



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A.C.**

**COMBINACIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE *Lippia graveolens* E  
IMIPENEM PARA INHIBIR CULTIVOS AXÉNICOS Y CO-  
CULTIVOS DE *Pseudomonas aeruginosa* Y *Acinetobacter  
baumannii***

---

Por:

**Jorge Omar Fimbres García**

TESIS APROBADA POR LA


COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**


## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Jorge Omar Fimbres García, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.




---

Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala  
Director de tesis




---

M.C. Brenda Adriana Silva Espinoza  
Integrante del comité de tesis



---

Dr. Alfonso García Galaz  
Integrante del comité de tesis



---

Dr. Melvin Roberto Tapia Rodríguez  
Integrante del comité de tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Combinación de Aceite Esencial de *Lippia graveolens* e Imipenem para Inhibir Cultivos Axénicos y Co-cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Jorge Omar Fimbres García, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.  
Coordinación de Programas Académicos

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "GCJ", is written over a horizontal line.

Dra. Graciela Caire Juvera  
Directora General

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), por el apoyo económico brindado durante la realización de mis estudios de maestría en ciencias.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) por brindarme la oportunidad de continuar con mi desarrollo profesional.

Al proyecto 319752 financiado por el fondo de ciencia básica del CONAHCYT: “Modelaje de la combinación de antibióticos convencionales y terpenos de aceites esenciales para inhibir la resistencia y factores de virulencia de bacterias patógenas alimentarias”.

A la Coordinación de Tecnologías de Alimentos de Origen Vegetal (CTAOV) y sus investigadores que apoyaron al desarrollo de este proyecto ayudándome con sus consejos, uso de equipos y material.

A mi director de tesis, el Dr. Jesús Fernando Ayala, por haberse mostrado dispuesto a recibirme para mis estudios de posgrado y por el apoyo brindado en este tiempo donde siempre me motivó a ir más allá y esforzarme para conseguir mis objetivos.

A mi comité de tesis, el Dr. Alfonso García Galaz, el Dr. Melvin Tapia Rodríguez y la M.C. Brenda Silva Espinoza, por todos los conocimientos que me transmitieron, las motivaciones para seguir en la ciencia y el apoyo académico y laboral.

A mis compañeras y compañeros del Laboratorio de Tecnologías Emergentes, Yessica Enciso, Marcela Flores, Daniela Othón y Melvin, por hacer más grata mi estancia de estudios, por sus consejos, amistad y ayudarme a ver las cosas más claras.

A mis padres Magdalena y Jorge, y mi familia Deyanira, Cristóbal, Matías y Kevin, por escucharme, guiarme y motivarme a seguir adelante y a confiar más en mis capacidades.

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>CONTENIDO</b> .....	5
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	7
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	8
<b>LISTA DE FÓRMULAS</b> .....	9
<b>RESUMEN</b> .....	10
<b>ABSTRACT</b> .....	11
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	12
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	15
2.1. Resistencia Bacteriana a los Antibióticos: Un Problema Serio y Multidisciplinario.....	15
2.1.1. Definición y Panorama de la Resistencia a Antibióticos.....	15
2.1.1.1. <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	18
2.1.1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	19
2.1.2. Consecuencias de la Resistencia Bacteriana.....	20
2.1.3. Factores Causantes de Resistencia Bacteriana.....	20
2.1.3.1. Mecanismos genéticos y tipos de resistencia.....	21
2.1.3.2. Determinantes ambientales.....	22
2.2. Carencia de Información Mecanística Sobre la Acción Antibacteriana de Compuestos Vegetales.....	23
2.2.1. Alternativas Frente la Resistencia a Antibióticos.....	23
2.2.2. Aceites Esenciales Antibacterianos y sus Limitaciones: Evaluaciones con Orégano: <i>Lippia graveolens</i> y <i>Origanum vulgare</i> .....	24
2.3. Capacidad Antibacteriana de Orégano Mexicano <i>Lippia graveolens</i> y <i>Origanum         vulgare</i> .....	30
2.4. Efecto Potencial De <i>Lippia graveolens</i> Contra Complejos Bacterianos Multiespecie y de su Acción Sinérgica con Antibióticos Convencionales.....	33
2.4.1. Relevancia y Características de los Co-cultivos.....	34
2.4.2. Evaluaciones Conjuntas de Compuesto Vegetal-Antibiótico.....	37
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	39
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	40
4.1. Objetivo General.....	40
4.2. Objetivos Específicos.....	40
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	41
5.1. Evaluación de la Capacidad Antibacteriana del Aceite Esencial de <i>L. graveolens</i> , Carvacrol e Imipenem Sobre <i>P. aeruginosa</i> y <i>A. baumannii</i> en Cultivo Axénico y Mixto....	41

## CONTENIDO (continuación)

5.1.1. Condiciones para el Co-cultivo.....	41
5.1.2. Establecimiento de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) y Bactericidas (CMB) de <i>L. graveolens</i> , Carvacrol e Imipenem Sobre <i>P. aeruginosa</i> y <i>A. baumannii</i> .....	41
5.2. Efecto de las Combinaciones de Aceite Esencial <i>L. Graveolens</i> -Imipenem y Carvacrol-Imipenem Sobre Cultivos Axénicos y Mixtos de <i>P. aeruginosa</i> y <i>A. baumannii</i> .....	42
5.3. Efecto de la Evaluación Individual de Aceite Esencial de <i>L. graveolens</i> y Carvacrol, así Como su Combinación con Imipenem Sobre las Biopelículas de <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i> y su Co-Cultivo Sobre Tubos Endotraqueales.....	43
5.3.1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de Biopelículas de <i>L. graveolens</i> , Carvacrol y su Combinación con Imipenem Sobre <i>P. aeruginosa</i> y <i>A. baumannii</i> .....	44
5.3.2. Análisis de Cambios Morfológicos de biopelículas de <i>P. aeruginosa</i> y <i>A. baumannii</i> Expuestas a Carvacrol, Aceite esencial de <i>L. graveolens</i> y su Combinación con Imipenem por Microscopía de Fluorescencia.....	44
5.4. Anclaje Molecular <i>in Silico</i> (Docking) de Enzimas OXA-51 e IMP-1 de <i>A. baumannii</i> y <i>P. aeruginosa</i> con Carvacrol, Timol e Imipenem.....	45
5.5. Diseño Experimental y Análisis de Datos.....	47
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>48</b>
6.1. Evaluación de la Capacidad Antibacteriana del Aceite Esencial de <i>L. graveolens</i> , Carvacrol e Imipenem Sobre <i>P. aeruginosa</i> y <i>A. baumannii</i> en Cultivo Axénico y Mixto.....	48
6.1.1. Formación del Co-cultivo.....	48
6.1.2. Establecimiento de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) y Bactericidas (CMB) de <i>L. graveolens</i> , Carvacrol e Imipenem Sobre <i>P. aeruginosa</i> y <i>A. baumannii</i> .....	50
6.2. Efecto de las Combinaciones de Aceite Esencial <i>L. graveolens</i> -Imipenem y Carvacrol-Imipenem Sobre Cultivos Axénicos y Mixtos de <i>P. aeruginosa</i> y <i>A. baumannii</i> .....	56
6.3. Efecto de la Evaluación Individual de Aceite Esencial de <i>L. graveolens</i> y Carvacrol, así Como su Combinación con Imipenem Sobre las Biopelículas de <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i> y su Co-Cultivo Sobre Tubos Endotraqueales.....	60
6.4. Anclaje Molecular <i>in Silico</i> (Docking) de Enzimas OXