos cambios pueden ser notables como los observados en *P. aeruginosa*, donde hasta el 10% del genoma está regulado por *QS* (Lee and Zhang, 2014).

Los cambios estructurales importantes relacionados con la formación del *biofilm*, incluyen la producción de exopolisacáridos (EPS) dirigida por la señalización de cdi-GMP, lo anterior permite una mejor adhesión en la superficie del huésped. Además, la señalización por cdi-GMP se relaciona con la formación de celulosa, alginato, adhesinas y otras moléculas relevantes en la formación del *biofilm* de diferentes bacterias. La señalización por *QS* se ha asociado con un incremento en el cdi-GMP intracelular que promueve el paso del estado planctónico al estado sésil, en gran parte debido a la síntesis de carbohidratos y proteínas estructurales importantes en la constitución de los *biofilms* (Ahmad *et al.*, 2020; Hee *et al.*, 2020).

Se ha documentado también que en algunas especies bacterianas el *QS* es importante para coordinar la disociación del *biofilm* (Roy *et al.*, 2018). La dispersión del *biofilm* es esencial para permitir que las bacterias escapen y colonicen nuevos nichos cuando los nutrientes y otros recursos se vuelven limitados y los productos de desecho se acumulan (Fleming y Rumbaugh, 2018). Existen diferentes estrategias por medio de las cuales puede llevarse a cabo la dispersión

del *biofilm*, entre estas, se destacan la terminación de la síntesis de los compuestos de la matriz, la degradación de la matriz y la interrupción de las interacciones no covalentes entre los componentes de la matriz (Guilhen, Forestier y Balestrino, 2017). Se ha reportado (Solano, Echeverz and Lasa, 2014; Aswathanarayan and Vittal, 2018; Yan and Wu, 2019), que las complejas redes de comunicación del *QS* pueden intervenir en la dispersión del *biofilm* de diferentes bacterias patógenas, entre las cuales se encuentran *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Xanthomonas campestris* y *Staphylococcus aureus*. En la **Tabla 7**, se presentan genes regulados por *QS* asociados con virulencia y formación del *biofilm*.

**Tabla 7**

*Genes de bacterias patógenas asociados con virulencia y formación del biofilm regulados por QS*

<b>Gen</b>	<b>Bacteria</b>	<b>Factores de virulencia</b>	<b>Referencia</b>
<i>CtxA, ctxB</i>	<i>V.cholerae</i>	Enterotoxina colérica	(Zhu <i>et al.</i> , 2002)
<i>HapA</i>	<i>V. cholerae</i>	Proteasa HA	(Zhu <i>et al.</i> , 2002)
<i>FlaA</i>	<i>V. cholerae</i>	Producción de exopolisacárido	(Giacomucci <i>et al.</i> , 2019)
<i>plcR</i>	<i>B. cereus</i>	Enterotoxina, hemolisina, colagenasa, fosfolipasa, proteasa	(Rutherford y Bassler, 2012)
<i>RNAIII</i>	<i>S. aureus</i>	$\delta$ -Hemolisina, $\alpha$ -toxina, fibronectina, coagulasa, proteinasa, lipasa	(Figuroa <i>et al.</i> , 2014)
<i>PhzA-G</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Producción de piocianina	(Lee y Zhang, 2014)
<i>toxA</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Producción de exotoxina	(Nazzaro, Fratianni y Coppola, 2013)
<i>lasA</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Actividad proteasa	(Ahmed <i>et al.</i> , 2019)

<i>lasB</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Actividad elastasa	(Ahmed <i>et al.</i> , 2019)
<i>rhlAB</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Producción de ramnolípidos	(Ahmed <i>et al.</i> , 2019)
<i>LecA</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Producción de lectina	(Lee y Zhang, 2014)

#### 4.1.2. El mecanismo de QS como objetivo terapéutico

Debido a la importancia del QS en la patogénesis microbiana, en la formación de *biofilm* de algunas bacterias y en la resistencia bacteriana a múltiples fármacos en los últimos años, los estudios sobre los mecanismos de QS se han incrementado (Krzyżek, 2019; Paluch *et al.*, 2020; Piewngam *et al.*, 2020), al igual que la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos en la vía de señalización del QS. En este contexto, el bloqueo del QS, constituye una estrategia alternativa para el control de las infecciones bacterianas y sus mecanismos de resistencia asociados.

Una de las maneras de interrumpir el circuito de QS es mediante la destrucción enzimática de la señal del QS, conocida como *quorum quenching* (QQ) (Romero, Acuna y Otero, 2012; Grandclément *et al.*, 2015; Murugayah y Gerth, 2019). Las enzimas del QQ se han estudiado ampliamente en bacterias Gram negativas, los estudios se han dirigido hacia enzimas que degradan las AHL, entre las cuales se destacan las AHL-lactonasas y las AHL-acilasas (Chen *et al.*, 2013; Utari, Vogel y Quax, 2017; Wahjudi *et al.*, 2019). Las AHL-lactonasas escinden el anillo de homoserina lactona presente en las AHL mediante una hidrólisis reversible, lo que hace que la molécula de QS sea incapaz de unirse al regulador transcripcional apropiado y, por lo tanto, atenuar la efectividad de la molécula señal; diversos estudios (Guendouze *et al.*, 2017; Dong *et al.*, 2018), han demostrado que las AHL-lactonasas pueden degradar las señales

de AHL en bacterias Gramnegativas, entre ellas figuran *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, y afectar los fenotipos asociados a virulencia. La acción de las AHL-acilasas permite hidrolizar irreversiblemente el enlace amida entre la cadena acilo y el resto homoserina de la AHL, que ocasiona una liberación de la homoserina lactona y de su correspondiente ácido graso asociado, que no exhibe ninguna actividad de señalización (Utari, Vogel y Quax, 2017). Las AHL-acilasas se han encontrado y caracterizado en diversas bacterias, entre ellas aparecen *Ralstonia erythropolis*, *Shewanella* spp, y *Streptomyces* spp (Chen *et al.*, 2013).

Otro mecanismo para bloquear el QS lo constituye la inhibición de la síntesis de la señal de QS, que puede interferir en la acción de enzimas biosintéticas. Un ejemplo de lo anterior lo constituye el ácido ambuico, un metabolito secundario fúngico que se une e inhibe la actividad enzimática de homólogos de *agrB*, como se ha demostrado en *S. aureus*, *E. faecalis* y *L. innocua*, lo que conduce a una inhibición de los péptidos autoinductores (AIP) (Nakayama *et al.*, 2009; Vadakkan *et al.*, 2018). En bacterias Gram negativas, se ha documentado la acción de la sinefungina y la S-adenosil-L-metionina, análogos de la S-adenosilhomocisteína y S-adenosilcisteína, que pueden disminuir la síntesis de AHL, produciendo la inhibición de la actividad de *rhII* en *P. aeruginosa* (Fleitas Martínez *et al.*, 2018; Kalia *et al.*, 2019).

Otro posible blanco de acción para inhibir el QS está relacionado con el bloqueo del receptor de QS y la transducción de la señal; la mayoría de los inhibidores de QS están dirigidos a la interacción de la señal con su receptor por un modo competitivo o no competitivo (Jiang *et al.*, 2019). Las furanonas, las primeras moléculas con capacidad inhibitoria del QS fueron sobre las cuales se pensaba inicialmente que funcionaban de manera competitiva, luego, se descubrió que las furanonas actúan bloqueando la señal de LuxR, lo cual conduce a la inhibición de la

expresión de factores de virulencia, aumento de la susceptibilidad del *biofilm* a la acción de los antibióticos e incremento de la eliminación de *P. aeruginosa* en modelos agudos de infección pulmonar (Manefield *et al.*, 2002; Rémy *et al.*, 2018). Además de las furanonas, los derivados de flavonoides y el éster bencílico de N-decanoil-L-homoserina también han sido asociados con inhibición del QS de bacterias Gram negativas y disminución en la expresión de genes de virulencia (Yang *et al.*, 2012; Paczkowski *et al.*, 2017). Referente a la inhibición del QS en bacterias Gram positivas, es importante resaltar que aquellas, clínicamente importantes, tienen el sistema de QS dependiente de Agr, por lo tanto, la mayoría de los fármacos inhibidores del QS en bacterias Gram positivas se dirigen hacia Agr y, específicamente, al receptor AgrC o al regulador de respuesta AgrA, la mayoría de los cuales funcionan como inhibidores competitivos de la unión de AIP a AgrC (Gray, Hall y Gresham, 2013; Banerjee y Ray, 2017; Khan *et al.*, 2018).

#### 4.1.3. Inhibidores del QS

Para seleccionar inhibidores del QS efectivos, se ha propuesto que deben cumplir con los siguientes criterios: (a) ser moléculas pequeñas con la capacidad de reducir la expresión génica dependiente de QS, (b) ser altamente específicos para un regulador de QS sin efectos adversos sobre la bacteria o el huésped, (c) ser químicamente estables y resistentes a la degradación por diversos sistemas metabólicos del huésped y (d) ser estructuralmente más largos que el AHL nativo (Vattem *et al.*, 2007; Kalia, 2013; Brackman y Coenye, 2014). Se ha descrito que las anteriores características disminuyen notoriamente las posibilidades de que las bacterias se

vuelvan resistentes a dichas moléculas, que generalmente ejercen presión de selección durante el tratamiento de las infecciones, además, es poco probable que estos compuestos afecten la población de bacterias beneficiosas presentes en el huésped (Rasmussen *et al.*, 2005; Zhao, Yu y Ding, 2020).

Los inhibidores del *QS* pueden ser sintéticos o naturales; los inhibidores sintéticos se basan principalmente en moléculas sintetizadas que son análogas o tienen modificaciones en autoinductores y moléculas implicadas en el *QS*. Entre los análogos de señal se destaca el antranilato de metilo, que reprime la producción de la señal de quinolonas de *Pseudomonas* (PQS) y, por lo tanto, se reduce la síntesis de elastasa sin afectar el crecimiento de *Pseudomonas*; un efecto similar se ha demostrado recientemente en *Aeromonas sobria* (Papenfort, Bassler y Chase, 2017; Li *et al.*, 2020). Otros inhibidores sintéticos modifican la cadena lateral de AHL, entre estos, se destacan aquellas moléculas sintéticas que reemplazan el enlace carboxamida, por un enlace sulfonamida, lo que resulta en la inhibición de la bioluminiscencia de *V. fischeri* (Castang *et al.*, 2004). Los inhibidores sintéticos presentan otros mecanismos de acción para bloquear el *QS* de diferentes bacterias patógenas, entre los cuales se encuentra su función como antagonistas de las interacciones entre ligando-receptor o actuar como análogos del alquilo de 2,3-dihidroxi-pentadiona (DPD), bloquear sensores de histidina unidos a la membrana quinasa mediante la señal *QseC*, lo cual permite inactivar genes de virulencia y modificar la señal AIP II para inhibir la virulencia dependiente de *Agr* en *S. aureus* (Lowery *et al.*, 2013; Papenfort, Bassler y Chase, 2017; Rémy *et al.*, 2018; Rodríguez-López *et al.*, 2019).

Los inhibidores naturales del *QS* pueden ser de origen procariota. En este caso se utilizan principalmente cuatro tipos de enzimas para degradar la señal de *QS*; las lactonasas de AHL y las

decarboxilasas asociadas con la hidrólisis del anillo de lactona, y las acilasas de AHL y desaminasas relacionadas con el corte de la cadena lateral de acilo (Polkade *et al.*, 2016; Dessaux y Faure, 2018). Entre estas enzimas las acilasas de AHL son las más estudiadas, descubiertas en *Ralstonia* sp y *P. aeruginosa* PAO1, que comparten un 39% de la identidad a nivel de aminoácidos; y las lactonasas de AHL, encontradas en diferentes especies del género *Bacillus*, como *B. cereus*, *B. subtilis* y *B. thuringiensis*, asociadas con una alta especificidad sobre residuos de lactona de 4 y 12 átomos de carbono (Chen *et al.*, 2009; Sari, Rusmana y Akhdiya, 2016; Utari *et al.*, 2018; Raafat, Ali-Tammam y Ali, 2019).

Los inhibidores naturales también han sido identificados en animales, que producen enzimas relacionadas con *QQ*; entre ellas se destacan ratones, peces cebra y cerdos que poseen acilasas que bloquean las señales de *QS* dependiente de hexanoil-homoserina lactona (C6-HSL) y 3-oxo-dodecanoil homoserina lactona (3OC-12HSL) presentes en *A. hydrophila* y *P. putida* (Rémy *et al.*, 2018; Murugayah y Gerth, 2019). Se han documentado también inhibidores naturales relacionados con hongos, entre estos, se encuentran moléculas inhibitoras de la señal de *QS* en *P. aeruginosa* y *S. Typhi* como la patulina y el ácido penicílico producido por *Penicillium* spp; también, se ha reportado que los pigmentos elaborados por el hongo *Auricularia auricular* inhiben la producción de violaceína en *C. violaceum* (Zhu, He and Chu, 2011; Vijayababu *et al.*, 2018; Ghosh, Das y Mallik, 2019).

Entre los inhibidores naturales más estudiados se destacan los derivados de plantas. Se ha demostrado que los extractos de plantas inhiben el *QS* debido principalmente a su similitud estructural con algunas señales relacionadas con el mecanismo de *QS*, tales como las AHL; también ha sido reportada la capacidad de los compuestos vegetales para degradar las señales de

los receptores LuxR/LuxS (Teplitski, Mathesius y Rumbaugh, 2011; Bouyahya *et al.*, 2017; Asfour, 2018). Se ha publicado el efecto de la *Curcuma longa* y su compuesto mayoritario, la curcumina, asociada con inhibición de la expresión de genes de virulencia en *P. aeruginosa* PAO1 (Bahari *et al.*, 2017).

Otros compuestos vegetales destacados con actividad inhibitoria del QS son los flavonoides quercetina y naringenina, que tienen la capacidad de inhibir la bioluminiscencia de la bacteria *V. harveyi*, asociada con regulación dependiente de QS (Vikram *et al.*, 2010). Gopu *et al.*, estudiaron en 2016 que la antocianina-cianidina inhibía significativamente fenotipos dependientes de QS como la formación de *biofilm* (72.43%), producción de violaceína (73.96%) y producción de EPS (68.65%) en el patógeno oportunista *Klebsiella pneumoniae*, de una manera dependiente de su concentración (Gopu y Shetty, 2016).

Entre los inhibidores del QS de origen vegetal se destacan los AE que se conocen principalmente por su aplicación en medicina tradicional, en la Industria alimentaria y por sus efectos antimicrobianos, antioxidantes y anticarcinógenos (Luciardi *et al.*, 2020); sus componentes son ampliamente aceptados como aditivos alimentarios debido a su naturaleza biodegradable (Stevanović *et al.*, 2018). Entre los AE que han exhibido actividad inhibitoria del QS se encuentran *Lippia origanoides*, *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*, *Elettaria cardamomum*, *Citrus clementina*, entre otros (Cervantes-Ceballos, Caballero-Gallardo y Olivero-Verbel, 2015; Abdullah *et al.*, 2017; Poli *et al.*, 2018; Camele *et al.*, 2019). En la **Tabla 8** se muestran AE con actividad inhibitoria del QS frente a diferentes microorganismos.

**Tabla 8**

*Aceites esenciales con actividad inhibitoria del quorum sensing frente a diferentes microorganismos*

<b>Aceite esencial</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>CMIQ (mg/mL)</b>	<b>Referencias</b>
<i>Mentha suaveolens</i>	<i>C. violaceum</i>	0.10	(Poli <i>et al.</i> , 2018)
<i>Eucaliptus polybractea</i>	<i>C. violaceum</i>	0.05	(Poli <i>et al.</i> , 2018)
<i>Citrus clementina</i>	<i>C. violaceum</i>	0.4	(Poli <i>et al.</i> , 2018)
<i>C. limon</i>	<i>C. violaceum</i>	0.4	(Poli <i>et al.</i> , 2018)
<i>Helychrisun italicum</i>	<i>C. violaceum</i>	0.8	(Poli <i>et al.</i> , 2018)
<i>C. paradisi</i>	<i>P. aeruginosa</i>	0.1	(Luciardi <i>et al.</i> , 2020)
<i>E. radiata</i>	<i>C. violaceum</i>	0,5	(Luís <i>et al.</i> , 2016)
<i>E. globulus</i>	<i>C. violaceum</i>	1	(Luís <i>et al.</i> , 2016)
<i>Ferula asafoetida</i>	<i>P. aeruginosa</i>	0.02	(Sepahi <i>et al.</i> , 2015)
<i>Dorema aucheri</i>	<i>P. aeruginosa</i>	0.02	(Sepahi <i>et al.</i> , 2015)
<i>Carum copticum</i>	<i>C. violaceum</i>	0.23	(Snoussi <i>et al.</i> , 2018)
<i>Elettaria cardamomum</i>	<i>C. violaceum</i>	0.3	(Abdullah <i>et al.</i> , 2017)
<i>Mentha piperita</i>	<i>A. hydrophyla</i>	0.2	(Husain <i>et al.</i> , 2015)
	<i>C. violaceum</i>	0.2	
<i>Cinnamomum cassia</i>	<i>C. violaceum</i>	0.2	(Kalia, 2013)
	<i>P. aeruginosa</i>	0.6	
<i>Syzygium aromaticum</i>	<i>C. violaceum</i>	0.08	(Khan <i>et al.</i> , 2009)
	<i>P. aeruginosa</i>	0.4	
<i>Piper bogotense</i>	<i>C. violaceum</i>	0.6	(Olivero, Pájaro y Stashenko, 2011)
<i>P. brachypodom</i>	<i>C. violaceum</i>	0.1	(Olivero, Pájaro y Stashenko, 2011)
<i>P. bredemeyeri</i>	<i>C. violaceum</i>	0.5	(Olivero, Pájaro y Stashenko, 2011)
<i>Cinnamomum camphora</i>	<i>C. violaceum</i>	0.6	(Wang <i>et al.</i> , 2019)
<i>Salvia sclarea</i>	<i>C. violaceum</i>	1	(Kerekes <i>et al.</i> , 2013)
<i>Origanum majorana</i>	<i>C. violaceum</i>	1	(Kerekes <i>et al.</i> , 2013)
<i>Lippia graveolans</i>	<i>C. violaceum</i>	6.25	(Alvarez <i>et al.</i> , 2014)
<i>Melaleuca alternifolia</i>	<i>C. violaceum</i>	5	(Noumi <i>et al.</i> , 2018)

CMIQ: Concentración Mínima Inhibitoria del QS

## 4.2. Materiales y métodos

### 4.2.1. Materiales

En relación con las bacterias estudiadas, la cepa de *Chromobacterium violaceum* CV026 fue donada por el cepario del Grupo de Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad de Santander.

17 AE extraídos y caracterizados en el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales (CENIVAM), de la Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga, Colombia).

*Lippia alba*, Quimiotipo carvona (LACA)

*L. alba*, Quimiotipo citral (LACI)

*Cymbopogon nardus* (CN)

*C. martini* (CM)

*C. flexuosus* (CF)

*L. origanoides*, Quimiotipo timol-carvacrol I (LTC I)

*L. origanoides*, Quimiotipo timol-carvacrol (LTC II)

*L. origanoides*, Quimiotipo felandreno (LOF)

*Rosmarinus officinalis* (RO)

*Salvia officinalis* (SO)

*Swinglea glutinosa* (SG)

*Tagetes lucida* (TL)

*Thymus vulgaris* (TV)

*Satureja viminea* (SV)

*Cananga odorata* (CO)

*Citrus sinensis* (CS)

*Elettaria cardamomum* (EC)

El medio de cultivo Luria Bertani (LB), fue obtenido de Oxoid (Hampshire, UK). El Dimetilsulfóxido (DMSO) grado HPLC y la N-Hexanoil-L-Homoserina Lactona (C6HSL) fueron adquiridos en Merck (Darmstadt, Alemania). Las microplacas de 96 pozos de poliestireno de fondo plano fueron marca Biologix.

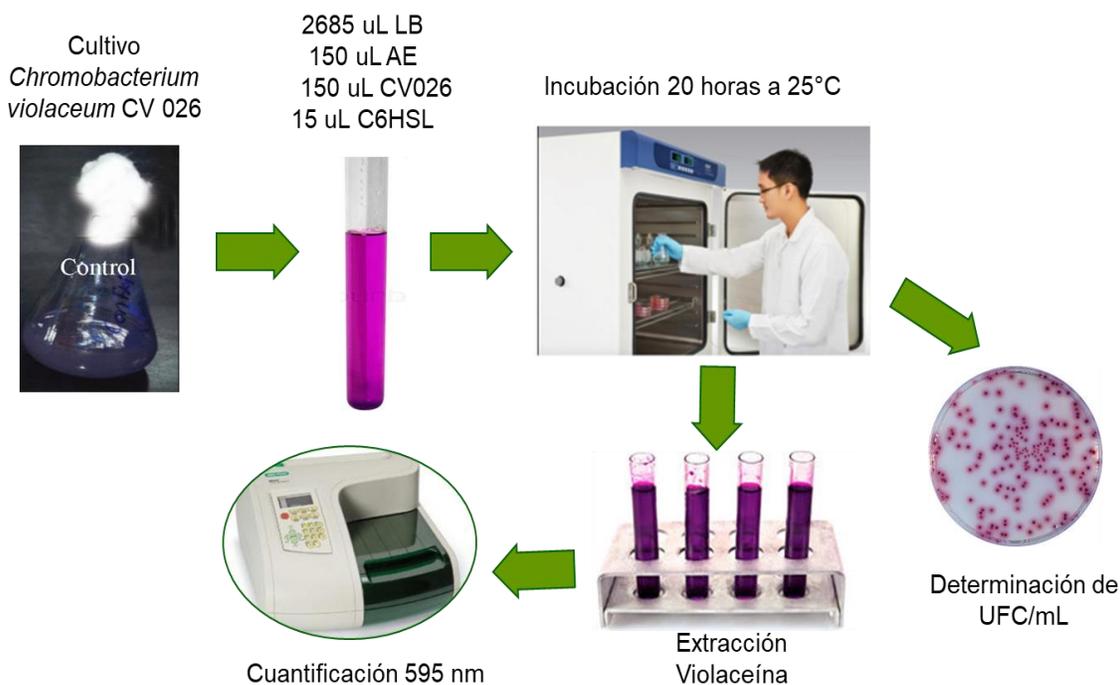
Todas las reacciones y ensayos de actividad *antibiofilm* fueron realizados empleando agua MilliQ de resistividad 18.2  $\Omega$ , extraída del equipo de laboratorio Smart2 Pure de Thermo Scientific (Helsinki, Alemania).

#### 4.2.2. Métodos

Para realizar la evaluación de la actividad anti-QS *in vitro* de diferentes AE en cultivos de *Chromobacterium violaceum* CV026, se llevó a cabo la metodología desarrollada por Blosser *et al.* (Blosser y Gray, 2000) con algunas modificaciones, la cual se describe en la **figura 15**.

#### Figura 15

*Metodología para la determinación de la actividad anti-QS de los AE frente a la bacteria Chromobacterium violaceum CV026*



#### 4.2.3. Determinación de la actividad anti-*QS* *in vitro*

La evaluación de la actividad anti-*QS in vitro* de los AE frente a CV026, se llevó a cabo de acuerdo con el método de evaluación de la producción de violaceína desarrollado por (Blosser and Gray, 2000) con algunas modificaciones. Los ensayos experimentales de inhibición en la producción de violaceína se realizaron utilizando recipientes de vidrio de 20 mL con tapa.

Para determinar la actividad anti-*QS* de los AE frente a CV026, se preparó un preinóculo del microorganismo en caldo LB durante 12 h a 25 °C y 150 rpm hasta alcanzar una concentración bacteriana de  $10^6$ - $10^7$  UFC/mL. Posteriormente, 150 µL del inóculo bacteriano fueron adicionados en un recipiente de vidrio junto con 2685 µL de medio LB, 15µL de C6HSL a una concentración final de 10 µmol/mL y 150µL del AE en concentraciones subinhibitorias (subCMI) para cada AE; esta concentración subCMI fue determinada utilizando el método de microdilución en caldo (Véase capítulo 2). Los recipientes fueron incubados a 25 °C y 150 rpm durante 20 h. El microorganismo creciendo en ausencia de AE se utilizó como control negativo de inhibición.

Después de la incubación, 1 mL de cada una de las muestras se centrifugó a 13000 g durante 10 min. El sobrenadante fue descartado y el sedimento se solubilizó en 1 mL de DMSO al 50%. La solución se agitó con vortice durante 30 s para homogeneizar la violaceína. Posteriormente, se centrifugó nuevamente a 13000 g durante 10 min para eliminar los restos celulares. La violaceína fue cuantificada espectrofotométricamente a OD595 (UV-1800 Shimadzu, Japón) según lo descrito por (Choo, Rukayadi and Hwang, 2006).

El porcentaje de inhibición en la producción de violaceína se calculó mediante la

siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{(\text{Abs control positivo} - \text{Abs experimental})}{\text{Abs control positivo}} \times 100$$

La viabilidad celular de la bacteria CV026 se determinó por recuento en placa de bacterias viables (Véase capítulo 3). Todos los experimentos se llevaron a cabo con tres réplicas biológicas. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para comparar entre los grupos tratados y sin tratar con el AE. Las diferencias con un valor de  $p < 0.05$  fueron considerados como significativos.

### **4.3. Resultados y discusión**

#### **4.3.1. Determinación de la actividad anti-QS *in vitro***

La evaluación de la actividad anti-QS de los 17 AE se realizó utilizando la bacteria biosensora CV026. Las concentraciones de cada AE utilizadas en los ensayos experimentales correspondieron a concentraciones subinhibitorias, determinadas por el método de microdilución en caldo, previamente enunciado (véase capítulo 2). Se utilizaron concentraciones subinhibitorias para garantizar que se estaba inhibiendo la comunicación bacteriana y no el crecimiento bacteriano planctónico de CV026. Los resultados obtenidos del ensayo de actividad

antibacteriana de los 17 AE frente a CV026 se muestran en la **Tabla 9**.

**Tabla 9**

*Determinación de la CMI<sub>50</sub> y la CMB de los AE evaluados frente a CV026*

Código	Aceite esencial	CV026	
		CMI <sub>50</sub> (mg/mL)	CMB (mg/mL)
LACA	<i>Lippia alba</i> (carvona)	>3	>3
LACI	<i>L. alba</i> (citral)	>3	>3
CN	<i>Cymbopogon nardus</i>	>3	>3
CM	<i>C. martini</i>	>3	>3
CF	<i>C. flexuosus</i>	>3	>3
LTC I	<i>L. origanoides</i> (timol-carvacrol I)	0.75 ±0.25	1.5 ±0.21
LTC II	<i>L. origanoides</i> (timol-carvacrol II)	0.37 ±0.03	0.75 ±0.10
LOF	<i>L. origanoides</i> (felandreno)	>3	>3
RO	<i>Rosmarinus officinalis</i>	>3	>3
SO	<i>Salvia officinalis</i>	>3	>3
SG	<i>Swinglea glutinosa</i>	>3	>3
TL	<i>Tagetes lucida</i>	1.5 ±0.18	>3
TV	<i>Thymus vulgaris</i>	0.37 ±0.05	0.75 ±0.1
SV	<i>Satureja viminea</i>	>3	>3
CO	<i>Cananga odorata</i>	>3	>3
CS	<i>Citrus sinensis</i>	>3	>3
EC	<i>Elettaria cardamomum</i>	>3	>3

Entre los AE analizados, la mayor actividad antimicrobiana contra CV026 se obtuvo con los AE de LTC II y TV, con una CMI<sub>50</sub> de 0.37 mg/mL y una CMB de 0.75 mg/ml. Los AE de

LTC I y TL exhibieron actividad antimicrobiana contra CV026, con una CMI<sub>50</sub> de 0.75 y 1.5 mg/mL, respectivamente.

Los resultados obtenidos muestran una CMI<sub>50</sub> en los AE de LTC II y TV inferiores a los reportados en la literatura para otros AE; en 2018 Noumi *et al.*, determinaron una CMI<sub>50</sub> de 10 mg/mL para el AE de *Melaleuca alternifolia* y de 0.125 mg/mL para su principal componente terpinen-4-ol (Noumi *et al.*, 2018). En otras investigaciones (Poli *et al.*, 2018; Snoussi *et al.*, 2018) se evaluaron los AE de *Carum copticum* y *Citrus clementina* y se obtuvieron CMI<sub>50</sub> de 0.6 mg/mL y 1.5 mg/mL, respectivamente.

Los dos AE de LTC II y TV con mayor actividad antimicrobiana contra CV026, tienen timol como principal componente; que se evaluó en 2018 por Zhang *et al.*, frente a CV026 y se determinó que su CMI<sub>50</sub> fue de 0.156 mg/mL (Y. Zhang *et al.*, 2018), valor que se encuentra por debajo del reportado en la presente investigación para los AE que lo tienen como componente mayoritario. Sin embargo, aunque el timol presenta una elevada actividad antimicrobiana, su actividad anti-QS no es alta.

El ensayo de evaluación de la inhibición en la producción de violaceína se realizó utilizando la bacteria biosensora CV026, un mutante mini-T5 de tipo salvaje que carece de AHL sintasa codificada por el gen *cvil*, y por lo tanto, sólo puede producir violaceína en respuesta a moléculas de señal AHL suministradas externamente (Kothari, Sharma y Padia, 2017). Aunque la producción de violaceína ha sido ampliamente estudiada por ser una característica regulada por QS, otros fenotipos como la producción de elastasa y de cianuro también son controlados a través de comunicación QS mediado por la señal AHL (Zins *et al.*, 2001; de Vasconcelos *et al.*, 2003; Fairbrother *et al.*, 2009). Los ensayos de inhibición en la producción de violaceína de los

17 AE frente a CV026 se llevaron a cabo utilizando concentraciones subinhibitorias, con el objetivo de garantizar que los resultados obtenidos sean producto del bloqueo del mecanismo de QS, en lugar de una disminución sobre el crecimiento de células planctónicas. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 10**.

**Tabla 10**

*Evaluación de la actividad anti-QS de AE frente a CV026*

Aceite esencial	CMIQ (mg/mL)	Inhibición de la violaceína (%)
<i>Lippia alba</i> (carvona)	1.5	2.2
<i>L. alba</i> (citral)	1.5	6.4
<i>Cymbopogon nardus</i>	1.5	9.1
<i>C. martini</i>	0.75	8.1
<i>C. flexuosus</i>	1.5	7.3
<i>L. origanoides</i> (timol-carvacrol I)	0.6	62.0
<i>L. origanoides</i> (timol-carvacrol II)	0.2	84.8
<i>L. origanoides</i> (felandreno)	1.5	5.5
<i>Rosmarinus officinalis</i>	1.5	7.4
<i>Salvia officinalis</i>	1.5	8.5
<i>Swinglea glutinosa</i>	1.5	12.7
<i>Tagetes lucida</i>	0.75	6.1
<i>Thymus vulgaris</i>	0.2	8.9
<i>Satureja viminea</i>	1.5	7.7
<i>Cananga odorata</i>	1.5	11.8
<i>Citrus sinensis</i>	1.0	65.3
<i>Elettaria cardamomum</i>	1.5	10.7

CMIQ: Concentración Mínima Inhibitoria del *Quorum Sensing*

El resultado obtenido de la inhibición en la producción de violaceína de CV026, utilizando diferentes concentraciones subinhibitorias de los 17 AE, permitieron evidenciar una inhibición mayor del 50% en la producción de la violaceína en tres AE evaluados, LTC II, TV y EC. Entre estos tres AE, LTC II presentó la mayor inhibición en la producción de violaceína con una disminución del 84.8% a una CMIQ de 0.2 mg/mL.

Por su parte, el AE de *Elettaria cardamomum* exhibió una inhibición en la producción de violaceína de 65.3% a una concentración subinhibitoria de 1 mg/mL; estos resultados son similares a los reportados en la literatura (Abdullah *et al.*, 2017) para el AE de *E. cardamomum*; Abdullah *et al.*, en 2017 estudiaron el efecto del AE de cardamomo sobre la inhibición del QS utilizando la bacteria biosensora *C. violaceum*, los autores observaron una disminución mayor del 50% en la producción de violaceína a una concentración de 1.25 mg/mL. Sin embargo, el posible mecanismo de acción mediante el cual este AE o su principal componente, el acetato de terpenilo, inhiben la comunicación bacteriana dependiente de QS aún no se ha reportado.

Los AE LTC I y LTC II con actividad inhibitoria del QS presentaron similitud en sus componentes principales (timol, carvacrol y *trans*- $\beta$ -cariofileno) (Véase capítulo 2). Pese a sus similitudes, estos AE presentan CMIQ diferentes; lo cual se puede explicar con base en que el efecto inhibitorio en la producción de violaceína es resultado del efecto combinado de los componentes minoritarios y mayoritarios en estos AE. Estudios realizados con AE con composiciones similares evidencian que el resultado obtenido con el AE de LTC II (CMIQ de 0.2 mg/mL) se encuentra en el rango de los mejores resultados reportados en la literatura; en 2016 Myszka *et al.*, evaluaron el efecto del AE de *Thymus vulgaris* y sus dos principales componentes, timol y carvacrol, sobre el efecto del QS de CV026 y *P. fluorescens* KM121; los valores de CMIQ obtenidos del AE de *Thymus vulgaris* fueron de 20 mg/mL, superiores a los obtenidos con el AE de LTC II (Myszka *et al.*, 2016). Alvarez *et al.* (2014), reportaron una CMIQ de 0.125 mg/mL sobre una cepa de *C. violaceum* utilizando el AE de orégano, valor menor al obtenido con el AE de LTC II (Alvarez *et al.*, 2014). Las anteriores diferencias en la CMIQ entre AE con composición similar pero diferentes se deben principalmente a que la

actividad biológica se ve afectada por factores como la temperatura, el pH del suelo, los tiempos de cosecha e incluso la manipulación humana de los cultivos (Camele *et al.*, 2019).

Debido a que se ha reportado que los AE con componentes mayoritarios de carvacrol y timol tienen actividad anti-QS (Alvarez *et al.*, 2014; Myszka *et al.*, 2016; D. Zhang *et al.*, 2018; Camele *et al.*, 2019); su actividad ha sido evaluada con el objetivo de determinar qué tanto influyen estos compuestos en la actividad biológica obtenida en el AE. En 2017, Tapía-Rodríguez *et al.*, demostraron que la inhibición del QS en *P. aeruginosa* se asocia con la reducción en la virulencia bacteriana y la formación del *biofilm* en superficies de acero inoxidable expuestas a timol y carvacrol (Tapia-Rodriguez *et al.*, 2017). El efecto del carvacrol sobre la inhibición del QS también fue evaluado en un estudio realizado por Burt *et al.* (2014), en el cual los autores demostraron que el carvacrol tenía efecto inhibitorio sobre el *biofilm* de *C. violaceum*, *S. Typhimurium* y *S. aureus* sin reducir la viabilidad celular, este efecto se atribuyó a mecanismos distintos a la inhibición del crecimiento o muerte celular, por lo tanto, se infirió su asociación con el bloque de la comunicación bacteriana dependiente de QS. Lo anterior se evidenció en la expresión reducida del gen *cvil* (gen que codifica N-acil-homoserina lactona sintasa), en la inhibición de producción de violaceína mayor de 90% y en la disminución de la actividad quitinasa al utilizar concentraciones subinhibitorias de carvacrol frente a *C. violaceum* ATCC 12472 (Burt, Victoria T.A. Ojo-Fakunle, *et al.*, 2014). El efecto del carvacrol y el timol sobre la producción de la violaceína cambia dependiendo de la cepa de *C. violaceum* evaluada; en un estudio realizado en 2018 por Zhang *et al.*, se determinó la CMIQ del carvacrol y timol sobre CV026 (el mismo microorganismo utilizado en la presente tesis doctoral), en el cual se evaluó una concentración subinhibitoria de carvacrol y timol de 0.1 mg/mL y se obtuvo un

reducción en la producción de violaceína de 8.35% y 12.11%, respectivamente (D. Zhang *et al.*, 2018). Por lo tanto, se pueden evidenciar diferencias en la actividad anti QS del carvacrol frente a las cepas *C. violaceum* ATCC 12472 y *C. violaceum* CV026. Lo anterior permite inferir además que el efecto anti-QS presentado por el AE de LTC II no es producto solamente de la acción de sus componentes mayoritarios.

Respecto al mecanismo de acción de los compuestos fenólicos que hacen parte de los AE, se ha planteado que el efecto del carvacrol, timol y eugenol puede ser similar al de la zingerona; compuesto fenólico con una fuerte actividad inhibitoria del QS. El mecanismo de acción de la zingerona se relaciona con la capacidad de su grupo hidróxilo fenólico de formar enlaces de hidrógeno con el residuo Ser129 de *LasR* de *P. aeruginosa* y además de la interacción  $\pi$ - $\pi$  entre el grupo aromático y la Tyr56, que fortalece la unión de la zingerona con el receptor de QS; lo anterior bloquearía el mecanismo de QS (Vijendra Kumar *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2015). Estos resultados fueron respaldados por el estudio llevado a cabo por Jayalekshmi *et al.* (2016), quienes demostraron que el grupo hidroxilo aromático del eugenol puede formar enlaces de hidrógeno con los aminoácidos Arg61 y Tyr47 de *LasR* en *P. aeruginosa* y contribuir a la inhibición de la activación de este receptor, reduciendo su expresión génica (H *et al.*, 2016).

#### **4.4. Conclusiones**

- El AE de *Lippia origanoides* quimiotipo timol-carvacrol II, presentó la actividad anti-QS más alta frente a la bacteria biosensora *Chromobacterium violaceum* CV026, con una CMIQ de 0.2 mg/mL.
- La acción de los componentes fenólicos de los AE con actividad anti-QS es importante para bloquear el receptor de QS de CV026, sin embargo, es necesario un análisis mediante técnicas ómicas para dilucidar el posible mecanismo de acción del AE de LTC II.
- Los AE con valores bajos de CMI pueden tener efectos inhibitorios sobre el mecanismo de QS a concentraciones subinhibitorias, lo cual indica que la diversidad de componentes del AE le confiere un amplio rango de dianas de acción y, por lo tanto, diferentes actividades biológicas.

## **5. Determinación de la actividad citotóxica en células eucariotas *in vitro* de los aceites esenciales con mayor actividad inhibitoria sobre el *biofilm* y *Quorum Sensing* de bacterias patógenas**

### **5.1. Introducción**

Los AE son extensamente utilizados en la industria alimentaria y cosmética para dar sabor a alimentos y bebidas o como fragancias naturales (Bhavaniramya *et al.*, 2019). Además, varios compuestos presentes en los AE son importantes en la industria farmacéutica debido a sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas, anticancerígenas y sus efectos ansiolíticos (Osuntokun, 2017). Aunque muchos AE se reconocen como seguros, se han reportado una serie de reacciones adversas después de su uso por vías internas y externas (de Araújo Delmondes *et al.*, 2019; Contini *et al.*, 2020). Por lo tanto, se hace indispensable un conocimiento más profundo del perfil de seguridad de los AE para incrementar sus efectos beneficiosos y reducir sus efectos adversos.

Los AE presentan una lipofilicidad significativa debido a un alto contenido de monoterpenos, siendo capaces de atravesar con facilidad diferentes barreras biológicas. De esta manera, la absorción sistémica de componentes químicos específicos es posible después de la administración oral o cutánea de AE, dando como resultado un efecto terapéutico beneficioso en algunos casos y con implicaciones toxicológicas en otros (Kohlert *et al.*, 1999). Después de una administración oral de AE, la absorción sistémica de varias moléculas presentes en su composición química podría ser significativa; un estudio en ratas demostró que después de la

administración oral de *trans*-anetol radiomarcado, más del 90% de la sustancia fue absorbida desde el tracto digestivo al torrente sanguíneo, siendo posteriormente metabolizado y excretado en heces y orina (Koriem, 2015). En un estudio realizado por Pavan *et al.* (2018), se probó una formulación de liberación inmediata que contenía geraniol, la cual fue administrada en ratas y mostró una biodisponibilidad absoluta del 92%, exhibiendo de esta manera una mayor absorción sistémica (Pavan *et al.*, 2018).

El contacto de los AE con la piel sucede frecuentemente durante los masajes, esto podría conducir a una absorción sistémica de los componentes químicos, dependiendo del tiempo de contacto, el tamaño de la superficie cutánea expuesta y la concentración del compuesto evaluado; los AE y sus componentes volátiles pueden atravesar la piel y facilitar la absorción de otros fármacos aplicados tópicamente al inducir una modificación conformacional de proteínas intercelulares en la capa corneal (Herman y Herman, 2015).

La volatilidad de los AE los hace ideales para la administración pulmonar, adecuado en el tratamiento de enfermedades respiratorias. Sin embargo, una fracción de los compuestos inhalados podría absorberse rápidamente a nivel alveolar y a través de las mucosas de la vía respiratoria, con la aparición, por lo tanto, de concentraciones plasmáticas y el posible efecto sistémico (Horváth y Ács, 2015).

Referente a los efectos tóxicos de los AE, se han realizado estudios para evaluar los efectos de los AE y sus componentes en animales de laboratorio, generalmente, roedores. La toxicidad aguda se ha evaluado mediante la prueba de la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) en ratas, lo cual reveló que la mayoría de los AE tienen un DL<sub>50</sub> de 1-20 g/kg, lo que indica su baja toxicidad. En los humanos, algunos AE como el de limón tienen una DL<sub>50</sub> superior a 5 g/kg, es decir, que la

dosis letal sería de 350 gr para un adulto de 70 kg, un valor difícil de alcanzar en circunstancias normales (Tabarraei *et al.*, 2019).

A pesar de la toxicidad baja que se ha asociado con los AE, se han reportado sus efectos adversos, entre estos se destaca la toxicidad a nivel dermatológico; en aromaterapia, los AE se aplican generalmente diluidos en un aceite vehículo, directamente sobre la piel. Las reacciones dermatológicas adversas más importantes que se han reportado incluyen irritación, sensibilización y fotosensibilización (Ali *et al.*, 2015; Michalak, 2018). El campo de la dermatología ha experimentado un incremento en la frecuencia de reacciones alérgicas a los AE, probablemente debido a su creciente popularidad del uso tópico (Sabroe, Holden and Gawkrödger, 2016). Los AE son sensibilizadores conocidos y se ha documentado la dermatitis de contacto secundaria después de haber inhalado AE (Lapeere *et al.*, 2013). Varios AE tienen sustancias químicas propensas a causar sensibilidad, entre estas, se destacan limoneno, linalol, citral y el alcohol de cinámico (Dornic *et al.*, 2016).

Los AE han demostrado tener efectos citotóxicos sobre líneas celulares tumorales y baja toxicidad frente a modelos celulares eucariotas normales; entre estos AE, se destacan los del género *Thymus* y sus componentes principales, carvacrol y timol. En 2012, Dirican *et al.* reportaron que el timol y carvacrol son los compuestos fenólicos con mayor actividad antioxidante, debido a que previenen el daño oxidativo del ADN, y por tanto, puede prevenir el cáncer (Dirican, Turkez y Toğar, 2012); posteriormente, también se descubrió que el carvacrol y el timol eran activos contra el cáncer de mama y el cáncer colorrectal (Abaza *et al.*, 2015). La citotoxicidad del timol extraído de hojas de *T. vulgaris* se evaluó *in vitro* contra dos líneas celulares de cáncer humano, HeLa y Hep-2, y una línea celular normal Ref (fibroblasto

embrionario de rata); los resultados evidenciaron mayor toxicidad (87.25%) del timol frente a la línea celular HeLa, citotoxicidad moderada (51.45%) en Hep-2 y una ligera citotoxicidad (20.94%) frente a la línea celular Ref (Abed, 2011).

En el estudio llevado a cabo por Kozics *et al.* (2013), células de cáncer de hígado HepG2 fueron pretratadas con extractos y AE de tomillo: el resultado evidenció una reducción en las lesiones de ADN inducidas por compuestos oxidantes, esta actividad protectora puede explicarse por elevación de la actividad GPx y su actividad antioxidante (Kozics *et al.*, 2013). El mecanismo citotóxico de acción del AE extraído de tomillo se ha relacionado con una reducción del factor nuclear Kappa que potencia la activación de las células B (NF- $\kappa$ B) y la actividad de la proteína activadora 1 (AP-1) (Paur *et al.*, 2010).

En la presente investigación, se ha determinado la actividad antibacteriana, *antibiofilm* y *antiquorum sensing* de 17 AE frente a diferentes bacterias Gram (-), de tal manera que algunos AE han tenido mayor actividad biológica debido principalmente a diferencias en su composición. Es importante referenciar que, a las CMI, CMIB y CMIQ, los AE con más alta actividad biológica reportada, presentan una selectividad mayor frente a los microorganismos en comparación con el modelo celular utilizado.

## **5.2. Materiales y métodos**

### **5.2.1. Materiales**

La línea celular Vero ATCC CCL-81 fue adquirida comercialmente, se conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$  y su crecimiento se llevó a cabo en una incubadora humidificada con 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Se utilizaron los 4 AE con mayor actividad antimicrobiana (CM, LTC I, LTC II y TV), los cuales fueron extraídos y caracterizados en el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales (CENIVAM), de la Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga, Colombia).

El medio de cultivo Medio Eagle Mínimo Esencial (EMEM) y el suero fetal bovino fueron obtenidos de Gibco (Paisley, UK). El Dimetilsulfóxido (DMSO) grado HPLC y la gentamicina fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (San Luis, EE.UU). Las microplacas de 96 pozos de poliestireno de fondo curvo fueron marca Biologix.

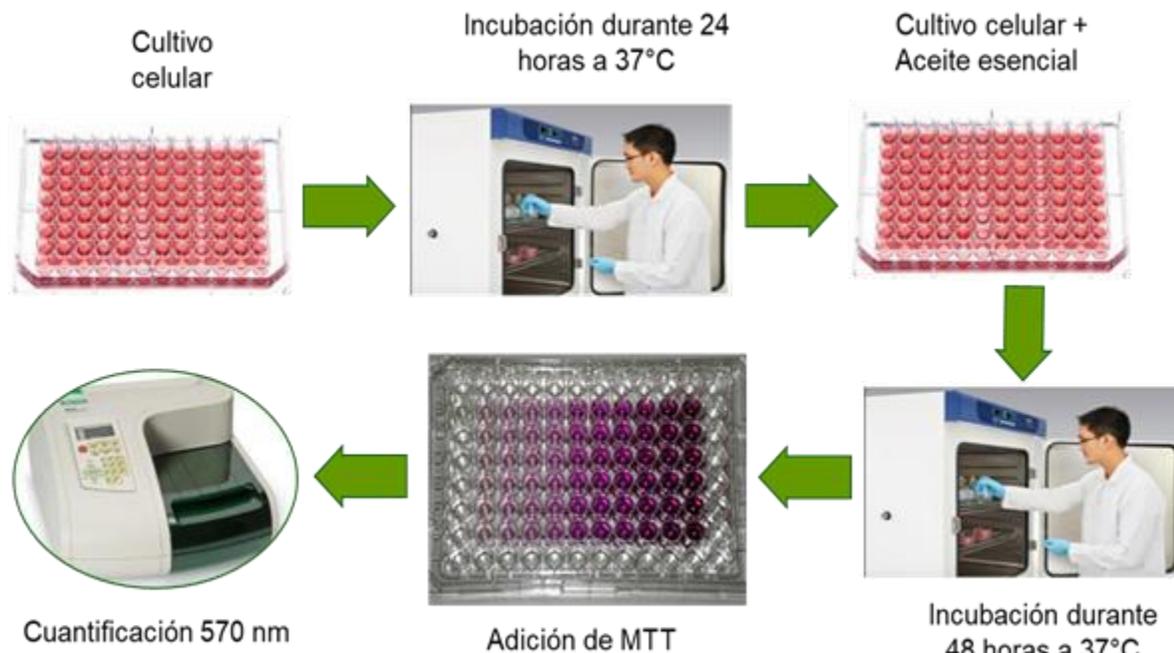
Todas las reacciones y ensayos de actividad *antibiofilm* fueron realizados empleando agua MilliQ de resistividad  $18.2 \Omega$ , extraída del equipo de laboratorio Smart2 Pure de Thermo Scientific (Helsinki, Finlandia).

### 5.2.3. Métodos

Para realizar la evaluación de la actividad citotóxica *in vitro* de diferentes AE de plantas aromáticas, en cultivos de células Vero, se llevó a cabo la metodología desarrollada por Mosmann (Mosmann, 1983) con algunas modificaciones, la cual se describe en la **Figura 16**.

**Figura 16**

*Metodología para la determinación de la actividad citotóxica de los AE frente a la línea celular Vero*



#### 5.2.4. Determinación de la actividad citotóxica *in vitro*

La evaluación de la actividad citotóxica *in vitro* de los AE frente a la línea celular Vero se llevó a cabo de acuerdo con el método de reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), desarrollado por Mosmann (Mosmann, 1983), con algunas modificaciones. Los ensayos experimentales de evaluación del efecto del AE sobre la línea celular Vero se realizaron utilizando microplacas de cloruro de polipropileno de 96 pozos

con fondo plano.

La línea celular Vero fue cultivada en medio de cultivo EMEM que contenía suero fetal bovino al 10% y gentamicina (50 µg/mL), a 37 °C en una incubadora humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células fueron sembradas ( $7.5 \times 10^3$  células/pozo) en una microplaca de 96 pozos e incubadas durante 24 h. Posteriormente, las células VERO fueron tratadas con diferentes concentraciones de AE (0.18, 0.37, 0.75 y 1.5 mg/mL) durante 48 h. La viabilidad celular se evaluó mediante el método MTT. La absorbancia se midió a  $\lambda=570$  nm en un lector de microplacas Multiskan go (Thermo Fischer Scientific, Vantaa-Helsinki, Finlandia). Los resultados fueron expresados como porcentaje de células viables en comparación con las del control (tomado como 100%).

### **5.3. Resultados y discusión**

#### **5.3.1. Determinación de la actividad citotóxica *in vitro***

La evaluación de la actividad citotóxica de los cuatro AE con mayor actividad biológica se realizó sobre la línea celular Vero, un linaje celular derivado del riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Los cuatro AE utilizados fueron CM, LTC I, LTC II y TV, y las concentraciones evaluadas estuvieron en un rango entre 0.18 y 1.5 mg/mL. Posteriormente, se calculó la Concentración Mínima de aceite esencial que inhibe el 50% de la proliferación celular (IC<sub>50</sub>) y finalmente se determinó si el AE es más selectivo frente a los modelos bacterianos o la línea celular Vero mediante el cálculo del índice de Selectividad (SI). Los resultados obtenidos

del IC<sub>50</sub> y el SI se muestran en la Tabla 11.

**Tabla 11**

*Concentración Inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) en mg/mL e índice de Selectividad (SI) de los aceites esenciales con mayor actividad biológica*

Aceite esencial	Células VERO		SI <sup>c</sup>		
	IC <sub>50</sub> (mg/mL) ± SD <sup>a</sup>	R <sub>2</sub> <sup>b</sup>	<i>Salmonella</i> <i>Enteritidis</i> ATCC 13076	<i>E. coli</i> O157:H7	CV 026
<i>Cymbopogon martini</i>	0.86 ± 0.12	0.97	0.06	-0.54	-0.54
<i>Lippia origanoides</i> (timol-carvacrol I)	0.48 ± 0,02	0.99	-0.19	-0.19	-0.19
<i>L. origanoides</i> (timol-carvacrol II)	0.83 ± 0.02	0.98	0.35	0.35	0.35
<i>Thymus vulgaris</i>	1.76 ± 0.36	0.94	0.37	0.37	0.68

<sup>a</sup> Concentración mínima de AE que inhibe el 50% de la proliferación celular

<sup>b</sup> Coeficiente de correlación lineal

<sup>c</sup> Índice de selectividad

El SI se determinó como la relación logarítmica entre el IC<sub>50</sub> y el valor de la CMI<sub>50</sub> para cada microorganismo (SI=Log [IC<sub>50</sub>]/[CMI<sub>50</sub>]) (Case *et al.*, 2006; Nunes *et al.*, 2016). Los valores indican una selectividad elevada frente al microorganismo, mientras que los valores

negativos representan una alta toxicidad hacia las células Vero. Los AE de LTC II y TV tuvieron un SI positivo en todas las concentraciones probadas, que, significa que estos AE son más selectivos frente a las bacterias en lugar de las células Vero. Por el contrario, los AE de LTC I y CM presentaron valores de SI negativos, lo que indica una mayor toxicidad hacia las células Vero.

El resultado obtenido con los AE de LTC II y TV permiten inferir que estos dos aceites constituyen alternativas para ser utilizados en diseños de nuevas estrategias terapéuticas, principalmente, el AE de LTC II debido a que tiene los valores más bajos de CMI<sub>50</sub>, CMIB y CMIQ frente a los diferentes modelos bacterianos evaluados, en contraste con el aceite de TV que carece de actividad inhibitoria del QS.

El resultado de LTC II se correlaciona con lo reportado por diversos autores sobre la seguridad de utilizar el AE de *L. origanoides*. En 2017 Hernandez *et al.*, evaluaron la toxicidad aguda del AE de *L. origanoides*, determinando la DL<sub>50</sub> en 54 ratones albinos machos. El resultado mostró una LD<sub>50</sub> de 3548 mg/kg, lo cual, según criterios de la Unión Europea, es catalogado como no tóxico, este resultado se relaciona con el DL<sub>50</sub> reportado en la literatura (Hernandez *et al.*, 2017) para el carvacrol, que fue de 810 mg/kg.

En otro estudio, Andrade *et al.* (2014), evaluaron el efecto tóxico agudo y crónico del AE de *L. origanoides* administrado vía oral en ratas Wistar en dosis de 30, 60 y 120 mg/kg. Estas dosis de AE no indujeron cambios significativos de peso, comportamiento o parámetros hematológicos y bioquímicos en los animales; tampoco se evidenciaron signos de cambios histopatológicos en el hígado, riñón y corazón de las ratas tratadas, lo cual sugiere que el AE de *L. origanoides* no es tóxico, después de la administración oral en estudios de toxicidad aguda o

crónica. El resultado obtenido en este estudio mostró que el AE de *L. origanoides* tiene un alto margen de seguridad sin efectos tóxicos detectables en las ratas tratadas con dosis de 120 mg/kg (Andrade *et al.*, 2014).

En la literatura (Fontenelle *et al.*, 2007; Almeida *et al.*, 2010; Sarrazin, Leomara A. Da Silva, *et al.*, 2015), se encuentran pocos estudios sobre toxicidad del AE de *L. origanoides* y sus principales componentes, timol y carvacrol; la mayoría de estudios existentes evidencian la baja toxicidad del AE de *L. origanoides*.

A pesar de la similitud cualitativa de la composición de los AE de LTC I y LTC II, sus efectos sobre la línea celular Vero y sus demás actividades biológicas presentan diferencias que evidencian como las interacciones entre los componentes del AE producen cambios en la actividad biológica.

Con respecto al AE de *Cymbopogon martini* se debe evaluar que el SI es dependiente directamente de la actividad antimicrobiana que presente el AE, por esta razón, se obtuvo un SI positivo con *S. Enteritidis* ATCC 13076, mientras un SI negativo con *E. coli* O157:H7 y CV026 debido a que el AE de CM no exhibió actividad antimicrobiana frente a estos dos microorganismos a la mayor concentración evaluada (3 mg/mL). Análisis de citotoxicidad sobre este AE específicamente no se han reportado en la literatura, sin embargo, si se ha evaluado la acción de su componente mayoritario, el geraniol. En una revisión realizada por Maczka *et al.*, en 2020 se agrupan los resultados obtenidos en las últimas investigaciones realizadas en torno al geraniol; se destaca el efecto antioxidante, antiinflamatorio y anticancerígeno del geraniol en contraste con su baja toxicidad asociada (Mączka, Wińska y Grabarczyk, 2020). Lo anterior evidencia la necesidad de realizar ensayos de citotoxicidad y análisis de diferentes

composiciones del AE de CM y de sus diferentes componentes para entender la citotoxicidad obtenida en el presente estudio.

#### 5.4. Conclusiones

- El SI positivo obtenido con los AE de LTC II y TV evidencian una mayor selectividad frente a los microorganismos evaluados, lo que abre la posibilidad de su uso dentro de las estrategias terapéuticas seguras.
- El efecto citotóxico de los AE es dependiente de las interacciones de sus componentes minoritarios y mayoritarios, lo anterior se evidencia debido a que AE con composiciones mayoritarias similares, pero en diferentes proporciones presentan actividades citotóxicas diferentes.
- Es indispensable realizar estudios de toxicidad aguda y crónica *in vivo* para evaluar el nivel de seguridad en la administración de los AE en seres humanos.

**6. Estudiar el posible mecanismo de acción del mejor aceite esencial sobre la formación del *biofilm* y la inhibición del *Quorum Sensing* de bacterias patógenas, utilizando análisis metabolómicos.**

**6.1. Introducción**

La metabolómica se define como el estudio, la cuantificación y la identificación de compuestos de bajo peso molecular (< 400-600 u.m.a) dentro de un sistema dado, que proporciona una imagen de lo que está sucediendo en el metabolismo (Blow, 2008). Los metabolitos bacterianos tienen funciones fundamentales en la célula, en particular, en el metabolismo energético, la señalización celular y la formación del *biofilm* (Werf *et al.*, 2007). El análisis metabolómico permite estudiar los cambios en la abundancia de los metabolitos y relacionarlos con las vías metabólicas correspondientes, de tal manera, que se pueden asociar directamente con la actividad celular y con los cambios en la patogenicidad (Fiehn, 2002). La metabolómica constituye la expresión más cercana al fenotipo debido a que los metabolitos pueden ser moléculas efectoras, cofactores de reacciones enzimáticas y productos. La integración de datos genómicos, transcriptómicos, proteómicos y metabolómicos representa un desafío para entender con certeza lo que ocurre en el sistema biológico analizado (Villar *et al.*, 2015).

El metaboloma se define como la suma de todos los metabolitos presentes en un sistema biológico en condiciones fisiológicas particulares y se puede dividir en el exometaboloma (metabolitos fuera de la célula) y el endometaboloma (metabolitos intracelulares) (Witting, 2013). El análisis del metaboloma puede realizarse mediante dos enfoques: el primero, mediante

metabolómica global o no dirigida, la cual tiene como objetivo proporcionar una visión imparcial del metaboloma a través de la detección y cuantificación de tantos metabolitos como sea posible dentro de una muestra biológica dada y, la segunda, mediante metabolómica dirigida, cuyo objetivo es detectar y cuantificar un grupo predefinido de compuestos químicamente caracterizados de rutas metabólicas (Lu, Bennett y Rabinowitz, 2008; Ghosson *et al.*, 2018). A continuación, se describirá brevemente los dos tipos de enfoques metodológicos utilizados en el presente estudio.

### **6.1.1. Metabolómica no dirigida**

La metabolómica no dirigida tiene un alcance global y su objetivo principal es medir de forma simultánea el mayor número posible de metabolitos de cada muestra sin distorsión, en un solo experimento. En la estrategia no dirigida, su objetivo es medir todos los metabolitos presentes en una muestra biológica; no obstante, este enfoque se encuentra sesgado debido a diferentes factores que pueden interferir en el análisis como, por ejemplo, el método de preparación de muestra, características del equipo analítico utilizado, entre otras. Los enfoques no dirigidos generalmente están destinados a generar nuevas hipótesis que deberán ser validadas en estudios posteriores, incluyendo un enfoque dirigido; también esta estrategia no dirigida permite detectar el potencial de nuevos mecanismos en el metabolismo de un sistema muestreado, lo cual puede relacionarse con el funcionamiento biológico de un organismo y los cambios metabólicos alterados asociados con diferentes estados patológicos y modificaciones en

la homeostasis del organismo (Vincent *et al.*, 2014; Alonso, Marsal y Julià, 2015; Segers *et al.*, 2019; Wright Muelas *et al.*, 2020).

### **6.1.2. Metabolómica dirigida**

La metabolómica dirigida se refiere a estudios cuyo objetivo es medir moléculas específicas conocidas, centrándose en una o más rutas metabólicas relacionadas que hayan sido definidas en estudios previos como biológicamente relevantes. Hasta el momento, no existe un método global para la cuantificación de metabolitos. La metabolómica dirigida se considera generalmente una prueba de hipótesis y, a menudo, puede ser guiada por resultados de enfoques no dirigidos, destacando áreas de interés en el metaboloma. Los enfoques dirigidos constituyen una metodología alternativa en las pruebas biomédicas en las cuales los ensayos enzimáticos han utilizado tradicionalmente un enfoque no dirigido (Brown y Hazen, 2017; Segers *et al.*, 2019; Guo y Lu, 2020).

### **6.1.3. Metabolómica microbiana**

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

En un estudio realizado en 2017, Rempe *et al.* evaluaron el mecanismo de acción del extracto acuoso de la yerba mate frente a *Salmonella enterica* Serovariedad Typhimurium mediante análisis metabolómico. Entre los resultados obtenidos se destaca que el extracto acuoso de yerba mate indujo cambios significativos en el metabolismo del carbono del microorganismo evaluado, junto con cambios en moléculas reguladoras del metabolismo global como el  $\alpha$ -cetoglutarato, acetilfosfato y NAD<sup>+</sup>; además, generó una disminución de la actividad enzimática de catalasa. Sin embargo, no se produjeron cambios en la integridad de la membrana, pese a detectar incrementos significativos en la producción de precursores de la pared celular (Rempe *et al.*, 2017).

En otro estudio llevado a cabo en el 2020 por Chen *et al.*, se estudió la actividad antibacteriana del AE de *Cinnamomum camphora* sobre diferentes bacterias patógenas mediante un enfoque metabolómico. Entre los microorganismos evaluados se escogió a *Staphylococcus aureus* como microorganismo modelo para evaluar el mecanismo de acción del aceite esencial de *C. camphora* al presentar una CMI y CMB de 0.8 y 1.6 mg/mL, respectivamente. En el estudio metabolómico, se detectaron 74 metabolitos de interés, de los cuales, 29 presentaron un incremento en su expresión, mientras que los 45 metabolitos restantes, presentaron una expresión disminuida. Entre las rutas metabólicas afectadas por el AE se destacan las asociadas con el metabolismo de aminoácidos y con el metabolismo energético dependiente del ciclo del ácido tricarboxílico, lo cual, sumado a ensayos enzimáticos y evaluación de integridad de membrana, permitieron inferir que el mecanismo de acción del AE se relaciona con daños en la integridad de la membrana celular bacteriana y perturbación de la regulación del metabolismo del grupo amino (Chen *et al.*, 2020).

Tang *et al.* exploraron en el 2020 el mecanismo de acción del AE de *Amomum villosum* sobre *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM), los autores utilizaron un análisis metabolómico basado en GC/MS. El análisis químico reveló 72 metabolitos con expresión diferenciada (50 metabolitos incrementados y 22 metabolitos disminuidos) y diez vías metabólicas afectadas. El AE de *Amomum villosum* interrumpió específicamente el metabolismo de los aminoácidos y el ciclo de los ácidos tricarbónicos, también, inhibió la síntesis de trifosfato de adenosina (ATP) y de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés “*reactive oxygen species*”). En conclusión, según los autores, el mecanismo de acción del AE evaluado estaba asociado con la inducción de una disfunción metabólica en SARM relacionada con alteraciones en el metabolismo energético, disminución de las ROS y supresión de la actividad catalítica de enzimas claves del metabolismo proteico (Tang *et al.*, 2021).

Además de la evaluación de compuestos naturales como los AE, también se ha estudiado el mecanismo de acción de sus componentes específicos, por ejemplo, el  $\Delta^3$ -careno, constituyente mayoritario del AE de pimienta blanca. En 2020, Shu *et al.* realizaron un estudio para evaluar la desregulación metabólica que producía el  $\Delta^3$ -careno sobre la bacteria *Pseudomonas fluorescens*; el análisis metabolómico realizado evidenció alteración en la expresión de 42 metabolitos y afectación en rutas metabólicas esenciales del microorganismo como el ciclo del ácido tricarbónico, vías metabólicas de aminoácidos y péptidos; también se detectaron alteraciones en la biosíntesis de pantotenato y coenzima A (CoA), que causó un desbalance metabólico en el microorganismo que se asoció con su inhibición bacteriana (Shu *et al.*, 2020).

#### 6.1.4. Metabolómica del *biofilm*

El estudio de los cambios que presenta la célula bacteriana cuando cambia su estado de crecimiento planctónico a sésil, también, se ha estudiado mediante análisis metabolómico. El crecimiento del *biofilm* se inicia a través de una serie de procesos celulares en respuesta a estímulos ambientales, cambios notables en el metaboloma bacteriano que pueden identificarse y estudiarse (Ammons *et al.*, 2014; Wong *et al.*, 2018; Lu *et al.*, 2019; Sadiq *et al.*, 2020).

Entre estos estudios, se encuentra el de Wong *et al.*, en 2018; los autores evaluaron el perfil metabolómico de diferentes cepas de *Helicobacter pylori* con capacidades diferentes de formación de *biofilm*. Los resultados permitieron determinar que las cepas bacterianas con baja capacidad de formación del *biofilm* produjeron más metabolitos en comparación con las cepas bacterianas con alta capacidad de formación del *biofilm*. Análisis adicionales permitieron detectar los metabolitos asociados con el metabolismo central lipídico, prostaglandinas y folatos, los cuales fueron los metabolitos con mayores diferencias significativas en su expresión al comparar las cepas de *Helicobacter pylori* con baja y alta capacidad formadora del *biofilm* (Wong *et al.*, 2018).

En un estudio realizado por Lu *et al.*, en 2019, se analizó el perfil metabólico de una cepa de *Escherichia coli* asociada con infecciones urinarias en su estado de crecimiento planctónico y sésil; para ello, se utilizó un enfoque dirigido y no dirigido mediante análisis por espectrometría de masas. Los resultados obtenidos permitieron evidenciar claras diferencias en la morfología fenotípica como en el metabolismo de los dos patrones de crecimiento evaluados. En esta investigación, se identificaron y caracterizaron 38 metabolitos diferenciales y se detectaron

cambios metabólicos en la formación del *biofilm* principalmente, en tres vías metabólicas asociadas con el metabolismo de glicerolípidos, aminoácidos y carbohidratos (Lu *et al.*, 2019).

Recientemente, Sadiq *et al.*, en 2020, revelaron los cambios metabólicos que suceden en la bacteria *Bifidobacterium bifidum* en sus estados planctónico y *biofilm*, utilizando un enfoque de metabolómica no dirigida. De los 173 metabolitos identificados, 64 presentaron cambios significativos de expresión entre los estados planctónicos y *biofilm*. Los resultados permitieron detectar que la biosíntesis de aminoacil tRNA, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y el metabolismo de la arginina, prolina, glutamato, alanina y aspartato se encuentran disminuidos cuando el microorganismo está formando *biofilm*. Por el contrario, el metabolismo de los aminoácidos L-histidina y D-metionina se expresaron significativamente más cuando el microorganismo se encuentra formando *biofilm*; además también se reportó un incremento en los metabolitos implicados en la síntesis y regulación de nucleótidos (adenina, guanina, citosina y timina), y en la N-acetil glucosamina, un exopolisacárido que sirve como constituyente principal de la matriz del *biofilm* (Sadiq *et al.*, 2020).

Actualmente, se ha evaluado el efecto de diferentes compuestos con actividad biológica frente a la formación del *biofilm* de diferentes modelos bacterianos, utilizando metabolómica como herramienta de análisis. Entre los pocos estudios reportados, se destaca el realizado por Shen *et al.*, en 2020, quienes determinaron los cambios metabólicos inducidos por el carnosol sobre el *biofilm* de *Staphylococcus aureus*. Entre los principales resultados se encuentra la afectación del metabolismo del glioxilato y el dicarboxilato; también, se presentaron cambios significativos en el metabolismo de la serina, treonina, arginina, prolina, aspartato, alanina, glutamato y en los metabolitos asociados con el metabolismo del glutatión. Lo anterior permitió

evidenciar que el carnosol presenta una actividad inhibitoria del *biofilm* de *Staphylococcus aureus* dependiente principalmente de la perturbación del metabolismo de aminoácidos y otros metabolitos importantes para el metabolismo bacteriano como el glutatión y el glioxilato. Sumado a lo anterior también se evidenciaron cambios en la motilidad bacteriana, la estructura del exopolisacárido y expresión de ácidos nucleicos (Shen, Ge y Yuan, 2020).

En otro estudio relacionado, Guo *et al.*, en 2020, investigaron mediante metabolómica dirigida el efecto del manganeso sobre pequeñas moléculas relacionadas con la formación del *biofilm* de *Escherichia coli*. Los resultados obtenidos permitieron detectar 16 metabolitos con diferencias significativas asociados principalmente a tres vías metabólicas, entre las cuales se encuentran la glucólisis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y el metabolismo del triptófano. Los autores demostraron que el manganeso puede inhibir la formación del *biofilm* de *E. coli* e inducir una reprogramación metabólica del microorganismo para sobrevivir (Lu *et al.*, 2019).

#### **6.1.5. Metabolómica del *quorum sensing***

Recientemente, mediante el uso de la metabolómica, ha sido posible estudiar y comprender los mecanismos de *quorum sensing* de diferentes microorganismos. Tang *et al.*, en 2018, utilizaron análisis metabolómicos y lograron descubrir el mecanismo regulatorio basado en acil-homoserina lactonas del microorganismo *Anammox consortia*, modelo biológico utilizado en la industria para la eliminación de nitrógeno de las aguas residuales. Los resultados del estudio permitieron determinar que las diferentes lactonas presentan diferentes funciones sobre el metabolismo bacteriano; la 3-oxohexanoil homoserina lactona (3OC6-HSL) se asoció con la

regulación del metabolismo de la lisofosfatidilcolina y con el crecimiento bacteriano. La hexanoil-homoserina lactona (C6-HSL), la octanoil-homoserina lactona (C8-HSL) y la 3OC6-HSL se relacionaron con el normal funcionamiento de la cadena transportadora de electrones y el enriquecimiento de la vía de la UDP-N-acetilglucosamina para promover la síntesis de exopolisacárido y favorecer la formación de *biofilm*. Se determinó la importancia de las lactonas en la síntesis de los aminoácidos alanina, valina, glutamato y en la regulación selectiva del aspartato y la leucina para afectar el nivel de proteínas extracelulares (Tang *et al.*, 2018).

La metabolómica se ha utilizado para comprender cómo los compuestos con actividad inhibitoria del *quorum sensing* afectan el metaboloma bacteriano al bloquear este mecanismo de comunicación bacteriana. En un estudio llevado a cabo por Zhou *et al.*, en 2019 se realizó un análisis metabolómico basado en RMN-<sup>1</sup>H para determinar los cambios globales en los metabolitos de la bacteria patógena *Pseudomonas aeruginosa* PA01, después de su exposición al inhibidor del *quorum sensing*, hordenina. Un total de 40 metabolitos fueron detectados y se pudo determinar que la hordenina induce la represión de la síntesis de enzimas antioxidantes y potencia el estrés oxidativo debido a la disfuncionalidad del sistema de *quorum sensing* de la bacteria. Además, la hordenina altera los componentes de la membrana bacteriana, incrementa su permeabilidad y altera el metabolismo energético, el metabolismo de los aminoácidos, de los nucleótidos, y en última instancia, atenua la patogenicidad de *P. aeruginosa* PA01 (Zhou *et al.*, 2019).

En el presente trabajo se han evaluado los cambios metabolómicos producidos por el AE de LTC II sobre la formación del *biofilm* de *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis ATCC 13076 y *Escherichia coli* O157:H7, también se estudiaron los cambios metabólicos producidos

por el AE de LTC II cuando inhibe el mecanismo de *quorum sensing* en la bacteria biosensora *Chromobacterium violaceum* CV026.

Los resultados obtenidos permitieron proponer los posibles mecanismos de acción del AE de LTC II sobre cada uno de los microorganismos de estudio.

## 6.2. Materiales y métodos

### 6.2.1. Materiales

Las bacterias *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella entérica* Ser Enteritidis ATCC 13076 fueron utilizadas para la evaluación del efecto del AE de LTC II sobre la formación del *biofilm*. La evaluación del efecto del AE LTC II sobre la inhibición del *quorum sensing* se llevó a cabo con la cepa de *Chromobacterium violaceum* CV026.

El AE de LTC II fue extraído y caracterizado en el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales (CENIVAM), de la Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga, Colombia).

Los medios de cultivo Luria Bertani (LB), caseína hidrolizada, infusión cerebro corazón (BHI), peptona, agar bacteriológico, fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), fosfato dipotásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) y el sulfato de amonio ( $\text{NH}_4$ ) $_2$  $\text{SO}_4$  fueron obtenidos de Oxoid (Hampshire, UK). El Dimetilsulfóxido (DMSO), metanol y acetonitrilo (grado HPLC), el cristal violeta y el Carbobenzoxyglycyl-L-tyrosin (Z-GLY-TYR-OH) fueron adquiridos en Merck (Darmstadt,

Alemania).

Todas las reacciones y ensayos de actividad *antibiofilm* fueron realizados empleando agua MilliQ de resistividad 18.2  $\Omega$ , extraída del equipo de laboratorio Smart2 Pure de Thermo Scientific (Loughborough, UK).

### 6.2.2. Métodos

Para realizar la evaluación de los cambios metabólicos producidos por el AE de LTC sobre la formación del *biofilm* de *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella entérica* Ser Enteritidis ATCC 13076, y la inhibición del *quorum sensing* de la bacteria *Chromobacterium violaceum* CV026 se llevó a cabo la extracción de los metabolitos utilizando la metodología descrita por Zhou *et al.* (Zhou *et al.*, 2019). los extractos fueron analizados por cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (UHPLC-ESI-HRMS-Orbitrap).

### 6.2.3. Extracción de metabolitos bacterianos

La extracción de los metabolitos se llevó a cabo según la metodología descrita por Zhou *et al.*, (Zhou *et al.*, 2019), con algunas modificaciones. Para realizar la extracción del *biofilm* de *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella entérica* Ser Enteritidis ATCC 13076 se utilizaron

recipientes de vidrio estériles; el *biofilm* fue formado en cupones de vidrio de 1x1.5 cm durante 24 h a 37 °C, con tratamiento (en presencia de AE de LTC II) y sin tratamiento (control) como se indicó en la sección 2.2.2 del capítulo 3 del presente trabajo. La extracción se inició con el desprendimiento de las células del *biofilm* bacteriano después de 24 h en presencia y ausencia del AE de LTC II. El *biofilm* se desprendió del cupón de vidrio mediante sonicación durante 1 min y posterior desprendimiento mecánico. Los cultivos bacterianos se recogieron y se lavaron con agua peptonada al 0.1%, y luego, se centrifugaron tres (3) veces a 5000 rpm, durante 10 min a 4 °C. Posteriormente, se adicionaron 500 µL de metanol acuoso (50% v/v), seguido de Acetonitrilo (grado HPLC). Después de la sonicación de la muestra durante 15 min en baño con hielo utilizando un equipo de ultrasonido E30H (*Elma*, Singen, Alemania), la muestra se centrifugó a 14000 rpm, durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante se depositó en un tubo Eppendorf y se evaporó el disolvente utilizando un concentrador de vacío Savant Speed Vac SPD120 (*Thermo Fisher Scientific*, Asheville, NC 28804, EE.UU). Finalmente, el residuo se reconstituyó con 400 µL de metanol acuoso (70% v/v) y se almacenó a -80 °C para su posterior análisis por UHPLC-Orbitrap-MS. Se empleó como estándar interno el Z-Gly-Tyr-OH en una concentración de 5 ppm, el cual fue adicionado al iniciar la extracción de los metabolitos. Se utilizaron muestras de control de calidad preparadas a partir de las extracciones obtenidas, con el objetivo de garantizar que los resultados obtenidos se debían a diferencias entre las muestras control y tratamiento. Todas las extracciones se hicieron por triplicado.

#### **6.2.4. Análisis UHPLC-Orbitrap- MS**

Una alícuota (500  $\mu\text{L}$ ) de muestra se analizó por UHPLC-ESI-HRMS-*Orbitrap*-MS. Se empleó un UHPLC *Dionex<sup>TM</sup> Ultimate<sup>TM</sup> 3000* (*Thermo Scientific*, Sunnyvale, CA, EE.UU), equipado con un desgasificador (SRD-3400), una bomba binaria de gradiente (HPG3400RS), un inyector automático de muestras (WPS 300TRS) y una unidad termostataada para la columna (TCC 3000). Columna *Hypersil GOLD<sup>TM</sup> aQ* (*Thermo Scientific*, Sunnyvale, CA, EE.UU.; 100X 2.1 mm, 1.9  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula) se usó, a 30 °C. La fase móvil fue ácido fórmico al 0.2% en agua (A) y ácido fórmico al 0.2% en acetonitrilo (B). La condición inicial de gradiente fue la siguiente: 100% de A cambiando linealmente a 100% de B en 8 min, se mantuvo constante 4 min, se regresó a 100% A en 1 min y se mantuvo en equilibrio durante 3 min. El flujo de la fase móvil fue de 300  $\mu\text{L}/\text{min}$  y el volumen de inyección, 1  $\mu\text{L}$ . El UHPLC se acopló a un espectrómetro de masas de alta resolución con un sistema de detección de corrientes de iones tipo *Orbitrap* (*Exactive Plus*, *Thermo Scientific*, Sunnyvale, CA, EE.UU.), a través de una interfaz de electronebulización con calefacción (HESI-II), operada en modo de iones positivos, a 350 °C, voltaje de capilar +3500V, temperatura del capilar 320 °C. El *Orbitrap* operó en modo de barrido completo (*Full MS Scan*) con resolución 70000. Los iones se enviaron para su fragmentación a la celda de colisiones HCD (*High-Energy Collisional Dissociation*), a diferentes energías (20, 30, 40 y 50 eV) en el modo de barrido por pasos (*Stepped Scan*). Para cada energía de colisión, se utilizó una resolución  $R_{\text{FWHM}}$  de 35000, usando AGC de  $3 \times 10^6$  y un tiempo de inyección en la cámara *C-trap* de 50 ms. Todos los espectros de masas se obtuvieron en el rango de  $m/z$  80 – 1000 u.m.a. Esta misma metodología fue utilizada para el modo de ionización negativo.

### 6.2.5. Procesamiento y análisis estadístico de datos obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS

Los análisis por LC/MS se realizaron en los modos de ionización positiva y negativa usando un enfoque dirigido y no dirigido. Los datos obtenidos se analizaron con el *software* *Thermo Xcalibur* v3.1 (*Thermo-Scientific*, Sunnyvale, CA, EE.UU.). Para el procesamiento de los datos se usó el *software* libre XCMS (Versión 3.7.1), para realizar alineamiento y deconvolución de los datos del grupo control, tratamiento y muestras de calidad; luego, se extrajeron los datos en archivo Excel, en el cual se encontraban las características (relación  $m/z$ ) con su respectiva abundancia, y, a continuación, se disminuyó la dimensionalidad de los datos mediante un Análisis de Componentes Principales (PCA). Después, se exportaron los datos en Excel (.csv) y se analizaron usando el *software* *metaboanalyst* (Versión 5.0); en este *software* se realizó una normalización por la suma total de áreas, transformación logarítmica y un escalado de los datos *mean centering* para cada réplica del grupo control y el tratamiento. Posteriormente, se determinó la variable “veces de cambio” FC (Fold Change, en inglés) para obtener una cuantificación relativa de los metabolitos, donde el FC muestra una relación de medida de una muestra con tratamiento *versus* el control de referencia, cuyos valores de 0-0.5 corresponden a metabolitos que presentaron un incremento en su concentración, y valores mayores de 2 (umbral del 75%) indican metabolitos con disminución en su concentración. Posteriormente, se determinó el Log<sub>2</sub>FC, en el cual, valores negativos se asocian con aumento en la concentración, y valores positivos indican una reducción en la concentración.

Se realizó el segundo análisis (*t-test*), para determinar la variación estadística de las medidas de los dos grupos. Valores  $p$  menores de 0.05 fueron considerados estadísticamente

significativos. Se calculó el valor FDR (*False Discovery Rate*) que permite relacionar aquellos datos que son realmente extraños. Un metabolito es considerado estadísticamente significativo si su valor-*p* y FDR es menor de 0.05, de lo contrario, se considera como un falso descubrimiento (Storey, 2003).

La identificación tentativa de los metabolitos estadísticamente significativos se realizó mediante comparación de las relaciones masa/carga (*m/z*) medidas para cada molécula (junto con los posibles aductos) con las reportadas en base de datos de espectrometría de masas; con ayuda del *software online* CEU mass mediator (Versión 1.0), que hace búsquedas en bases de datos como Metlin, Mine, Lipid Maps, KEGG y HMDB. Finalmente, se determinaron las rutas metabólicas posiblemente afectadas por la alteración de los metabolitos tentativamente identificados, lo cual se realizó con el *software* Metaboanalyst (Versión 5.0).

### 6.3. Resultados y discusión

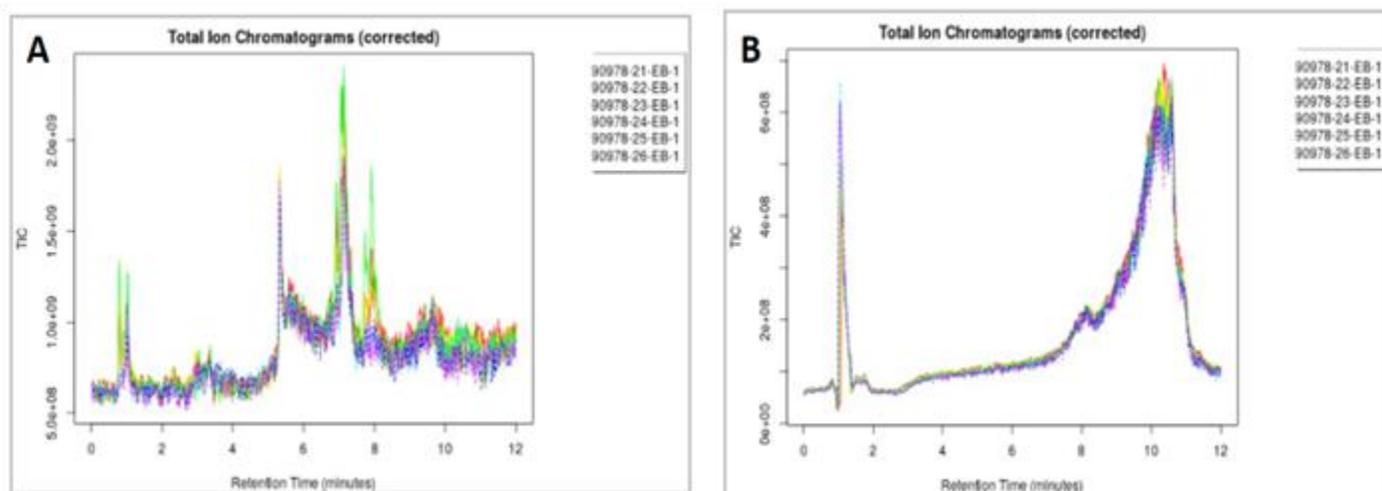
La concentración inhibitoria del AE de LTC II que inhibe la formación del *biofilm* de *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella entérica* Ser Enteritidis ATCC 13076 correspondió a la reportada previamente en el Capítulo 3, la cual fue de 0.19 mg/mL. Para los análisis metabolómicos de inhibición del QS del AE de LTC II se utilizó una concentración de 0.2 mg/mL, reportada en el Capítulo 4 del presente trabajo.

### 6.3.1. Análisis metabolómico del efecto del AE de LTC II sobre la formación del *biofilm* de *Salmonella enterica* Ser Enteritidis

Obtenidos los datos de análisis de muestras por UHPLC-Orbitrap-MS, se realizó su procesamiento según un enfoque de metabolómica dirigida, y no dirigida ambos modos de ionización, positiva y negativa. Se realizó el alineamiento de cada uno de los cromatogramas del grupo control y tratamiento (**Figura 17**), detectándose 601 y 346 características de relación

#### Figura 17

*Resultados de alineamiento y deconvolución de los cromatogramas del grupo control y tratamiento con LTC II sobre Salmonella enterica Ser Enteritidis para los datos obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS.*



masa/carga ( $m/z$ ) en modo de ionización positiva y negativa, respectivamente.

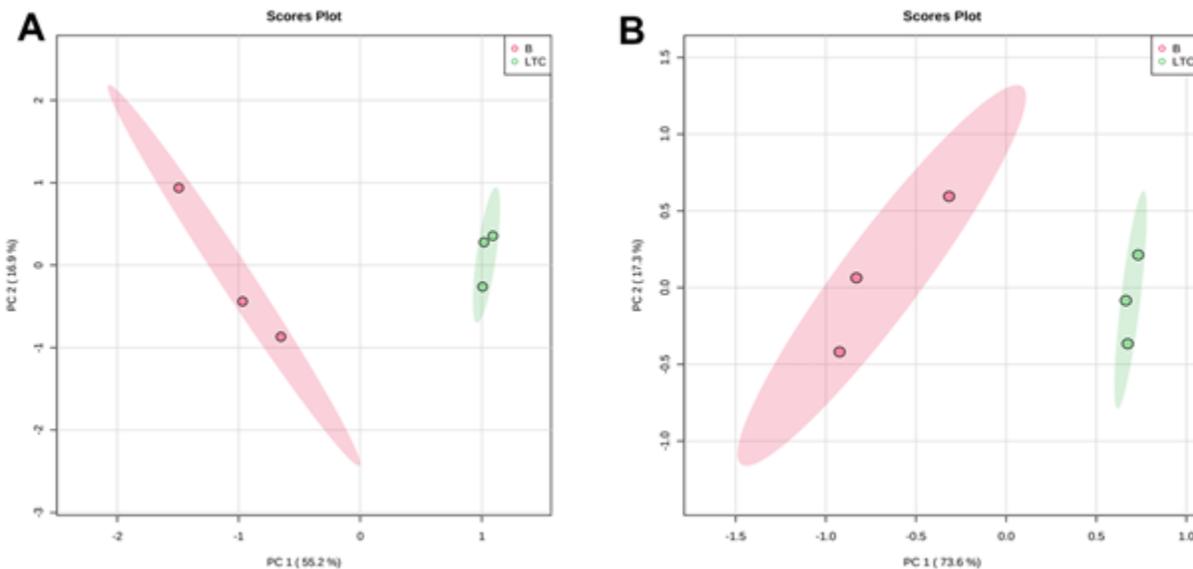
*Nota.* A. Modo de ionización positivo y B. Modo de ionización

**6.3.1.1. Análisis metabólico del efecto del AE de LTC II sobre la formación del *biofilm* de *Salmonella enterica* Ser Enteritidis: enfoque dirigido.** En la metabolómica dirigida se realizó la búsqueda de las masas de metabolitos de interés que habían sido reportados en la literatura (Anexo 1) (metabolitos relacionados con el metabolismo energético, de carbohidratos, aminoácidos, nucleótidos, lípidos, síntesis de LPS, peptidoglucano y comunicación bacteriana) para lo cual se utilizó el *software Thermo Xcalibur v3.1*.

El conjunto de datos se utilizó para realizar un análisis de componentes principales (PCA) con el objetivo de disminuir la dimensionalidad de los mismos; en la **Figura 18** se observan los PCA obtenidos con un nivel de confianza del 95%. En la **Figura 18A** se ilustra el PCA (score plot) para el análisis en modo de ionización positiva con una varianza analizada para el componente 1 y 2 de 55.2% y 16.9%, respectivamente; en la figura **18B** se muestran los resultados obtenidos para el análisis por modo de ionización negativa, cuya varianza analizada para los componentes 1 y 2 fue de 73.6% y 17.3%, respectivamente. Los resultados obtenidos indican que existen diferencias en la expresión (inducción o inhibición) de los metabolitos presentes entre las muestras control y el grupo tratamiento. En el **anexo 2** se relaciona el análisis PCA de los datos con las muestras de control de calidad, lo cual permitió validar que las diferencias de expresión metabólica se deben al proceso biológico experimental y no, a interferencias causadas de tipo instrumental. Este último análisis se llevó a cabo en todos los microorganismos estudiados y en los dos enfoques utilizados.

**Figura 18**

*Análisis de componentes principales (PCA) de los resultados obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS de muestras control (círculos en rojo) versus muestras con tratamiento (círculos en verde) en el enfoque dirigido A. Modo de ionización positiva y B. Modo de ionización negativa*

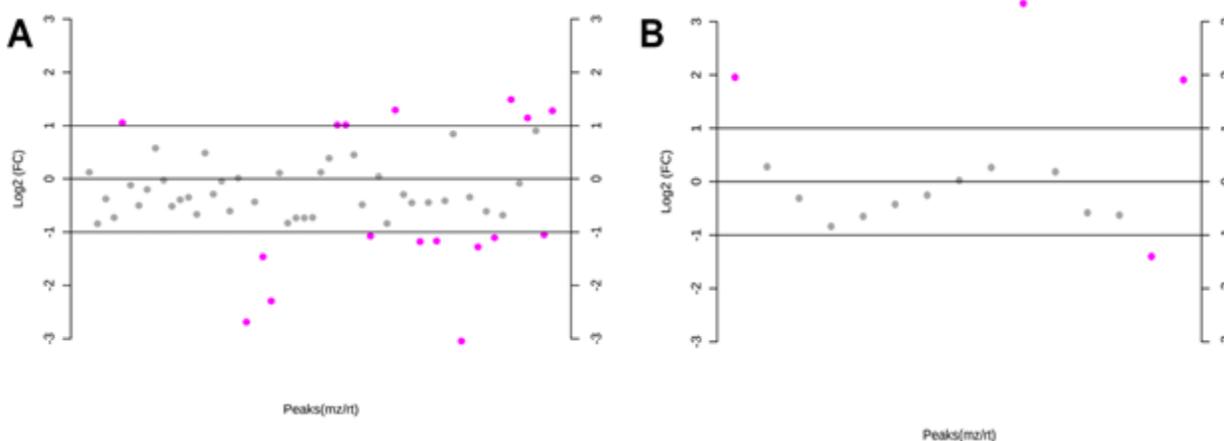


El análisis estadístico univariado de los datos permitió determinar la variable de respuesta *Fold Change* (FC) entre el grupo tratamiento y el grupo control para el enfoque dirigido; los datos que se tomaron en cuenta fueron aquellos que presentaron un FC mayor de 2 y menor de 0.5. En la **Figura 19** se muestran los esquemas de  $\text{Log}_2\text{FC}$  obtenidos a partir del FC para los resultados LC/MS operados en los dos modos de ionización del enfoque dirigido; en el cual valores negativos se asocian con un aumento en la concentración de los metabolitos (previamente identificados de interés para el estudio, **anexo 1**) en las muestras de tratamiento respecto a las muestras control, y valores positivos indican una disminución en la concentración de los metabolitos del tratamiento respecto a la del control. En la **Figura 19A** se muestran los resultados del análisis LC/MS operado en modo de ionización positiva; se detectaron 17

metabolitos con alteraciones en su expresión; de éstos, diez presentaron un aumento en la concentración y siete presentaron una disminución en la concentración en el grupo tratamiento en comparación con el grupo control. En la **figura 19B**, con base en los resultados LC/MS operado el modo de ionización negativa se determinó un metabolito con aumento de su concentración y tres con la disminución de su concentración en el grupo de tratamiento con respecto al control.

### Figura 19

*Relación de los cambios de expresión de metabolitos en la formación del biofilm de Salmonella enterica Ser Enteritidis en presencia del AE de LTC II usando el enfoque dirigido A. Modo de ionización positiva y B. Modo de ionización negativa. Las señales*

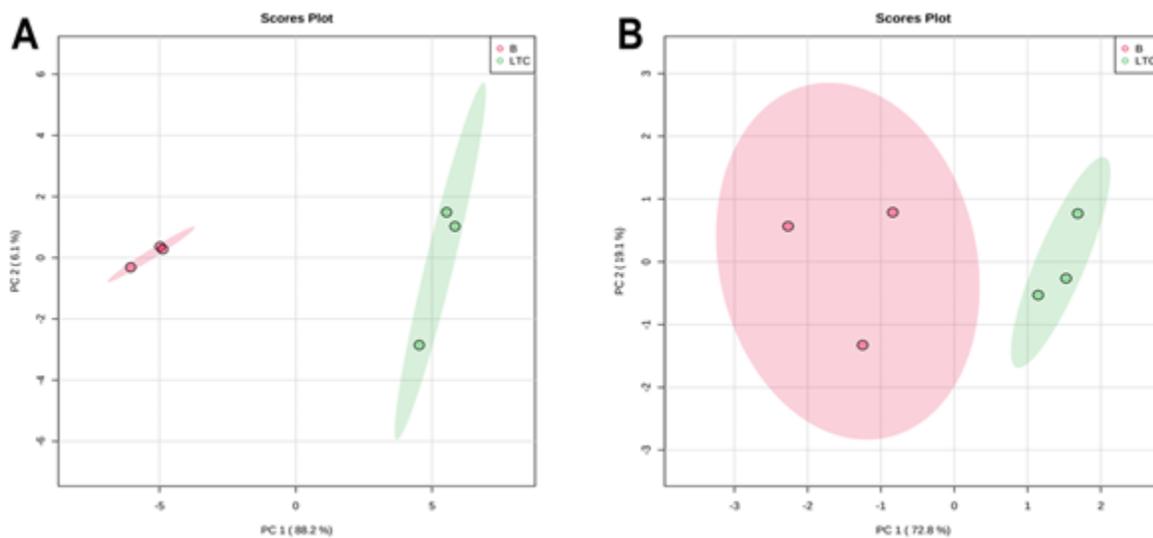


Se determinó el valor  $p$  para evaluar si las diferencias presentadas en los grupos eran estadísticamente significativas. Como resultado de los análisis por metabolómica dirigida se detectaron 8 metabolitos con diferencias significativas en su expresión, los cuales se encuentran reportados en la **Tabla 12**, (junto con los metabolitos obtenidos del análisis por metabolómica no dirigida).

**6.3.1.2. Análisis metabólico del efecto del AE de LTC II sobre la formación del biofilm de *Salmonella enterica* Ser Enteritidis: enfoque no dirigido.** Luego de realizar el alineamiento y deconvolución de las corrientes iónicas totales del grupo control y tratamiento con LTC II sobre *Salmonella enterica* Ser Enteritidis para los datos obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS, se realizó un PCA de las señales obtenidas con un nivel de confianza del 95%. En la Figura 20A se muestran los resultados de LC/MS en el modo de ionización positiva, con una varianza analizada para el componente 1 y 2 de 88.2% y 6.1%, respectivamente. En la Figura 20B se observan los resultados obtenidos por LC/MS en el modo de ionización negativa, cuya varianza analizada para los componentes 1 y 2 fue de 72.8% y 19.1%, respectivamente.

### Figura 20

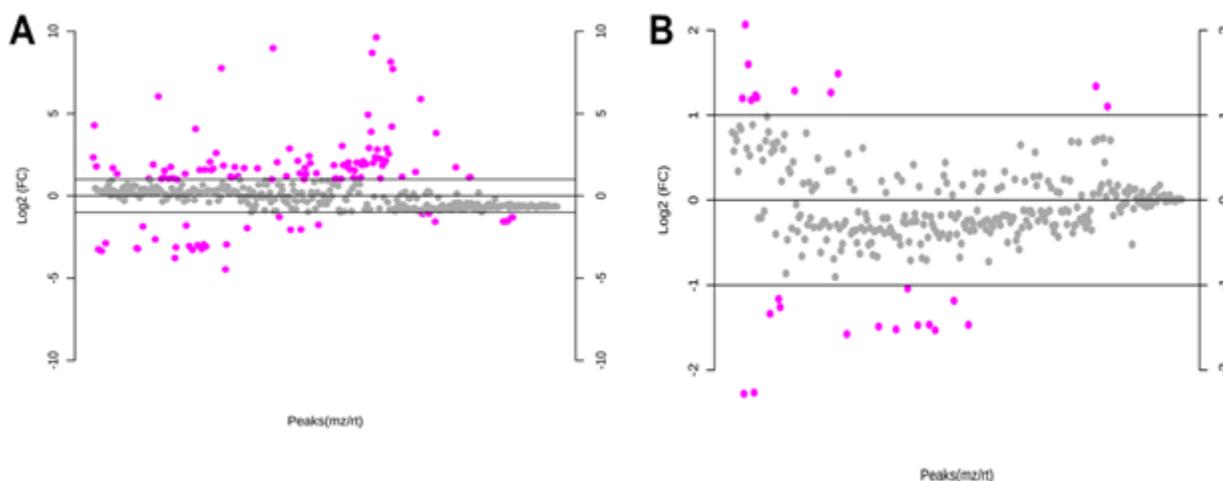
*Análisis de componentes principales (PCA) de los resultados obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS de muestras control (círculos en rojo) versus muestras con tratamiento (círculos en verde). A. Modo de ionización positiva y B. Modo de ionización negativa.*



Se determinó el *Fold Change* (FC) entre el grupo tratamiento y el grupo control. En la **Figura 21** se muestran los esquemas de Log2FC obtenidos a partir del FC para los dos modos de ionización. Los resultados por LC/MS mostraron que en el modo de ionización positivo fueron detectadas 119 corrientes iónicas, de las cuales 32 presentaron un incremento en la abundancia relativa respecto al patrón interno utilizado en el grupo tratamiento en comparación con el grupo control, mientras 87 corrientes iónicas evidenciaron una disminución (**Figura 21A**). Mientras que según los resultados de análisis por LC/MS en el modo de ionización negativa se detectaron 25 corrientes iónicas, de las cuales 14 se encontraron con concentración incrementada y 11 disminuidas en su abundancia relativa entre el grupo tratamiento en comparación con el grupo control.

### Figura 21

*Relación de los cambios de expresión de metabolitos en la formación del biofilm de Salmonella enterica Ser Enteritidis en presencia del AE de LTC II usando el enfoque no dirigido A. Modo de ionización positiva y B. Modo de ionización negativa.*



*Nota.* Las señales de color morado indican los metabolitos que presentaron cambios en su expresión, de tal manera que valores negativos se asocian con aumento en la concentración, y

valores positivos indican una reducción en la concentración del grupo tratamiento en comparación con el grupo control.

Los valores  $p$  y FDR mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las corrientes iónicas. El análisis de cada una de las corrientes iónicas permitió identificar tentativamente aquellos metabolitos con importancia en el metabolismo bacteriano. La identificación tentativa de los metabolitos se realizó a través de la comparación de las relaciones masa/carga ( $m/z$ ) obtenidas experimentalmente con las reportadas en bases de datos de espectrometría de masas (sección 6.2.6); adicional, los diferentes patrones de fragmentación de las señales obtenidas fueron también comparadas para lograr una mayor certeza de cada uno de los metabolitos identificados (**Anexo 3**). Como resultado de los análisis metabólicos, se encontraron 12 metabolitos con diferencias significativas en su expresión (**Tabla 12**). Es importante aclarar que algunos metabolitos fueron detectados en los dos enfoques de análisis utilizados, es decir, metabolómica dirigida y no dirigida. Finalmente, los metabolitos detectados y de interés para el estudio, fueron utilizados para el análisis de las rutas metabólicas que se vieron afectadas como consecuencia del efecto ocasionado por el AE de LTC II sobre la formación del *biofilm* de *Salmonella enterica* Ser Enteritidis.

**Tabla 12**

*Metabolitos (tentativamente identificados) significativamente alterados por el efecto del AE de LTC II sobre la formación del biofilm de Salmonella enterica Ser Enteritidis.*

<b>Metabolito</b>	<b>FC</b>	<b>Log2FC</b>	<b>Valor <i>p</i></b>	<b>FDR</b>	<b>Modo de Ionización</b>	<b>Tipo de análisis y nivel de expresión</b>
<b>Succinoil -L- arginina</b>	0.10508	-3.2505	1.87E-05	7.65E-04	+	(ND)↑
<b>Succinil-L-ornitina</b>	0.25660	-1.9624	5.28E-05	0.001189	+	(ND)↑
<b>LysoPE (0:0/16:1(9Z))</b>	0.33781	-1.5657	2.11E-02	0.042174	+	(ND)↑
<b>Ácido acetoacético</b>	0.37838	-1.4021	1.80E-03	0.008981	-	(ND)↑
<b>Ácido nicotínico</b>	0.36304	-1.4618	1.71E-03	0.041503	+	(D)↑
<b>UMP</b>	2.1092	1.0767	1.12E-03	0.008366	+	(D)↓
<b>AMP</b>	2.9842	1.5774	2.57E-04	0.002971	+	(D)↓
<b>Glutationato</b>	3.1810	1.6695	1.09E-04	0.002003	-	(ND)↓
<b>Octadecil homoserina lactona</b>	6.0767	2.6033	2.01E-04	0.002615	+	(ND)↓
<b>dGMP</b>	2.9842	1.5774	2.57E-04	0.002971	+	(D)↓

<b>Adenina</b>	2.69482	1.4302	3.20E-05	0.000405	+	(D)↓
<b>UDP-N-Acetil-D-Glucosamina</b>	2.80360	1.4873	2.11E-03	0.04513	+	(D)↓
<b>4-aminobutanoato</b>	3.7520	1.9077	8.46E-04	0.006341	-	(D)↓
<b>2 -Oxoarginina</b>	2.2960	1.1991	1.08E-05	3.72E-03	-	(ND)↓
<b>Ácido succínico</b>	3.8834	1.9573	6.61E-04	0.006342	-	(D)↓

D: Enfoque dirigido

ND: Enfoque no dirigido

**6.3.1.3. Análisis de las vías metabólicas afectadas por el efecto del AE de LTC II sobre la formación del *biofilm* de *Salmonella enterica* Ser Enteritidis.** La correlación entre los metabolitos identificados previamente (Tabla 12) y el mapa metabólico del microorganismo, permitió identificar siete principales rutas metabólicas, posiblemente alteradas por el efecto del AE de LTC II frente a la formación del *biofilm* de *Salmonella enterica* Ser Enteritidis (Tabla 13) En la Tabla 13 se muestran los hits que hacen referencia a la cantidad de metabolitos con expresión diferencial, significativamente alterados en cada una de las rutas metabólicas.

**Tabla 13**

*Principales rutas metabólicas afectadas por el AE de LTC II sobre la formación del biofilm de Salmonella enterica Ser Enteritidis*

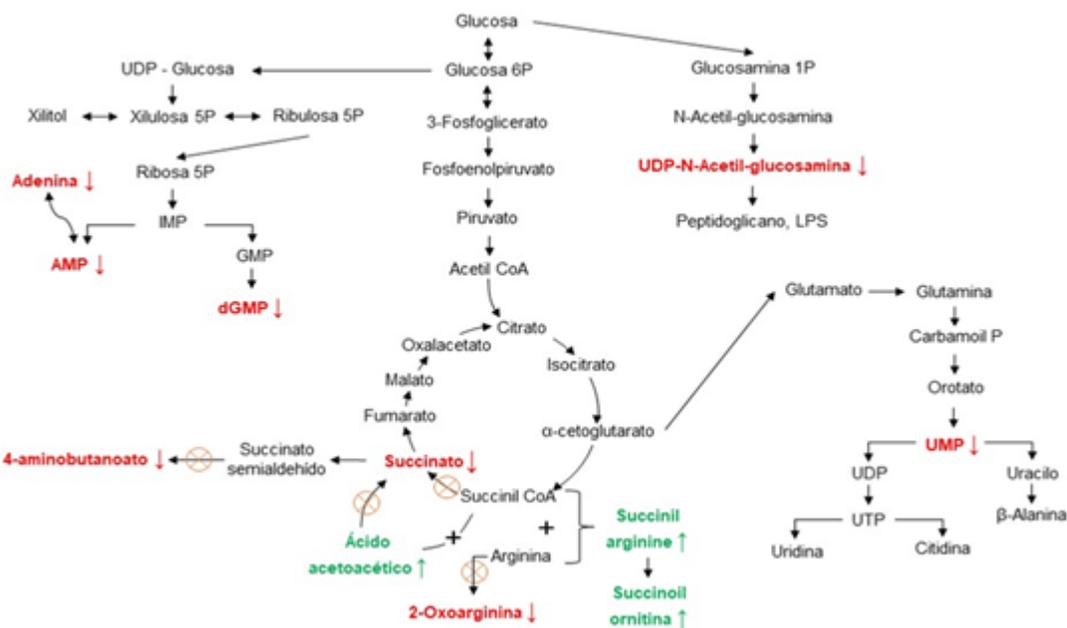
<b>Ruta Metabólica</b>	<b>Hits</b>	<b>Metabolitos identificados</b>
<b>Metabolismo de la arginina y prolina</b>	4	2-Oxoarginina, succinil -L- arginina, succinil -L-ornitina y 4-aminobutanoato
<b>Metabolismo del butanoato</b>	3	Ácido acetoacético, 4-aminobutanoato y ácido succínico
<b>Metabolismo de purinas</b>	3	AMP, dGMP, adenina
<b>Metabolismo de la nicotinamida</b>	2	Ácido nicotínico y ácido succínico
<b>Síntesis de LPS y peptidoglucano</b>	1	UDP-N-Acetil-D-glucosamina
<b>Metabolismo de pirimidinas</b>	1	UMP
<b>Ciclo de Krebs</b>	1	Ácido succínico

En la **Figura 22** se muestra un panorama general de las rutas metabólicas afectadas, entre

las cuales se destacan las relacionadas con el metabolismo de los ácidos nucleicos, la síntesis de peptidoglucano y lipopolisacárido (LPS), el ciclo de Krebs y sus interconexiones con el metabolismo de la arginina y el butanoato.

**Figura 22**

*Esquema general de las vías metabólicas afectadas por el AE de LTC II sobre la formación del biofilm de Salmonella enterica Ser Enteritidis*



*Nota.* El color verde representa los metabolitos incrementados, y los metabolitos en color rojo representa aquellos que se encuentran disminuidos.

En la interpretación de las rutas metabólicas afectadas por el AE de LTC II es importante

analizar la disminución en la concentración de UDP-N-Acetil-D- glucosamina (UDP-GlcNAc) en las muestras con tratamiento (las que tienen el AE de LTC II) en comparación con las muestras control (aquellas con ausencia del AE de LTC II), debido a que la UDP-GlcNAc es un precursor metabólico común utilizado en la síntesis de LPS y peptidoglucano. Por lo tanto, la regulación en la biosíntesis de UDP-GlcNAc constituye un punto de control esencial en el acoplamiento de la síntesis de los componentes principales del *biofilm* (Klein and Raina, 2015). Además, la UDP-GlcNAc al ser un componente de los exopolisacáridos que componen el *biofilm*, presenta un rol importante en la persistencia de las bacterias en los organismos huésped y las deficiencias en su síntesis modifican la morfología de las colonias bacterianas; lo anterior se ha demostrado en modelos bacterianos Gram negativos (Moreira *et al.*, 2003) y Gram positivos (Fittipaldi *et al.*, 2007). Sumado a lo anterior, también, se ha asociado la inhibición en la expresión de los genes *MurA* y *GlmS* con el bloqueo en la síntesis de UDP-GlcNAc, lo cual desencadena modificaciones en la estructura del *biofilm* y en el metabolismo bacteriano (Malcova, Karasova y Rychlik, 2009; Klein *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta lo anterior, la significativa disminución de la UDP-GlcNAc se correlaciona con la inhibición en la formación del *biofilm* de *Salmonella enterica* Ser Enteritidis en presencia del AE de LTC II, debido a la disminución en la síntesis de constituyentes esenciales de la capa del *biofilm*.

El metabolismo de los nucleótidos también se evidenció afectado por el tratamiento, debido a la disminución en la concentración de adenina, AMP, dGMP y UMP. Es importante recordar que el metabolismo de las purinas presenta una conexión con el metabolismo de los azúcares por vía de las pentosas fosfato, la cual permite la formación de ribosa-5P, azúcar que hace parte de la inosina monofosfatada (IMP), primer nucleótido formado en la síntesis de *novo*

de las purinas (Dandanell *et al.*, 2008). A partir del IMP se forma en simultáneo el AMP y el GMP; en el caso del AMP, se encontró una disminución significativa en su concentración durante el tratamiento con el AE, lo cual puede estar asociado con un bloqueo en algunas de las reacciones que permite el paso de IMP a AMP, y que, por tanto, tendría como consecuencia la imposibilidad de formar nucleótidos difosfatados y trifosfatados derivados de la adenina, conduciendo así, a una posible disminución en la formación de ADN. La disminución de dGMP evidencia un bloqueo en la formación de desoxirribonucleótidos derivados de la guanina, lo cual también tendría repercusiones en la formación de ácidos nucleicos. La adenina también se encontró disminuida en las muestras del tratamiento, por lo cual diferentes procesos metabólicos en los cuales participa esta base nitrogenada estarían siendo afectados negativamente, entre ellos, la síntesis de autoinductores relacionados con sistemas de comunicación bacteriana y las vías de salvamento de nucleótidos de adenina, lo que impediría obtener ATP por esta ruta metabólica. En lo referente a la afectación en el metabolismo de nucleótidos de pirimidinas se encontró una disminución en la concentración de UMP; primer nucleótido formado en la síntesis de *novo* de pirimidinas desde el cual se sintetizan los nucleótidos de uracilo, citosina y timina (Dandanell *et al.*, 2008). Por lo tanto, la disminución en la síntesis de UMP se traduce en una reducción de nucleótidos trifosfatados derivados del metabolismo de las pirimidinas; integrando lo anterior, se puede evidenciar una depleción en la síntesis de nucleótidos monofosfatados de purinas y pirimidinas.

La alteración en el metabolismo de nucleótidos tiene una relación directa en la formación del *biofilm*, lo cual ha sido evidenciada en diferentes estudios sobre varios modelos bacterianos, que sugieren que la biosíntesis de nucleótidos es indispensable para la correcta formación del

*biofilm* (Sauer *et al.*, 2002; Beenken *et al.*, 2004; Martin-Rodriguez y Romling, 2017; Caro-Astorga *et al.*, 2020). La disminución en la concentración de nucleótidos está estrechamente correlacionada con un efecto negativo sobre el microorganismo principalmente en: a). el desarrollo normal del microorganismo desencadenando alteraciones metabólicas que se evidencian en una disminución en la formación del *biofilm*; b). la inhibición en la producción de ADN extracelular, el cual es un componente esencial de la matriz del *biofilm* de muchos microorganismos, entre los que se incluyen las diferentes especies del género *Salmonella*; c). cambios de expresión en las moléculas de señalización derivadas de nucleótidos (como por ejemplo, el AMPc y el c-di-GMP) (Krasteva, Giglio y Sondermann, 2012; Keseler *et al.*, 2013; Caro-Astorga *et al.*, 2020).

La disminución en el ATP producido por el microorganismo no se evidenció solamente por el bloqueo en el metabolismo de los nucleótidos, también, se logró determinar por el bloqueo del ciclo de Krebs, debido a la marcada disminución del ácido succínico, un sustrato de esta ruta metabólica que se sintetiza luego de la acción de la enzima succinato sintetasa a partir de Succinil CoA. La disminución en la concentración del succinato impediría obtener energía metabólica a partir del ciclo de Krebs, entonces el succinil CoA se comenzaría a acumular y se tendría que buscar una alternativa para su utilización; en este caso, según los resultados obtenidos se puede inferir que el succinil CoA se metabolizaría junto con el aminoácido arginina y mediante catálisis de la enzima arginina succiniltransferasa produciría succinoil L-arginina, metabolito que se encontró incrementado en la muestra del tratamiento.

El incremento de succinoil L-arginina se correlaciona con el incremento en la síntesis de la succinil -L-ornitina, metabolito producido por una reacción posterior de la

succinoyl L-arginina mediante catálisis enzimática con la enzima succinylarginina dihidrolasa. El anterior análisis también permite explicar la disminución presentada de la 2-oxoarginina, metabolito derivado del metabolismo de la arginina producido por una vía alterna, la cual, según los resultados obtenidos, estaría siendo bloqueada por el efecto del AE; lo que produciría que la arginina no pueda metabolizarse hacia 2-oxoarginina y entonces reaccione con el succinil CoA que no se puede convertir en succinato, para formar succinoyl arginina y, posteriormente, succinoyl ornitina en exceso.

Además, según los resultados obtenidos del efecto del AE de LTC II, el bloqueo de la formación de ácido succínico también podría ser debido a la interrupción de la reacción catalizada por la enzima acetoacetato CoA transferasa, que da lugar a la formación de ácido succínico a partir de ácido acetoacético y succinil CoA; en la presente investigación se determinó un incremento del ácido acetoacético debido a la imposibilidad para formar ácido succínico, mientras que el succinil CoA posiblemente continuó metabolizándose con la arginina. Debido a la disminución del ácido succínico como se puede observar en la **Figura 22**, se puede inferir que el paso hacia succinato semialdehído podría estar disminuido, lo anterior se evidenció en los resultados que mostraron una reducción del 4-aminobutanoato, sustrato formado a partir del succinato semialdehído en una reacción posterior.

Diferentes investigaciones han demostrado la importancia del ciclo de Krebs en la formación y mantenimiento del *biofilm*, de tal manera que constituye un punto vital para el control del *biofilm* de diferentes especies bacterianas, entre ellas *Salmonella enterica* (Yahya *et al.*, 2014). Específicamente, el ácido succínico puede ser utilizado por los microorganismos como fuente de carbono (Leech *et al.*, 2020) y se ha asociado con el normal desarrollo del

*biofilm* en etapas tempranas de formación (Pisithkul *et al.*, 2019). Sumado a lo anterior, este bloqueo del ciclo de Krebs tendría efectos sobre el metabolismo energético debido a las dificultades para generar ATP y realizar la fosforilación oxidativa, que contribuiría a desestabilizar la estructura del *biofilm*; ello guarda relación con los resultados reportados en el Capítulo 3 de la presente tesis doctoral con respecto a la inhibición del *biofilm* de *Salmonella* por el efecto del AE de LTC II.

En conclusión, se puede deducir que el posible mecanismo de acción del AE de LTC II sobre la inhibición de la formación del *biofilm* de *Salmonella enterica* Ser Enteritidis se relaciona principalmente con una inhibición en la síntesis de la UDP-GlcNAc, sustrato vital para la formación de la matriz que constituye el *biofilm*, además, el efecto del AE evaluado estaría inhibiendo la síntesis de *novo* y, posiblemente, las vías de salvamento de nucleótidos, ocasionando una depleción en la disponibilidad de nucleótidos y afectando la integridad y los mecanismos de señalización del *biofilm* que son dependientes de nucleótidos. Finalmente, también se estaría afectando el ciclo de Krebs a nivel de la síntesis de ácido succínico, lo cual llevaría a inducir la síntesis de succinil L-arginina y succinil L-ornitina, moléculas relacionadas con el metabolismo de la arginina, y a generar una reducción energética en el microorganismo que se asociaría con irregularidades en la estructura de la capa del *biofilm*.

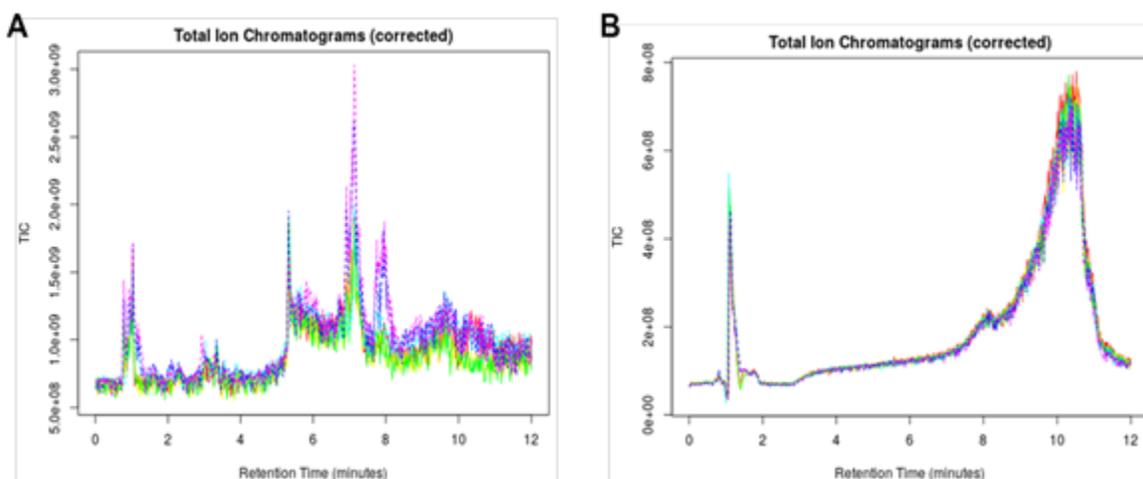
### **6.3.2. Análisis metabolómico del efecto del AE de LTC II sobre la formación del *biofilm* de *Escherichia coli* O157.H7**

Una vez obtenidos los resultados del análisis por UHPLC-Orbitrap-MS se realizó el procesamiento de los datos según la Sección 6.3.1. Mediante la utilización del *software* XCMS se alinearon los cromatogramas y se detectaron 584 características de relación masa/carga ( $m/z$ ) en modo de ionización positiva y 325 en modo de ionización negativa.

En la **Figura 23** se puede observar el resultado del alineamiento y deconvolución de los cromatogramas del grupo control (sin AE) y tratamiento con LTC II sobre *E. coli* O157:H7 para los modos de ionización utilizados.

### Figura 23

*Resultados de alineamiento y deconvolución de los cromatogramas del grupo control y tratamiento con LTC II sobre E. coli O157:H7 para los datos obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS. A. Modo de ionización positivo y B. Modo de ionización negativo.*

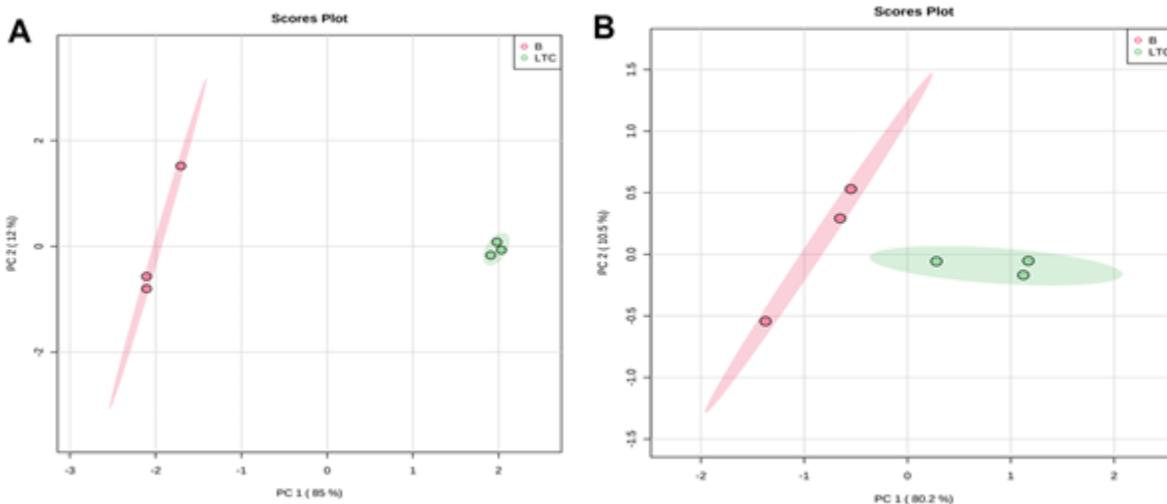


**6.3.2.1. Análisis metabólico del efecto del AE de LTC II sobre la formación del *biofilm* de *E. coli* O157:H7: Enfoque dirigido.** Para el análisis de los datos mediante un enfoque de metabolómica dirigida se realizó la búsqueda de diferentes metabolitos de interés reportados en la literatura y relacionados con la formación del *biofilm* y su metabolismo asociado. Entre estos metabolitos, se destacaron los relacionados con el metabolismo de las biomoléculas, síntesis de EPS, comunicación bacteriana, entre otros (anexo 1) (Guo 2020, Lu 2019, Zampieri 2017, Hill 2019).

Después de detectar los diferentes metabolitos de interés en la muestra control (sin presencia de LTC II) y la muestra tratamiento (en presencia de LTC II) se realizó un PCA con un nivel de confianza del 95%. En la **Figura 24A** se muestran los resultados del PCA (*score plot*) para el modo de ionización positiva con una varianza analizada para el componente 1 y 2 de 85% y 12%, respectivamente. En la **Figura 24B** se ilustran los resultados obtenidos para el modo de ionización negativa, cuya varianza analizada para los componentes 1 y 2 fue de 80.2% y 10.5%, respectivamente. Estos resultados indican que existe una diferencia en la expresión de los metabolitos entre las muestras de control y el tratamiento para los dos modos de ionización en el enfoque de análisis utilizado.

**Figura 24**

*Análisis de Componentes Principales (PCA) de los resultados obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS de muestras control (círculos en rojo) versus muestras con tratamiento (círculos en verde) en el enfoque dirigido.*

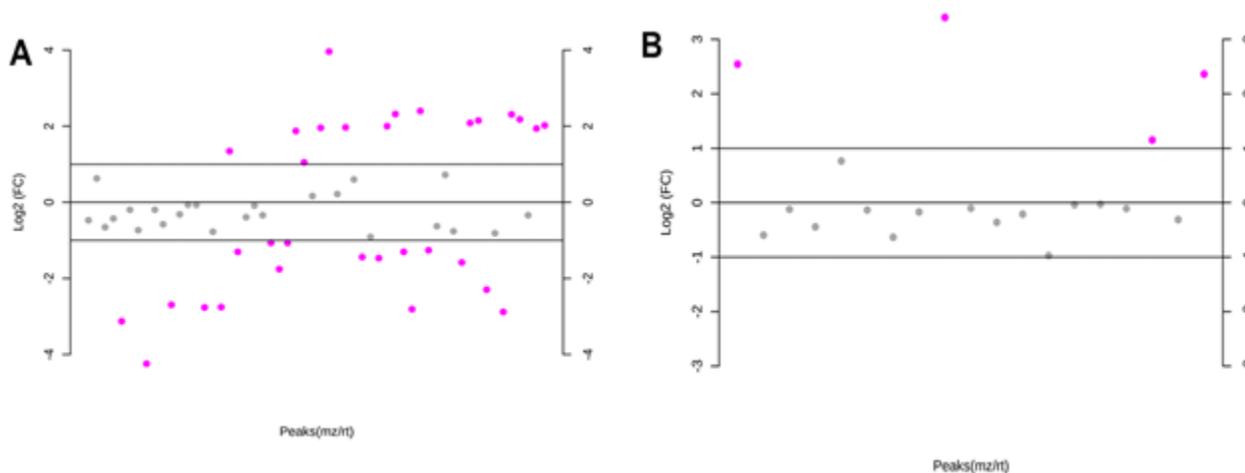


*Nota.* A. Modo de ionización positiva (A) y B. Modo de ionización positiva (A) y B. Modo de ionización negativa.

Se determinó el FC para el grupo tratamiento y el grupo control para los dos modos de ionización utilizados; como se indicó en la sección 6.3.1.1. En la **Figura 25A** se pueden observar los resultados en el modo de ionización positiva, en el cual 32 metabolitos fueron detectados con alteraciones en su expresión, de los cuales 17 presentaron un aumento en la concentración en el grupo tratamiento al ser comparados con el grupo control, mientras 15 presentaron una disminución en el grupo tratamiento al compararse con el grupo control. Con respecto al modo de ionización negativa, se obtuvieron cuatro metabolitos disminuidos en el grupo tratamiento respecto al del control (**Figura 25B**).

**Figura 25**

Relación de los cambios de expresión de metabolitos en la formación del biofilm de *E. coli* O157:H7 en presencia del AE de LTC II en el enfoque dirigido.



*Nota.* A. Modo de ionización positiva y B. Modo de ionización negativa Las señales de color morado indican los metabolitos que presentaron cambios en su expresión, de tal manera que valores negativos se asocian con aumento en la concentración, y valores positivos indican una reducción en la concentración del grupo tratamiento en comparación con los del grupo control.

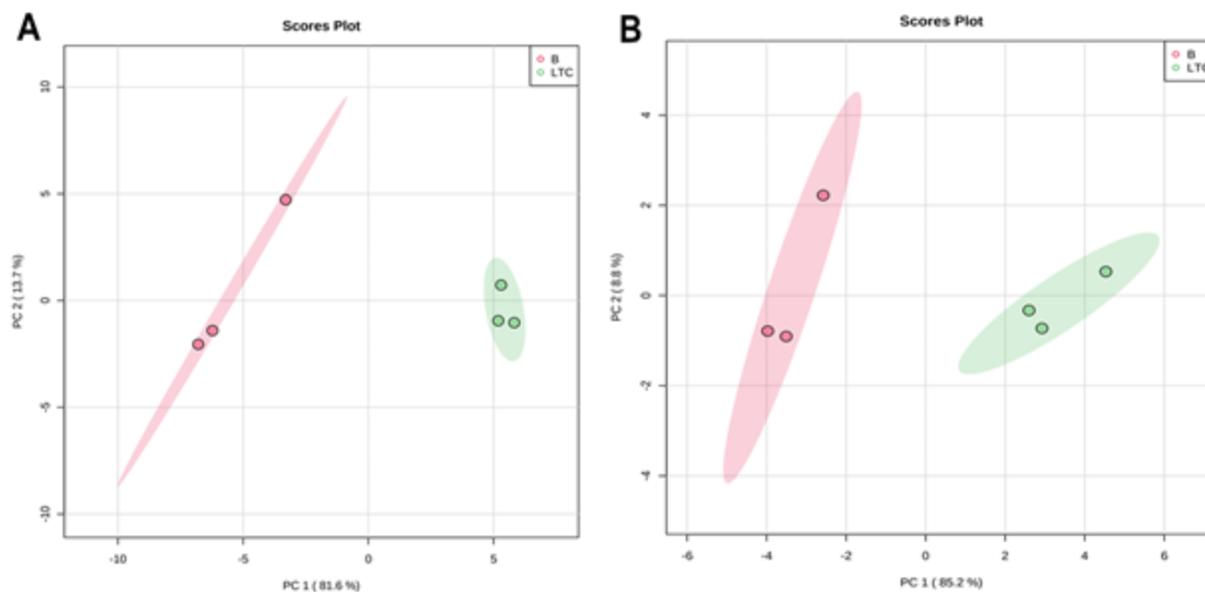
Se calcularon los valores  $p$  y FDR menores de 0.05 para poder detectar aquellos metabolitos estadísticamente significativos. Se encontraron 25 metabolitos con diferencias significativas como resultado del análisis metabolómico dirigido del efecto del AE de LTC II sobre la formación del *biofilm* de *E. coli* O157:H7. Los metabolitos obtenidos se encuentran reportados en la **Tabla 14** integrados con los metabolitos obtenidos del análisis no dirigido.

**6.3.2.2 Análisis metabólico del efecto del AE de LTC II sobre la formación del *biofilm* de *E. coli* O157:H7: Enfoque no dirigido.** Para el análisis mediante metabolómica no dirigida del efecto del AE de LTC II sobre la formación del *biofilm* de *E. coli* O157:H7, se

realizó un PCA de las señales obtenidas luego del alineamiento y deconvolución de los cromatogramas del grupo control y tratamiento (Figura 23). Los resultados mostraron diferencias notorias entre el grupo control y tratamiento para los dos modos de ionización utilizados, con una varianza analizada en, el componente 1 y 2 de 81.6% y 13.7%, respectivamente, en el modo de ionización positiva (Figura 26A) y una varianza analizada en el componente 1 y 2 de 85.2% y 8.8%, respectivamente, en el modo de ionización negativa (Figura 26B).

### Figura 26

*Análisis de componentes principales (PCA) de los resultados obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS de muestras control (círculos en rojo) versus muestras con tratamiento (círculos en verde) en el enfoque no dirigido*



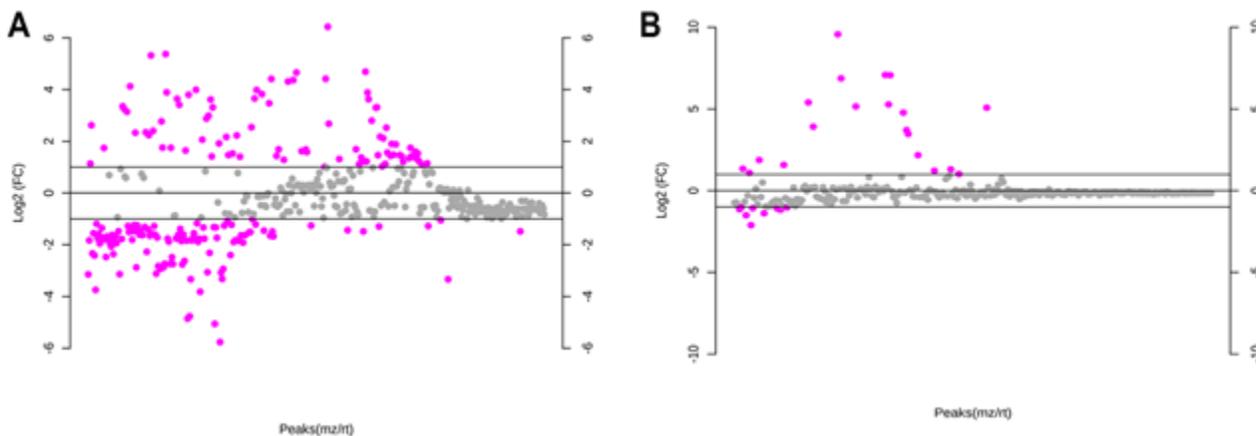
*Nota.* A. Modo de ionización positiva y B. Modo de ionización negativa.

Se calculó el FC entre el grupo tratamiento y el grupo control. En la **Figura 27** se pueden observar los esquemas de Log<sub>2</sub>FC obtenidos a partir de los valores de FC para los dos modos de

ionización del enfoque no dirigido; en la **Figura 27A** se evidencian 204 corrientes iónicas con diferencias en la expresión entre el grupo tratamiento y el grupo control en el modo de ionización positiva, de las cuales 114 corrientes iónicas exhibieron un incremento en la concentración, mientras 90 presentaron una disminución en la concentración en el grupo tratamiento. Por otra parte, en el modo de ionización negativa se detectaron 29 corrientes iónicas con cambios significativos en su expresión, de tal manera que 9 corrientes iónicas se encontraron incrementadas y 20 corrientes iónicas se evidenciaron disminuidas en el grupo tratamiento respecto al grupo control (**Figura 27B**).

### Figura 27

*Relación de los cambios de expresión de metabolitos en la formación del biofilm de E. coli O157:H7 en presencia del AE de LTC II en el enfoque no dirigido. A. Modo de ionización positiva y B. Modo de ionización negativa.*



*Nota.* Las señales de color morado indican los metabolitos que presentaron cambios en su expresión, de tal manera que valores negativos se asocian con aumento en la concentración, y valores positivos indican una reducción en la concentración del grupo tratamiento en comparación con el grupo control.

A continuación, se determinó cuáles de las corrientes iónicas detectadas eran

estadísticamente significativas, para lo cual se determinaron los valores  $p$  y FDR. Se realizó la identificación tentativa de los metabolitos a través de la comparación de las relaciones masa/carga ( $m/z$ ), como se describió en la Sección 6.3.1.2. Se detectaron 20 metabolitos con diferencias significativas en su expresión (**Tabla 14**), los cuales se utilizaron para la correlación con las vías metabólicas afectadas en *E. coli* O157:H7 por el efecto del AE de LTC II.

**Tabla 14**

*Metabolitos (tentativamente identificados) significativamente alterados por el efecto del AE de LTC II sobre la formación del biofilm de E. coli O157:H7*

<b>Metabolito</b>	<b>FC</b>	<b>Log2FC</b>	<b>Valor <i>p</i></b>	<b>FDR</b>	<b>Modo de Ionización</b>	<b>Tipo de análisis y nivel de expresión</b>
<b>L- arginina</b>	0.18438	-4.8515	5.10E-5	0.002229	+	(D)↑
<b>Beta-Alanil-L-arginina</b>	0.10020	-3.3190	2.36E-4	0.003634	+	(ND)↑
<b>Piridoxina</b>	0.19498	-2.3586	1.73E-3	0.011427	+	(ND)↑
<b>Uridina</b>	0.25640	-1.9636	8.64E-4	0.007099	+	(ND)↑
<b>Carnosina</b>	0.27093	-1.8840	1.06E-2	0.031514	+	(ND)↑
<b>Guanina</b>	0.29552	-1.7587	1.76E-3	0.011455	+	(ND)↑
<b>Ácido 4-piridóxico</b>	0.34023	-1.5554	5.46E-3	0.018929	-	(ND)↑

<b>Piridoxal</b>	0.35993	-1.4742	4.06E-3	0.016629	+	(ND)↑
<b>Timidina</b>	0.37757	-1.4052	4.27E-3	0.016793	+	(D)↑
<b>N-Fenilacetilglicina</b>	0.39105	-1.3546	6.15E-3	0.020190	+	(ND)↑
<b>Ácido 2-cetoglutarámico</b>	0.43133	-1.2131	0.002001	0.011978	-	(ND)↑
<b>Lisina</b>	0.11448	-3.1269	1.66E-3	0.007169	+	(D)↑
<b>O-succinil-L-homoserina</b>	0.14275	-2.8085	1.40E-3	0.006928	+	(D)↑
<b>Asparagina</b>	0.14720	-2.7642	1.45E-3	0.006928	+	(D)↑
<b>N-Acetilglutamina</b>	0.14810	-2.7553	1.45E-3	0.006928	+	(D)↑
<b>Glutamina</b>	0.15446	-2.6947	1.97E-5	8.79E-4	+	(D)↑
<b>Treonina</b>	0.020362	-2.2961	2.35E-3	0.008772	+	(D)↑
<b>Biotina</b>	0.33430	-1.5808	2.19E-2	0.039617	+	(D)↑

<b>Ácido piroglutámico</b>	0.40554	-1.3021	1.27E-2	0.026283	+	(D)↑
<b>5-Metilcitosina</b>	0.40554	-1.3021	1.27E-1	0.026283	+	(D)↑
<b>Piridoxal-5-fosfato</b>	2.8784	1.5253	0.002515	0.129550	+	(D)↓
<b>Acetil espermidina</b>	3.2068	1.6811	8.62E-5	0.002512	+	(D)↓
<b>Acetil putrescina</b>	6.8223	2.7703	5.47E-4	0.005937	+	(ND)↓
<b>Acetil cadaverina</b>	12.468	3.6401	1.56E-4	0.003086	+	(ND)↓
<b>AMP</b>	15.898	3.9908	1.11E-4	0.002883	+	(D)↓
<b>Ácido mirístico</b>	11.103	3.4729	4.56E-3	0.020438	-	(D)↓
<b>Ácido 3 hidroxitetradecanoico</b>	13.065	3.7077	1.32E-2	0.040474	-	(ND)↓
<b>Adenosina</b>	2.5401	1.3449	6.75E-3	0.017176	+	(D)↓
<b>Dihidrouracilo</b>	3.8392	1.9408	5.67E-3	0.015872	+	(D)↓

<b>Hipoxantina</b>	3.9165	1.9696	4.32E-3	0.013426	+	(D)↓
<b>5-Metiltioadenosina</b>	4.0024	2.0009	9.61E-4	0.006928	+	(D)↓
<b>UMP</b>	4.2460	2.0861	8.87E-3	0.021605	+	(D)↓
<b>Anserina</b>	4.5360	2.1814	4.72E-4	0.006604	+	(D)↓
<b>Citosina</b>	4.9960	2.3108	6.40E-3	0.017074	+	(D)↓
<b>Xantina</b>	4.9634	2.3113	1.70E-2	0.032743	+	(D)↓
<b>Ácido succínico</b>	5.8247	2.5422	2.14E-3	0.013519	-	(D)↓

---

D: Enfoque dirigido

ND: Enfoque no dirigido

**6.3.2.3. Análisis de las vías metabólicas afectadas por el efecto del AE de LTC II sobre la formación del *biofilm* de *E. coli* O157:H7.** El análisis de las principales vías metabólicas afectadas en *E. coli* O157:H7 por el efecto del AE de LTC II se llevó a cabo utilizando los metabolitos detectados con diferencias estadísticamente significativas en los dos enfoques utilizados, los cuales se encuentran compilados en la Tabla 14. Seguidamente, los metabolitos se asociaron con sus respectivas vías metabólicas y se realizó el análisis de los posibles efectos metabólicos producidos por el AE de LTC II (Tabla 15).

**Tabla 15**

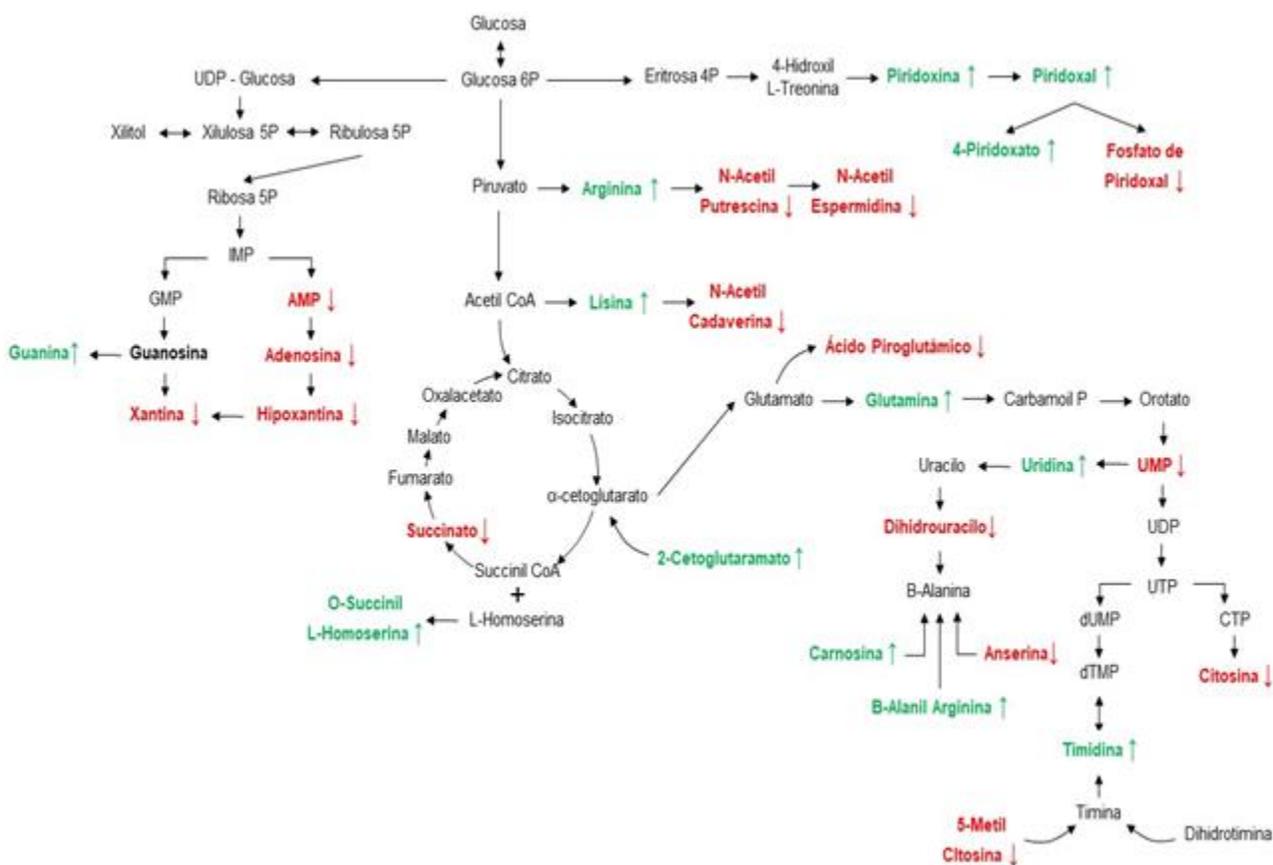
*Principales rutas metabólicas afectadas por el AE de LTC II sobre la formación del biofilm de E. coli O157:H7*

<b>Ruta metabólica</b>	<b>Hits</b>	<b>Metabolitos</b>
<b>Metabolismo de pirimidinas</b>	7	L-Glutamina, UMP, uridina, dihidrouracilo, citosina, timidina y 5-metilcitosina
<b>Metabolismo de purinas</b>	5	AMP, adenosina, xantina, hipoxantina y guanina
<b>Metabolismo de la piridoxina</b>	4	Piridoxina, piridoxal, 4-piridoxato y fosfato de piridoxal
<b>Metabolismo de la <math>\beta</math>-alanina</b>	4	Carnosina, $\beta$ -alanil arginina, anserina y dihidrouracilo
<b>Metabolismo de la arginina</b>	3	Arginina, N-acetil putrescina y N-acetil espermidina
<b>Metabolismo del glutamato</b>	3	L-Glutamina, 2-cetoglutamato y ácido piroglutámico
<b>Ciclo de Krebs</b>	1	Succinato
<b>Síntesis de lípido A</b>	1	Ácido 3-hidroxitetradecanoico

En la **Figura 28** se muestra un panorama general de las rutas metabólicas afectadas por el AE de LTC II, entre las cuales se destacan las relacionadas con el metabolismo de los nucleótidos, el metabolismo de aminoácidos como la arginina, glutamato y β-alanina, el ciclo de Krebs, la síntesis de lípido A y el metabolismo de la piridoxina.

**Figura 28**

*Esquema general de las vías metabólicas afectadas por el AE de LTC II sobre la formación del biofilm de E. coli O157:H7.*



*Nota.* El color verde representa los metabolitos incrementados, y los metabolitos en color rojo representa aquellos que se encuentran disminuidos en la muestra con tratamiento.

En el análisis de las rutas metabólicas se destaca la afectación en el metabolismo ocasionada por el AE de LTC II, a nivel del metabolismo de los nucleótidos de purinas y pirimidinas de *E. coli* O157:H7, el cual es más evidente que el efecto mostrado del AE de LTC II sobre el metabolismo de los nucleótidos en *Salmonella* Enteritidis, debido a que se detectaron cambios significativos en la concentración de 12 metabolitos asociados con los ácidos nucleicos. Diferentes estudios han resaltado la importancia de los nucleótidos en la formación del *biofilm* de *E. coli*; especialmente, los relacionados con las vías biosintéticas de pirimidinas (Lee *et al.*, 2008; Ueda *et al.*, 2009; Garavaglia, Rossi and Landini, 2012; Rossi *et al.*, 2018). La inactivación de genes que pertenecen a la vía biosintética del UMP altera la producción de fibras curli y celulosa, componentes importantes en la matriz del *biofilm* de *E. coli*, al inhibir la transcripción del operón *csgDEFG*, y evita así la producción de la proteína CsgD, una de las principales moléculas reguladoras en la formación del *biofilm* (Garavaglia, Rossi y Landini, 2012). Se ha evidenciado un vínculo entre el *biofilm* y las concentraciones de nucleótidos intracelulares que parece ser particularmente fuerte, ya que incluso ligeras perturbaciones en la síntesis de *ново* de nucleótidos pueden no afectar el metabolismo y crecimiento celular, pero si afectar la formación y el mantenimiento del *biofilm* (Ueda *et al.*, 2009).

En el presente estudio, se detectaron modificaciones en la concentración de siete metabolitos asociados con el metabolismo de pirimidinas, entre los cuales se destaca la disminución en la concentración del UMP, primer nucleótido formado en la síntesis de *ново* de pirimidinas, y a partir del cual se sintetizan también los nucleótidos derivados de la citosina y la timina. La disminución del UMP reportada en la presente investigación se puede asociar con la

depleción en la formación de fibras curli y celulosa, lo cual contribuiría con la inhibición de la formación del *biofilm* de *E. coli* que se obtuvo en los ensayos de actividad antibiofilm descritos en el Capítulo 3 de la presente tesis doctoral. Además del UMP, se evidenció también disminución en la concentración de la citosina, el dihidrouracilo y la 5-metilcitosina, lo cual tiene efectos en el metabolismo de las pirimidinas. Como se representa en la **Figura 28**, la uridina y la timidina se detectaron con un incremento en la concentración respecto al control. Para el caso de la uridina, el incremento presentado puede ser producto de la incapacidad para fosforilar la molécula, lo cual ocasiona su acumulación; mientras que para la timidina, su incremento puede ser debido a un efecto contrarregulatorio del metabolismo bacteriano para mantener la síntesis de nucleótidos de timina a partir de su conexión con la dihidrotimina.

Además de la afectación del metabolismo de las pirimidinas, el AE de LTC II también indujo alteraciones en el metabolismo de las purinas, en este caso se observó una disminución en la concentración del AMP, adenosina, hipoxantina, xantina; mientras que la guanina tuvo un incremento en su concentración. Diferentes estudios han asociado la elevada concentración de ATP con la estimulación de la adhesión inicial del *biofilm* en *E. coli*, debido a que el ATP constituye la estructura del EPS (Xi and Wu, 2010; Sharma *et al.*, 2016; Spari y Beldi, 2020). La disminución de los metabolitos relacionados con la formación de los nucleótidos de adenina posiblemente disminuye la producción de ATP, molécula vital para la formación del *biofilm*; la disminución de la hipoxantina y la xantina evidencian una disminución también en el catabolismo de los nucleótidos de purinas. Lo anterior indica que, en la fase inicial de formación de los nucleótidos de purina, cuando se ha sintetizado el IMP, la conversión de IMP a AMP estaría bloqueada, pero la formación de IMP a GMP no tendría alteraciones e incluso se

comenzarían a acumular metabolitos asociados con la guanina como se muestra en la **Figura 28**. Este posible mecanismo de acción del AE de LTC II sobre la síntesis de *novoo* del metabolismo de las purinas y pirimidinas ha sido reportado en fármacos como el 5-fluorouracilo, azatioprina y sulfatiazol, los cuales han demostrado actividad *antibiofilm* sobre *E. coli* y *P. aeruginosa* (Antoniani *et al.*, 2010, 2013)

La disminución en la concentración de ATP en *E. coli*, también, podría ser ocasionada por el bloqueo del ciclo de Krebs producido por la inhibición del succinato, lo cual impediría que la fosforilación oxidativa se lleve a cabo, y por consiguiente, los niveles de ATP disminuirían. Sin embargo, es importante resaltar que recientemente Zhang *et al.* (2020) demostraron que ante la incapacidad de obtener el ATP a partir de la fosforilación oxidativa u otras vías metabólicas, *E. coli* recurre a obtener el ATP para sus funciones vitales vía glucolítica (Zhang *et al.*, 2020). Lo anterior explicaría en parte la inhibición del *biofilm* presentado, sin la afectación de la viabilidad del microorganismo.

Sumado a la afectación del metabolismo de los nucleótidos, el AE de LTC II presentó efectos sobre la síntesis de poliaminas, como la N-acetil putrescina, la N-acetil espermidina y la N-acetil cadaverina; metabolitos que fueron detectados disminuidos, y afectaron la formación del *biofilm* de *E. coli*. Estas poliaminas se han asociado con la estabilización de la estructura cromosómica, estimulación de la actividad ribosómica, afectación positiva en la traducción de varios reguladores globales, como RpoS, CyaA y proteínas involucradas en la señalización ppGpp (Terui *et al.*, 2012). Por lo tanto, el impacto fisiológico de estas poliaminas en la célula bacteriana es sustancial y se encuentra conectado con un comportamiento microbiano complejo en la formación diferencial del *biofilm* (Terui *et al.*, 2012; Nesse, Berg y Vestby, 2015). En el

caso de la putrescina, esta poliamina promueve la traducción de las proteínas UvrY y CpxR, dos reguladores de respuesta pertenecientes a los sistemas de respuesta BarA/UvrY y CpxA/CpxR, respectivamente. Lo anterior se encuentra ligado a cambios entre curli y el exopolisacárido poli  $\beta$ -1-6 N-acetil glucosamina, dos componentes principales en la formación del *biofilm* de *E. coli* (Rossi *et al.*, 2018).

El AE de LTC II también afectó metabolitos asociados con la síntesis de  $\beta$ -alanina, un aminoácido no proteico indispensable para la síntesis de pantotenato, precursor del cofactor esencial Coenzima A (CoA) (López-Sámamo *et al.*, 2020). En este caso, la mayoría de la  $\beta$ -alanina producida por las bacterias proviene de la conexión con el metabolismo de la uridina, específicamente, con la dihidrouridina (**Figura 28**), lo cual se detectó porque su concentración se disminuyó en la muestra con tratamiento, lo que ocasionaría una disminución de  $\beta$ -alanina; sin embargo, también, se evidenció un incremento en la concentración de carnosina y  $\beta$ -alanil arginina, dos sustratos a partir de los cuales, también, se puede sintetizar  $\beta$ -alanina y que serían importantes para mantener los niveles de CoA en *E. coli*.

Otro resultado importante obtenido en la presente investigación es la disminución del ácido 3-hidroxitetradecanoico, el ácido graso más común encontrado en el lípido A (Huang 1997), molécula que hace parte del LPS bacteriano. En este caso, podría presentarse una alteración en la estructura del *biofilm* de *E. coli* debido a la estrecha relación existente entre los niveles y estructura del LPS y la formación de la matriz del *biofilm* (Vogeleer *et al.*, 2019). El AE de LTC II también produjo cambios en la concentración de diferentes metabolitos asociados con el metabolismo de la piridoxina, con el incremento en la concentración de piridoxal, piridoxina y 4-piridoxato; con la disminución del fosfato de piridoxal. Hasta el momento no se

ha reportado en la literatura científica una conexión directa entre el metabolismo de la piridoxina y la formación del *biofilm* de *E.coli*. Sin embargo, la piridoxina tiene importancia en el crecimiento del microorganismo y sus niveles elevados son necesarios para la biosíntesis de aminoácidos y mantenimiento de la viabilidad bacteriana (Pease *et al.*, 2002; Rosenberg, Ischebeck y Commichau, 2017).

En conclusión, el efecto del AE de LTC II sobre la formación del *biofilm* de *E. coli* se encuentra asociado principalmente con la disminución en la síntesis de *novo* de los nucleótidos de purina y pirimidinas, la disminución en la concentración de poliaminas y la disminución de moléculas asociadas con el metabolismo energético; de tal manera, que estos cambios producen una disminución en la formación del *biofilm* por parte de *E. coli* O157:H7.

### **6.3.3. Análisis metabolómico del efecto del AE de LTC II sobre la inhibición del *quorum sensing* de CV026**

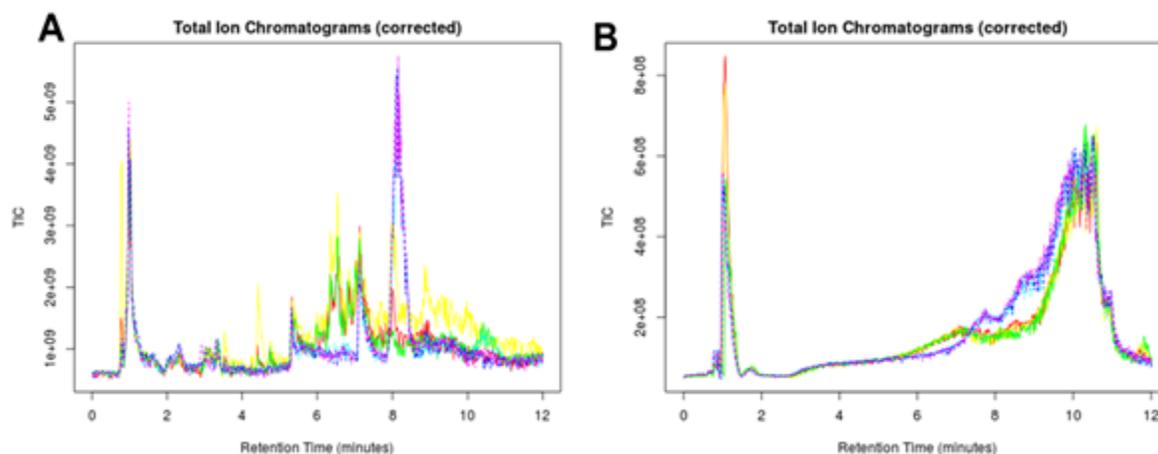
Una vez obtenidos los resultados del análisis por UHPLC-Orbitrap-MS de las muestras de control (CV026 inducido con hexanoil homoserina lactona en ausencia del AE) y muestra de tratamiento (CV026 inducido con hexanoil homoserina lactona en presencia del AE de LTC II). Mediante la utilización del software XCMS se alinearon los cromatogramas y se detectaron 1230 características de relación masa/carga ( $m/z$ ) en modo de ionización positiva y 626 en modo de ionización negativa.

En la **Figura 29** se muestra el resultado del alineamiento y deconvolución de los

cromatogramas del grupo control y tratamiento con LTC II sobre CV026 para los modos de ionización utilizados.

### Figura 29

*Resultados de alineamiento y deconvolución de los cromatogramas del grupo control y tratamiento con LTC II sobre CV026 para los datos obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS. A. Modo de ionización positivo y B. Modo de ionización negativo*



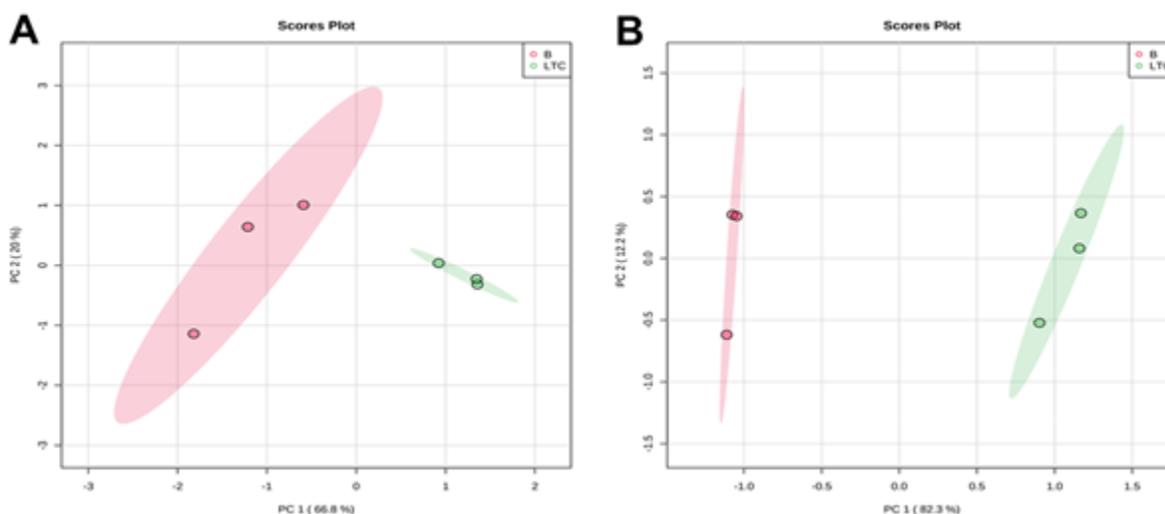
**6.3.3.1. Análisis metabólico del efecto del AE de LTC II sobre la inhibición del QS de CV026: Enfoque dirigido.** Para el análisis y la interpretación de los datos mediante un enfoque de metabolómica dirigida se realizó la búsqueda de diferentes metabolitos de interés reportados en la literatura y relacionados con la comunicación bacteriana dependiente de QS y su metabolismo asociado (Anexo 1).

Luego de detectar los diferentes metabolitos de interés en la muestra control y la muestra tratamiento, se realizó un PCA con un nivel de confianza del 95%. En la **Figura 30A** se muestran los resultados del PCA (*score plot*) para el modo de ionización positiva con una

varianza analizada para el componente 1 y 2 de 66.8% y 20%, respectivamente; en la **Figura 30B** se ilustran los resultados obtenidos para el modo de ionización negativa, cuya varianza analizada para los componentes 1 y 2 fue de 82.3% y 12.2%, respectivamente. Los resultados obtenidos muestran cambios en la expresión de los metabolitos entre las muestras de control y tratamiento para los dos modos de ionización en el enfoque de análisis utilizado.

### Figura 30

*Análisis de componentes principales (PCA) de los resultados obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS de muestras control (círculos en rojo) versus muestras con tratamiento (círculos en verde) en el enfoque no dirigido*



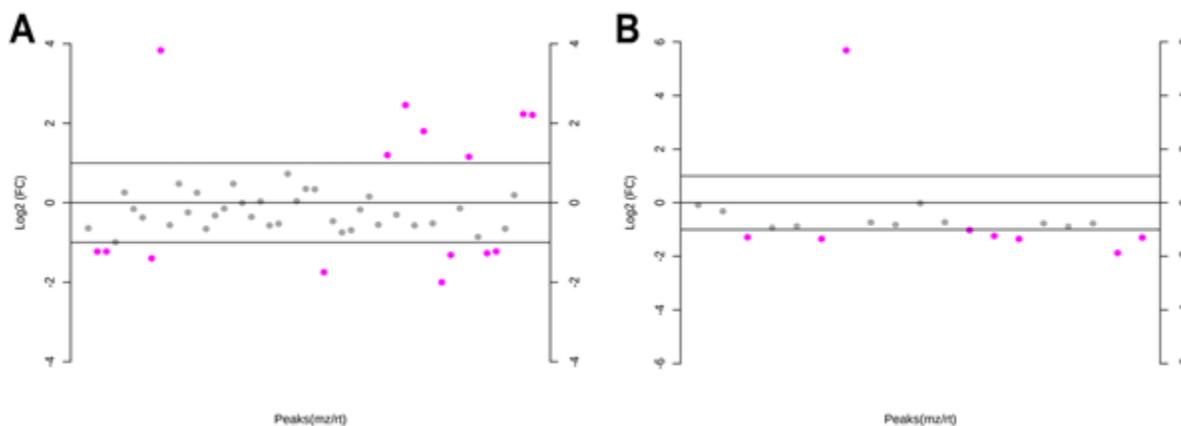
*Nota.* A. Modo de ionización positiva y B. Modo de ionización negativa.

El FC fue determinado para el grupo tratamiento y el grupo control para los dos modos de ionización utilizados; como se indicó en la sección 6.3.1.1. En la **Figura 31A** se evidencian los resultados en el modo de ionización positiva, en el cual 15 metabolitos fueron detectados con

alteraciones en su expresión, de los cuales siete presentaron un aumento en la concentración en el grupo tratamiento al ser comparados con el grupo control, mientras ocho tuvieron una disminución en el grupo tratamiento al compararse con el grupo control. De igual manera, en la **Figura 31B**, por el modo de ionización negativa se determinaron siete metabolitos con su concentración incrementada y uno disminuido en el grupo tratamiento respecto al control.

### Figura 31

*Relación de los cambios de expresión de metabolitos en la inhibición del QS de CV026 en presencia del AE de LTC II. A. Modo de ionización positiva y B. Modo de ionización negativa.*



*Nota.* Las señales de color morado indican las características de relación m/z encontradas como significativamente diferentes, de tal manera, que valores negativos se asocian con aumento en la concentración, y valores positivos indican una reducción en la concentración del grupo tratamiento en comparación con el grupo control.

A continuación, se detectaron los metabolitos estadísticamente significativos mediante el cálculo de los valores  $p$  y FDR. Se encontraron ocho metabolitos con diferencias significativas

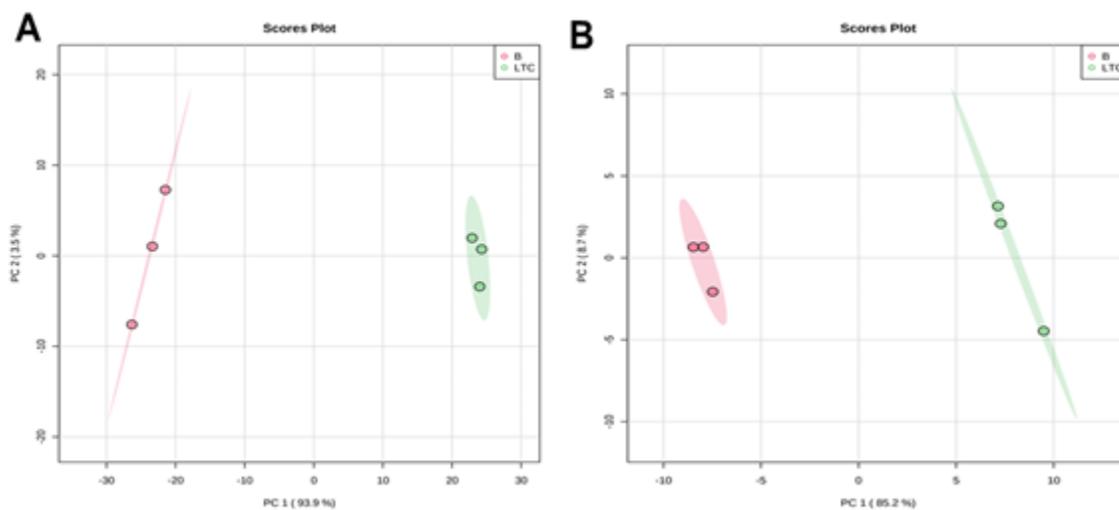
como resultado del análisis metabolómico dirigido del efecto del AE de LTC II sobre la inhibición del QS de CV026. Los metabolitos obtenidos se encuentran en la tabla 16 integrados con los metabolitos obtenidos del análisis no dirigido.

### 6.3.3.2. Análisis metabólico del efecto del AE de LTC II sobre la inhibición del QS

**de CV026: Enfoque no dirigido.** Para el análisis mediante metabolómica no dirigida del efecto del AE de LTC II sobre la inhibición del QS de CV026, se realizó un PCA de las señales obtenidas luego del alineamiento y deconvolución de los cromatogramas del grupo control y tratamiento (Figura 29). Los resultados evidenciaron cambios en la expresión entre el grupo control y tratamiento para los dos modos de ionización utilizados, con una varianza analizada en el componente 1 y 2 de 93.9% y 3.5%, respectivamente; en el modo de ionización positiva (Figura 32A) y una varianza analizada en el componente 1 y 2 de 85.2% y 8.7%, respectivamente, en el modo de ionización negativa (Figura 32B).

#### Figura 32

*Análisis de componentes principales (PCA) de los resultados obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS de muestras control (círculos en rojo) versus muestras con tratamiento (círculos en verde) en el enfoque no dirigido.*

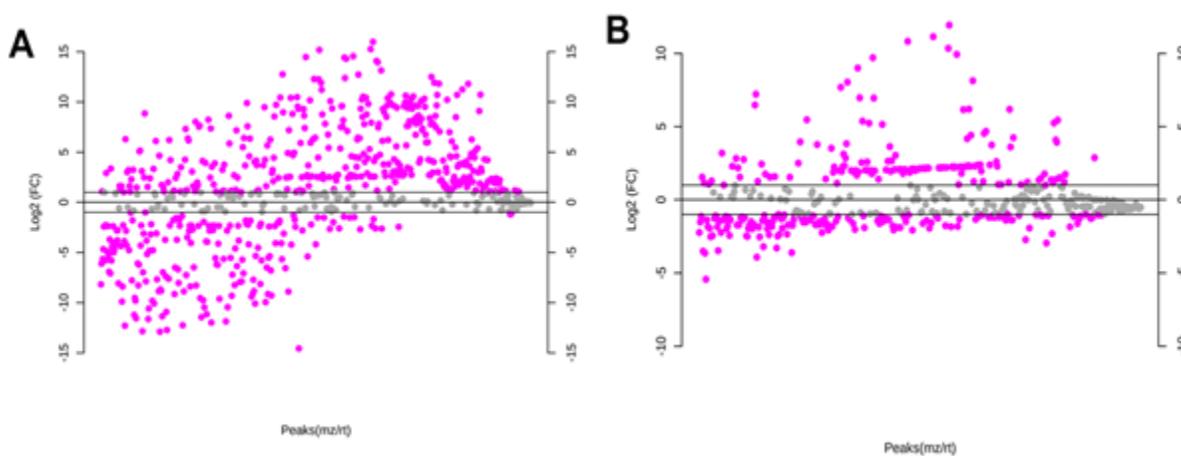


*Nota.* A. Modo de ionización positiva y B. Modo de ionización negativa.

Después de realizar el PCA, se determinó el FC entre el grupo tratamiento y el grupo control. En la **Figura 33** se muestran los esquemas de Log<sub>2</sub>FC obtenidos a partir de los valores de FC para los dos modos de ionización del enfoque no dirigido; en la **Figura 33A** se evidencian 590 corrientes iónicas con diferencias en la expresión entre el grupo tratamiento y el grupo control en el modo de ionización positiva, de las cuales 194 corrientes iónicas exhibieron un incremento en la concentración, mientras 396 presentaron una disminución en la concentración en el grupo tratamiento. Por otra parte, en el modo de ionización negativa se detectaron 301 corrientes iónicas con cambios significativos en su expresión, de tal manera que 159 corrientes iónicas se encontraron incrementadas y 142 corrientes iónicas se evidenciaron disminuidas en el grupo tratamiento respecto al grupo control (**Figura 33B**).

### Figura 33

*Relación de los cambios de expresión de metabolitos en la inhibición del QS de CV026 en presencia del AE de LTC II en el modo de ionización positiva (A) y negativa (B).*



**Nota.** Las señales de color morado indican las características de relación m/z encontradas como significativamente diferentes, de tal manera que valores negativos se asocian con aumento en la

concentración, y valores positivos indican una reducción en la concentración del grupo tratamiento en comparación con el grupo control.

Posteriormente, se determinó el valor  $p$  y el valor FDR para evidenciar las diferencias estadísticamente significativas entre las corrientes iónicas. Luego, se realizó la identificación tentativa de los metabolitos mediante la comparación de las relaciones masa/carga ( $m/z$ ), como fue descrito en la sección 6.3.1.2. Finalmente, se detectaron 23 metabolitos con diferencias significativas en su expresión (**Tabla 16**), los cuales se utilizaron para la correlación con las vías metabólicas afectadas en CV026 por el efecto del AE de LTC II.

**Tabla 16**

*Metabolitos (tentativamente identificados) significativamente alterados por el efecto del AE de LTC II sobre la inhibición del QS de CV026*

<b>Metabolito</b>	<b>FC</b>	<b>Log2FC</b>	<b>Valor <i>p</i></b>	<b>FDR</b>	<b>Modo de Ionización</b>	<b>Tipo de análisis y nivel de expresión</b>
<b>5-Hidroxi-L-triptófano</b>	0.39491	-1.3404	4.45E-5	3.97E-4	-	(D)↓
<b>Fenilalanina</b>	0.38475	-1.378	7.22E-4	2.80E-3	+	(ND)↓
<b>Pantoato</b>	0.39599	-1.3365	1.32E-3	3.68E-3	-	(ND)↓
<b>Xantina</b>	0.40419	-1.3069	2.26E-3	5.02E-3	+	(ND)↓
<b>3-Metilxantina</b>	0.42458	-1.2359	7.39E-4	2.82E-3	-	(ND)↓
<b>Triptófano</b>	14.2660	3.8345	4.59E-4	0.008101	+	(D)↑
<b>O-succinil-L-homoserina</b>	3.4846	1.801	1.19E-4	0.003194	+	(D)↑
<b>Violaceina</b>	4.6952	2.2312	0.001008	0.013351	+	(D)↑
<b>Deoxiviolaceína</b>	4.6333	2.212	1.21E-4	0.013351	+	(D)↑
<b>Ácido 2-hidroxibutirico</b>	51.7900	5.6946	1.61E-6	3.37E-5	+	(D)↑
<b>Prolina</b>	2.0233	1.0167	4.64E-3	0.007151	+	(ND)↑
<b>Timidina</b>	2.0588	1.0418	1.02E-2	0.014061	+	(ND)↑

<b>4-Piridoxato</b>	2.0734	1.0520	0.002977	0.005033	-	(ND)↑
<b>Ácido oftálmico</b>	2.1156	1.0811	0.004058	0.006363	-	(ND)↑
<b>B-Alanina</b>	2.1189	1.0833	0.002581	0.004536	+	(ND)↑
<b>Piridoxina</b>	2.2547	1.1729	0.003880	0.006136	+	(ND)↑
<b>Citrulina</b>	2.2589	1.1756	0.004479	0.006921	+	(ND)↑
<b>Panteteina</b>	3.0720	1.6192	6.59E-4	0.001469	+	(ND)↑
<b>Piridoxal</b>	4.9037	2.2939	1.12E-4	4.49E-4	-	(ND)↓
<b>L-Homofenilalanina</b>	6.7238	2.7493	5.92E-4	2.75E-5	+	(ND)↓
<b>Succinil-L-arginina</b>	11.2970	3.4978	4.16E-5	2.41E-4	+	(ND)↓
<b>Citidina</b>	17.7930	4.1532	2.68E-5	1.80E-4	+	(ND)↓

D: Enfoque dirigido

ND: Enfoque no dirigido

**6.3.3.3 Análisis de las vías metabólicas afectadas por el efecto del AE de LTC II sobre la inhibición del QS de CV026.** El análisis de las principales vías metabólicas afectadas en CV026 por el efecto del AE de LTC II se llevó a cabo utilizando los metabolitos detectados con diferencias estadísticamente significativas en los dos enfoques utilizados, los cuales se encuentran compilados en la tabla 16. Seguidamente, los metabolitos se asociaron en sus respectivas vías metabólicas y se realizó el análisis de los posibles efectos metabólicos producidos por el AE de LTC II (Tabla 17).

**Tabla 17**

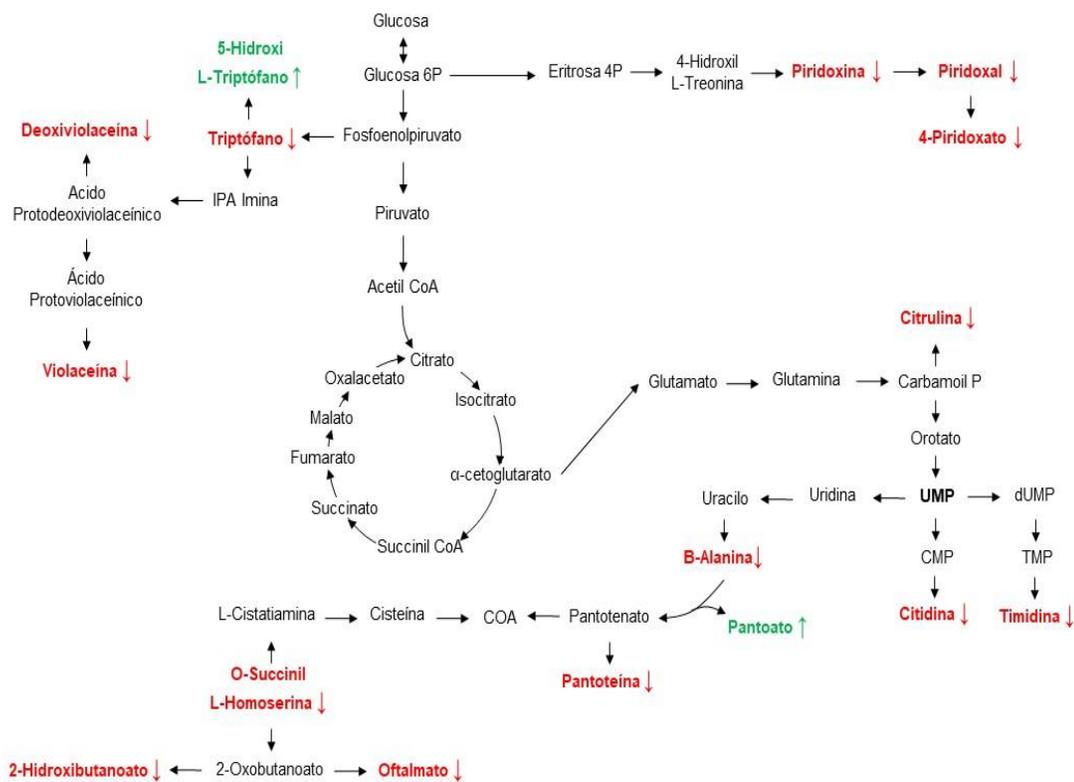
*Principales rutas metabólicas afectadas por el AE de LTC II sobre la inhibición del QS de CV026*

<b>Ruta Metabólica</b>	<b>Hits</b>	<b>Metabolitos</b>
<b>Síntesis de violaceína</b>	3	Triptófano, deoxiviolaceína y violaceína
<b>Metabolismo del pantotenato y la CoA</b>	3	$\beta$ -Alanina, pantoato y pantoteína
<b>Metabolismo de la piridoxina</b>	3	Piridoxina, piridoxal y 4-piridoxato
<b>Metabolismo de la cisteína</b>	3	O-succinil-L-homoserina, 2-hidroxi-butanoato y oftalmato
<b>Metabolismo de las pirimidinas</b>	3	B-Alanina, citidina y timidina

En la **Figura 34** se muestra un panorama general de las rutas metabólicas afectadas por el AE de LTC II sobre el metabolismo de CV026, entre las cuales se destacan las relacionadas con la síntesis de violaceína, el metabolismo del pantotenato, CoA, piridoxina, nucleótidos de pirimidina y metabolismo del aminoácido cisteína.

**Figura 34**

*Esquema general de las vías metabólicas afectadas por el AE de LTC II sobre la inhibición del QS de CV026.*



*Nota.* El color verde representa los metabolitos incrementados, y los metabolitos en color rojo representa aquellos que se encuentran disminuidos en la muestra con tratamiento.

En el análisis de las rutas metabólicas se destaca la afectación del AE de LTC II sobre la síntesis de la violaceína, debido a su relación directa con el mecanismo de comunicación bacteriana QS de CV026 (Venkatramanan *et al.*, 2020). El sistema de QS de CV026 consta de dos componentes denominados CviI y CviR (homólogos de LuxI y LuxR), los cuales responden

a una alta afinidad de las moléculas de acil-homoserina lactona (AHL) (McClellan *et al.*, 1997; Stauff and Bassler, 2011). Con el incremento en la densidad celular bacteriana, las moléculas de AHL se unen a receptores afines para formar un complejo que regula la expresión de genes diana (incluido el operón *vioABCDE*) e inducir la formación del pigmento violaceína (Choi *et al.*, 2015). Es importante destacar que la síntesis de violaceína producto del mecanismo de QS en CV026 se encuentra asociado con la regulación de la secreción de factores de virulencia como metaloproteasas Tipo II (TISS) y sistemas de secreción Tipo III (TIISS), motilidad en enjambre, síntesis de exopolisacáridos, proteínas flagelares, colagenasa, quitinasa y toxinas citolíticas (Ciprandi *et al.*, 2013; Batista and Neto, 2017; Champalal *et al.*, 2018). Por lo tanto, la inhibición en la síntesis de violaceína sin la afectación de la viabilidad del microorganismo por parte del AE de LTC II, como se describió en el Capítulo 4 y se evidencia en estos análisis metabólicos; permiten sugerir que el AE de LTC II inhibe específicamente el QS de CV026 mediante el bloqueo específico en la vía de síntesis de la violaceína. En la **Figura 34** se evidencia que el AE de LTC II bloquea la síntesis de violaceína y de deoxiviolaceína, lo que sugiere una inhibición a nivel del proceso catalítico realizado por la enzima violaceína sintasa, la cual cataliza una hidroxilación en la posición 16 de la protoviolaceína y deoxiprotoviolaceína para formar violaceína y deoxiviolaceína, respectivamente (Balibar Walsh, 2006; Shinoda *et al.*, 2007). Sin embargo, el triptófano, el principal precursor en la síntesis de la violaceína también se encontró disminuido en la muestra tratamiento, lo cual indicaría que al no existir una limitación en la síntesis de violaceína, la célula bacteriana metabolizaría el triptófano hacia compuestos de otras rutas metabólicas, por ejemplo hacia 5-hidroxi-L-triptófano, metabolito que se detectó incrementado y que tiene un papel regulatorio en actividades fisiológicas esenciales de la célula al unirse diferentes receptores celulares, entre los cuales se destacan los receptores acoplados a

Proteína G (GPCR) y los receptores relacionados con el metabolismo de la serotonina (Hara and Kino, 2013). Lo anterior tiene relevancia porque pese a que se inhibió el QS, el microorganismo continúa siendo viable, lo cual indica que las funciones vitales de CV026 no presentaron afectaciones mayores a nivel metabólico.

Entre los resultados obtenidos, se evidenció una disminución en metabolitos asociados con la vitamina B6, la cual tiene funciones en la homeostasis de procesos transcripcionales y enzimáticos, permitiéndole a la célula bacteriana regular la síntesis de diferentes moléculas, entre las cuales se destacan aquellas asociadas con el metabolismo proteico (Belitsky, 2014; Tramonti *et al.*, 2015; Rosenberg, Ischebeck y Commichau, 2017). Lo anterior posiblemente se relacione con las modificaciones evidenciadas en el metabolismo de los aminoácidos triptófano, arginina y cisteína.

Sumado a lo anterior, otros metabolitos que se evidenciaron afectados fueron los relacionados con el metabolismo del pantotenato y la CoA, molécula precursora en la síntesis de ácidos grasos, péptidos no ribosomales y policétidos (Leonardi y Jackowski, 2007). En este estudio los niveles de pantotenato y CoA no se vieron significativamente alterados, pese a la disminución en sustratos que son precursores de sus síntesis, como la  $\beta$ -alanina y la pantoteína; lo cual sugiere que el microorganismo tiene la capacidad de obtener el pantotenato a partir de otras conexiones metabólicas como el pantotenol o el incremento del pantoato para mantener niveles normales de pantotenato que no afecten el metabolismo energético y las demás conexiones metabólicas con las cuáles se asocia este sustrato (Romine *et al.*, 2017). Además, en el metabolismo de la cisteína también se detectaron sustratos disminuidos por el efecto del AE de LTC II, entre los cuales se destacan la O-succinil-L-homoserina, el oftalmato y el 2-

hidroxibutanoato. Sin embargo, los niveles de cistationina y cisteína no se alteraron, por lo cual el metabolismo asociado con la cisteína no tuvo afectaciones significativas.

El metabolismo de las pirimidinas también se encontró alterado a nivel de la expresión de los nucleósidos timidina y citidina, lo cual denota afectaciones a nivel de los ácidos nucleicos de CV026, lo anterior puede tener alguna relación con la desregulación en la virulencia relacionada con el QS ocasionada por el AE de LTC II en el microorganismo, debido a que en modelos bacterianos similares se ha asociado el metabolismo de las pirimidinas con regulación del QS (Ueda *et al.*, 2009). Debido a la escasez de estudios metabólicos relacionados con CV026, la asociación, análisis y comparación de los resultados obtenidos se encuentra limitada, por lo tanto, en estudios posteriores se realizarán análisis específicos sobre ciertos metabolitos de CV026 con el objetivo de comprender mejor las variaciones producidas por el AE de LTC II en el metabolismo de este microorganismo.

#### 6.4. Conclusiones

- El posible mecanismo de acción del AE de LTC II sobre la inhibición de la formación del *biofilm* de *Salmonella enterica* ser Enteritidis se relaciona principalmente con la inhibición en la síntesis de la UDP-GlcNAc, inhibición del metabolismo de nucleótidos de purina y pirimidina y afectación en el metabolismo energético del microorganismo.

- el efecto del AE de LTC II sobre la formación del *biofilm* de *E. coli* se encuentra asociado principalmente con la disminución en la síntesis de *novo* de los nucleótidos de purina y

pirimidinas, la disminución en la concentración de poliaminas y la disminución de moléculas asociadas con el metabolismo energético.

- El efecto inhibitorio del AE de LTC II sobre el QS de CV026 se relaciona principalmente con la inhibición en la formación de violaceína a nivel del paso catalizado por la enzima violaceína sintasa, lo cual se asocia con una reducción en la virulencia del microorganismo.

## **7. Recomendaciones**

- Determinar la citotoxicidad de los AE sobre otras líneas celulares relacionadas con la aplicación deseada como células epiteliales y fibroblastos humanos.
- Realizar análisis de comprobación de los metabolitos analizados mediante técnicas transcriptómicos y estudios dirigidos en los metabolitos afectados de mayor relevancia en cada uno de los microorganismos.
- Utilizar estrategias de nanoencapsulación de los AE con el objetivo de mejorar su actividad biológica, su biocompatibilidad y biodisponibilidad.

## 8. Referencias bibliográficas

A.C., M.-A. *et al.* (2009) 'Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: Composition, cytotoxicity and antifungal activity', *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(6), pp. 878–884. Available at: [http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L355477476%5Cnhttp://memorias.ioc.fiocruz.br/104\\_6\\_1150.pdf](http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L355477476%5Cnhttp://memorias.ioc.fiocruz.br/104_6_1150.pdf).

Abaza, M. S. I. *et al.* (2015) 'Growth inhibitory and chemo-sensitization effects of naringenin, a natural flavanone purified from *Thymus vulgaris*, on human breast and colorectal cancer', *Cancer Cell International*, 15(1), pp. 1–19. doi: 10.1186/s12935-015-0194-0.

Abbasipour, H. *et al.* (2011) 'Fumigant Toxicity and Oviposition Deterrency of the Essential Oil from Cardamom, *Elettaria cardamomum*, Against Three Stored—product Insects', *Journal of Insect Science*, 11(165), pp. 1–10. doi: 10.1673/031.011.16501.

Abdel lateif, K. S., Maghrabi, I. A. and Eldeab, H. A. (2016) 'The Plant Natural Products: Their Antioxidants, Free Radical Scavengers, DNA Protection and Antimicrobial Activities', *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 06(09). doi: 10.4172/2155-9821.1000293.

Abdullah *et al.* (2017) 'Evaluating the antimicrobial potential of green cardamom essential oil focusing on quorum sensing inhibition of *Chromobacterium violaceum*', *Journal of Food Science and Technology*, 54(8), pp. 2306–2315. doi: 10.1007/s13197-017-2668-7.

Abed, R. M. (2011) 'Cytotoxic, cytogenetics and immunomodulatory effects of thymol

from *Thymus vulgaris* on cancer and normal cell lines in vitro and in vivo', *Al-Mustansiriyah Journal of Science*, 22(5), pp. 41–53.

Achinas, S., Charalampogiannis, N. and Euverink, G. J. W. (2019) 'A brief recap of microbial adhesion and biofilms', *Applied Sciences (Switzerland)*, 9(14), pp. 1–15. doi: 10.3390/app9142801.

Acosta, J. M. *et al.* (2019) 'Actividad biocida del aceite esencial de *Lippia origanoides* H.B.K sobre *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary', *Informacion Tecnologica*, 30(6), pp. 45–54. doi: 10.4067/S0718-07642019000600045.

Adator, E. H. *et al.* (2018) 'Ability of Shiga toxigenic *Escherichia coli* to survive within dry-surface biofilms and transfer to fresh lettuce', *International Journal of Food Microbiology*, 269(August 2017), pp. 52–59. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.01.014.

Adukwu, E. C. *et al.* (2016) 'Antimicrobial activity, cytotoxicity and chemical analysis of lemongrass essential oil (*Cymbopogon flexuosus*) and pure citral', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(22), pp. 9619–9627. doi: 10.1007/s00253-016-7807-y.

Agulló, L. *et al.* (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), pp. 1–24. doi: 10.1371/journal.pone.0169544.

Ahmad, I. *et al.* (2020) 'A Cyclic-di-GMP signalling network regulates biofilm formation and surface associated motility of *Acinetobacter baumannii* 17978', *Scientific Reports*, 10(1), pp.

1–11. doi: 10.1038/s41598-020-58522-5.

Ahmed, S. A. K. S. *et al.* (2019) ‘Natural quorum sensing inhibitors effectively downregulate gene expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors’, *Applied Microbiology and Biotechnology*, pp. 3521–3535. doi: 10.1007/s00253-019-09618-0.

Ainane, A. *et al.* (2019) ‘Chemical composition and insecticidal activity of five essential oils: *Cedrus atlantica*, *Citrus limonum*, *Rosmarinus officinalis*, *Syzygium aromaticum* and *Eucalyptus globules*’, *Materials Today: Proceedings*, 13, pp. 474–485. doi: 10.1016/j.matpr.2019.04.004.

Akbari, J. *et al.* (2015) ‘Transdermal absorption enhancing effect of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* on percutaneous absorption of Na diclofenac from topical gel’, *Pharmaceutical Biology*, 53(10), pp. 1442–1447. doi: 10.3109/13880209.2014.984855.

Al-Asmari, A. K. *et al.* (2017) ‘Chemical composition of essential oil of *Thymus vulgaris* collected from Saudi Arabian market’, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(2), pp. 147–150. doi: 10.1016/j.apjtb.2016.11.023.

Al-Hadid, K. J. (2017) ‘Quantitative analysis of antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare*. A review’, *Plant OMICS*, 10(1), pp. 28–36. doi: 10.21475/poj.10.01.17.322.

Al-Kandari, F. *et al.* (2019) ‘Thymol tolerance in *Escherichia coli* induces morphological, metabolic and genetic changes’, *BMC Microbiology*, 19(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/s12866-019-1663-8.

Alaoui Jamali, C. *et al.* (2017) ‘Synergie des huiles essentielles de trois espèces de thymus

marocaines avec l'antibiotique céfixime', *Phytotherapie*, pp. 1–6. doi: 10.1007/s10298-017-1107-2.

Aleksic Sabo, V. and Knezevic, P. (2019) 'Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. plant extracts and essential oils: A review', *Industrial Crops and Products*, 132(February), pp. 413–429. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.02.051.

Ali, B. *et al.* (2015) 'Essential oils used in aromatherapy: A systemic review', *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(8), pp. 601–611. doi: 10.1016/j.apjtb.2015.05.007.

Almeida, A. C. *et al.* (2010) 'Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira e barbatimão e do farelo da casca de pequi administrados por via intraperitoneal', *Ciencia Rural*, 40(1). doi: 10.1590/s0103-84782009005000230.

Alonso, A., Marsal, S. and Julià, A. (2015) 'Analytical methods in untargeted metabolomics: State of the art in 2015', *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3(MAR), pp. 1–20. doi: 10.3389/fbioe.2015.00023.

Alvarez, M. V. *et al.* (2014) 'Oregano essential oil-pectin edible films as anti-quorum sensing and food antimicrobial agents', *Frontiers in Microbiology*, 5(DEC), pp. 1–7. doi: 10.3389/fmicb.2014.00699.

Amado, C. M. *et al.* (2019) 'Jo ur l P re', *BBA - Biomembranes*, p. 183135. doi: 10.1016/j.bbamem.2019.183135.

Ammons, M. C. B. *et al.* (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), pp. 2973–2985. doi: 10.1021/pr500120c.

Andrade-Ochoa, S. *et al.* (2015) 'Quantitative structure-activity relationship of molecules constituent of different essential oils with antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*', *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/s12906-015-0858-2.

Andrade, T. C. B. *et al.* (2015) 'Isolation, characterization and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activity of estragole, obtained from the essential oil of croton zehntneri (euphorbiaceae)', *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 87(1), pp. 173–182. doi: 10.1590/0001-3765201520140111.

Andrade, V. A. *et al.* (2014) 'Antimicrobial activity and acute and chronic toxicity of the essential oil of *Lippia organoides*', *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 34(12), pp. 1153–1161. doi: 10.1590/S0100-736X2014001200002.

Antoniani, D. *et al.* (2010) 'Monitoring of diguanylate cyclase activity and of cyclic-di-GMP biosynthesis by whole-cell assays suitable for high-throughput screening of biofilm inhibitors', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4), pp. 1095–1104. doi: 10.1007/s00253-009-2199-x.

Antoniani, D. *et al.* (2013) 'The immunosuppressive drug azathioprine inhibits biosynthesis of the bacterial signal molecule cyclic-di-GMP by interfering with intracellular nucleotide pool availability', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(16), pp. 7325–7336. doi: 10.1007/s00253-013-4875-0.

Antonioli, L. *et al.* (2019) 'Rethinking Communication in the Immune System: The Quorum Sensing Concept', *Trends in Immunology*, 40(2), pp. 88–97. doi: 10.1016/j.it.2018.12.002.

de Araújo Delmondes, G. *et al.* (2019) 'Toxicological and pharmacologic effects of farnesol (C<sub>15</sub> H<sub>26</sub> O): A descriptive systematic review', *Food and Chemical Toxicology*, 129(December 2018), pp. 169–200. doi: 10.1016/j.fct.2019.04.037.

Ariafar, M. N., Buzrul, S. and Akçelik, N. (2016) 'Modeling and predicting the biofilm formation of Salmonella Virchow with respect to temperature and pH', *Acta Biologica Hungarica*, 67(1), pp. 99–111. doi: 10.1556/018.67.2016.1.8.

Armas, K. *et al.* (2012) 'Comparative study of the chemical composition of essential oils of five Tagetes species collected in Venezuela', *Natural Product Communications*, 7(9), pp. 1225–1226. doi: 10.1177/1934578x1200700932.

Arooj, N., Dar, N. and Samra, Z. Q. (2014) 'Stable silver nanoparticles synthesis by citrus sinensis (orange) and assessing activity against food poisoning microbes', *Biomedical and Environmental Sciences*, 27(10), pp. 815–818. doi: 10.3967/bes2014.118.

Asfour, H. Z. (2018) 'Anti - Quorum Sensing Natural Compounds', pp. 1–10. doi: 10.4103/JMAU.JMAU.

Aswathanarayan, J. B. and Vittal, R. R. (2018) 'Inhibition of biofilm formation and quorum sensing mediated phenotypes by berberine in: Pseudomonas aeruginosa and Salmonella typhimurium', *RSC Advances*, 8(63), pp. 36133–36141. doi: 10.1039/c8ra06413j.

Atif, M. *et al.* (2020) 'Essential oils of two medicinal plants and protective properties of jack fruits against the spoilage bacteria and fungi', *Industrial Crops and Products*, 147(January), p. 112239. doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112239.

Aumeeruddy-Elalfi, Z. *et al.* (2018) 'Essential oils from tropical medicinal herbs and food plants inhibit biofilm formation in vitro and are non-cytotoxic to human cells', *3 Biotech*, 8(9), pp. 1–11. doi: 10.1007/s13205-018-1413-x.

Aumeeruddy-Elalfi, Z., Gurib-Fakim, A. and Mahomoodally, F. (2015) 'Antimicrobial, antibiotic potentiating activity and phytochemical profile of essential oils from exotic and endemic medicinal plants of Mauritius', *Industrial Crops and Products*, 71, pp. 197–204. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.03.058.

Ayari, S. *et al.* (2020) 'Potential synergistic antimicrobial efficiency of binary combinations of essential oils against *Bacillus cereus* and *Paenibacillus amylolyticus*-Part A', *Microbial Pathogenesis*, 141(January), p. 104008. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104008.

Azar, P. A. *et al.* (2011) 'Chemical composition of the essential oils of *Citrus sinensis* cv. Valencia and a quantitative structure-retention relationship study for the prediction of retention indices by multiple linear regression', *Journal of the Serbian Chemical Society*, 76(12), pp. 1627–1637. doi: 10.2298/JSC101218141A.

Azizan, N. *et al.* (2017) 'Composition and antibacterial activity of the essential oils of *Orthosiphon stamineus* Benth and *Ficus deltoidea* Jack against pathogenic oral bacteria', *Molecules*, 22(12). doi: 10.3390/molecules22122135.

Aznar, A. *et al.* (2015) 'Antimicrobial activity of nisin, thymol, carvacrol and cymene against growth of *Candida lusitanae*', *Food Science and Technology International*, 21(1), pp. 72–79. doi: 10.1177/1082013213514593.

Babushok, V. I., Linstrom, P. J. and Zenkevich, I. G. (2011) 'Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils', 40(November). doi: 10.1063/1.3653552.

Bagamboula, C. F., Uyttendaele, M. and Debevere, J. (2004) 'Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*', *Food Microbiology*, 21(1), pp. 33–42. doi: 10.1016/S0740-0020(03)00046-7.

Bagavan, A. *et al.* (2011) 'Antiplasmodial activity of botanical extracts against *Plasmodium falciparum*', *Parasitology Research*, 108(5), pp. 1099–1109. doi: 10.1007/s00436-010-2151-0.

Bahari, S. *et al.* (2017) 'Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by subinhibitory concentrations of curcumin with gentamicin and azithromycin', *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 10(October), pp. 21–28. doi: 10.1016/j.jgar.2017.03.006.

Balibar, C. J. and Walsh, C. T. (2006) 'In vitro biosynthesis of violacein from L-tryptophan by the enzymes VioA-E from *Chromobacterium violaceum*', *Biochemistry*, 45(51), pp. 15444–15457. doi: 10.1021/bi061998z.

Banerjee, G. and Ray, A. K. (2017) 'Quorum-sensing network-associated gene regulation

in Gram-positive bacteria', *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 64(4), pp. 439–453. doi: 10.1556/030.64.2017.040.

Barbieri, R. *et al.* (2017) 'Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity', *Microbiological Research*, 196, pp. 44–68. doi: 10.1016/j.micres.2016.12.003.

Barreca, D. *et al.* (2014) 'First evidence of C- and O-glycosyl flavone in blood orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) juice and their influence on antioxidant properties', *Food Chemistry*, 149, pp. 244–252. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.10.096.

Basavegowda, N., Patra, J. K. and Baek, K. H. (2020) 'Essential oils and mono/Bi/tri-metallic nanocomposites as alternative sources of antimicrobial agents to combat multidrug-resistant pathogenic microorganisms: An overview', *Molecules*, 25(5). doi: 10.3390/molecules25051058.

Batista, J. H. and Neto, J. F. d. S. (2017) 'Chromobacterium violaceum pathogenicity: Updates and insights from genome sequencing of novel Chromobacterium species', *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV), pp. 1–7. doi: 10.3389/fmicb.2017.02213.

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

Beenken, K. E. *et al.* (2004) 'Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms', *Journal of Bacteriology*, 186(14), pp. 4665–4684. doi: 10.1128/JB.186.14.4665-4684.2004.

Belitsky, B. R. (2014) 'Role of *pdxr* in the activation of vitamin B6 biosynthesis in *Listeria monocytogenes*', *Molecular Microbiology*, 92(5), pp. 1113–1128. doi: 10.1111/mmi.12618.

Bellik, F. Z. *et al.* (2019) 'Chemical composition, kinetic study and antimicrobial activity of essential oils from *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng extracted by conventional and microwave-assisted techniques using cryogenic grinding', *Industrial Crops and Products*, 139(July), p. 111505. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.111505.

Bereksi, M. S. *et al.* (2018) 'Evaluation of antibacterial activity of some medicinal plants extracts commonly used in algerian traditional medicine against some pathogenic bacteria', *Pharmacognosy Journal*, 10(3), pp. 507–512. doi: 10.5530/pj.2018.3.83.

Bettenworth, V. *et al.* (2019) 'Phenotypic Heterogeneity in Bacterial Quorum Sensing Systems', *Journal of Molecular Biology*, 431(23), pp. 4530–4546. doi: 10.1016/j.jmb.2019.04.036.

Bhavaniramya, S. *et al.* (2019) 'Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications', *Grain & Oil Science and Technology*, 2(2), pp. 49–55. doi: 10.1016/j.gaost.2019.03.001.

Blosser, R. S. and Gray, K. M. (2000) 'Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for N -acyl homoserine lactone autoinducers', *Journal of Microbiological Methods*, 40, pp. 47–55.

Blow, N. (2008) 'Metabolomics: Biochemistry's new look', *Nature*, 455(7213), pp. 697–

700. doi: 10.1038/455697a.

Borges, K. A. *et al.* (2018) 'Biofilm formation capacity of Salmonella serotypes at different temperature conditions', *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 38(1), pp. 71–76. doi: 10.1590/1678-5150-pvb-4928.

Boskovic, M. *et al.* (2015) 'Antimicrobial Activity of Thyme (*Tymus vulgaris*) and Oregano (*Origanum vulgare*) Essential Oils against Some Food-borne Microorganisms', *Procedia Food Science*, 5, pp. 18–21. doi: 10.1016/j.profoo.2015.09.005.

Bouyahya, A. *et al.* (2017) 'Medicinal plant products targeting quorum sensing for combating bacterial infections', *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(8), pp. 729–743. doi: 10.1016/j.apjtm.2017.07.021.

Bouyahya, A. *et al.* (2019) 'Essential oils of *Origanum compactum* increase membrane permeability, disturb cell membrane integrity, and suppress quorum-sensing phenotype in bacteria', *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 9(5), pp. 301–311. doi: 10.1016/j.jpha.2019.03.001.

Brackman, G. and Coenye, T. (2014) 'Quorum Sensing Inhibitors as Anti-Biofilm Agents', *Current Pharmaceutical Design*, 21(1), pp. 5–11. doi: 10.2174/1381612820666140905114627.

Bridges, A. A. and Bassler, B. L. (2019) 'The intragenus and interspecies quorum-sensing autoinducers exert distinct control over *Vibrio cholerae* biofilm formation and dispersal', *PLoS Biology*, 17(11), pp. 1–28. doi: 10.1371/journal.pbio.3000429.

Brown, J. M. and Hazen, S. L. (2017) 'Targeting of microbe-derived metabolites to improve human health: The next frontier for drug discovery', *Journal of Biological Chemistry*, 292(21), pp. 8560–8568. doi: 10.1074/jbc.R116.765388.

Budri, P. E. *et al.* (2015) 'Effect of essential oils of *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum zeylanicum* and their major components on biofilm production in *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk of cows with mastitis', *Journal of Dairy Science*, 98(9), pp. 5899–5904. doi: 10.3168/jds.2015-9442.

Bueno, J. and Coy, E. D. (2011) 'Bueno-Sanchez, Coy, Stashenko - 2011 - Antimycobacterial natural products--an opportunity for the Colombian biodiversity', 24(4), pp. 175–183.

Bukvički, D. *et al.* (2014) 'Satureja horvatii essential oil: In vitro antimicrobial and antiradical properties and in situ control of *Listeria monocytogenes* in pork meat', *Meat Science*, 96(3), pp. 1355–1360. doi: 10.1016/j.meatsci.2013.11.024.

Burt, S. (2004) 'Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review', *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), pp. 223–253. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.

Burt, S. A., Ojo-Fakunle, V. T. A., *et al.* (2014) 'The natural antimicrobial carvacrol inhibits quorum sensing in *chromobacterium violaceum* and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations', *PLoS ONE*, 9(4), pp. 1–6. doi: 10.1371/journal.pone.0093414.

Burt, S. A., Ojo-Fakunle, V. T. A., *et al.* (2014) 'The natural antimicrobial carvacrol

inhibits quorum sensing in chromobacterium violaceum and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations', *PLoS ONE*, 9(4), pp. 1–6. doi: 10.1371/journal.pone.0093414.

Cabarkapa, I. *et al.* (2015) 'Effect of *Thymus vulgaris* on initial cell attachment and preformed biofilm of *Salmonella enteritidis*', *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 9(Special Edition 1), pp. 123–129.

Čabarkapa, I. *et al.* (2015) 'Biofilm forming ability of salmonella enteritidis in vitro', *Acta Veterinaria*, 65(3), pp. 371–389. doi: 10.1515/acve-2015-0031.

Čabarkapa, I. *et al.* (2019) 'Anti-biofilm activities of essential oils rich in carvacrol and thymol against *Salmonella* Enteritidis', *Biofouling*, 0(0), pp. 1–15. doi: 10.1080/08927014.2019.1610169.

Cabral, D. J., Wurster, J. I. and Belenky, P. (2018) 'Antibiotic persistence as a metabolic adaptation: Stress, metabolism, the host, and new directions', *Pharmaceuticals*, 11(1). doi: 10.3390/ph11010014.

Caceres, A. *et al.* (1990) 'Plants used in guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against enterobacteria', *Journal of Ethnopharmacology*, 30(1), pp. 55–73. doi: 10.1016/0378-8741(90)90017-N.

Cambeiro-Pérez, N. *et al.* (2018) 'A Metabolomics Approach Reveals Immunomodulatory Effects of Proteinaceous Molecules Derived From Gut Bacteria Over Human Peripheral Blood Mononuclear Cells', *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV). doi: 10.3389/fmicb.2018.02701.

Camele, I. *et al.* (2019) 'Anti-quorum Sensing and Antimicrobial Effect of Mediterranean Plant Essential Oils Against Phytopathogenic Bacteria', *Frontiers in Microbiology*, 10(November), pp. 1–6. doi: 10.3389/fmicb.2019.02619.

Capunzo, M. *et al.* (2003) 'Antimicrobial activity of dry extracts of *Tagetes lucida* from Guatemala', (February 1997), pp. 85–87. doi: 10.13140/2.1.4247.6167.

Caro-Astorga, J. *et al.* (2020) 'Biofilm formation displays intrinsic offensive and defensive features of *Bacillus cereus*', *npj Biofilms and Microbiomes*, 6(1). doi: 10.1038/s41522-019-0112-7.

Case, R. J. *et al.* (2006) 'Ethnopharmacological evaluation of the informant consensus model on anti-tuberculosis claims among the Manus', *Journal of Ethnopharmacology*, 106(1), pp. 82–89. doi: 10.1016/j.jep.2005.12.005.

Castang, S. *et al.* (2004) 'N-Sulfonyl homoserine lactones as antagonists of bacterial quorum sensing', *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 14(20), pp. 5145–5149. doi: 10.1016/j.bmcl.2004.07.088.

Castillo-Juárez, I. *et al.* (2015) 'Role of quorum sensing in bacterial infections', *World Journal of Clinical Cases*, 3(7), p. 575. doi: 10.12998/wjcc.v3.i7.575.

Cervantes-Ceballos, L., Caballero-Gallardo, K. and Olivero-Verbel, J. (2015) 'Repellent and Anti-quorum Sensing Activity of Six Aromatic Plants Occurring in Colombia.', *Natural product communications*, 10(10), pp. 1753–1757.

Champalal, L. *et al.* (2018) 'Modulation of quorum sensing-controlled virulence factors

in *Chromobacterium violaceum* by selective amino acids', *FEMS Microbiology Letters*, 365(23), pp. 1–8. doi: 10.1093/femsle/fny252.

Chan, W. K. *et al.* (2016) *Nerolidol: A sesquiterpene alcohol with multi-faceted pharmacological and biological activities*, *Molecules*. doi: 10.3390/molecules21050529.

Chang, H. J. *et al.* (2013) 'Protective effect of  $\beta$ -caryophyllene, a natural bicyclic sesquiterpene, against cerebral ischemic injury', *Journal of Medicinal Food*, 16(6), pp. 471–480. doi: 10.1089/jmf.2012.2283.

Chen, C. N. *et al.* (2009) 'A probable aculeacin A acylase from the *Ralstonia solanacearum* GMI1000 is N-acyl-homoserine lactone acylase with quorum-quenching activity', *BMC Microbiology*, 9, pp. 1–11. doi: 10.1186/1471-2180-9-89.

Chen, F. *et al.* (2013) 'Quorum quenching enzymes and their application in degrading signal molecules to block quorum sensing-dependent infection', *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), pp. 17477–17500. doi: 10.3390/ijms140917477.

Chen, J. *et al.* (2020) 'Metabolomics analysis to evaluate the antibacterial activity of the essential oil from the leaves of *Cinnamomum camphora* (Linn.) Presl', *Journal of Ethnopharmacology*, 253(January), p. 112652. doi: 10.1016/j.jep.2020.112652.

Choi, S. Y. *et al.* (2015) 'Violacein: Properties and production of a versatile bacterial pigment', *BioMed Research International*, 2015. doi: 10.1155/2015/465056.

Choo, J. H., Rukayadi, Y. and Hwang, J. K. (2006) 'Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract', *Letters in Applied Microbiology*, 42(6), pp. 637–641. doi:

10.1111/j.1472-765X.2006.01928.x.

Ciprandi, A. *et al.* (2013) 'Chromobacterium violaceum: Important insights for virulence and biotechnological potential by exoproteomic studies', *Current Microbiology*, 67(1), pp. 100–106. doi: 10.1007/s00284-013-0334-5.

Ćirić, A. D. *et al.* (2019) 'Natural products as biofilm formation antagonists and regulators of quorum sensing functions: A comprehensive review update and future trends', *South African Journal of Botany*, 120, pp. 65–80. doi: 10.1016/j.sajb.2018.09.010.

Conte, R. *et al.* (2017) 'Recent advances in nanoparticle-mediated delivery of anti-inflammatory phytochemicals', *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4), pp. 1–23. doi: 10.3390/ijms18040709.

Contini, A. *et al.* (2020) 'Assessing the cytotoxic/genotoxic activity and estrogenic/antiestrogenic potential of essential oils from seven aromatic plants', *Food and Chemical Toxicology*, 138(November 2019), p. 111205. doi: 10.1016/j.fct.2020.111205.

Corrêa Dias, P. *et al.* (2000) 'Antiulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extract of *Rosmarinus officinalis* L.', *Journal of Ethnopharmacology*, 69(1), pp. 57–62. doi: 10.1016/S0378-8741(99)00133-6.

Crabbé, A. *et al.* (2019) 'Antimicrobial Tolerance and Metabolic Adaptations in Microbial Biofilms', *Trends in Microbiology*, 27(10), pp. 850–863. doi: 10.1016/j.tim.2019.05.003.

Cristani, M. *et al.* (2007) 'Interaction of four monoterpenes contained in essential oils

with model membranes: Implications for their antibacterial activity', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(15), pp. 6300–6308. doi: 10.1021/jf070094x.

D'Alvise, P. W. *et al.* (2014) 'Biofilm formation and antibiotic production in *Ruegeria mobilis* are influenced by intracellular concentrations of cyclic dimeric guanosinmonophosphate', *Environmental Microbiology*, 16(5), pp. 1252–1266. doi: 10.1111/1462-2920.12265.

Dalla Costa, K. A., Moura, R. and Millezi, A. F. (2019) 'Antimicrobial and antibiofilm activity of *Cymbopogon flexuosus* essential oil microemulsions', *Revista Ceres*, 66(5), pp. 372–379. doi: 10.1590/0034-737X201966050006.

Dandanell, G. *et al.* (2008) 'Nucleotides, Nucleosides, and Nucleobases', *EcoSal Plus*, 3(1). doi: 10.1128/ecosalplus.3.6.2.

Davies, N. W., Hons, B. S. A. and Davies, N. W. (1993) 'Mass Spectrometry and Gas Chromatography in Chemical Analysis and Identification ; Experimental Factors and Case Studies by'.

Defoirdt, T. (2018) 'Quorum-Sensing Systems as Targets for Antivirulence Therapy', *Trends in Microbiology*, 26(4), pp. 313–328. doi: 10.1016/j.tim.2017.10.005.

Derakhshan, S., Navidinia, M. and Ahmadi, A. (2018) 'Antibacterial Activity of Dill (*Anethum graveolens*) Essential Oil and Antibiofilm Activity of Cumin (*Cuminum cyminum*) Alcoholic Extract', 3(4), pp. 122–126. doi: 10.18869/modares.iem.3.4.122.

Dessaux, Y. and Faure, D. (2018) 'Quorum sensing and quorum quenching in

agrobacterium: A “go/no go system”?, *Genes*, 9(4). doi: 10.3390/genes9040210.

Dianat, M. *et al.* (2014) ‘Protective effects of crocin on hemodynamic parameters and infarct size in comparison with vitamin e after ischemia reperfusion in isolated rat hearts’, *Planta Medica*, 80(5), pp. 393–398. doi: 10.1055/s-0033-1360383.

Dickey, S. W., Cheung, G. Y. C. and Otto, M. (2017) ‘Different drugs for bad bugs: Antivirulence strategies in the age of antibiotic resistance’, *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(7), pp. 457–471. doi: 10.1038/nrd.2017.23.

Dirican, E., Turkez, H. and Toğar, B. (2012) ‘Modulatory effects of *Thymbra spicata* L. different extracts against the mercury induced genotoxicity in human lymphocytes in vitro’, *Cytotechnology*, 64(2), pp. 181–186. doi: 10.1007/s10616-011-9406-1.

Dong, K. *et al.* (2020) ‘Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms’, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(1), pp. 149–183. doi: 10.1111/1541-4337.12513.

Dong, W. *et al.* (2018) ‘Characterization of AiiK, an AHL lactonase, from *Kurthia huakui* LAM0618T and its application in quorum quenching on *Pseudomonas aeruginosa* PAO1’, *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/s41598-018-24507-8.

Dorman, H. J. and Deans, S. G. (2000) ‘Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils.’, *Journal of applied microbiology*, 88(2), pp. 308–316. doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x.

Dornic, N. *et al.* (2016) ‘Usage patterns of aromatherapy among the French general

population: A descriptive study focusing on dermal exposure', *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 76, pp. 87–93. doi: 10.1016/j.yrtph.2016.01.016.

Duarte, M. C. T. *et al.* (2007) 'Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*', *Journal of Ethnopharmacology*, 111(2), pp. 197–201. doi: 10.1016/j.jep.2006.11.034.

Dugassa, J. and Shukuri, N. (2017) 'Review on antibiotic resistance and its mechanism of development', *Journal of Health, Health, Medicine and Nursing*, 1(3), pp. 1–17.

Džamić, A. M. *et al.* (2015) 'Libyan *Thymus capitatus* essential oil: Antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and colon pathogen adhesion-inhibition properties', *Journal of Applied Microbiology*, 119(2), pp. 389–399. doi: 10.1111/jam.12864.

El-Bassossy, H. M., Elberry, A. A. and Ghareib, S. A. (2016) 'Geraniol improves the impaired vascular reactivity in diabetes and metabolic syndrome through calcium channel blocking effect', *Journal of Diabetes and its Complications*, 30(6), pp. 1008–1016. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2016.04.006.

El, abed S. *et al.* (2011) 'Carvacrol and thymol components inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* adherence and biofilm formation', *African Journal of Microbiology Research*, 5(20), pp. 3229–3232. doi: 10.5897/AJMR11.275.

Elguindy, N. M. *et al.* (2016) 'Chemoprotective Effect of *Elettaria Cardamomum* against Chemically induced Hepatocellular Carcinoma in Rats by Inhibiting NF- $\kappa$ B, Oxidative Stress, and Activity of Ornithine Decarboxylase', *South African Journal of Botany*, 105, pp. 251–258.

doi: 10.1016/j.sajb.2016.04.001.

Epps, S. V. R. *et al.* (2015) 'Comparison of anti-Campylobacter activity of free thymol and thymol- $\beta$ -d-glucopyranoside in absence or presence of  $\beta$ -glycoside-hydrolysing gut bacteria', *Food Chemistry*, 173, pp. 92–98. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.10.007.

Epstein, W. (2003) 'The Roles and Regulation of Potassium in Bacteria', *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 75, pp. 293–320. doi: 10.1016/S0079-6603(03)75008-9.

Erhabor, C. R., Erhabor, J. O. and McGaw, L. J. (2019) 'The potential of South African medicinal plants against microbial biofilm and quorum sensing of foodborne pathogens: A review', *South African Journal of Botany*, 126, pp. 214–231. doi: 10.1016/j.sajb.2019.07.024.

Escobar, P. *et al.* (2010) 'Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components', *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(2), pp. 184–190. doi: 10.1590/S0074-02762010000200013.

Esmael, A. *et al.* (2020) 'Antimicrobial activity of certain natural-based plant oils against the antibiotic-resistant acne bacteria', *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(1), pp. 448–455. doi: 10.1016/j.sjbs.2019.11.006.

Essid, R. *et al.* (2017) 'Antifungal mechanism of the combination of *Cinnamomum verum* and *Pelargonium graveolens* essential oils with fluconazole against pathogenic *Candida* strains', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(18), pp. 6993–7006. doi: 10.1007/s00253-017-8442-y.

El Euch, S. K. *et al.* (2019) 'Salvia officinalis essential oil: Chemical analysis and evaluation of anti-enzymatic and antioxidant bioactivities', *South African Journal of Botany*, 120, pp. 253–260. doi: 10.1016/j.sajb.2018.07.010.

Fairbrother, L. *et al.* (2009) 'Effect of the cyanide-producing bacterium *Chromobacterium violaceum* on ultraflat Au surfaces', *Chemical Geology*, 265(3–4), pp. 313–320. doi: 10.1016/j.chemgeo.2009.04.010.

Fang, K., Park, O. J. and Hong, S. H. (2020) 'Controlling biofilms using synthetic biology approaches', *Biotechnology Advances*, 40(January), p. 107518. doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107518.

Ferreira, G. R. S. *et al.* (2018) 'Antimicrobial potential of *Alpinia purpurata* lectin (ApuL): Growth inhibitory action, synergistic effects in combination with antibiotics, and antibiofilm activity', *Microbial Pathogenesis*, 124(July), pp. 152–162. doi: 10.1016/j.micpath.2018.08.027.

Ferreira, J. V. N. *et al.* (2016) 'Mechanism of Action of Thymol on Cell Membranes Investigated through Lipid Langmuir Monolayers at the Air-Water Interface and Molecular Simulation', *Langmuir*, 32(13), pp. 3234–3241. doi: 10.1021/acs.langmuir.6b00600.

Fidy, K. *et al.* (2016) 'B-Caryophyllene and B-Caryophyllene Oxide—Natural Compounds of Anticancer and Analgesic Properties', *Cancer Medicine*, 5(10), pp. 3007–3017. doi: 10.1002/cam4.816.

Fiehn, O. (2002) 'Metabolomics - The link between genotypes and phenotypes', *Plant*

*Molecular Biology*, 48(1–2), pp. 155–171. doi: 10.1023/A:1013713905833.

Figueroa-Lopez, K. J. *et al.* (2019) ‘Antimicrobial and antioxidant performance of various essential oils and natural extracts and their incorporation into biowaste derived poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) layers made from electrospun ultrathin fibers’, *Nanomaterials*, 9(2), pp. 1–22. doi: 10.3390/nano9020144.

Figueroa, M. *et al.* (2014) ‘Polyhydroxyanthraquinones as quorum sensing inhibitors from the guttates of *Penicillium restrictum* and their analysis by desorption electrospray ionization mass spectrometry’, *Journal of Natural Products*, 77(6), pp. 1351–1358. doi: 10.1021/np5000704.

Firmino, D. F. *et al.* (2018) ‘Antibacterial and Antibiofilm Activities of *Cinnamomum* Sp. Essential Oil and Cinnamaldehyde: Antimicrobial Activities’, *Scientific World Journal*, 2018. doi: 10.1155/2018/7405736.

Fittipaldi, N. *et al.* (2007) ‘Potential use of an unencapsulated and aromatic amino acid-auxotrophic *Streptococcus suis* mutant as a live attenuated vaccine in swine’, *Vaccine*, 25(18), pp. 3524–3535. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.01.084.

Fleitas Martínez, O. *et al.* (2018) ‘Interference With Quorum-Sensing Signal Biosynthesis as a Promising Therapeutic Strategy Against Multidrug-Resistant Pathogens’, *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8(February), p. 444. doi: 10.3389/fcimb.2018.00444.

Fleming, D. and Rumbaugh, K. (2018) ‘The Consequences of Biofilm Dispersal on the

Host', *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–7. doi: 10.1038/s41598-018-29121-2.

Flemming, H. C. *et al.* (2016) 'Biofilms: An emergent form of bacterial life', *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), pp. 563–575. doi: 10.1038/nrmicro.2016.94.

Flores-Encarnacion, M. *et al.* (2018) 'The effect of *Thymus vulgaris* on growth and biofilm formation of uropathogenic *Escherichia coli*', *African Journal of Microbiology Research*, 12(10), pp. 237–242. doi: 10.5897/ajmr2017.8770.

Fontenelle, R. O. S. *et al.* (2007) 'Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(5), pp. 934–940. doi: 10.1093/jac/dkm066.

Foroutan, A. N. I. A. *et al.* (2016) 'Changes in the essential oil content and terpene composition of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) by using plant biostimulants', *Acta Agriculturae Slovenica*, 107(1), pp. 147–157. doi: 10.14720/aas.2016.107.1.15.

Fouladkhah, A., Geornaras, I. and Sofos, J. N. (2013) 'Biofilm Formation of O157 and Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Multidrug-Resistant and Susceptible *Salmonella* Typhimurium and Newport and Their Inactivation by Sanitizers', *Journal of Food Science*, 78(6). doi: 10.1111/1750-3841.12123.

Frigolet, M. E. and Gutiérrez-Aguilar, R. (2017) 'Ciencias "ómicas", ¿cómo ayudan a las ciencias de la salud?', *Revista Digital Universitaria*, 18(7), pp. 0–15. doi: 10.22201/codeic.16076079e.2017.v18n7.a3.

Galle, M. *et al.* (2014) 'Suppression by geraniol of the growth of A549 human lung

adenocarcinoma cells and inhibition of the mevalonate pathway in culture and in vivo: Potential use in cancer chemotherapy', *Nutrition and Cancer*, 66(5), pp. 888–895. doi: 10.1080/01635581.2014.916320.

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

Gemeda, N. *et al.* (2018) 'Development, Characterization, and Evaluation of Novel Broad-Spectrum Antimicrobial Topical Formulations from *Cymbopogon martini* (Roxb.) W. Watson Essential Oil', *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2018. doi: 10.1155/2018/9812093.

Genovese, S. *et al.* (2014) 'Analysis of Biologically Active Oxyprenylated Ferulic Acid Derivatives in Citrus Fruits', *Plant Foods for Human Nutrition*, 69(3), pp. 255–260. doi: 10.1007/s11130-014-0427-8.

Ghorbani, A. and Esmaeilzadeh, M. (2017) 'Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components', *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 7(4), pp. 433–440. doi: 10.1016/j.jtcme.2016.12.014.

Ghosh, R., Das, A. and Mallik, S. (2019) 'Inhibition of Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*: A review', *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81(5), pp. 797–806. doi: 10.36468/pharmaceutical-sciences.573.

Ghosson, H. *et al.* (2018) 'Simultaneous untargeted and targeted metabolomics profiling

of underivatized primary metabolites in sulfur-deficient barley by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole/time-of-flight mass spectrometry', *Plant Methods*, 14(1), pp. 1–17. doi: 10.1186/s13007-018-0329-0.

Giacomucci, S. *et al.* (2019) 'Flagella-dependent inhibition of biofilm formation by sub-inhibitory concentration of polymyxin B in *Vibrio cholerae*', *PLoS ONE*, 14(8), pp. 1–21. doi: 10.1371/journal.pone.0221431.

Giweli, A. *et al.* (2012) 'Antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of *Thymus thymifolius* growing wild in Libya', *Molecules*, 17(5), pp. 4836–4850. doi: 10.3390/molecules17054836.

Gloag, E. S. *et al.* (2020) 'Biofilm mechanics: Implications in infection and survival', *Biofilm*, 2(December 2019), p. 100017. doi: 10.1016/j.bioflm.2019.100017.

Gomar, A., Hosseini, A. and Mirazi, N. (2014) 'Evaluation of *Salvia officinalis* L. (sage) leaves on morphine-induced memory impairment in adult male rats', *Focus on Alternative and Complementary Therapies*, 19(3), pp. 156–162. doi: 10.1111/fct.12132.

Gonçalves, G. M. S., Bottaro, M. and Nilson, A. C. (2011) 'Effect of the *Thymus vulgaris* essential oil on the growth of *Streptococcus mutans*', *Revista de Ciências Farmacéuticas Básica e Aplicada*, 32(3).

González-Mas, M. C. *et al.* (2019) 'Volatile compounds in citrus essential oils: A comprehensive review', *Frontiers in Plant Science*, 10(February), pp. 1–18. doi: 10.3389/fpls.2019.00012.

González, J. F. *et al.* (2018) 'Biofilm Formation Protects Salmonella from the Antibiotic Ciprofloxacin in Vitro and in Vivo in the Mouse Model of chronic Carriage', *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–8. doi: 10.1038/s41598-017-18516-2.

Gopu, V. and Shetty, P. H. (2016) 'Cyanidin inhibits quorum signalling pathway of a food borne opportunistic pathogen', *Journal of Food Science and Technology*, 53(2), pp. 968–976. doi: 10.1007/s13197-015-2031-9.

Gorelik, O. *et al.* (2019) 'Vibrio cholerae autoinducer-1 enhances the virulence of enteropathogenic Escherichia coli', *Scientific Reports*, 9(1), pp. 1–13. doi: 10.1038/s41598-019-40859-1.

Grandclément, C. *et al.* (2015) 'Quorum quenching: Role in nature and applied developments', *FEMS Microbiology Reviews*, 40(1), pp. 86–116. doi: 10.1093/femsre/fuv038.

Gray, B., Hall, P. and Gresham, H. (2013) 'Targeting agr- and agr-like quorum sensing systems for development of common therapeutics to treat multiple gram-positive bacterial infections', *Sensors (Switzerland)*, 13(4), pp. 5130–5166. doi: 10.3390/s130405130.

Guendouze, A. *et al.* (2017) 'Effect of quorum quenching lactonase in clinical isolates of pseudomonas aeruginosa and comparison with quorum sensing inhibitors', *Frontiers in Microbiology*, 8(FEB), pp. 1–10. doi: 10.3389/fmicb.2017.00227.

Guilhen, C., Forestier, C. and Balestrino, D. (2017) 'Biofilm dispersal: multiple elaborate strategies for dissemination of bacteria with unique properties', *Molecular Microbiology*, 105(2), pp. 188–210. doi: 10.1111/mmi.13698.

Guimarães, A. C. *et al.* (2019) ‘Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils’, *Molecules*, 24(13), pp. 1–12. doi: 10.3390/molecules24132471.

Guo, R. and Lu, H. (2020) ‘Targeted Metabolomics Revealed the Regulatory Role of Manganese on Small-Molecule Metabolism of Biofilm Formation in *Escherichia coli*’, *Journal of Analysis and Testing*, 4(3), pp. 226–237. doi: 10.1007/s41664-020-00139-8.

Gutiérrez-Pacheco, M. M. *et al.* (2019) ‘Quorum sensing interruption as a tool to control virulence of plant pathogenic bacteria’, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 106(February), pp. 281–291. doi: 10.1016/j.pmpp.2019.04.002.

H, J. *et al.* (2016) ‘Clove bud oil reduces kynurenine and inhibits pqs A gene expression in *P. aeruginosa*’, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(8), pp. 3681–3692. doi: 10.1007/s00253-016-7313-2.

Ha, D.-G. and O’Toole, G. A. (2015) ‘c-di-GMP and its Effects on Biofilm Formation and Dispersion: a *Pseudomonas Aeruginosa* Review’, *Microbiology Spectrum*, 3(2). doi: 10.1128/microbiolspec.mb-0003-2014.

Hall, C. W. and Mah, T. F. (2017) ‘Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria’, *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), pp. 276–301. doi: 10.1093/femsre/fux010.

Han, X. and Parker, T. L. (2017) ‘Lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) essential oil demonstrated anti-inflammatory effect in pre-inflamed human dermal fibroblasts’, *Biochimie Open*, 4, pp. 107–111. doi: 10.1016/j.biopen.2017.03.004.

Haque, S. *et al.* (2018) 'Developments in strategies for Quorum Sensing virulence factor inhibition to combat bacterial drug resistance', *Microbial Pathogenesis*, 121, pp. 293–302. doi: 10.1016/j.micpath.2018.05.046.

Hara, R. and Kino, K. (2013) 'Enhanced synthesis of 5-Hydroxy-L-tryptophan through tetrahydropterin regeneration', *AMB Express*, 3, pp. 1–7. doi: 10.1186/2191-0855-3-70.

Hasanein, P., Felehgari, Z. and Emamjomeh, A. (2016) 'Preventive effects of *Salvia officinalis* L. against learning and memory deficit induced by diabetes in rats: Possible hypoglycaemic and antioxidant mechanisms', *Neuroscience Letters*, 622, pp. 72–77. doi: 10.1016/j.neulet.2016.04.045.

Hawver, L. A., Jung, S. A. and Ng, W. L. (2016) 'Specificity and complexity in bacterial quorum-sensing systems', *FEMS Microbiology Reviews*, 40(5), pp. 738–752. doi: 10.1093/femsre/fuw014.

Hee, C. S. *et al.* (2020) 'Intercepting second-messenger signaling by rationally designed peptides sequestering c-di-GMP', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(29), pp. 17211–17220. doi: 10.1073/pnas.2001232117.

Hegstad, K. *et al.* (2020) 'Role of Horizontal Gene Transfer in the Development of Multidrug Resistance in *Haemophilus influenzae*', *mSphere*, 5(1), pp. 1–13. doi: 10.1128/msphere.00969-19.

Herman, A. and Herman, A. P. (2015) 'Essential oils and their constituents as skin penetration enhancer for transdermal drug delivery: A review', *Journal of Pharmacy and*

*Pharmacology*, 67(4), pp. 473–485. doi: 10.1111/jphp.12334.

Hernandes, C. *et al.* (2017) ‘Lippia origanoides essential oil: an efficient and safe alternative to preserve food, cosmetic and pharmaceutical products’, *Journal of Applied Microbiology*, 122(4), pp. 900–910. doi: 10.1111/jam.13398.

Horváth, G. and Ács, K. (2015) ‘Essential oils in the treatment of respiratory tract diseases highlighting their role in bacterial infections and their anti-inflammatory action: A review’, *Flavour and Fragrance Journal*, 30(5), pp. 331–341. doi: 10.1002/ffj.3252.

Houdkova, M. *et al.* (2018) ‘In vitro growth-inhibitory effect of Cambodian essential oils against pneumonia causing bacteria in liquid and vapour phase and their toxicity to lung fibroblasts’, *South African Journal of Botany*, 118, pp. 85–97. doi: 10.1016/j.sajb.2018.06.005.

Husain, F. M. *et al.* (2015) ‘Sub-MICs of Mentha piperita essential oil and menthol inhibits AHL mediated quorum sensing and biofilm of Gram-negative bacteria’, *Frontiers in Microbiology*, 6(MAY), pp. 1–12. doi: 10.3389/fmicb.2015.00420.

Hyldgaard, M., Mygind, T. and Meyer, R. L. (2012) ‘Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components’, *Frontiers in Microbiology*, 3(JAN), pp. 1–24. doi: 10.3389/fmicb.2012.00012.

Ilić, B. S. *et al.* (2014) ‘An in vitro synergistic interaction of combinations of thymus glabrescens essential oil and its main constituents with chloramphenicol’, *The Scientific World Journal*, 2014. doi: 10.1155/2014/826219.

Imane, N. I. *et al.* (2020) ‘Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities

of some essential oils against multidrug resistant bacteria’, *European Journal of Integrative Medicine*, 35(December 2019). doi: 10.1016/j.eujim.2020.101074.

Isah, T. (2019) ‘Stress and defense responses in plant secondary metabolites production’, *Biological research*, 52(1), p. 39. doi: 10.1186/s40659-019-0246-3.

Jacyna, J., Kordalewska, M. and Markuszewski, M. J. (2019) ‘Design of Experiments in metabolomics-related studies: An overview’, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 164, pp. 598–606. doi: 10.1016/j.jpba.2018.11.027.

Jakubowski, W. and Walkowiak, B. (2015) ‘Resistance of oxidative stress in biofilm and planktonic cells’, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58(2), pp. 300–308. doi: 10.1590/S1516-8913201500356.

Jardak, M. *et al.* (2017) ‘Chemical composition, anti-biofilm activity and potential cytotoxic effect on cancer cells of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil from Tunisia’, *Lipids in Health and Disease*, 16(1), pp. 1–10. doi: 10.1186/s12944-017-0580-9.

Jesus, F. P. K. *et al.* (2015) ‘In vitro activity of carvacrol and thymol combined with antifungals or antibacterials against *Pythium insidiosum*’, *Journal de Mycologie Medicale*, 25(2), pp. e89–e93. doi: 10.1016/j.mycmed.2014.10.023.

Jiang, Q. *et al.* (2019) ‘Quorum Sensing: A Prospective Therapeutic Target for Bacterial Diseases’, *BioMed Research International*, 2019. doi: 10.1155/2019/2015978.

Kačániová, M. *et al.* (2020) ‘Antioxidant, Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Coriander (*Coriandrum sativum* L.) Essential Oil for Its Application in Foods’, *Foods*, 9(3). doi:

10.3390/foods9030282.

Kachur, K. and Suntres, Z. (2019) 'The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0(0), pp. 1–12. doi: 10.1080/10408398.2019.1675585.

Kai, K. (2018) 'Bacterial quorum sensing in symbiotic and pathogenic relationships with hosts', *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 82(3), pp. 363–371. doi: 10.1080/09168451.2018.1433992.

Kakaraparthi, P. S. *et al.* (2015) 'Changes in the essential oil content and composition of palmarosa (*Cymbopogon martini*) harvested at different stages and short intervals in two different seasons', *Industrial Crops and Products*, 69, pp. 348–354. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.02.020.

Kalia, V. C. (2013) 'Quorum sensing inhibitors: An overview', *Biotechnology Advances*, 31(2), pp. 224–245. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.10.004.

Kalia, V. C. *et al.* (2019) 'Quorum sensing inhibitors as antipathogens: biotechnological applications', *Biotechnology Advances*, 37(1), pp. 68–90. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.006.

Kamali, E. *et al.* (2020) 'Evaluation of antimicrobial resistance, biofilm forming potential, and the presence of biofilm-related genes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*', *BMC Research Notes*, 13(1), pp. 4–9. doi: 10.1186/s13104-020-4890-z.

Kang, J. *et al.* (2019) 'Antibacterial and anti-biofilm activities of peppermint essential oil against *Staphylococcus aureus*', *Lwt*, 101(August 2018), pp. 639–645. doi:

10.1016/j.lwt.2018.11.093.

Kannappan, A. *et al.* (2017) 'Inhibitory efficacy of geraniol on biofilm formation and development of adaptive resistance in *Staphylococcus epidermidis* RP62A', *Journal of Medical Microbiology*, 66(10), pp. 1506–1515. doi: 10.1099/jmm.0.000570.

Karamaouna, F. *et al.* (2013) 'Insecticidal Activity of Plant Essential Oils Against the Vine Mealybug, *Planococcus ficus*', *Journal of Insect Science*, 13(142), pp. 1–13. doi: 10.1673/031.013.14201.

Kariminik, A. *et al.* (2019) 'Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils extracted from 4 medicinal plants (Labiatae) of kerman, iran', *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 6(4), pp. 172–179. doi: 10.29252/JABR.06.04.07.

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

Kassinger, S. J. and van Hoek, M. L. (2020) 'Biofilm architecture: An emerging synthetic biology target', *Synthetic and Systems Biotechnology*, 5(1), pp. 1–10. doi: 10.1016/j.synbio.2020.01.001.

Kaviya, S. *et al.* (2011) 'Biosynthesis of silver nanoparticles using citrus sinensis peel extract and its antibacterial activity', *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 79(3), pp. 594–598. doi: 10.1016/j.saa.2011.03.040.

Kedia, A. *et al.* (2014) 'Antifungal and antiaflatoxigenic properties of *Cuminum*

cuminum (L.) seed essential oil and its efficacy as a preservative in stored commodities’, *International Journal of Food Microbiology*, 168–169, pp. 1–7. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.008.

Kerekes, E. B. *et al.* (2013) ‘Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related micro-organisms’, *Journal of Applied Microbiology*, 115(4), pp. 933–942. doi: 10.1111/jam.12289.

Kerekes, E. B. *et al.* (2015) ‘Essential oils against bacterial biofilm formation and quorum sensing of food-borne pathogens and spoilage microorganisms’, *Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*, pp. 429–437.

Kerekes, E. B. *et al.* (2019) ‘Anti-biofilm effect of selected essential oils and main components on mono- and polymicrobial bacterial cultures’, *Microorganisms*, 7(9). doi: 10.3390/microorganisms7090345.

Keren-Paz, A. and Kolodkin-Gal, I. (2020) ‘A brick in the wall: Discovering a novel mineral component of the biofilm extracellular matrix’, *New Biotechnology*, 56(November 2019), pp. 9–15. doi: 10.1016/j.nbt.2019.11.002.

Keseler, I. M. *et al.* (2013) ‘EcoCyc: Fusing model organism databases with systems biology’, *Nucleic Acids Research*, 41(D1), pp. 605–612. doi: 10.1093/nar/gks1027.

Khan, B. A. *et al.* (2018) ‘HHS Public Access’, 24(5), pp. 689–704. doi: 10.1517/13543784.2015.1019062. Investigational.

Khan, I. *et al.* (2020) ‘Antimicrobial potential of the food-grade additive carvacrol

against uropathogenic *E. coli* based on membrane depolarization, reactive oxygen species generation, and molecular docking analysis', *Microbial Pathogenesis*, 142(February), p. 104046. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104046.

Khan, M. M. *et al.* (2019) 'Multi-omics strategies uncover host-pathogen interactions', *ACS Infectious Diseases*, 5(4), pp. 493–505. doi: 10.1021/acsinfecdis.9b00080.

Khan, M. S. A. *et al.* (2009) 'Inhibition of quorum sensing regulated bacterial functions by plant essential oils with special reference to clove oil', *Letters in Applied Microbiology*, 49(3), pp. 354–360. doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02666.x.

Khan, S. T. *et al.* (2017) 'Thymol and carvacrol induce autolysis, stress, growth inhibition and reduce the biofilm formation by *Streptococcus mutans*', *AMB Express*, 7(1). doi: 10.1186/s13568-017-0344-y.

Khan, U. A. *et al.* (2013) 'Antibacterial activity of some medicinal plants against selected human pathogenic bacteria', *European Journal of Microbiology and Immunology*, 3(4), pp. 272–274. doi: 10.1556/eujmi.3.2013.4.6.

Khiya, Z. *et al.* (2019) 'Valorization of the *Salvia officinalis* L. of the Morocco bioactive extracts: Phytochemistry, antioxidant activity and corrosion inhibition', *Journal of King Saud University - Science*, 31(3), pp. 322–335. doi: 10.1016/j.jksus.2018.11.008.

Kifer, D., Mužinić, V. and Klaric, M. Š. (2016) 'Antimicrobial potency of single and combined mupirocin and monoterpenes, thymol, menthol and 1,8-cineole against *Staphylococcus aureus* planktonic and biofilm growth', *Journal of Antibiotics*, 69(9), pp. 689–696. doi:

10.1038/ja.2016.10.

Kissels, W., Wu, X. and Santos, R. R. (2017) 'Short communication: Interaction of the isomers carvacrol and thymol with the antibiotics doxycycline and tilmicosin: In vitro effects against pathogenic bacteria commonly found in the respiratory tract of calves', *Journal of Dairy Science*, 100(2), pp. 970–974. doi: 10.3168/jds.2016-11536.

Klein, G. *et al.* (2014) 'Assembly of lipopolysaccharide in escherichia coli requires the essential LapB heat shock protein', *Journal of Biological Chemistry*, 289(21), pp. 14829–14853. doi: 10.1074/jbc.M113.539494.

Klein, G. and Raina, S. (2015) 'Regulated control of the assembly and diversity of lps by noncoding sRNAs', *BioMed Research International*, 2015. doi: 10.1155/2015/153561.

Knee, J. M. *et al.* (2013) 'A novel ion pairing LC/MS metabolomics protocol for study of a variety of biologically relevant polar metabolites', *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 936, pp. 63–73. doi: 10.1016/j.jchromb.2013.07.027.

Kohlert, C. *et al.* (1999) 'Kohlert2000'. Available at: <http://dabamirror.sci-hub.cc/abec99194c406ad266ba1a7fdb7467f/kohlert2000.pdf>.

Koo, H. *et al.* (2017) 'Targeting microbial biofilms: Current and prospective therapeutic strategies', *Nature Reviews Microbiology*, 15(12), pp. 740–755. doi: 10.1038/nrmicro.2017.99.

Koriem, K. M. M. (2015) 'Approach to pharmacological and clinical applications of Anisi aetheroleum', *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(1), pp. 60–67. doi:

10.1016/S2221-1691(15)30172-6.

Korsch, M. *et al.* (2014) 'Microbial analysis of biofilms on cement surfaces: An investigation in cement-associated peri-implantitis', *Journal of Applied Biomaterials and Fundamental Materials*, 12(2), pp. 70–80. doi: 10.5301/jabfm.5000206.

Kothari, V., Sharma, S. and Padia, D. (2017) 'Recent research advances on *Chromobacterium violaceum*', *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(8), pp. 744–752. doi: 10.1016/j.apjtm.2017.07.022.

Koutsoudaki, C., Krsek, M. and Rodger, A. (2005) 'Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of *Pistacia lentiscus* Var. chia', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), pp. 7681–7685. doi: 10.1021/jf050639s.

Kozics, K. *et al.* (2013) 'Effects of *Salvia officinalis* and *Thymus vulgaris* on oxidant-induced DNA damage and antioxidant status in HepG2 cells', *Food Chemistry*, 141(3), pp. 2198–2206. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.04.089.

Krasteva, P. V., Giglio, K. M. and Sondermann, H. (2012) 'Sensing the messenger: The diverse ways that bacteria signal through c-di-GMP', *Protein Science*, 21(7), pp. 929–948. doi: 10.1002/pro.2093.

Krause, D. J. *et al.* (2018) 'Functional and evolutionary characterization of a secondary metabolite gene cluster in budding yeasts', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(43), pp. 11030–11035. doi: 10.1073/pnas.1806268115.

Krzyżek, P. (2019) 'Challenges and limitations of anti-quorum sensing therapies',

*Frontiers in Microbiology*, 10(OCT). doi: 10.3389/fmicb.2019.02473.

Kuhn, D. *et al.* (2019) 'Antibiofilm activity of the essential oil of *Campomanesia aurea* O. Berg against microorganisms causing food borne diseases', *Lwt*, 108(November 2018), pp. 247–252. doi: 10.1016/j.lwt.2019.03.079.

Kumar, L. *et al.* (2015) 'Zingerone silences quorum sensing and attenuates virulence of *Pseudomonas aeruginosa*', *Fitoterapia*, 102, pp. 84–95. doi: 10.1016/j.fitote.2015.02.002.

Labadie, C. *et al.* (2015) 'Hydrosols of orange blossom (*Citrus aurantium*), and rose flower (*Rosa damascena* and *Rosa centifolia*) support the growth of a heterogeneous spoilage microbiota', *Food Research International*, 76, pp. 576–586. doi: 10.1016/j.foodres.2015.07.014.

Lagha, R. *et al.* (2019) 'Antibacterial and Biofilm Inhibitory Activity of Medicinal Plant Essential Oils Against *Escherichia coli* Isolated from UTI Patients', *Molecules*, pp. 1–12. doi: 10.3390/molecules24061161.

Lambert, R. J. W. *et al.* (2001) 'A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol', *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), pp. 453–462. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x.

Lapeere, H. *et al.* (2013) 'Contact dermatitis caused by lovage (*Levisticum officinalis*) essential oil', *Contact Dermatitis*, 69(3), pp. 181–182. doi: 10.1111/cod.12082.

Larrazabal-Fuentes, M. *et al.* (2019) 'Chemical composition, antioxidant capacity, toxicity and antibacterial activity of the essential oils from *Acantholippia deserticola* (Phil.) Moldenke (*Rica rica*) and *Artemisia copa* Phil. (*Copa copa*) extracted by microwave-assisted

hydrodistillation', *Industrial Crops and Products*, 142(May), p. 111830. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.111830.

Lee, J. *et al.* (2008) 'Indole cell signaling occurs primarily at low temperatures in *Escherichia coli*', *ISME Journal*, 2(10), pp. 1007–1023. doi: 10.1038/ismej.2008.54.

Lee, J. and Zhang, L. (2014) 'The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*', *Protein and Cell*, 6(1), pp. 26–41. doi: 10.1007/s13238-014-0100-x.

Lee, S. *et al.* (2020) 'Synergistic antimicrobial activity of oregano and thyme thymol essential oils against *Leuconostoc citreum* in a laboratory medium and tomato juice', *Food Microbiology*, 90(December 2019), p. 103489. doi: 10.1016/j.fm.2020.103489.

Leech, J. *et al.* (2020) 'Non-pathogenic *Escherichia coli* biofilms: effects of growth conditions and surface properties on structure and curli gene expression', *Archives of Microbiology*, 202(6), pp. 1517–1527. doi: 10.1007/s00203-020-01864-5.

Leite, B. *et al.* (2017) 'Integration host factor is important for biofilm formation by *Salmonella enterica* Enteritidis', *Pathogens and Disease*, 75(6), pp. 1–8. doi: 10.1093/femspd/ftx074.

Leite, M. C. A. *et al.* (2015) 'Investigating the antifungal activity and mechanism(s) of geraniol against *Candida albicans* strains', *Medical Mycology*, 53(3), pp. 275–284. doi: 10.1093/mmy/myu078.

León-Méndez, G. *et al.* (2019) 'Essential oils as a source of bioactive molecules', *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 48(1), pp. 80–93. doi:

10.15446/rcciquifa.v48n1.80067.

Leonardi, R. and Jackowski, S. (2007) 'Biosynthesis of Pantothenic Acid and Coenzyme A', *EcoSal Plus*, 2(2), pp. 1–28. doi: 10.1128/ecosalplus.3.6.3.4.

Li, H. *et al.* (2014) 'Antibacterial activity and mechanism of action of *Monarda punctata* essential oil and its main components against common bacterial pathogens in respiratory tract.', *International journal of clinical and experimental pathology*, 7(11), pp. 7389–98. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4270556&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Li, L. *et al.* (2014) 'The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens', *Frontiers in Microbiology*, 5(JUN), pp. 1–1. doi: 10.3389/fmicb.2014.00258.

Li, T. *et al.* (2020) 'Methyl anthranilate: A novel quorum sensing inhibitor and anti-biofilm agent against *Aeromonas sobria*', *Food Microbiology*, 86, p. 103356. doi: 10.1016/j.fm.2019.103356.

Licata, M. *et al.* (2015) 'Study of quantitative and qualitative variations in essential oils of Sicilian oregano biotypes', *Journal of Essential Oil Research*, 27(4), pp. 293–306. doi: 10.1080/10412905.2015.1045088.

Lin, J. *et al.* (2018) 'The *Pseudomonas* quinolone signal (PQS): Not just for quorum sensing anymore', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(JUL), pp. 1–9. doi: 10.3389/fcimb.2018.00230.

Ling, L. L. *et al.* (2015) 'A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance.', *Nature*, 517(7535), pp. 455–9. doi: 10.1038/nature14098.

Liu, Q. *et al.* (2020) 'Synergistic action of electrolyzed water and mild heat for enhanced microbial inactivation of Escherichia coli O157:H7 revealed by metabolomics analysis', *Food Control*, 110(September 2019), p. 107026. doi: 10.1016/j.foodcont.2019.107026.

Liu, Z. *et al.* (2014) 'CsgD regulatory network in a bacterial trait-altering biofilm formation', *Emerging Microbes and Infections*, 3(000), p. 0. doi: 10.1038/emi.2014.1.

Lixa, C. *et al.* (2015) 'A structural perspective on the mechanisms of', 87, pp. 2189–2203.

López-Sámano, M. *et al.* (2020) 'A novel way to synthesize pantothenate in bacteria involves  $\beta$ -alanine synthase present in uracil degradation pathway', *MicrobiologyOpen*, 9(4), pp. 1–25. doi: 10.1002/mbo3.1006.

Lorenzo, D. *et al.* (2001) 'Composition of a new essential oil type of Lippia alba (Mill.) N.E. Brown from Uruguay', *Flavour and Fragrance Journal*, 16(5), pp. 356–359. doi: 10.1002/ffj.1011.

Lories, B. *et al.* (2020) 'Biofilm Bacteria Use Stress Responses to Detect and Respond to Competitors', *Current Biology*, 30(7), p. 1231–1244.e4. doi: 10.1016/j.cub.2020.01.065.

Lowery, C. A. *et al.* (2013) 'A chemical biology approach to interrogate quorum-sensing regulated behaviors at the molecular and cellular level', *Chemistry and Biology*, 20(7), pp. 903–911. doi: 10.1016/j.chembiol.2013.05.009.

Lu, H. *et al.* (2019) 'Metabolomics Deciphered Metabolic Reprogramming Required for Biofilm Formation', *Scientific Reports*, 9(1), pp. 1–7. doi: 10.1038/s41598-019-49603-1.

Lu, W., Bennett, B. D. and Rabinowitz, J. D. (2008) 'Analytical strategies for LC-MS-based targeted metabolomics', *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 871(2), pp. 236–242. doi: 10.1016/j.jchromb.2008.04.031.

Luciardi, M. C. *et al.* (2016) 'Mandarin essential oils inhibit quorum sensing and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*', *LWT - Food Science and Technology*, 68, pp. 373–380. doi: 10.1016/j.lwt.2015.12.056.

Luciardi, M. C. *et al.* (2020) 'Grapefruit essential oils inhibit quorum sensing of *Pseudomonas aeruginosa*', *Food Science and Technology International*, 26(3), pp. 231–241. doi: 10.1177/1082013219883465.

Luís, Â. *et al.* (2016) 'Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils', *Industrial Crops and Products*, 79, pp. 274–282. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.10.055.

Machado, I. *et al.* (2020) 'Quorum sensing in food spoilage and natural-based strategies for its inhibition', *Food Research International*, 127(July 2019), p. 108754. doi: 10.1016/j.foodres.2019.108754.

MacKenzie, K. D. *et al.* (2017) 'Examining the link between biofilm formation and the ability of pathogenic *Salmonella* strains to colonize multiple host species', *Frontiers in Veterinary Science*, 4(AUG), pp. 1–19. doi: 10.3389/fvets.2017.00138.

Mączka, W., Wińska, K. and Grabarczyk, M. (2020) 'One Hundred Faces of Geraniol', *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(14), pp. 1–16. doi: 10.3390/molecules25143303.

Malcova, M., Karasova, D. and Rychlik, I. (2009) 'aroA and aroD mutations influence biofilm formation in Salmonella Enteritidis: RESEARCH LETTER', *FEMS Microbiology Letters*, 291(1), pp. 44–49. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01433.x.

Manefield, M. *et al.* (2002) 'Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover', *Microbiology*, 148(4), pp. 1119–1127. doi: 10.1099/00221287-148-4-1119.

Marchese, A. *et al.* (2017) 'Update on monoterpenes as antimicrobial agents: A particular focus on p-cymene', *Materials*, 10(8), pp. 1–15. doi: 10.3390/ma10080947.

Marchese, A. *et al.* (2018) 'The natural plant compound carvacrol as an antimicrobial and anti-biofilm agent: mechanisms, synergies and bio-inspired anti-infective materials', *Biofouling*, 34(6), pp. 630–656. doi: 10.1080/08927014.2018.1480756.

Marlon, C. *et al.* (no date) 'Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial , Anti-Biofilm and Anti-Quorum Sensing Activities against Pathogenic Bacteria'.

Marotti, M. *et al.* (2004) 'Characterization and yield evaluation of essential oils from different tagetes Species', *Journal of Essential Oil Research*, 16(5), pp. 440–444. doi: 10.1080/10412905.2004.9698767.

Martín-Rodríguez, A. J. *et al.* (2015) 'Flavonoids from Piper delineatum modulate quorum-sensing-regulated phenotypes in Vibrio harveyi', *Phytochemistry*, 117, pp. 98–106. doi:

10.1016/j.phytochem.2015.06.006.

Martin-Rodriguez, A. J. and Romling, U. (2017) 'Nucleotide Second Messenger Signaling as a Target for the Control of Bacterial Biofilm Formation', *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 17(17), pp. 1928–1944. doi: 10.2174/1568026617666170105144424.

Martínez, A. L. *et al.* (2012) 'Antinociceptive effectiveness of triterpenes from rosemary in visceral nociception', *Journal of Ethnopharmacology*, 142(1), pp. 28–34. doi: 10.1016/j.jep.2012.03.052.

Martucci, J. F. *et al.* (2015) 'Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films', *Industrial Crops and Products*, 71, pp. 205–213. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.03.079.

Masoumi-Ardakani, Y. *et al.* (2016) 'Chemical composition, anticonvulsant activity, and toxicity of essential oil and methanolic extract of *Elettaria cardamomum*', *Planta Medica*, 82(17), pp. 1482–1486. doi: 10.1055/s-0042-106971.

Matiz, G. E., Fuentes, K. and Méndez, L. (2015) 'Microencapsulation of thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil in polymeric matrices based on modified yam (*Dioscorea rotundata*) starch', *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas*. May 2015 44(2):189-207, 44(2), pp. 189–207. Available at: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-74182015000200005&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74182015000200005&lng=en&tlng=en).

Mazid, M., Khan, T. A. and Mohammad, F. (2011) 'Role of secondary metabolites in

defense mechanisms of plants', *Biology and Medicine*, 3(2 SPECIALISSUE), pp. 232–249.

McClellan, K. H. *et al.* (1997) 'Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: Exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones', *Microbiology*, 143(12), pp. 3703–3711. doi: 10.1099/00221287-143-12-3703.

Meinert, S. *et al.* (2013) 'Quantitative quenching evaluation and direct intracellular metabolite analysis in *Penicillium chrysogenum*', *Analytical Biochemistry*, 438(1), pp. 47–52. doi: 10.1016/j.ab.2013.03.021.

Memar, M. Y. *et al.* (2017) 'Carvacrol and thymol: Strong antimicrobial agents against resistant isolates', *Reviews in Medical Microbiology*, 28(2), pp. 63–68. doi: 10.1097/MRM.000000000000100.

Mendes, S. S. *et al.* (2010) 'Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves', *Journal of Ethnopharmacology*, 129(3), pp. 391–397. doi: 10.1016/j.jep.2010.04.005.

Mera, I. F. G., Falconí, D. E. G. and Córdova, V. M. (2019) 'Secondary metabolites in plants: Main classes, phytochemical analysis and pharmacological activities', *Revista Bionatura*, 4(4). doi: 10.21931/RB/2019.04.04.11.

Merino, L. *et al.* (2019) 'Biofilm formation by *Salmonella* sp. in the poultry industry: Detection, control and eradication strategies', *Food Research International*, 119(July 2017), pp. 530–540. doi: 10.1016/j.foodres.2017.11.024.

Michalak, M. (2018) 'Aromatherapy and methods of applying essential oils', *Arch*

*Physiother Glob Res*, 22(2), pp. 25–31. doi: 10.15442/apgr.22.2.3.

Mielko, K. A. *et al.* (2019) ‘Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*’, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(11), pp. 1–11. doi: 10.1007/s11274-019-2739-1.

Miladi, H. *et al.* (2016) ‘Antibiofilm formation and anti-adhesive property of three mediterranean essential oils against a foodborne pathogen *Salmonella* strain’, *Microbial Pathogenesis*, 93, pp. 22–31. doi: 10.1016/j.micpath.2016.01.017.

Miladi, H. *et al.* (2017) ‘Synergistic effect of eugenol, carvacrol, thymol, p-cymene and  $\gamma$ -terpinene on inhibition of drug resistance and biofilm formation of oral bacteria’, *Microbial Pathogenesis*, 112, pp. 156–163. doi: 10.1016/j.micpath.2017.09.057.

Mitropoulou, G. *et al.* (2015) ‘Composition, antimicrobial, antioxidant, and antiproliferative activity of *Origanum dictamnus* (dittany) essential oil’, *Microb Ecol Health Dis*, 26, p. 26543. doi: 10.3402/mehd.v26.26543.

Mohsenipour, Z. and Hassanshahian, M. (2015) ‘The inhibitory effect of *Thymus vulgaris* extracts on the planktonic form and biofilm structures of six human pathogenic bacteria.’, *Avicenna journal of phytomedicine*, 5(4), pp. 309–18. doi: 10.22038/ajp.2015.4210.

Moreira, L. M. *et al.* (2003) ‘Identification and physical organization of the gene cluster involved in the biosynthesis of *Burkholderia cepacia* complex exopolysaccharide’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 312(2), pp. 323–333. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.10.118.

Morsy, N. F. S. (2015) ‘A short extraction time of high quality hydrodistilled cardamom

(*Elettaria cardamomum* L. Maton) essential oil using ultrasound as a pretreatment', *Industrial Crops and Products*, 65, pp. 287–292. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.12.012.

Mosmann, T. (1983) 'Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays', *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), pp. 55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

Murbach Teles Andrade, B. F. *et al.* (2014) 'Cymbopogon martinii essential oil and geraniol at noncytotoxic concentrations exerted immunomodulatory/anti-inflammatory effects in human monocytes', *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 66(10), pp. 1491–1496. doi: 10.1111/jphp.12278.

Murugayah, S. A. and Gerth, M. L. (2019) 'Engineering quorum quenching enzymes: Progress and perspectives', *Biochemical Society Transactions*, 47(3), pp. 793–800. doi: 10.1042/BST20180165.

Myszka, K. *et al.* (2016) 'Inhibition of quorum sensing-related biofilm of *Pseudomonas fluorescens* KM121 by *Thymus vulgare* essential oil and its major bioactive compounds', *International Biodeterioration and Biodegradation*, 114, pp. 252–259. doi: 10.1016/j.ibiod.2016.07.006.

Nakayama, J. *et al.* (2009) 'Ambuic acid inhibits the biosynthesis of cyclic peptide quormones in gram-positive bacteria', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(2), pp. 580–586. doi: 10.1128/AAC.00995-08.

Nalbantoglu, S. (2019) 'Metabolomics: Basic Principles and Strategies', *Molecular*

*Medicine*, pp. 1–15. doi: 10.5772/intechopen.88563.

Nazzaro, F. *et al.* (2013) ‘Effect of essential oils on pathogenic bacteria’, *Pharmaceuticals*, 6(12), pp. 1451–1474. doi: 10.3390/ph6121451.

Nazzaro, F., Fratianni, F. and Coppola, R. (2013) ‘Quorum sensing and phytochemicals’, *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), pp. 12607–12619. doi: 10.3390/ijms140612607.

Nesse, L. L., Berg, K. and Vestby, L. K. (2015) ‘Effects of norspermidine and spermidine on biofilm formation by potentially pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* wild-type strains’, *Applied and Environmental Microbiology*, 81(6), pp. 2226–2232. doi: 10.1128/AEM.03518-14.

Newman, J. W., Floyd, R. V. and Fothergill, J. L. (2017) ‘The contribution of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and host factors in the establishment of urinary tract infections’, *FEMS Microbiology Letters*, 364(15), pp. 1–11. doi: 10.1093/femsle/fnx124.

Nikolić, M. *et al.* (2014) ‘Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and *Reut* and *Thymus vulgaris* L. essential oils’, *Industrial Crops and Products*, 52, pp. 183–190. doi: 10.1016/j.indcrop.2013.10.006.

Noumi, E. *et al.* (2018) ‘*Chromobacterium violaceum* and *pseudomonas aeruginosa* pao1: Models for evaluating anti-quorum sensing activity of *melaleuca alternifolia* essential oil and its main component terpinen-4-ol’, *Molecules*, 23(10), pp. 1–16. doi:

10.3390/molecules23102672.

Novović, K. *et al.* (2018) 'Acinetobacter spp. porin Omp33-36: Classification and transcriptional response to carbapenems and host cells', *PLoS ONE*, 13(8), pp. 1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0201608.

Nunes, B. C. *et al.* (2016) 'Antimicrobial activity, cytotoxicity and selectivity index of *Banisteriopsis laevifolia* (A. Juss.) B. Gates leaves', *Industrial Crops and Products*, 92, pp. 277–289. doi: 10.1016/j.indcrop.2016.08.016.

O'Bryan, C. A. *et al.* (2015) 'Potential of plant essential oils and their components in animal agriculture - in vitro studies on antibacterial mode of action', *Frontiers in Veterinary Science*, 2(SEP), pp. 1–8. doi: 10.3389/fvets.2015.00035.

O'Toole, G. A. (2010) 'Microtiter dish Biofilm formation assay', *Journal of Visualized Experiments*, (47), pp. 10–11. doi: 10.3791/2437.

Oh, S. Y. *et al.* (2017) 'Effects of essential oil (blended and single essential oils) on anti-biofilm formation of *Salmonella* and *Escherichia coli*', *Journal of Animal Science and Technology*, 59(1), pp. 1–5. doi: 10.1186/s40781-017-0127-7.

de Oliveira, P. F. *et al.* (2016) 'Manool, a *Salvia officinalis* diterpene, induces selective cytotoxicity in cancer cells', *Cytotechnology*, 68(5), pp. 2139–2143. doi: 10.1007/s10616-015-9927-0.

De Oliveira Pereira, F. *et al.* (2015) 'Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol

biosynthesis', *Pharmaceutical Biology*, 53(2), pp. 228–234. doi:

10.3109/13880209.2014.913299.

Olivero-Verbel, J. *et al.* (2014) 'Composition, anti-quorum sensing and antimicrobial activity of essential oils from *Lippia alba*', *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(3), pp. 759–767. doi: 10.1590/S1517-83822014000300001.

Olivero, J. T. V., Pájaro, N. P. C. and Stashenko, E. (2011) 'Antiquorum sensing activity of essential oils isolated from different species of the genus piper', *Vitae*, 18(1), pp. 77–82.

Osuntokun, O. T. (2017) 'Prospects of Essential Oils in Drug Discovery', *Advances in Cytology & Pathology*, 2(1). doi: 10.15406/acp.2017.02.00010.

Othman, L., Sleiman, A. and Abdel-Massih, R. M. (2019) 'Antimicrobial activity of polyphenols and alkaloids in middle eastern plants', *Frontiers in Microbiology*, 10(MAY). doi: 10.3389/fmicb.2019.00911.

Ouedrhiri, W. *et al.* (2017) 'Synergistic antimicrobial activity of two binary combinations of marjoram, lavender, and wild thyme essential oils', *International Journal of Food Properties*, 20(12), pp. 3149–3158. doi: 10.1080/10942912.2017.1280504.

Öztürk, M. *et al.* (2009) 'GC-MS analysis and antimicrobial activity of essential oil of *Stachys cretica* subsp. *smyrnaea*', *Natural Product Communications*, 4(1), pp. 109–114. doi: 10.1177/1934578x09000400124.

Paczkowski, J. E. *et al.* (2017) 'Flavonoids suppress *Pseudomonas aeruginosa* virulence through allosteric inhibition of quorum-sensing Receptors', *Journal of Biological Chemistry*,

292(10), pp. 4064–4076. doi: 10.1074/jbc.M116.770552.

Paluch, E. *et al.* (2020) ‘Prevention of biofilm formation by quorum quenching’, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(5), pp. 1871–1881. doi: 10.1007/s00253-020-10349-w.

Pan, K. *et al.* (2014) ‘Thymol nanoencapsulated by sodium caseinate: Physical and antilisterial properties’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(7), pp. 1649–1657. doi: 10.1021/jf4055402.

Papenfort, K., Bassler, B. and Chase, C. (2017) ‘Quorum sensing Signal- Response Systems in Gram-Negative Bacteria’, *Nat ev Microbiology*, 14(9), pp. 576–588. doi: 10.1038/nrmicro.2016.89.Quorum-Sensing.

Paulander, W. *et al.* (2018) ‘The agr quorum sensing system in *Staphylococcus aureus* cells mediates death of sub-population’, *BMC Research Notes*, 11(1), pp. 1–5. doi: 10.1186/s13104-018-3600-6.

Paur, I. *et al.* (2010) ‘Extract of oregano, coffee, thyme, clove, and walnuts inhibits NF- $\kappa$ B in monocytes and in transgenic reporter mice’, *Cancer Prevention Research*, 3(5), pp. 653–663. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-09-0089.

Pavan, B. *et al.* (2018) ‘Geraniol pharmacokinetics, bioavailability and its multiple effects on the liver antioxidant and xenobiotic-metabolizing enzymes’, *Frontiers in Pharmacology*, 9(JAN), pp. 1–14. doi: 10.3389/fphar.2018.00018.

Pavela, R. and Sedlák, P. (2018) ‘Post-application temperature as a factor influencing the insecticidal activity of essential oil from *Thymus vulgaris*’, *Industrial Crops and Products*,

113(August 2017), pp. 46–49. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.01.021.

Pease, A. J. *et al.* (2002) ‘and pdxB Genes of Escherichia coli K-12’, *Society*, 184(5), pp. 1359–1369. doi: 10.1128/JB.184.5.1359.

Pedro, D. F. N. *et al.* (2016) ‘Colon Cancer Chemoprevention by Sage Tea Drinking: Decreased DNA Damage and Cell Proliferation’, *Phytotherapy Research*, 30(2), pp. 298–305. doi: 10.1002/ptr.5531.

Peixoto-Neves, D. *et al.* (2010) ‘Vasorelaxant effects of the monoterpene phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta: ORIGINAL ARTICLE’, *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 24(3), pp. 341–350. doi: 10.1111/j.1472-8206.2009.00768.x.

Pena, R. T. *et al.* (2019) ‘Relationship between quorum sensing and secretion systems’, *Frontiers in Microbiology*, 10(JUN). doi: 10.3389/fmicb.2019.01100.

Peng, L. *et al.* (2018) ‘Chemical composition of essential oil in Mosla chinensis Maxim cv. Jiangxiangru and its inhibitory effect on Staphylococcus aureus biofilm formation’, *Open Life Sciences*, 13(1), pp. 1–10. doi: 10.1515/biol-2018-0001.

Peterson, B. W. *et al.* (2015) ‘Viscoelasticity of biofilms and their recalcitrance to mechanical and chemical challenges’, *FEMS Microbiology Reviews*, 39(2), pp. 234–245. doi: 10.1093/femsre/fuu008.

Piewngam, P. *et al.* (2020) ‘Alternative approaches to treat bacterial infections: targeting quorum-sensing’, *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 18(6), pp. 499–510. doi: 10.1080/14787210.2020.1750951.

Pinto, C. D. P. *et al.* (2013) ‘Antimicrobial activity of Lippia species from the Brazilian semiarid region traditionally used as antiseptic and anti-infective agents’, *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. doi: 10.1155/2013/614501.

Pinzón-Torres, J. A. *et al.* (2014) ‘Green biomass production and quality of essential oils of palmarosa (*Cymbopogon martini*) with application of synthesis fertilizers and organic fertilizers’, *Acta Agronomica*, 63(4), pp. 335–342. doi: 10.15446/acag.v63n4.42840.

Pisithkul, T. *et al.* (2019) ‘Metabolic remodeling during biofilm development of bacillus subtilis’, *mBio*, 10(3), pp. 1–32. doi: 10.1128/mBio.00623-19.

Poli, J. P. *et al.* (2018) ‘Anti-quorum sensing activity of 12 essential oils on chromobacterium violaceum and specific action of cis-cis-p-menthenolide from corsican mentha suaveolens ssp. Insularis’, *Molecules*, 23(9). doi: 10.3390/molecules23092125.

Polkade, A. V. *et al.* (2016) ‘Quorum sensing: An under-explored phenomenon in the phylum Actinobacteria’, *Frontiers in Microbiology*, 7(FEB), pp. 1–13. doi: 10.3389/fmicb.2016.00131.

Pontes, E. K. U. *et al.* (2019) ‘Antibiofilm activity of the essential oil of citronella (*Cymbopogon nardus*) and its major component, geraniol, on the bacterial biofilms of *Staphylococcus aureus*’, *Food Science and Biotechnology*, 28(3), pp. 633–639. doi: 10.1007/s10068-018-0502-2.

Prakash, A. *et al.* (2019) ‘Antibacterial and antibiofilm activities of linalool nanoemulsions against *Salmonella Typhimurium*’, *Food Bioscience*, 28(January), pp. 57–65. doi:

10.1016/j.fbio.2019.01.018.

Prescott, R. D. and Decho, A. W. (2020) 'Flexibility and Adaptability of Quorum Sensing in Nature', *Trends in Microbiology*, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.tim.2019.12.004.

Pušárová, A. *et al.* (2017) 'The antibacterial and antifungal activity of six essential oils and their cyto/genotoxicity to human HEL 12469 cells', *Scientific Reports*, 7(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/s41598-017-08673-9.

Queiroz, T. B. *et al.* (2017) 'Cytotoxic and genotoxic potential of geraniol in peripheral blood mononuclear cells and human hepatoma cell line (HepG2)', *Genetics and Molecular Research*, 16(3). doi: 10.4238/gmr16039777.

Quendera, A. P., Barreto, A. S. and Semedo-Lemsaddek, T. (2019) 'Antimicrobial activity of essential oils against foodborne multidrug-resistant enterococci and aeromonads in planktonic and biofilm state', *Food Science and Technology International*, 25(2), pp. 101–108. doi: 10.1177/1082013218799027.

Quintans-júnior, L. *et al.* (2013) ... 'Antinociceptive Activity and Redox Profile of.pdf', 2013.

Raafat, M. M., Ali-Tammam, M. and Ali, A. E. (2019) 'Quorum quenching activity of *Bacillus cereus* isolate 30b confers antipathogenic effects in *Pseudomonas aeruginosa*', *Infection and Drug Resistance*, 12, pp. 1583–1596. doi: 10.2147/IDR.S182889.

Radaelli, M. *et al.* (2016) 'Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against *Clostridium perfringens*', *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(2),

pp. 424–430. doi: 10.1016/j.bjm.2015.10.001.

Rao, J., Chen, B. and McClements, D. J. (2019) ‘Improving the Efficacy of Essential Oils as Antimicrobials in Foods: Mechanisms of Action’, *Annual Review of Food Science and Technology*, 10(1), pp. 365–387. doi: 10.1146/annurev-food-032818-121727.

Rasmussen, T. B. *et al.* (2005) ‘Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector’, *Journal of Bacteriology*, 187(5), pp. 1799–1814. doi: 10.1128/JB.187.5.1799-1814.2005.

Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P. (2010) ‘Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholerae* in food’, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(5), pp. 614–619. doi: 10.1016/j.jbiosc.2010.06.010.

Raut, J. S. and Karuppayil, S. M. (2014) ‘A status review on the medicinal properties of essential oils’, *Industrial Crops and Products*, 62, pp. 250–264. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.05.055.

Rempe, C. S. *et al.* (2017) ‘Metabolomic analysis of the mechanism of action of yerba mate aqueous extract on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium’, *Metabolomics*, 13(2). doi: 10.1007/s11306-016-1159-6.

Rémy, B. *et al.* (2018) ‘Interference in bacterial quorum sensing: A biopharmaceutical perspective’, *Frontiers in Pharmacology*, 9(MAR). doi: 10.3389/fphar.2018.00203.

Rendueles, O. *et al.* (2018) ‘Genetic exchanges are more frequent in bacteria encoding

capsules', *PLoS Genetics*, 14(12), pp. 1–25. doi: 10.1371/journal.pgen.1007862.

Ribeiro, A. F. *et al.* (2014) 'Circadian and seasonal study of the cinnamate chemotype from *Lippia origanoides* Kunth', *Biochemical Systematics and Ecology*, 55, pp. 249–259. doi: 10.1016/j.bse.2014.03.014.

Ríos, N., Stashenko, E. E. and Duque, J. E. (2017) 'Evaluation of the insecticidal activity of essential oils and their mixtures against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)', *Revista Brasileira de Entomologia*, 61(4), pp. 307–311. doi: 10.1016/j.rbe.2017.08.005.

Rodríguez-López, P. *et al.* (2019) 'Efficacy of Synthetic Furanones on *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation', *Foods*, 8(12), pp. 1–17. doi: 10.3390/foods8120647.

Romero, C. M. *et al.* (2016) 'Biofilm inhibition activity of traditional medicinal plants from Northwestern Argentina against native pathogen and environmental microorganisms', *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 49(6), pp. 703–712. doi: 10.1590/0037-8682-0452-2016.

Romero, M., Acuna, L. and Otero, A. (2012) 'Patents on Quorum Quenching: Interfering with Bacterial Communication as a Strategy to Fight Infections', *Recent Patents on Biotechnology*, 6(1), pp. 2–12. doi: 10.2174/187220812799789208.

Romine, M. F. *et al.* (2017) 'Underlying mechanisms for syntrophic metabolism of essential enzyme cofactors in microbial communities', *ISME Journal*, 11(6), pp. 1434–1446. doi: 10.1038/ismej.2017.2.

Rosato, A. *et al.* (2007) 'Antibacterial effect of some essential oils administered alone or

in combination with Norfloxacin', *Phytomedicine*, 14(11), pp. 727–732. doi:

10.1016/j.phymed.2007.01.005.

Rosenberg, J., Ischebeck, T. and Commichau, F. M. (2017) 'Vitamin B6 metabolism in microbes and approaches for fermentative production', *Biotechnology Advances*, 35(1), pp. 31–40. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.11.004.

Rossi, E. *et al.* (2018) "'It's a gut feeling'"–*Escherichia coli* biofilm formation in the gastrointestinal tract environment', *Critical Reviews in Microbiology*, 44(1), pp. 1–30. doi: 10.1080/1040841X.2017.1303660.

Rota, M. C. *et al.* (2008) 'Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils', *Food Control*, 19(7), pp. 681–687. doi: 10.1016/j.foodcont.2007.07.007.

Roy, R. *et al.* (2018) 'Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action', *Virulence*, 9(1), pp. 522–554. doi: 10.1080/21505594.2017.1313372.

Rutherford, S. T. and Bassler, B. L. (2012) 'Bacterial quorum sensing: Its role in virulence and possibilities for its control', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11), pp. 1–25. doi: 10.1101/cshperspect.a012427.

S G Zeedan, G. (2014) 'Antimicrobial, Antiviral Activity and GC-MS Analysis of Essential Oil Extracted from *Achillea fragrantissima* Plant Growing In Sinai Peninsula, Egypt', *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, s8(01). doi: 10.4172/1948-5948.S8-006.

Sabroe, R. A., Holden, C. R. and Gawkrödger, D. J. (2016) 'Contact allergy to essential oils cannot always be predicted from allergy to fragrance markers in the baseline series', *Contact Dermatitis*, 74(4), pp. 236–241. doi: 10.1111/cod.12528.

Sadiq, F. A. *et al.* (2020) 'Untargeted metabolomics reveals metabolic state of *Bifidobacterium bifidum* in the biofilm and planktonic states', *Lwt*, 118(October 2019). doi: 10.1016/j.lwt.2019.108772.

Saeki, E. K., Kobayashi, R. K. T. and Nakazato, G. (2020) 'Quorum sensing system: Target to control the spread of bacterial infections', *Microbial Pathogenesis*, 142(July 2019), p. 104068. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104068.

Salehi, B. *et al.* (2018) *Tagetes spp. Essential oils and other extracts: Chemical characterization and biological activity*, *Molecules*. doi: 10.3390/molecules23112847.

De Santana, M. F. *et al.* (2015) 'The anti-hyperalgesic and anti-inflammatory profiles of p-cymene: Evidence for the involvement of opioid system and cytokines', *Pharmaceutical Biology*, 53(11), pp. 1583–1590. doi: 10.3109/13880209.2014.993040.

Santhakumari, S. and Ravi, A. V. (2019) 'Targeting quorum sensing mechanism: An alternative anti-virulent strategy for the treatment of bacterial infections', *South African Journal of Botany*, 120, pp. 81–86. doi: 10.1016/j.sajb.2018.09.028.

Santos, J. D. C. *et al.* (2019) 'Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja montana* byproducts essential oils', *Industrial Crops and Products*, 137(February), pp. 541–548. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.05.058.

Saputra, N. A. *et al.* (2020) 'Chemical composition of *Cymbopogon nardus* essential oil and its broad spectrum benefit', *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 415(1). doi: 10.1088/1755-1315/415/1/012017.

Sari, P. E., Rusmana, I. and Akhdiya, A. (2016) 'AHL-lactonase characteristics of *Bacillus thuringiensis* SGT3g and its effectiveness in inhibiting pathogenicity of *Dickeya dadantii*', *Malaysian Journal of Microbiology*, 12(4), pp. 315–321. doi: 10.21161/mjm.80515.

Sarrazin, S. L. F., Da Silva, L. A., *et al.* (2015) 'Antibacterial action against food-borne microorganisms and antioxidant activity of carvacrol-rich oil from *Lippia organoides* Kunth', *Lipids in Health and Disease*, 14(1), pp. 1–8. doi: 10.1186/s12944-015-0146-7.

Sarrazin, S. L. F., Da Silva, L. A., *et al.* (2015) 'Antimicrobial and seasonal evaluation of the carvacrol-chemotype oil from *Lippia organoides* kunth', *Molecules*, 20(2), pp. 1860–1871. doi: 10.3390/molecules20021860.

Sartoratto, A. *et al.* (2004) 'Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil', *Brazilian Journal of Microbiology*, 35(4), pp. 275–280. doi: 10.1590/S1517-83822004000300001.

Sauer, K. *et al.* (2002) '*Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm', *Journal of Bacteriology*, 184(4), pp. 1140–1154. doi: 10.1128/jb.184.4.1140-1154.2002.

Segers, K. *et al.* (2019) 'Analytical techniques for metabolomic studies: A review', *Bioanalysis*, 11(24), pp. 2297–2318. doi: 10.4155/bio-2019-0014.

Sepahi, E. *et al.* (2015) 'Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by two herbal essential oils from Apiaceae family', *Journal of Microbiology*, 53(2), pp. 176–180. doi: 10.1007/s12275-015-4203-8.

Shaaban, M., Elgaml, A. and Habib, E. S. E. (2019) 'Biotechnological applications of quorum sensing inhibition as novel therapeutic strategies for multidrug resistant pathogens', *Microbial Pathogenesis*, 127(April 2018), pp. 138–143. doi: 10.1016/j.micpath.2018.11.043.

Shafiee-Nick, R. *et al.* (2012) 'Chronic administration of a combination of six herbs inhibits the progression of hyperglycemia and decreases serum lipids and aspartate amino transferase activity in diabetic rats', *Advances in Pharmacological Sciences*, 2012. doi: 10.1155/2012/789796.

Sharma, G. *et al.* (2016) 'Escherichia coli biofilm: development and therapeutic strategies', *Journal of Applied Microbiology*, 121(2), pp. 309–319. doi: 10.1111/jam.13078.

Shen, F., Ge, C. and Yuan, P. (2020) 'Metabolomics Study Reveals Inhibition and Metabolic Dysregulation in *Staphylococcus aureus* Planktonic Cells and Biofilms Induced by Carnosol', *Frontiers in Microbiology*, 11(September), pp. 1–14. doi: 10.3389/fmicb.2020.538572.

Shinoda, K. *et al.* (2007) 'Biosynthesis of violacein: A genuine intermediate, protoviolaceinic acid, produced by VioABDE, and insight into VioC function', *Chemical Communications*, (40), pp. 4140–4142. doi: 10.1039/b705358d.

Shojaee-Aliabadi, S., Hosseini, S. M. and Mirmoghtadaie, L. (2017) 'Antimicrobial

Activity of Essential Oil', *Essential Oils in Food Processing: Chemistry, Safety and Applications*, pp. 191–229. doi: 10.1002/9781119149392.ch6.

Shu, C., Sun, L. and Zhang, W. (2016) 'Thymol has antifungal activity against *Candida albicans* during infection and maintains the innate immune response required for function of the p38 MAPK signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*', *Immunologic Research*, 64(4), pp. 1013–1024. doi: 10.1007/s12026-016-8785-y.

Shu, H. *et al.* (2020) 'Metabolomics study on revealing the inhibition and metabolic dysregulation in *Pseudomonas fluorescens* induced by 3-carene', *Food Chemistry*, 329(September 2019), p. 127220. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127220.

Sienkiewicz, M. *et al.* (2017) 'The ability of selected plant essential oils to enhance the action of recommended antibiotics against pathogenic wound bacteria', *Burns*, 43(2), pp. 310–317. doi: 10.1016/j.burns.2016.08.032.

Da Silva, A. P. *et al.* (2017) 'Tyrosinase inhibitory activity, molecular docking studies and antioxidant potential of chemotypes of *Lippia origanoides* (Verbenaceae) essential oils', *PLoS ONE*, 12(5), pp. 1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0175598.

Silva, I. N. *et al.* (2018) 'The OmpR regulator of *Burkholderia multivorans* controls mucoid-to-nonmucoid transition and other cell envelope properties associated with persistence in the cystic fibrosis lung', *Journal of Bacteriology*, 200(17), pp. 1–22. doi: 10.1128/JB.00216-18.

Singh, S. *et al.* (2017) 'Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents', *The Open Microbiology Journal*, 11(1), pp. 53–62. doi:

10.2174/1874285801711010053.

Snene, A. *et al.* (2020) 'Comparative study of essential oils composition and in vitro antibacterial effects of two subspecies of *Daucus carota* growing in Tunisia', *South African Journal of Botany*, 130, pp. 366–370. doi: 10.1016/j.sajb.2020.01.028.

Snoussi, M. *et al.* (2016) 'Chemical composition and antibiofilm activity of *Petroselinum crispum* and *Ocimum basilicum* essential oils against *Vibrio* spp. strains', *Microbial Pathogenesis*, 90, pp. 13–21. doi: 10.1016/j.micpath.2015.11.004.

Snoussi, M. *et al.* (2018) 'Antioxidant properties and anti-quorum sensing potential of *Carum copticum* essential oil and phenolics against *Chromobacterium violaceum*', *Journal of Food Science and Technology*, 55(8), pp. 2824–2832. doi: 10.1007/s13197-018-3219-6.

Solano, C., Echeverz, M. and Lasa, I. (2014) 'Biofilm dispersion and quorum sensing', *Current Opinion in Microbiology*, 18(1), pp. 96–104. doi: 10.1016/j.mib.2014.02.008.

Solarte, A. L. *et al.* (2017) 'Combination of Antimicrobials and Essential Oils as an Alternative for the Control of *Salmonella enterica* Multiresistant Strains Related to Foodborne Disease', *Foodborne pathogens and disease*, 14(10), pp. 558–563. doi: 10.1089/fpd.2017.2295.

Song, Y. R. *et al.* (2016) 'Antibacterial activity of cinnamaldehyde and estragole extracted from plant essential oils against *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae* causing bacterial canker disease in kiwifruit', *Plant Pathology Journal*, 32(4), pp. 363–370. doi: 10.5423/PPJ.NT.01.2016.0006.

Soni, K. A. *et al.* (2013) 'Inhibition and inactivation of *salmonella typhimurium* biofilms

from polystyrene and stainless steel surfaces by essential oils and phenolic constituent carvacrol', *Journal of Food Protection*, 76(2), pp. 205–212. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-196.

Souza, C. M. C. *et al.* (2016) 'Antifungal activity of plant-derived essential oils on *Candida tropicalis* planktonic and biofilms cells', *Medical Mycology*, 54(5), pp. 515–523. doi: 10.1093/mmy/myw003.

de Souza, E. L. *et al.* (2010) 'Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*', *International Journal of Food Microbiology*, 137(2–3), pp. 308–311. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.025.

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

Stashenko, E. E., Rui, C. A. and Salgar, W. (2010) 'Lippia organoides chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis', pp. 93–103. doi: 10.1002/jssc.200900452.

Stauff, D. L. and Bassler, B. L. (2011) 'Quorum sensing in *chromobacterium violaceum*: DNA recognition and gene regulation by the CviR receptor', *Journal of Bacteriology*, 193(15), pp. 3871–3878. doi: 10.1128/JB.05125-11.

Stępień-Pyśniak, D. *et al.* (2019) 'Biofilm formation capacity and presence of virulence

factors among commensal *Enterococcus* spp. from wild birds', *Scientific Reports*, 9(1), pp. 1–7.

doi: 10.1038/s41598-019-47602-w.

Stevanović, Z. D. *et al.* (2018) 'Essential oils as feed additives—Future perspectives', *Molecules*, 23(7). doi: 10.3390/molecules23071717.

Stewart, P. S. (2015) 'Antimicrobial Tolerance in Biofilms', *Microbiology Spectrum*, 3(3), pp. 1–30. doi: 10.1128/microbiolspec.mb-0010-2014.

Stokes, J. M. *et al.* (2019) 'Bacterial Metabolism and Antibiotic Efficacy', *Cell Metabolism*, 30(2), pp. 251–259. doi: 10.1016/j.cmet.2019.06.009.

Storey, J. D. (2003) 'The positive false discovery rate: A Bayesian interpretation and the q-value', *Annals of Statistics*, 31(6), pp. 2013–2035. doi: 10.1214/aos/1074290335.

Suárez G, A., Castillo, G. and Chacón S, M. I. (2008) 'Genetic diversity and spatial genetic structure within a population of an aromatic shrub, *Lippia origanoides* (Verbenaceae), in the Chicamocha Canyon, northeastern Colombia', *Genetics Research*, 90(6), pp. 455–465. doi: 10.1017/S0016672308009841.

Sun, D. (2018) 'Pull in and push out: Mechanisms of horizontal gene transfer in bacteria', *Frontiers in Microbiology*, 9(SEP), pp. 1–8. doi: 10.3389/fmicb.2018.02154.

Swamy, M. K., Akhtar, M. S. and Sinniah, U. R. (2016) 'Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action : An Updated Review', 2016. doi: 10.1155/2016/3012462.

Tabarraei, H. *et al.* (2019) 'Evaluation of the acute and sub-acute toxicity of the black caraway seed essential oil in Wistar rats', *Toxicology Reports*, 6(April 2017), pp. 869–874. doi: 10.1016/j.toxrep.2019.08.010.

Takayama, C. *et al.* (2016) 'Chemical composition of Rosmarinus officinalis essential oil and antioxidant action against gastric damage induced by absolute ethanol in the rat', *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(8), pp. 677–681. doi: 10.1016/j.apjtb.2015.09.027.

Tan, L. T. H. *et al.* (2015) 'Traditional uses, phytochemistry, and bioactivities of Cananga odorata (ylang-ylang)', *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2015. doi: 10.1155/2015/896314.

Tang, C. *et al.* (2021) 'Exploring antimicrobial mechanism of essential oil of Amomum villosum Lour through metabolomics based on gas chromatography-mass spectrometry in methicillin-resistant Staphylococcus aureus', *Microbiological Research*, 242(June 2020), p. 126608. doi: 10.1016/j.micres.2020.126608.

Tang, X. *et al.* (2018) 'Metabolomics Uncovers the Regulatory Pathway of Acyl-homoserine Lactones Based Quorum Sensing in Anammox Consortia', *Environmental Science and Technology*, 52(4), pp. 2206–2216. doi: 10.1021/acs.est.7b05699.

Tapia-Rodriguez, M. R. *et al.* (2017) 'Carvacrol as potential quorum sensing inhibitor of Pseudomonas aeruginosa and biofilm production on stainless steel surfaces', *Food Control*, 75, pp. 255–261. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.12.014.

Taylor, P. *et al.* (no date) 'Natural Product Research : Formerly Natural Product Letters

Comparison of antifungal activities of Vietnamese citrus essential oils', (March 2013), pp. 3–6.

Teplitski, M., Mathesius, U. and Rumbaugh, K. P. (2011) 'Perception and degradation of N-Acyl homoserine lactone quorum sensing signals by mammalian and plant cells', *Chemical Reviews*, 111(1), pp. 100–116. doi: 10.1021/cr100045m.

Ternus ZR, Z. M. (2015) 'Microbiological Characterization of Pure Geraniol and Comparison with Bactericidal Activity of the Cinnamic Acid in Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria', *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 07(04), pp. 186–193. doi: 10.4172/1948-5948.1000203.

Terui, Y. *et al.* (2012) 'Increase in cell viability by polyamines through stimulation of the synthesis of ppGpp regulatory protein and  $\omega$  protein of RNA polymerase in *Escherichia coli*', *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 44(2), pp. 412–422. doi: 10.1016/j.biocel.2011.11.017.

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*, 5(6), p. e01860. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01860.

De Toledo, L. G. *et al.* (2016) 'Essential oil of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle: A strategy to combat fungal infections caused by *Candida* species', *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8). doi: 10.3390/ijms17081252.

Tomadoni, B. *et al.* (2015) 'Efficacy of vanillin and geraniol in reducing *Escherichia coli* O157:H7 on strawberry juice', *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), pp. 554–557. doi:

10.1016/j.lwt.2015.06.039.

Torres, N. J. *et al.* (2019) 'Proteomic and metabolomic analyses of a tea-tree oil-selected *Staphylococcus aureus* small colony variant', *Antibiotics*, 8(4). doi: 10.3390/antibiotics8040248.

Tramonti, A. *et al.* (2015) 'Molecular mechanism of PdxR - A transcriptional activator involved in the regulation of vitamin B6 biosynthesis in the probiotic bacterium *Bacillus clausii*', *FEBS Journal*, 282(15), pp. 2966–2984. doi: 10.1111/febs.13338.

Tran, F. and Boedicker, J. Q. (2017) 'Genetic cargo and bacterial species set the rate of vesicle-mediated horizontal gene transfer', *Scientific Reports*, 7(1), pp. 1–10. doi:

10.1038/s41598-017-07447-7.

Trevisan, D. A. C. *et al.* (2018) 'Antibacterial and antibiofilm activity of carvacrol against *Salmonella enterica* serotype typhimurium', *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54(1), pp. 1–8. doi: 10.1590/s2175-97902018000117229.

Tucker, A. O. and Libbey, L. M. (2000) 'Essential oil of *Satureja viminea* L. (Lamiaceae)', *Journal of Essential Oil Research*, 12(3), pp. 283–284. doi: 10.1080/10412905.2000.9699516.

Ueda, A. *et al.* (2009) 'Uracil influences quorum sensing and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* and fluorouracil is an antagonist', *Microbial Biotechnology*, 2(1), pp. 62–74. doi: 10.1111/j.1751-7915.2008.00060.x.

Ultee, A., Bennik, M. H. J. and Moezelaar, R. (2002) 'The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus* The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus*

cereus', *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), pp. 1561–1568. doi:

10.1128/AEM.68.4.1561.

Unlu, M. *et al.* (2010) 'Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae)', *Food and Chemical Toxicology*, 48(11), pp. 3274–3280. doi: 10.1016/j.fct.2010.09.001.

Utari, P. D. *et al.* (2018) 'PvdQ quorum quenching acylase attenuates *Pseudomonas aeruginosa* virulence in a mouse model of pulmonary infection', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(APR). doi: 10.3389/fcimb.2018.00119.

Utari, P. D., Vogel, J. and Quax, W. J. (2017) 'Deciphering physiological functions of AHL quorum quenching acylases', *Frontiers in Microbiology*, 8(JUN), pp. 1–13. doi: 10.3389/fmicb.2017.01123.

Vadakkan, K. *et al.* (2018) 'Quorum sensing intervened bacterial signaling: Pursuit of its cognizance and repression', *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), pp. 239–252. doi: 10.1016/j.jgeb.2018.07.001.

Valentini, M. and Filloux, A. (2016) 'Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria', *Journal of Biological Chemistry*, 291(24), pp. 12547–12555. doi: 10.1074/jbc.R115.711507.

de Vasconcelos, A. T. R. *et al.* (2003) 'The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(20), pp.

11660–11665. doi: 10.1073/pnas.1832124100.

Vasconcelos, S. E. C. B. *et al.* (2017) ‘Plectranthus amboinicus essential oil and carvacrol bioactive against planktonic and biofilm of oxacillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*’, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), pp. 1–9. doi: 10.1186/s12906-017-1968-9.

Vattem, D. A. *et al.* (2007) ‘Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors’, *Fitoterapia*, 78(4), pp. 302–310. doi: 10.1016/j.fitote.2007.03.009.

Venkatramanan, M. *et al.* (2020) ‘Inhibition of Quorum Sensing and Biofilm Formation in *Chromobacterium violaceum* by Fruit Extracts of *Passiflora edulis*’, *ACS Omega*, 5(40), pp. 25605–25616. doi: 10.1021/acsomega.0c02483.

Veras, H. N. H. *et al.* (2012) ‘Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol’, *Fitoterapia*, 83(3), pp. 508–512. doi: 10.1016/j.fitote.2011.12.024.

Verbeke, F. *et al.* (2017) ‘Peptides as quorum sensing molecules: Measurement techniques and obtained levels in vitro and in vivo’, *Frontiers in Neuroscience*, 11(APR), pp. 1–18. doi: 10.3389/fnins.2017.00183.

Verderosa, A. D., Totsika, M. and Fairfull-Smith, K. E. (2019) ‘Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review’, *Frontiers in Chemistry*, 7(November), pp. 1–17. doi: 10.3389/fchem.2019.00824.

Vicuña, G. C., Stashenko, E. E. and Fuentes, J. L. (2010) ‘Chemical composition of the

Lippia origanoides essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage', *Fitoterapia*, 81(5), pp. 343–349. doi: 10.1016/j.fitote.2009.10.008.

Vijayababu, P. *et al.* (2018) 'Patulin interference with ATP binding cassette transferring auto inducer –2 in Salmonella typhi and biofilm inhibition via quorum sensing', *Informatics in Medicine Unlocked*, 11(February), pp. 9–14. doi: 10.1016/j.imu.2018.02.001.

Vijendra Kumar, N. *et al.* (2014) 'Synthesis and quorum sensing inhibitory activity of key phenolic compounds of ginger and their derivatives', *Food Chemistry*, 159, pp. 451–457. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.03.039.

Vikram, A. *et al.* (2010) 'Suppression of bacterial cell-cell signalling, biofilm formation and type III secretion system by citrus flavonoids', *Journal of Applied Microbiology*, 109(2), pp. 515–527. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04677.x.

Vila, R., Clcció, J. F. and Cañigueral, S. (2000) 'Essential oil of satureja viminea L. From costa rica', *Journal of Essential Oil Research*, 12(3), pp. 279–282. doi: 10.1080/10412905.2000.9699515.

Villar, M. *et al.* (2015) 'Integrated metabolomics, transcriptomics and proteomics identifies metabolic pathways affected by Anaplasma phagocytophilum infection in tick cells', *Molecular and Cellular Proteomics*, 14(12), pp. 3154–3172. doi: 10.1074/mcp.M115.051938.

Vincent, I. M. *et al.* (2014) 'Untargeted metabolomic analysis of miltefosine action in Leishmania infantum reveals changes to the internal lipid metabolism', *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 4(1), pp. 20–27. doi: 10.1016/j.ijpddr.2013.11.002.

Vincent, I. M. *et al.* (2016) ‘Untargeted metabolomics to ascertain antibiotic modes of action’, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(4), pp. 2281–2291. doi: 10.1128/AAC.02109-15.

Viuda-Martos, M. *et al.* (2011) ‘In vitro antioxidant and antibacterial activities of essential oils obtained from Egyptian aromatic plants’, *Food Control*, 22(11), pp. 1715–1722. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.04.003.

Vogeleer, P. *et al.* (2019) ‘Escherichia coli O157: H7 responds to phosphate starvation by modifying LPS involved in biofilm formation’, *bioRxiv*, pp. 1–49. doi: 10.1101/536201.

Wahjudi, M. *et al.* (2019) ‘Inhibition of Burkholderia cenocepacia H111 quorum sensing system by environmental bacterial isolates’, *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 293(1). doi: 10.1088/1755-1315/293/1/012028.

Walker, G. and Stewart, G. (2016) ‘Saccharomyces cerevisiae in the Production of Fermented Beverages’, *Beverages*, 2(4), p. 30. doi: 10.3390/beverages2040030.

Walsh, D. J. *et al.* (2019) ‘Antimicrobial Activity of Naturally Occurring Phenols and Derivatives Against Biofilm and Planktonic Bacteria’, *Frontiers in Chemistry*, 7(October), pp. 1–13. doi: 10.3389/fchem.2019.00653.

Wang, C. F. *et al.* (2015) ‘Chemical composition and insecticidal activity of essential oils from Zanthoxylum dissitum leaves and roots against three species of storage pests’, *Molecules*, 20(5), pp. 7990–7999. doi: 10.3390/molecules20057990.

Wang, F. *et al.* (2017) ‘Dodartia orientalis L. essential oil exerts antibacterial activity by

mechanisms of disrupting cell structure and resisting biofilm’, *Industrial Crops and Products*, 109(August), pp. 358–366. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.08.058.

Wang, S., Payne, G. F. and Bentley, W. E. (2020) ‘Quorum Sensing Communication: Molecularly Connecting Cells, Their Neighbors, and Even Devices’, *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, 11, pp. 447–468. doi: 10.1146/annurev-chembioeng-101519-124728.

Wang W, Li D, Huang X, Yang H, Qiu Z, Zou L, Liang Q, Shi Y, Wu Y, Wu S, Yang C, L. Y. (2019) ‘Study on Antibacterial and Quorum-Sensing’. doi: 10.3390/molecules24203792.

Wei, L. S. and Wee, W. (2013) ‘Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon nardus* citronella essential oil against systemic bacteria of aquatic animals’, *Iranian Journal of Microbiology*, 5(2), pp. 147–152.

Werf, M. J. van der *et al.* (2007) ‘Microbial metabolomics: Toward a platform with full metabolome coverage’, *Analytical Biochemistry*, 370(1), pp. 17–25. doi: 10.1016/j.ab.2007.07.022.

Wijesundara, N. M. and Rupasinghe, H. P. V. (2018) ‘Essential oils from *Origanum vulgare* and *Salvia officinalis* exhibit antibacterial and anti-biofilm activities against *Streptococcus pyogenes*’, *Microbial Pathogenesis*, 117(February), pp. 118–127. doi: 10.1016/j.micpath.2018.02.026.

Wińska, K. *et al.* (2019) ‘Essential oils as antimicrobial agents—myth or real alternative?’, *Molecules*, 24(11), pp. 1–21. doi: 10.3390/molecules24112130.

Witting, M. (2013) 'Host - Pathogen metabolomics of *Pseudomonas aeruginosa* infection models'.

Wong, E. H. J. *et al.* (2018) 'Metabolomic analysis of low and high biofilm-forming *Helicobacter pylori* strains', *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–9. doi: 10.1038/s41598-018-19697-0.

Wood, T. K. (2017) 'Strategies for combating persister cell and biofilm infections', *Microbial Biotechnology*, 10(5), pp. 1054–1056. doi: 10.1111/1751-7915.12774.

Wright Muelas, M. *et al.* (2020) 'An untargeted metabolomics strategy to measure differences in metabolite uptake and excretion by mammalian cell lines', *Metabolomics*, 16(10), pp. 1–12. doi: 10.1007/s11306-020-01725-8.

Wu, Y. K., Cheng, N. C. and Cheng, C. M. (2019) 'Biofilms in Chronic Wounds: Pathogenesis and Diagnosis', *Trends in Biotechnology*, 37(5), pp. 505–517. doi: 10.1016/j.tibtech.2018.10.011.

Xi, C. and Wu, J. (2010) 'dATP/ATP, a multifunctional nucleotide, stimulates bacterial cell lysis, extracellular DNA release and biofilm development', *PLoS ONE*, 5(10). doi: 10.1371/journal.pone.0013355.

Yahya, M. F. Z. R. *et al.* (2014) 'In silico analysis of essential tricarboxylic acid cycle enzymes from biofilm-forming bacteria', *Trends in Bioinformatics*, 7(1), pp. 19–26. doi: 10.3923/tb.2014.19.26.

Yan, J. and Bassler, B. L. (2019) 'Surviving as a Community: Antibiotic Tolerance and Persistence in Bacterial Biofilms', *Cell Host and Microbe*, 26(1), pp. 15–21. doi:

10.1016/j.chom.2019.06.002.

Yan, S. and Wu, G. (2019) ‘Can Biofilm Be Reversed Through Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*?’, *Frontiers in Microbiology*, 10(July), pp. 1–9. doi: 10.3389/fmicb.2019.01582.

Yang, L. *et al.* (2018) ‘Response of plant secondary metabolites to environmental factors’, *Molecules*, 23(4), pp. 1–26. doi: 10.3390/molecules23040762.

Yang, T. S., Chao, L. K. P. and Liu, T. T. (2014) ‘Antimicrobial activity of the essential oil of *Glossogyne tenuifolia* against selected pathogens’, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(14), pp. 2965–2971. doi: 10.1002/jsfa.6641.

Yang, Y. X. *et al.* (2012) ‘A new quorum-sensing inhibitor attenuates virulence and decreases antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*’, *Journal of Microbiology*, 50(6), pp. 987–993. doi: 10.1007/s12275-012-2149-7.

Ye, T. *et al.* (2020) ‘*Cupriavidus* sp. HN-2, a novel quorum quenching bacterial isolate, is a potent biocontrol agent against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*’, *Microorganisms*, 8(1), pp. 1–11. doi: 10.3390/microorganisms8010045.

Yousefbeyk, F. *et al.* (2014) ‘Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from Different Parts of *Daucus littoralis* Smith subsp. *hyrcanicus* Rech. f’, *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 17(4), pp. 570–576. doi: 10.1080/0972060X.2014.901610.

Yu, Q. *et al.* (2017) ‘The Agr-like quorum sensing system is required for pathogenesis of necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens* in poultry’, *Infection and Immunity*, 85(6),

pp. 1–17. doi: 10.1128/IAI.00975-16.

Zampieri, M. *et al.* (2017) ‘Nontargeted Metabolomics Reveals the Multilevel Response to Antibiotic Perturbations’, *Cell Reports*, 19(6), pp. 1214–1228. doi: 10.1016/j.celrep.2017.04.002.

Zantar, S. *et al.* (2015) ‘Effect of gamma irradiation on chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Thymus vulgaris* and *Mentha pulegium* essential oils’, *Radiation Physics and Chemistry*, 115, pp. 6–11. doi: 10.1016/j.radphyschem.2015.05.019.

Zapién-Chavarría, K. A. *et al.* (2019) ‘Susceptibility of multidrug-resistant and biofilm-forming uropathogens to Mexican oregano essential oil’, *Antibiotics*, 8(4). doi: 10.3390/antibiotics8040186.

Zhang, D. *et al.* (2018) ‘Research progress on the antibacterial mechanisms of carvacrol: a mini review’, *Bioactive Compounds in Health and Disease*, 1(6), pp. 71–81. Available at: <https://ffhdj.com/index.php/BioactiveCompounds/article/view/551>.

Zhang, H. *et al.* (2019) ‘Effect of simultaneous ultrasonic and microwave assisted hydrodistillation on the yield, composition, antibacterial and antibiofilm activity of essential oils from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis*’, *Journal of Food Engineering*, 244(August 2018), pp. 126–135. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2018.09.014.

Zhang, J. *et al.* (2019) ‘The Mechanisms and Applications of Quorum Sensing (QS) and Quorum Quenching (QQ)’, *Journal of Ocean University of China*, 18(6), pp. 1427–1442. doi: 10.1007/s11802-019-4073-5.

Zhang, N. *et al.* (2016) 'The anxiolytic effect of essential oil of *Cananga odorata* exposure on mice and determination of its major active constituents', *Phytomedicine*, 23(14), pp. 1727–1734. doi: 10.1016/j.phymed.2016.10.017.

Zhang, N. *et al.* (2018) 'Cananga odorata essential oil reverses the anxiety induced by 1-(3-chlorophenyl) piperazine through regulating the MAPK pathway and serotonin system in mice', *Journal of Ethnopharmacology*, 219(January 2017), pp. 23–30. doi: 10.1016/j.jep.2018.03.013.

Zhang, W. *et al.* (2020) 'Escherichia coli increases its ATP concentration in weakly acidic environments principally through the glycolytic pathway', *Genes*, 11(9), pp. 1–19. doi: 10.3390/genes11090991.

Zhang, Y. *et al.* (2018) 'Essential oil components inhibit biofilm formation in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas fluorescens* via anti-quorum sensing activity', *LWT - Food Science and Technology*, 92, pp. 133–139. doi: 10.1016/j.lwt.2018.02.027.

Zhao, X., Yu, Z. and Ding, T. (2020) 'Quorum-sensing regulation of antimicrobial resistance in bacteria', *Microorganisms*, 8(3). doi: 10.3390/microorganisms8030425.

Zhou, J. W. *et al.* (2019) 'Metabolomic analysis of quorum sensing inhibitor hordenine on *Pseudomonas aeruginosa*', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(15), pp. 6271–6285. doi: 10.1007/s00253-019-09878-w.

Zhou, W. *et al.* (2020) 'Chemical composition and evaluation of antioxidant activities, antimicrobial, and anti-melanogenesis effect of the essential oils extracted from *Dalbergia*

pinnata (Lour.) Prain', *Journal of Ethnopharmacology*, 254(February), p. 112731. doi: 10.1016/j.jep.2020.112731.

Zhu, H., He, C.-C. and Chu, Q.-H. (2011) 'Inhibition of quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* by pigments extracted from *Auricularia auricular*', *Letters in Applied Microbiology*, p. no-no. doi: 10.1111/j.1472-765x.2011.02993.x.

Zhu, J. *et al.* (2002) 'Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(5), pp. 3129–3134. doi: 10.1073/pnas.052694299.

Ziemichód, A. and Skotarczak, B. (2017) 'QS – systems communication of Gram-positive bacterial cells', *Acta Biologica*, 24, pp. 51–56. doi: 10.18276/ab.2017.24-06.

Zins, M. M. *et al.* (2001) 'Expression and partial characterization of an elastase from *Chromobacterium violaceum*', *Veterinary Microbiology*, 80(1), pp. 63–74. doi: 10.1016/S0378-1135(00)00370-9.

## 9. Apéndices

## Apéndice A

Listado de metabolitos utilizados en los análisis de metabolómica dirigida

Metabolito	Fórmula	<i>m/z</i>	<i>m/z</i> (aducto M+H)
Z-GLY-TYR-OH	C19H20N2O6	372.13159	373.13941
Isoleucina	C6H13NO2	131.09408	132.1019
Leucina	C6H13NO2	131.09408	132.1019
Valina	C5H11NO2	117.07843	118.08625
Lisina	C6H14N2O2	146.10498	147.1128
Glutamato	C5H9NO4	147.05261	148.06043
Tirosina	C9H11NO3	181.07334	182.08116
Fenilalanina	C9H11NO2	165.07843	166.08625
Triptófano	C11H12N2O2	204.08933	205.09715
Arginina	C6H14N4O2	174.11112	175.11895
Alanina	C3H7NO2	89.04713	90.05493
Aspartato	C4H7NO4	133.03696	134.04478
Glutamina	C5H10N2O3	146.06859	147.07641
Histidina	C6H9N3O2	155.06892	156.07675
Treonina	C4H9NO3	119.05769	120.06552
Metionina	C5H11NO2S	149.05050	150.05832
Prolina	C5H9NO2	115.06278	116.0706
Asparagina	C4H8N2O3	132.05294	133.06077
Cisteína	C3H7NO2S	121.0192	122.02702
Serina	C3H7NO3	105.04204	106.04987
Glicina	C2H5NO2	75.03148	76.0393
Carnitina	C7H15NO3	161.10464	162.11247
N-acetil glutamina	C7H12N2O4	188.07916	189.08699
Adenosina	C10H13N5O4	267.0962	268.10403
Hexadecil urea	C17H36N2O	284.28221	285.29004
Ácido piroglutámico	C5H7NO3	129.04204	130.04987
Ácido N-acetil glutámico	C7H11NO5	189.06317	190.07
Guanosina	C10H13N5O5	283.09112	284.09894
9-octadecenamida	C18H35NO	281.27132	282.27914
Putrescina	C4H12N2	88.0995	89.10732
Valinol	C5H13NO	103.09116	104.10699
Ácido oleico	C18H34O2	282.25533	283.26316
Ciclo Leu-Leu	C12H22N2O2	226.16758	227.1754

<b>ADP</b>	C10H15N5O10P2	427.02887	428.03669
<b>Pentobarbital</b>	C11H18N2O3	226.13119	227.13902
<b>Acetil espermidina</b>	C9H21N3O	187.16791	188.17574
<b>Esfingosina</b>	C17H35NO2	285.26623	286.27405
<b>15-Metilhexadecaesfingina</b>	C17H37NO2	287.28188	288.2897
<b>Lyso-PE(16:0)</b>	C21H44NO7P	453.28499	454.29281
<b>AMP</b>	C10H14N5O7P	347.06253	348.07036
<b>NAD</b>	C21H27N7O14P2	663.10857	664.1164
<b>Lyso-PE (15:0)</b>	C20H42NO7P	439.26934	440.27717
<b>Lyso-PE (14:0)</b>	C19H40NO7P	425.25369	426.26151
<b>Creatinina</b>	C4H7N3O	113.05836	114.06618
<b>Hipoxantina</b>	C5H4N4O	136.03796	137.04579
<b>Creatina</b>	C4H9N3O2	131.06893	132.07675
<b>Adenina</b>	C5H5N5	135.05395	136.06177
<b>Deoxiguanosina</b>	C10H13N5O4	267.0962	268.10403
<b>Timidina</b>	C10H14N2O5	242.08972	243.09755
<b>Etil timina</b>	C7H10N2O2	154.07368	155.0815
<b>Isoleucilvalina</b>	C11H22N2O3	230.16249	231.17031
<b>5-Metiltioadenosina</b>	C11H15N5O3S	297.08901	298.09684
<b>Citosina</b>	C4H5N3O	111.04271	112.05054
<b>5-Metilcitosina</b>	C5H7NO3	129.04204	130.04987
<b>O-Succinil-L-Homoserina</b>	C8H13NO6	219.07374	220.08156
<b>Valil aspartato</b>	C9H16N2O5	232.10537	233.1132
<b>Leucilprolina</b>	C11H20N2O3	228.14684	229.15467
<b>Etil lauril arginina</b>	C20H40N4O3	384.30949	385.31732
<b>Deoxiadenosina</b>	C10H13N5O3	251.10129	252.10911
<b>Citrulina</b>	C6H13N3O3	175.09514	176.10297
<b>Ácido nicotínico</b>	C6H5NO2	123.03148	124.0393
<b>Biotina</b>	C10H16N2O3S	244.08761	245.09544
<b>Histamina</b>	C5H9N3	111.0791	112.08692
<b>Hexanoil carnitina</b>	C13H25NO4	259.17781	260.18563
<b>Uridina-5-Monofosfato</b>	C9H13N2O9P	324.03532	325.04314
<b>L-Glutatión oxidado</b>	C20H32N6O12S2	612.15141	613.15924
<b>Glicerol</b>	C3H8O3	92.04679	93.05462
<b>Ácido láctico</b>	C3H6O3	90.03114	91.03897
<b>Ácido hidroxiglutarico</b>	C5H8O5	148.03662	149.04445
<b>Xantina</b>	C5H4N4O2	152.03288	153.0407
<b>Anserina</b>	C10H16N4O3	240.12169	241.12951
<b>N-N Dimetil glicina</b>	C4H9NO2	103.06278	104.0706
<b>4-Hidroxifenillactato</b>	C9H10O4	182.05736	183.06518
<b>Acetil arginina</b>	C8H16N4O3	216.12169	217.12951
<b>Esfingina</b>	C18H39NO2	301.29753	302.30536

<b>Lyso-PC (15:0)</b>	C23H48NO7P	481.31629	482.32411
<b>N-acetil aspartato</b>	C6H4NO5	170.0084	171.01622
<b>ATP</b>	C10H16N5O13P3	506.9952	508.00302
<b>GABA</b>	C4H9N02	103.06278	104.0706
<b>Timina</b>	C5H6N2O2	126.04238	127.0502
<b>Ornitina</b>	C5H12N2O2	132.08932	133.09715
<b>GMP</b>	C10H14N5O8P	363.05745	364.06527
<b>Creatinato</b>	C4H8N3O2	130.0611	131.06893

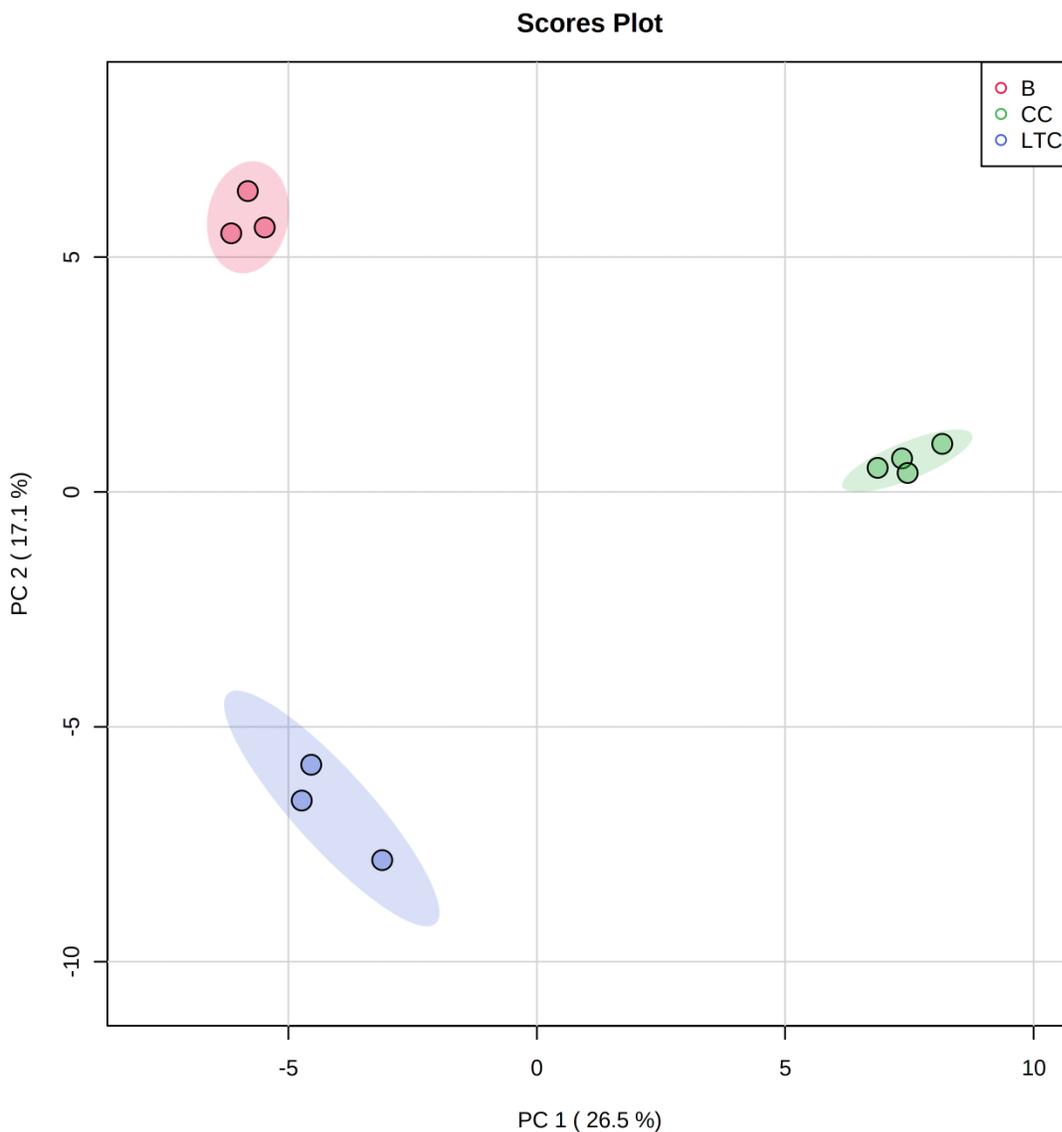
<b>Metabolito</b>	<b>Fórmula</b>	<b>m/z</b>	<b>m/z (aducto M-H)</b>
<b>Ácido succínico</b>	C4H6O4	118.02606	117.01823
<b>Ácido láctico</b>	C3H6O3	90.03114	89.02332
<b>Etil piruvato</b>	C5H8O3	116.04679	115.03897
<b>Ácido acetoacético</b>	C4H6O3	102.03114	101.02332
<b>Uracilo</b>	C4H4N2O2	112.02673	111.0189
<b>Ácido benzoico</b>	C7H6O2	122.03623	121.0284
<b>Ácido 2-hidroxibutirico</b>	C4H8O3	104.04679	103.03897
<b>UDP-Galactosa</b>	C15H24N2O17P2	566.05417	565.04665
<b>Piruvato</b>	C3H3O3	87.00767	85.99984
<b>Ácido dihidroxiacético</b>	C2H4O4	92.01041	91.00258
<b>Ácido glicérico</b>	C3H6O4	106.02606	105.01823
<b>Ácido mirístico</b>	C14H28O2	228.20838	227.20056
<b>Urato</b>	C5H4N4O3	168.02779	167.01996
<b>Taurina</b>	C2H7NO3S	125.01411	124.00629
<b>N-acetil-L-Metionina</b>	C7H13NO3S	191.06106	190.05324
<b>AMPA</b>	C7H10N2O4	186.06351	185.05568
<b>Trimetoprima</b>	C14H18N4O3	290.13734	289.12952
<b>5-Hidroxi-L-Triptófano</b>	C11H12N2O3	220.08424	219.07642
<b>Ácido octadienoico</b>	C8H12O2	140.08312	139.07536
<b>Ácido mevalónico</b>	C6H12O4	148.07301	147.06518
<b>9-oxo-2,4,5,7-decatetraenoic acid</b>	C10H10O3	178.06244	177.05462
<b>2-Aminoadenosina</b>	C10H14N6O4	282.1071	281.09928
<b>Ácido maleico</b>	C4H4O4	116.01041	115.00258
<b>Ácido málico</b>	C4H6O5	134.02097	133.01315
<b>Ácido oxálico</b>	C2H2O4	89.99476	88.98693
<b>Ácido cetoglutárico</b>	C5H6O5	146.02097	145.01315

<b>Ácido malónico</b>	C3H4O4	104.01041	103.00258
<b>Ácido argininosuccínico</b>	C10H18N4O6	290.12208	289.11426
<b>Ácido araquidónico</b>	C20H32O2	304.23968	303.23186
<b>Ácido ascórbico</b>	C6H8O6	176.03154	175.02371
<b>Furaguanidina</b>	C6H7N5O3	197.05434	196.04651
<b>Sulfato</b>	H2SO4	97.96683	96.959
<b>Alantoina</b>	C4H6N4O3	158.04344	157.03562
<b>Xantosina</b>	C10H12N4O6	284.07514	283.06731
<b>UDP-Glucosa</b>	C15H24N2O17P2	566.05447	565.04665
<b>Deoxiuridina</b>	C9H12N2O5	228.07407	227.06625
<b>Uridina</b>	C9H12N2O6	244.06899	243.06116
<b>Orotato</b>	C5H4N2O4	156.01656	155.00873
<b>Ácido 3-aminoisobutírico</b>	C4H9NO2	103.06278	102.05495
<b>Dihidouracilo</b>	C4H6N2O2	114.04238	113.03455
<b>3-oxopropanoato</b>	C3H4O3	88.01549	87.00767
<b>Barbiturato</b>	C4H4N2O3	128.02164	127.01382
<b>Dihidrotimina</b>	C5H8N2O2	128.05803	127.0502
<b>5-Metilbarbiturato</b>	C5H6N2O3	142.03729	141.02947
<b>S-Adenosil-L-Homocisteína</b>	C14H20N6O5S	384.12104	383.11321
<b>L-Cistationina</b>	C7H14N2O4S	222.06688	221.05951
<b>Gliceraldehído 3-fosfato</b>	C3H7O6P	169.99748	168.98965
<b>Fosfato de Piridoxal</b>	C8H10NO6P	247.02402	246.0162
<b>Guanosina 5-Monofosfato</b>	C10H14N5O8P	363.05745	362.04962
<b>3-DesfosfoCoenzima A</b>	C21H33Li2N7O13P2S	697.16292	696.1551
<b>Fenil piruvato de sodio</b>	C9H8NaO3	187.03656	186.02874
<b>Piperidona</b>	C9H15NO2	169.10973	168.1019
<b>Deoxicitidina</b>	C9H13N3O4	227.09006	226.08223
<b>AMPA</b>	C7H10N2O4	186.06351	185.05568
<b>Espermidina</b>	C7H19N3	145.15735	144.14952
<b>Ácido 2-2 Diaminobutírico</b>	C4H10N2O2	118.07368	117.06585
<b>Acetilcolina</b>	C7H16NO2	146.11755	145.10973
<b>3-Fenilpropionilglicina</b>	C11H13NO3	207.08899	206.08117
<b>Normetanefrina</b>	C9H13NO3	183.08899	182.08117
<b>L-Quinurenina</b>	C10H12N2O3	208.08424	207.07642
<b>Ácido guanidinoacético</b>	C3H7N3O2	117.05328	116.04545
<b>Ácido hipúrico</b>	C9H9NO3	179.05769	178.04987
<b>Colesterol</b>	C27H46O	386.35432	385.34649
<b>B-Sitosterol</b>	C29H50O	414.38562	413.37779

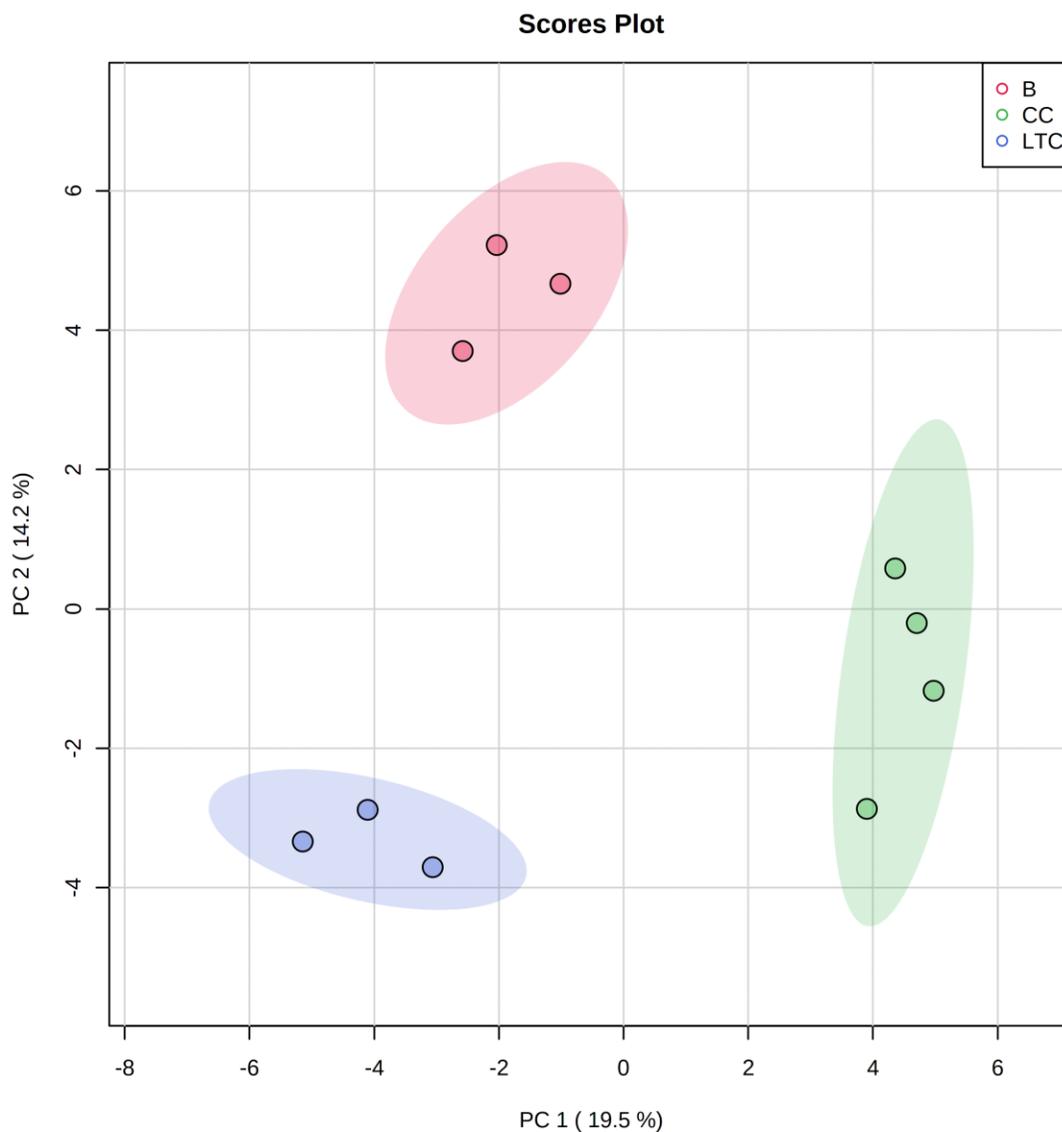
<b>Ácido litocólico</b>	C24H40O3	376.2972	375.28937
<b>Ácido itacónico</b>	C5H6O4	130.02606	129.01823
<b>Cinamoilglicina</b>	C11H11NO3	205.07334	204.06552
<b>Dopamina</b>	C8H11NO2	153.07843	152.0706
<b>Trimetoprima</b>	C14H18N4O3	290.13734	289.12952
<b>N-acetil-L-Triptófano</b>	C13H14N2O3	246.09989	245.09207
<b>N-Acetil-L-Cisteína</b>	C5H9NO3S	163.02976	162.02194
<b>Serotonina</b>	C10H12N2O	176.09441	175.08659
<b>L-Histidinol</b>	C6H11N3O	141.08966	140.08184
<b>8-Hidroxi-2-Deoxiguanosina</b>	C10H13N5O5	283.09112	282.08329
<b>L-Palmitoilcarnitina</b>	C23H45NO4	399.33431	398.32648
<b>2-Deoxiinosina</b>	C10H12N4O4	252.08531	251.07748
<b>5-Hidroxi-L-Triptófano</b>	C11H12N2O3	220.08424	219.07642

## Apéndice B

Análisis de Componentes Principales (PCA) de los resultados obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS de muestras de calidad, control y tratamiento en modo de ionización positiva y negativa.

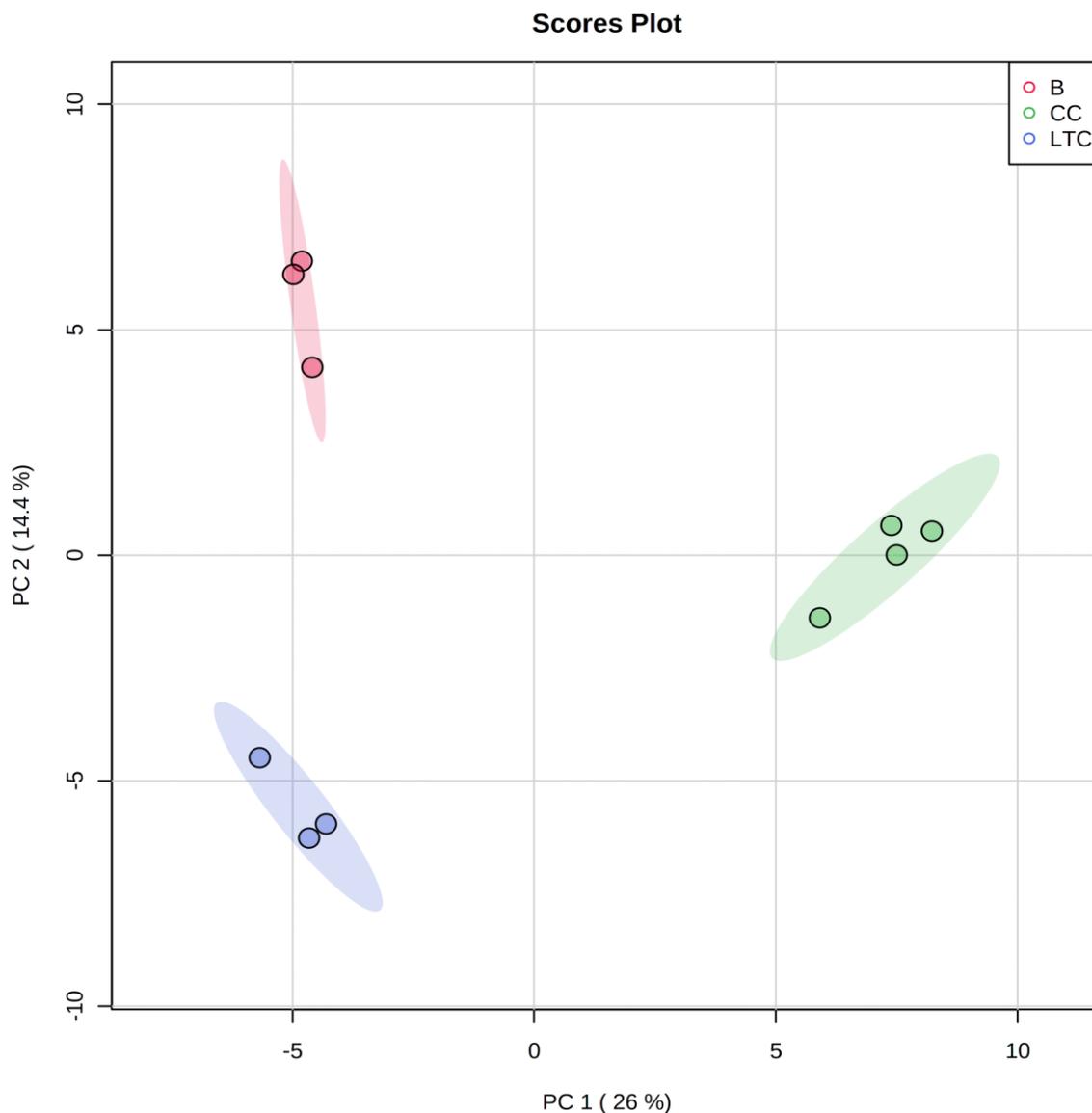


**Figura.** Análisis de Componentes Principales (PCA) de los resultados obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS del efecto del AE de LTC II frente a *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076. Muestras de calidad (círculos verdes), muestras control (círculos en rojo) y muestras con tratamiento (círculos en azul) en modo de ionización positiva

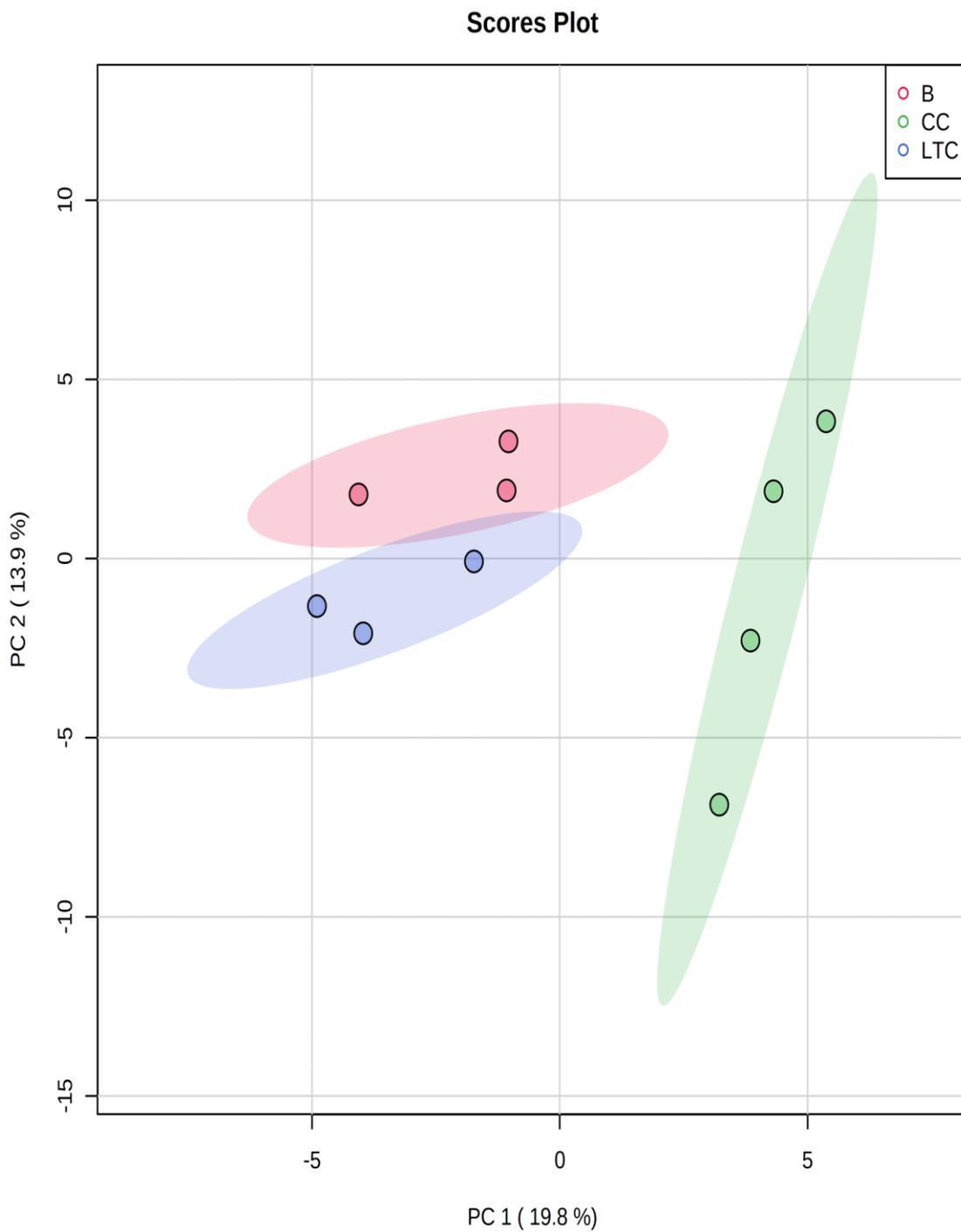


**Figura.** Análisis de Componentes Principales (PCA) de los resultados obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS del efecto del AE de LTC II frente a *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076. Muestras de calidad (círculos verdes), muestras control (círculos en rojo) y muestras con

tratamiento (círculos en azul) en modo de ionización negativa

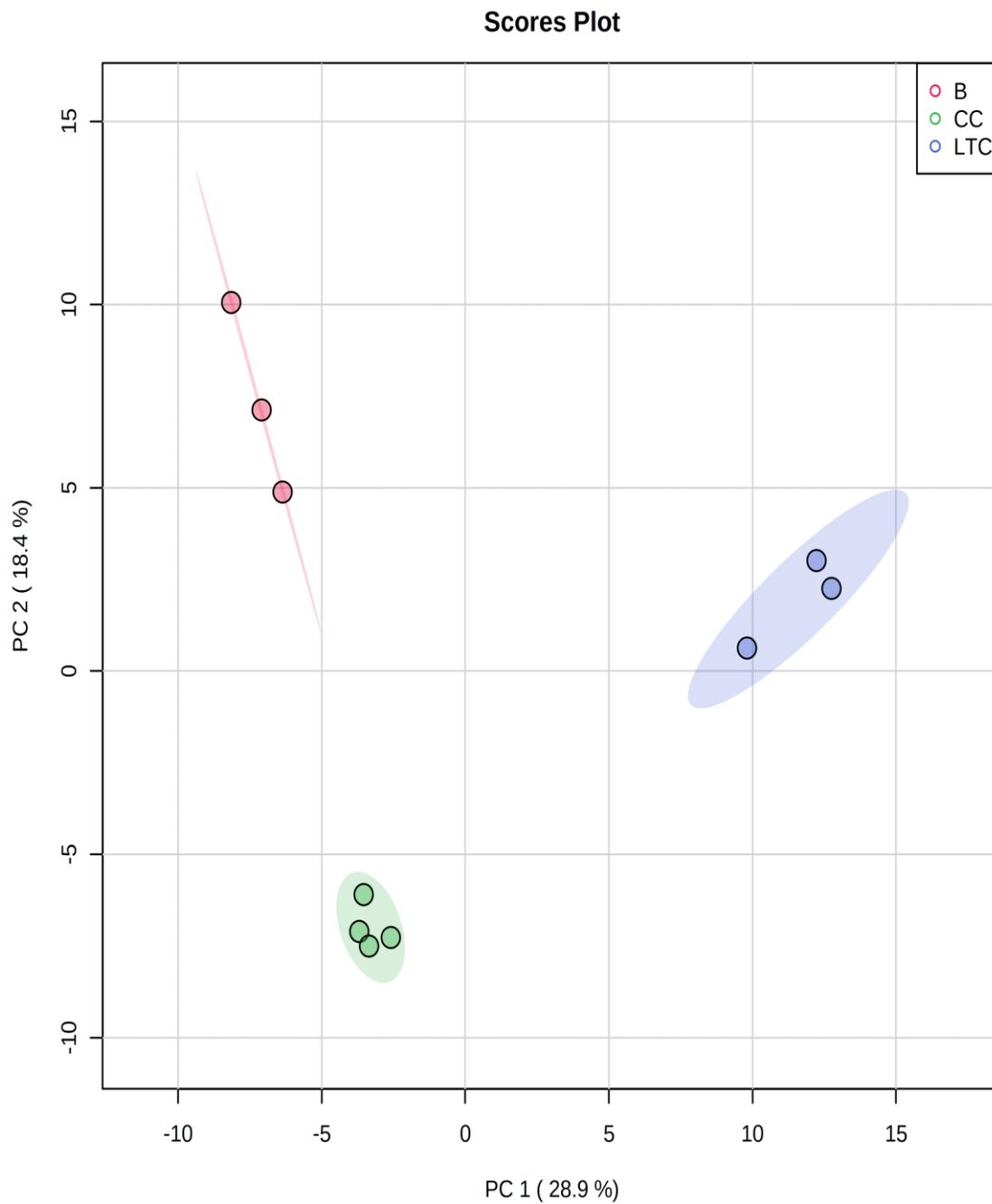


**Figura.** Análisis de Componentes Principales (PCA) de los resultados obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS del efecto del AE de LTC II frente a *Escherichia coli* O157:H7. Muestras de calidad (círculos verdes), muestras control (círculos en rojo) y muestras con tratamiento (círculos en azul) en modo de ionización positiva



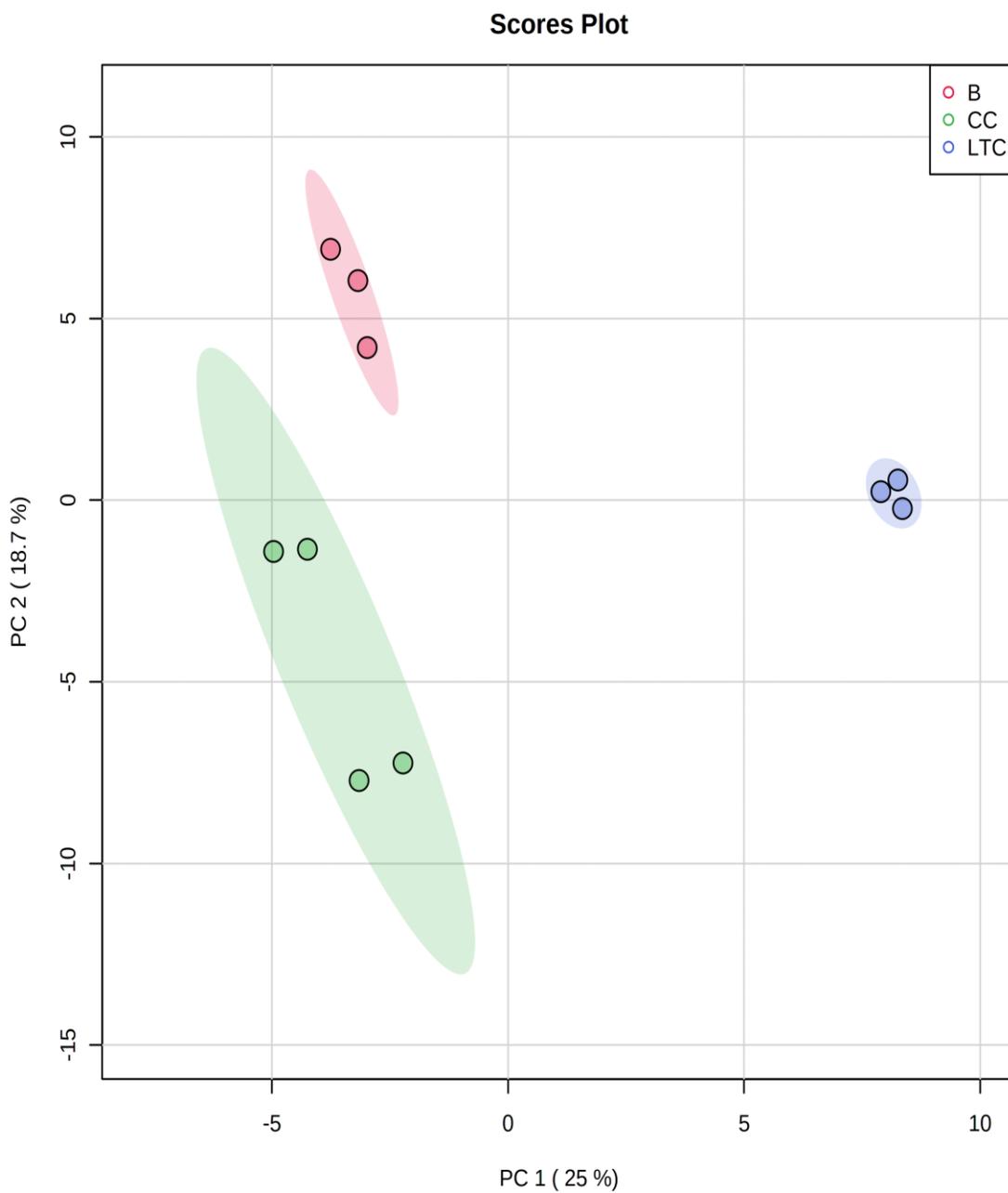
**Figura.** Análisis de Componentes Principales (PCA) de los resultados obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS del efecto del AE de LTC II frente a *EscherIchia coli* O157:H7. Muestras

de calidad (círculos verdes), muestras control (círculos en rojo) y muestras con tratamiento (círculos en azul) en modo de ionización negativo



**Figura.** Análisis de Componentes Principales (PCA) de los resultados obtenidos por

UHPLC-Orbitrap-MS del efecto del AE de LTC II frente a CV026. Muestras de calidad (círculos verdes), muestras control (círculos en rojo) y muestras con tratamiento (círculos en azul) en modo de ionización positiva



**Figura.** Análisis de Componentes Principales (PCA) de los resultados obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS del efecto del AE de LTC II frente a CV026. Muestras de calidad (círculos verdes), muestras control (círculos en rojo) y muestras con tratamiento (círculos en azul) en modo de ionización negativa

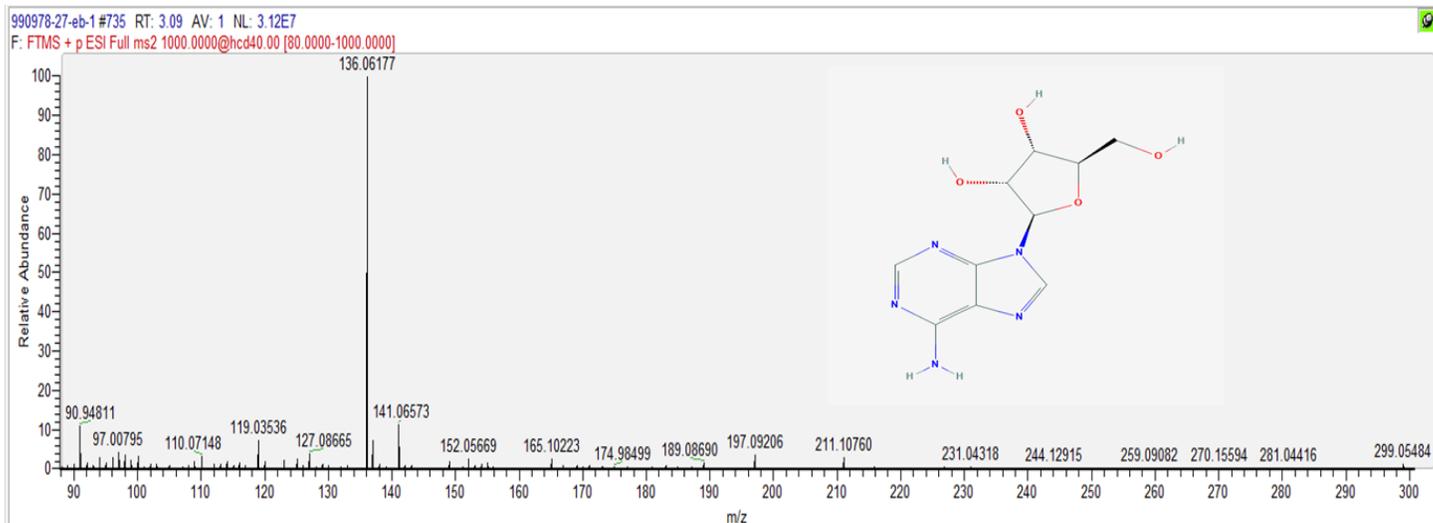
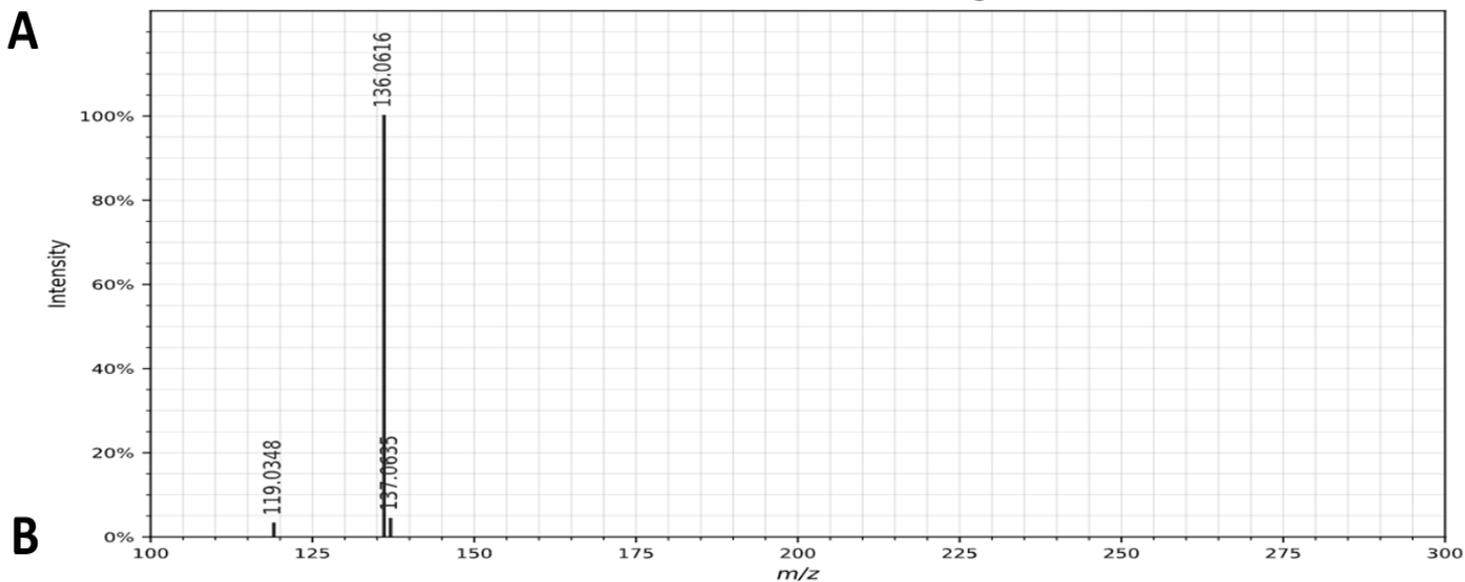
**Apéndice C**

*Análisis comparativo de los iones de fragmentación para los espectros teóricos y experimentales de los principales metabolitos detectados asociados con las rutas metabólicas estudiadas*

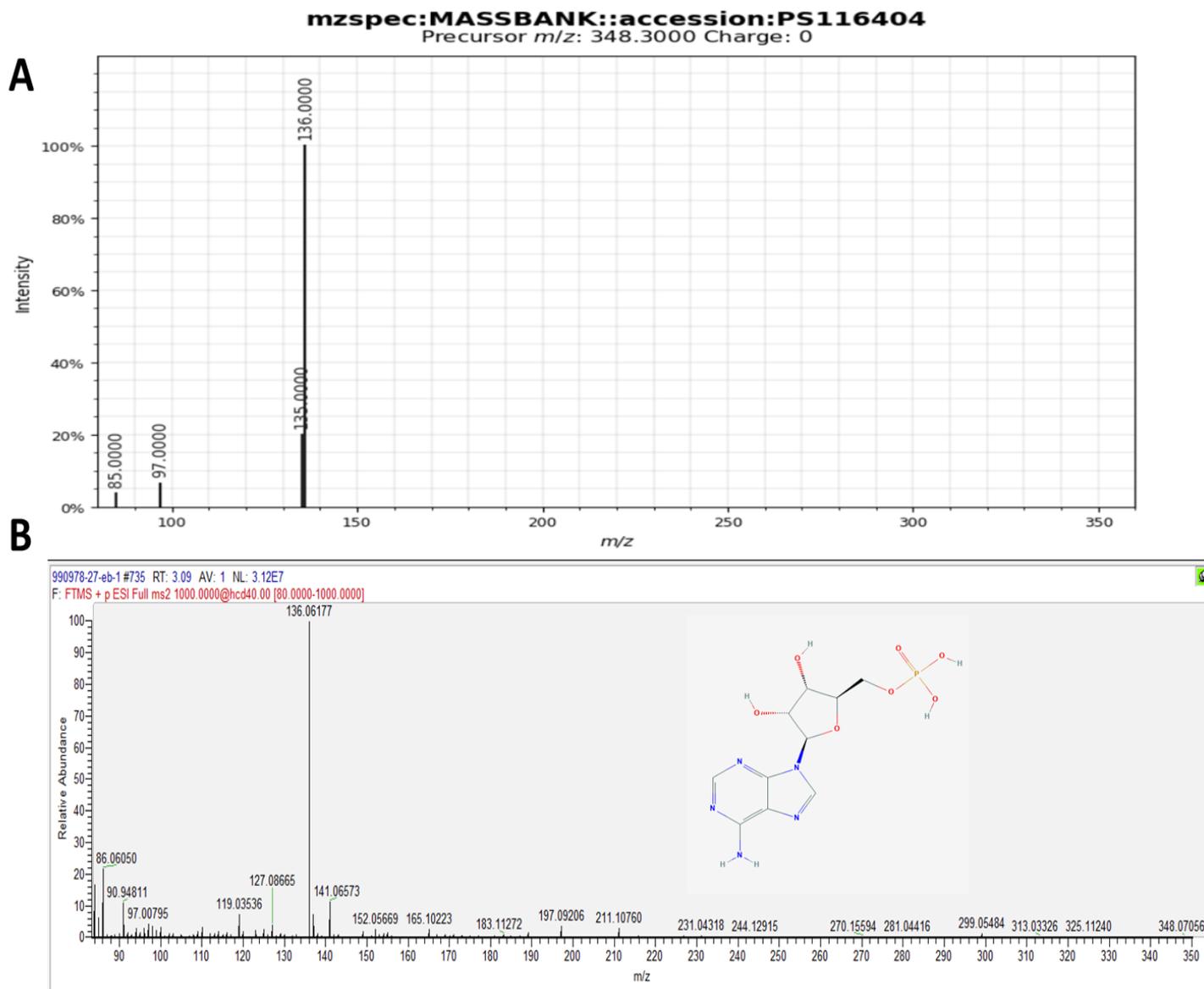
<b>Metabolito</b>	<b>tR</b>	<b>Iones producto (m/z, exp)</b>	<b>Iones producto (m/z) de referencia</b>
<b>Adenosina</b>	3.27	119.0, 136.0	119.0, 136.0
<b>AMP</b>	3.05	86.0, 97.0, 136.0	85.0, 97.0, 136.0
<b>Glutamina</b>	0.94	84.0	84.0
<b>Violaceína</b>	6.22	183.0, 259.0, 270.1, 273.1, 283.0, 301.0, 316.1, 326.0, 344.1	183.0, 259.0, 270.1, 273.1, 283.0, 301.0, 316.1, 326.0, 344.1
<b>Treonina</b>	3.33	102.1, 120.0	102.9, 120.0
<b>Valina</b>	1.00	118.0	118.0
<b>Fenilalanina</b>	3.44	103.0, 120.0, 166.0	103.0, 120.0, 166.0
<b>Prolina</b>	3.31	116.0	116.0
<b>Arginina</b>	0.90	116.0, 130.0, 158.0, 175.1	116.0, 130.0, 158.0, 175.1
<b>Citidina</b>	1.44	112.0, 244.0	112.0, 244.0
<b>Adenina</b>	5.32	92.0, 119.0, 136.0	92.0, 119.0, 136.0
<b>Guanina</b>	3.18	135.0, 152.0	135.0, 152.0
<b>Leucina</b>	2.65	86.0, 132.1	86.0, 132.1
<b>4-aminobutanoato</b>	1.2	84.4	84.4
<b>3-metilxantina</b>	3.2	96.0, 124.0, 167.0	96.0, 124.0, 167.0
<b>5-metil citosina</b>	1.75	83.1, 109.2, 126.2	83.1, 109.2, 126.2
<b>Acetil espermidina</b>	0.92	84.2, 114.0	84.2, 114.0
<b>Acetil putrescina</b>	0.94	114.0, 131.0	114.0, 131.0
<b>Ácido 2-hidroxi- butírico</b>	0.96	103.0	103.0
<b>Fosfato de piridoxal</b>	4.02	94.0, 122.0, 150.0	94.0, 122.0, 150.0
<b>n-butanoil- homoserina lactona</b>	2.6	102.0, 172.0	102.0, 172.0

<b>Ácido succínico</b>	0.75	99.1, 116.9	99.1, 116.9
<b>Uridina</b>	1.2	96.4, 113.2, 119.0	96.4, 113.2, 119.0
<b>Uridina-5-monofosfato</b>	1.39	97.0, 113.0	97.0, 113.0
<b>Xantina</b>	1.54	81.0, 93.0, 110.0	81.0, 93.0, 110.0

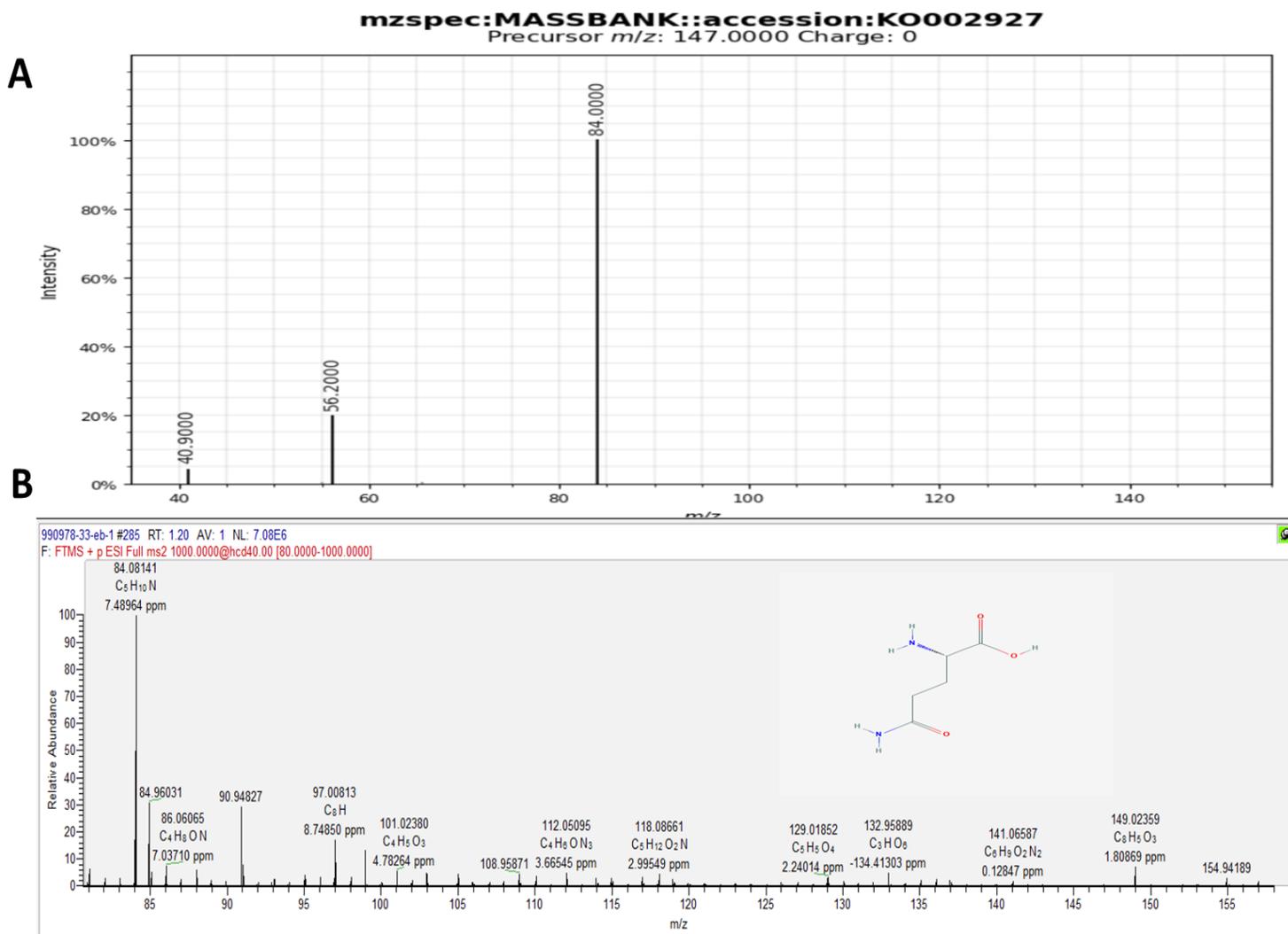
**mzspec:MASSBANK::accession:FIO00686**  
Precursor m/z: 268.1040 Charge: 0



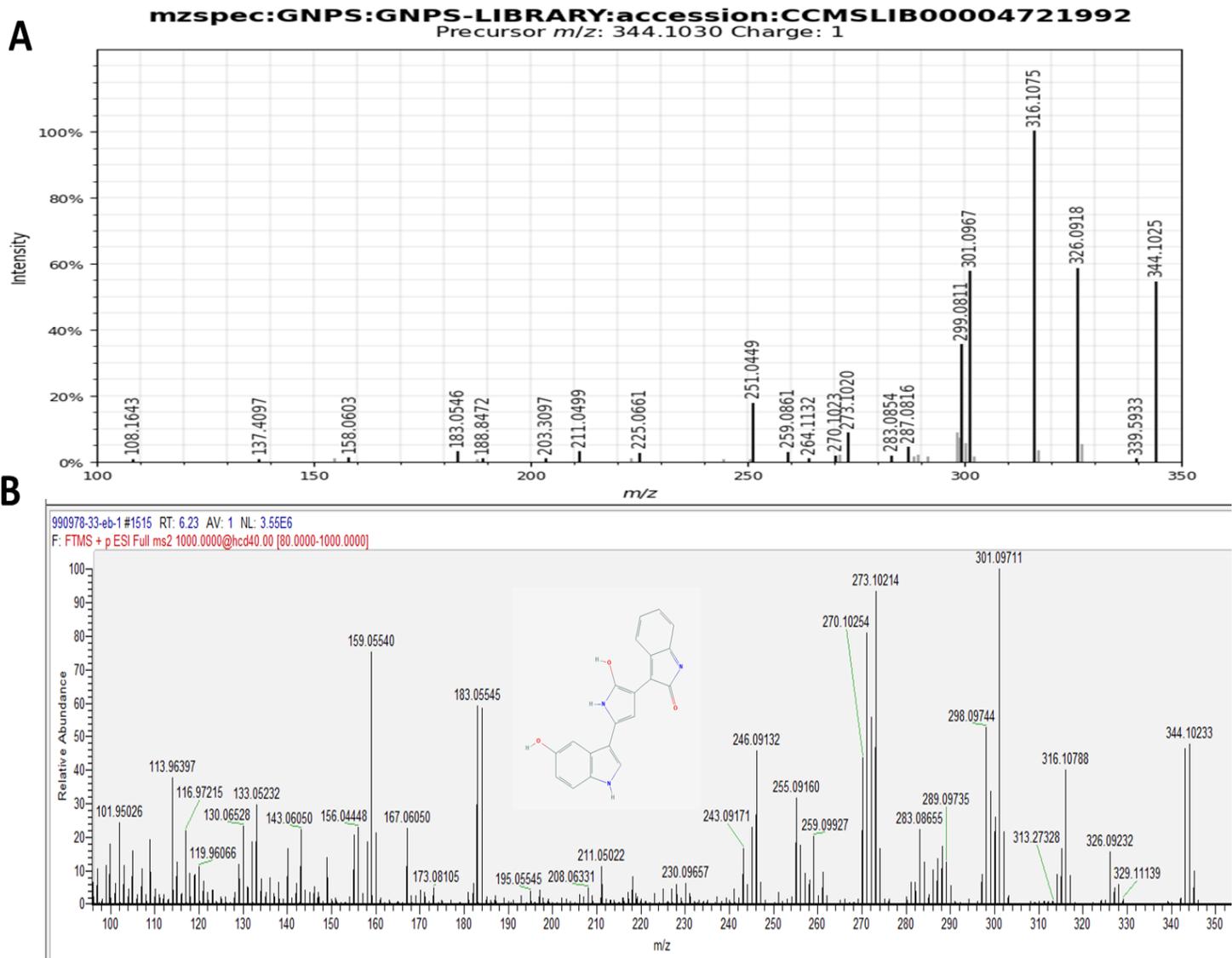
**Figura.** Espectro de masas de la adenosina obtenido en la muestra tratamiento del efecto del AE de LTC II sobre *E. coli* O157:H7. Espectro de masas suministrado por la base de datos (A) y espectro de masas experimental (B). Hcd 40 EV.



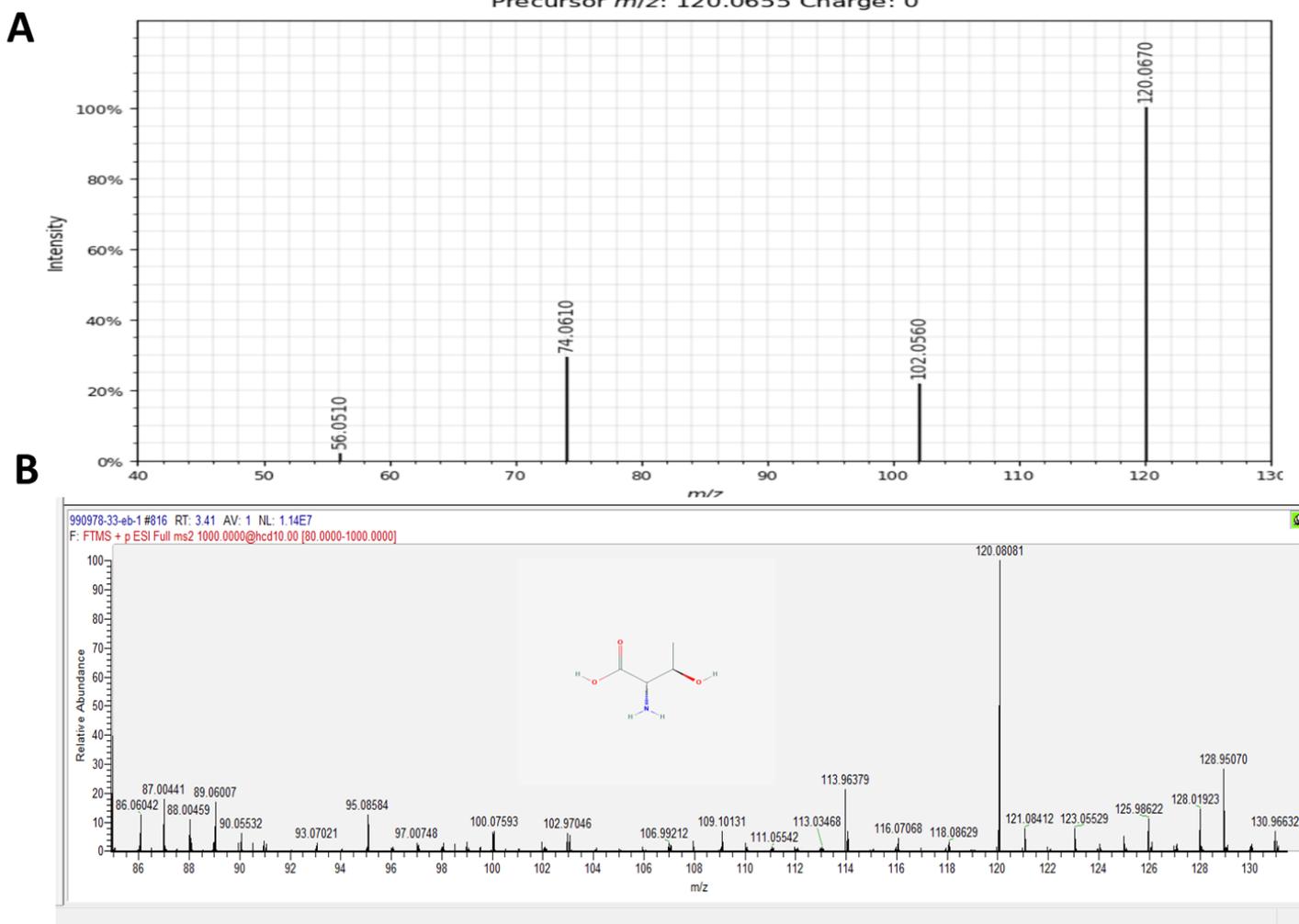
**Figura.** Espectro de masas del AMP obtenido en la muestra tratamiento del efecto del AE de LTC II sobre *E. coli* O157:H7. Espectro de masas suministrado por la base de datos (A) y espectro de masas experimental (B). Hcd 40 EV.



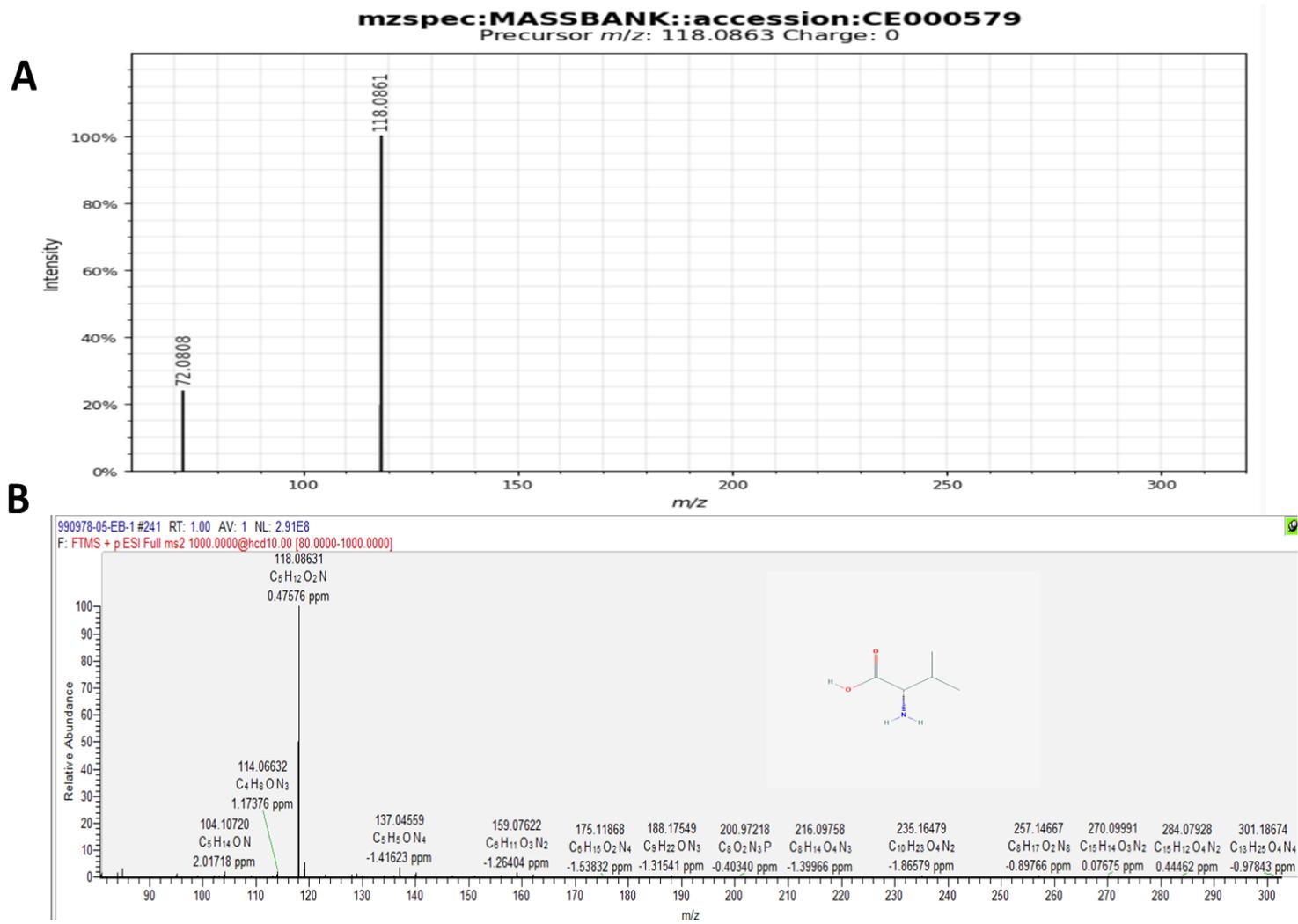
**Figura.** Espectro de masas de la glutamina obtenido en la muestra tratamiento del efecto del AE de LTC II sobre *E. coli* O157:H7. Espectro de masas suministrado por la base de datos (A) y espectro de masas experimental (B). Hcd 40 EV.



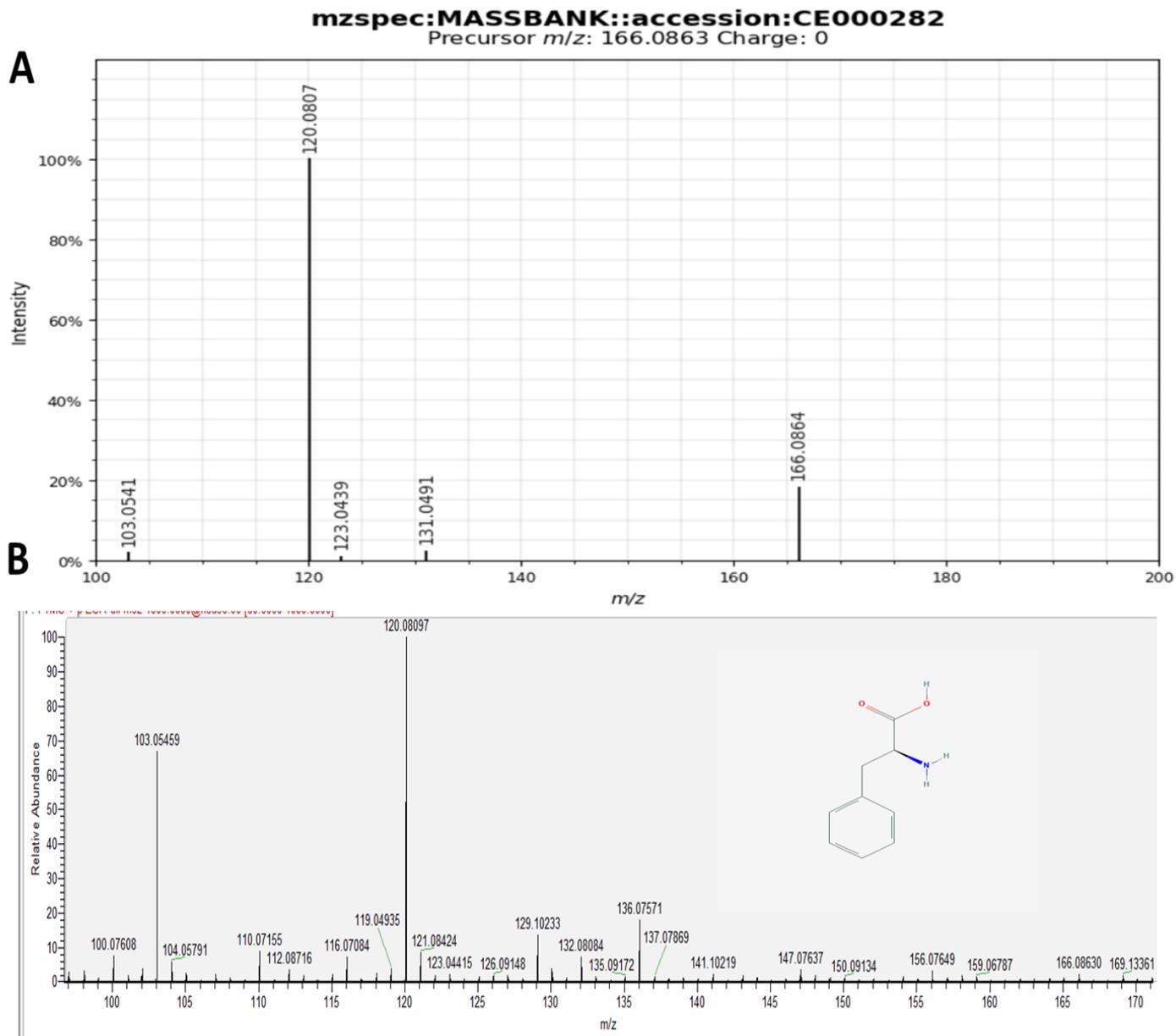
**Figura.** Espectro de masas de la violaceína obtenido en la muestra control de CV026 en presencia de Hexanoil homoserina lactona. Espectro de masas suministrado por la base de datos (A) y espectro de masas experimental (B). Hcd 40 EV.



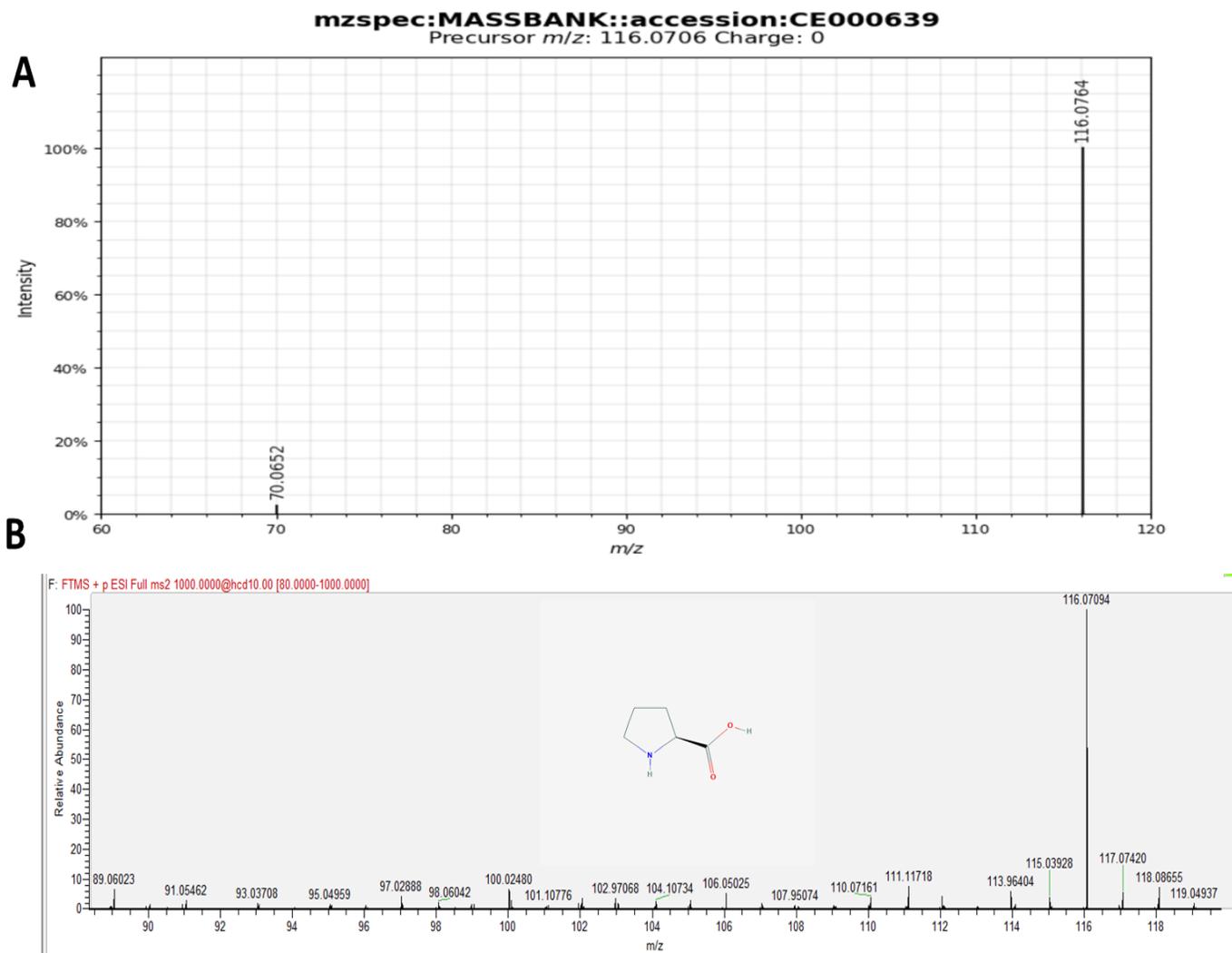
**Figura.** Espectro de masas de la treonina obtenido en la muestra tratamiento del efecto del AE de LTC II sobre *E. coli* O157:H7. Espectro de masas suministrado por la base de datos (A) y espectro de masas experimental (B). Hcd 10 EV.



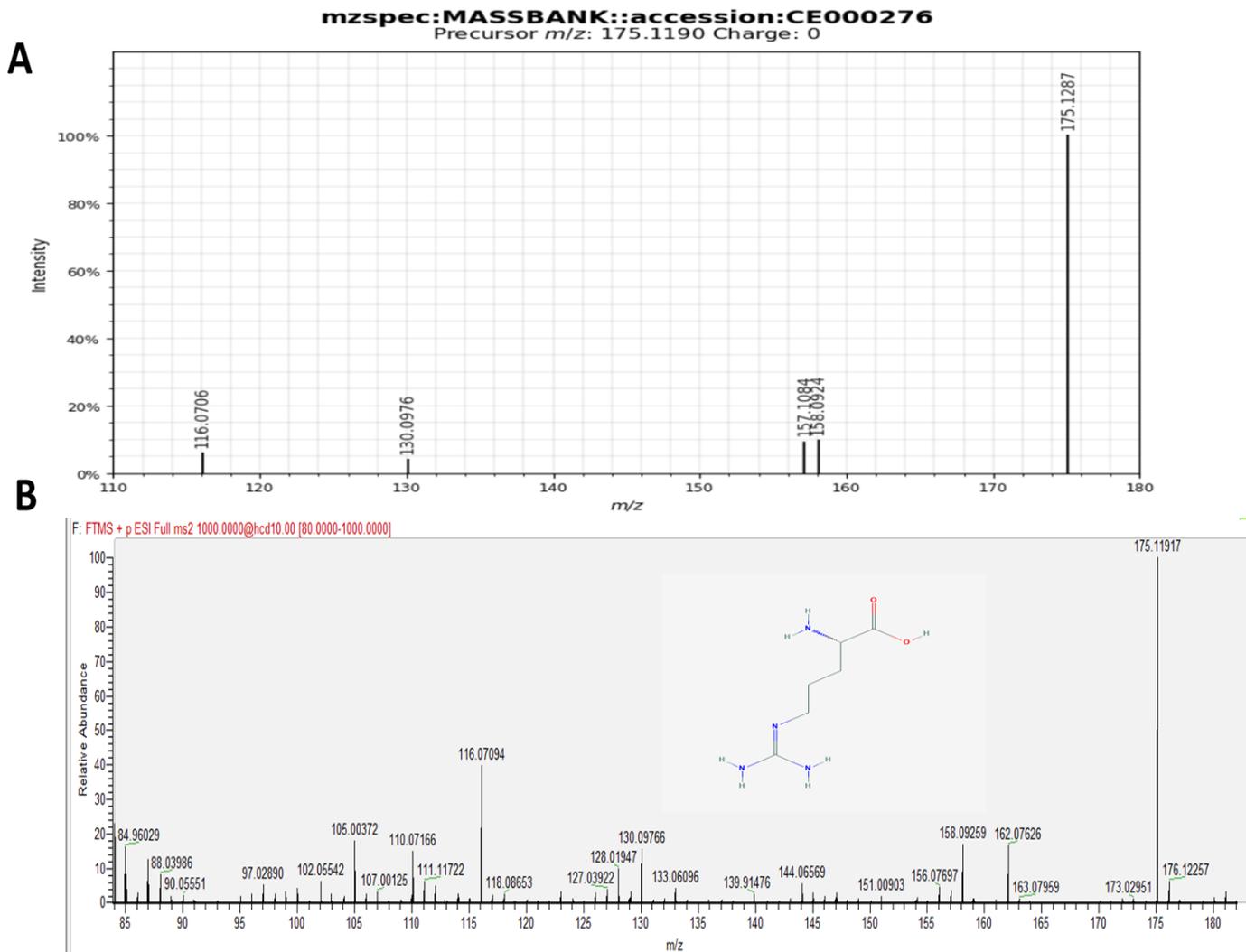
**Figura.** Espectro de masas de la valina obtenido en la muestra tratamiento del efecto del AE de LTC II sobre *S. Enteritidis* ATCC 13076. Espectro de masas suministrado por la base de datos (A) y espectro de masas experimental (B). Hcd 10 EV.



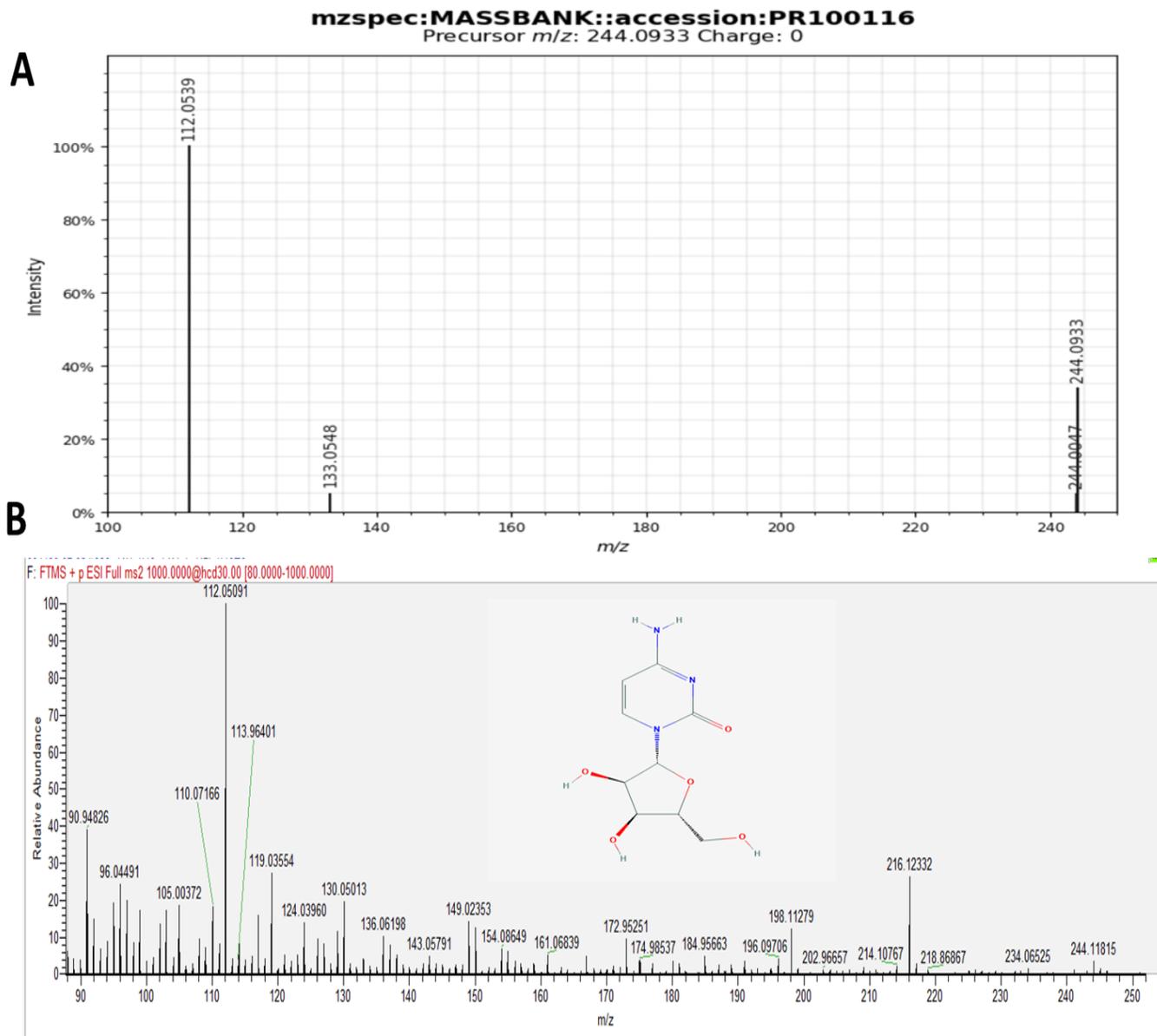
**Figura.** Espectro de masas de la fenilalanina obtenido en la muestra tratamiento del efecto del AE de LTC II sobre *S. Enteritidis* ATCC 13076. Espectro de masas suministrado por la base de datos (A) y espectro de masas experimental (B). Hcd 30 EV.



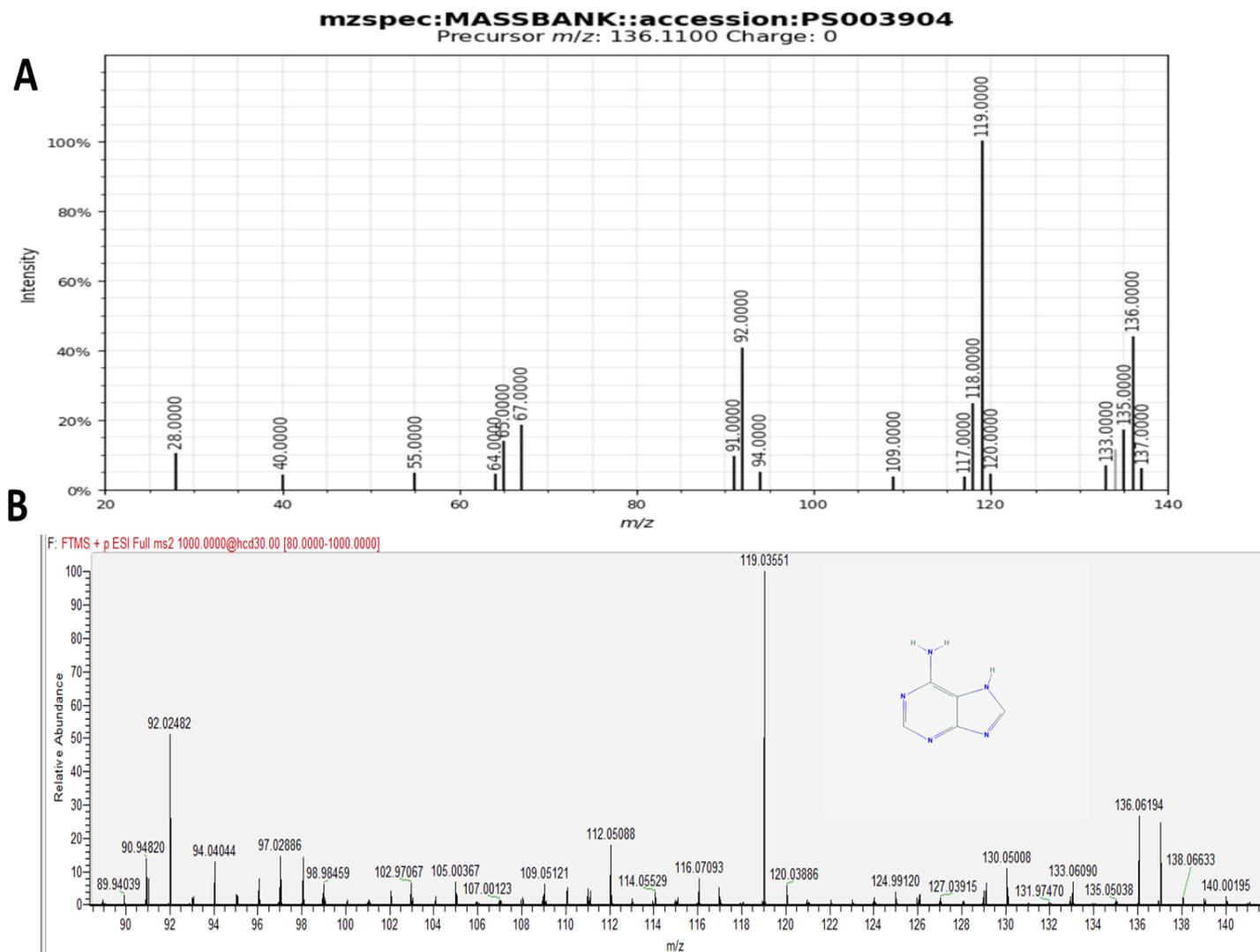
**Figura.** Espectro de masas de la prolina obtenido en la muestra tratamiento del efecto del AE de LTC II sobre *S. Enteritidis* ATCC 13076. Espectro de masas suministrado por la base de datos (A) y espectro de masas experimental (B). Hcd 10 EV.



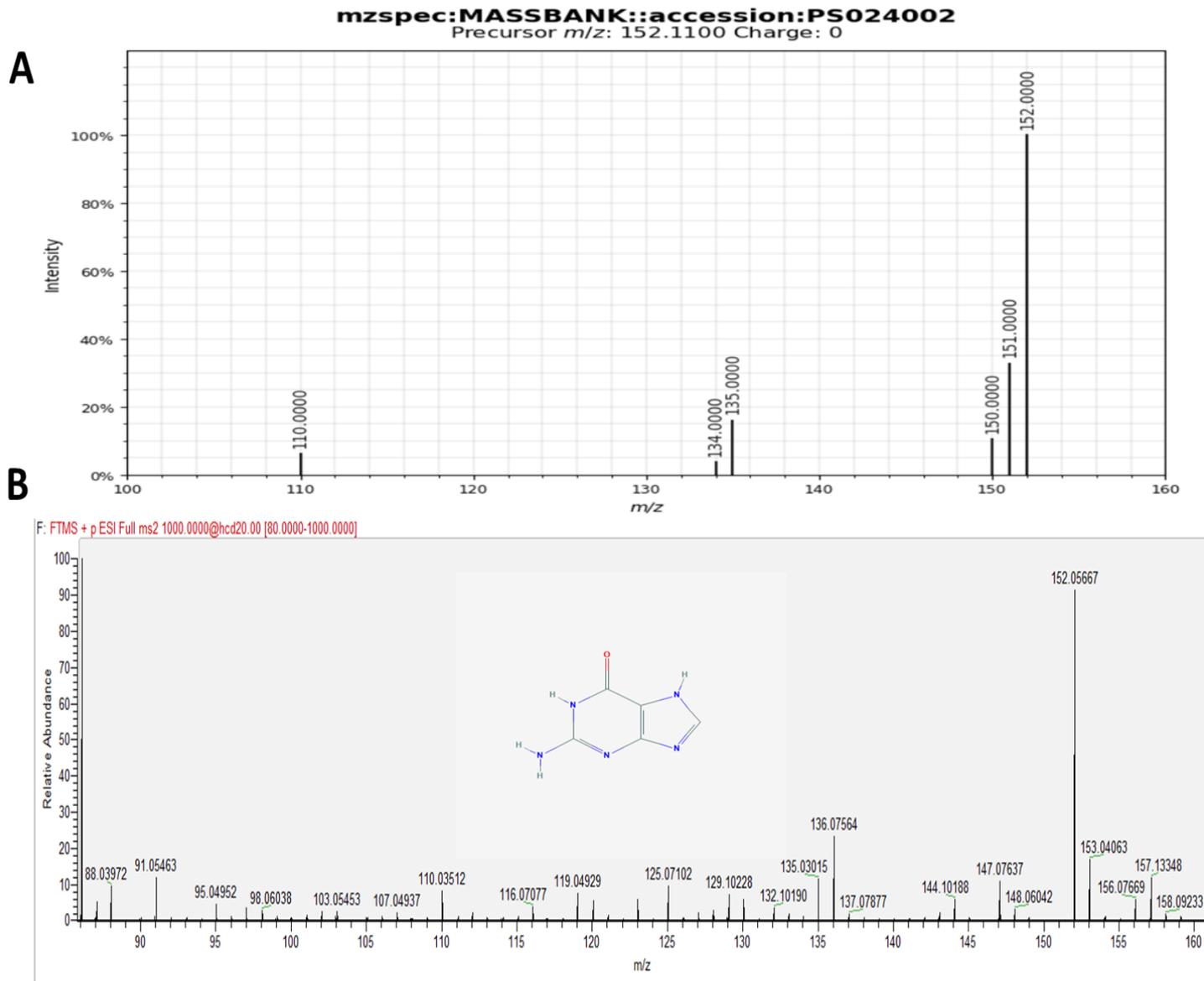
**Figura.** Espectro de masas de la arginina obtenido en la muestra tratamiento del efecto del AE de LTC II sobre *S. Enteritidis* ATCC 13076. Espectro de masas suministrado por la base de datos (A) y espectro de masas experimental (B). Hcd 10 EV.



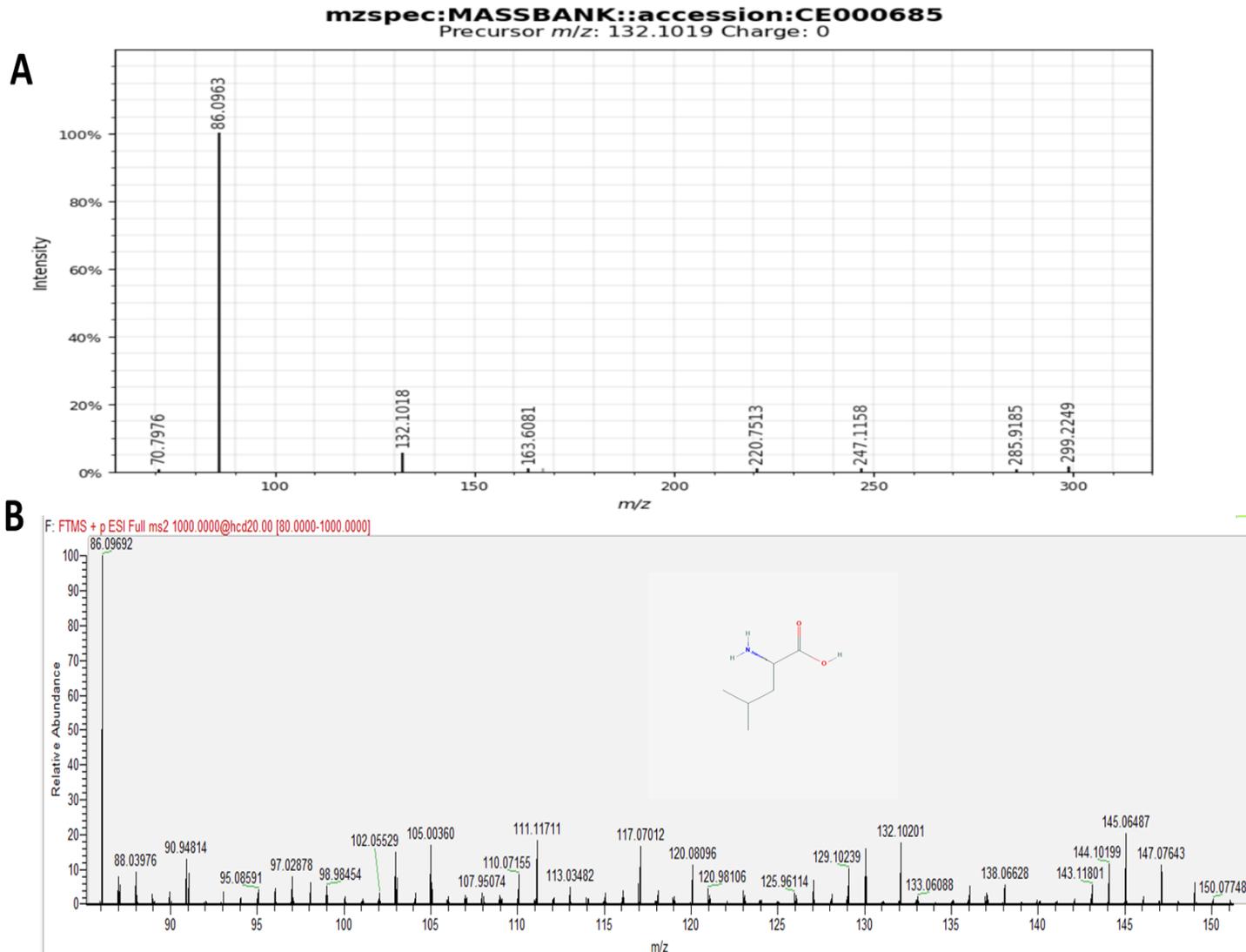
**Figura.** Espectro de masas de la citidina obtenido en la muestra tratamiento del efecto del AE de LTC II sobre CV026. Espectro de masas suministrado por la base de datos (A) y espectro de masas experimental (B). Hcd 30 EV.



**Figura.** Espectro de masas de la adenina obtenido en la muestra tratamiento del efecto del AE de LTC II sobre *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076. Espectro de masas suministrado por la base de datos (A) y espectro de masas experimental (B). Hcd 40 EV.



**Figura.** Espectro de masas de la guanina obtenido en la muestra tratamiento del efecto del AE de LTC II sobre *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076. Espectro de masas suministrado por la base de datos (A) y espectro de masas experimental (B). Hcd 20 EV.



**Figura.** Espectro de masas de la guanina obtenido en la muestra tratamiento del efecto del AE de LTC II sobre *E. coli* O157:H7. Espectro de masas suministrado por la base de datos (A) y espectro de masas experimental (B). Hcd 20 EV.

## 10. Divulgación

### 10.1. Publicaciones científicas

- **CÁCERES, M., HIDALGO, W., STASHENKO, E., TORRES, R. y ORTIZ, C.** ‘Essential oils of aromatic plants with antibacterial, anti-biofilm and anti-quorum sensing activities against pathogenic bacteria’, *Antibiotics*. (2020). 9(4). doi: 10.3390/antibiotics9040147.
- **GÓMEZ-SEQUEDA, N., CÁCERES, M., STASHENKO, E., HIDALGO, W. y ORTIZ, C.** ‘Antimicrobial and antibiofilm activities of essential oils against *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)’, *Antibiotics*, (2020) 9(11), pp. 1-18. doi:10.3390/antibiotics9110730

### 10.2. Participación en Congresos

- **Caceres M, Stashenko E, Torres R, y Ortiz C.** Antibacterial effect of plant essential oils from *Lippia origanoides* and *Thymus vulgaris* against pathogenic bacteria. Congreso International Conference: “Renewable plant resources: Chemistry, technology, medicine” (RR2017). San Petersburgo-Rusia
- **Guillin Y, Caceres M, Torres R, y Ortiz C.** Efecto Antibacterial y anti- biofilm de aceites esenciales de plantas medicinales aromáticas en bacterias patógenas del género

*Salmonella*. 33° Latin American Congress of Chemistry (33- CLAQ) and X Congress of Chemical Sciences, Technology and Innovation (QUIMICUBA´ 2018). La Habana-Cuba.

- **Cáceres M**, Stashenko E, Ortiz C. Evaluación de la actividad antibacteriana de aceites esenciales de *Lippia origanoides* y *Thymus vulgaris* frente a diferentes especies de salmonella. Primer Encuentro Internacional de Ciencias de la Salud (2017). Bucaramanga-Colombia.

- **Cáceres M**, Hidalgo W, Torres R, y Ortiz C. Aceites esenciales de plantas aromáticas con actividad antibacteriana y antibiofilm frente a *Staphylococcus epidermidis*. Simposio Internacional de búsqueda de nuevas alternativas antimicrobianas (2021). Bogotá-Colombia.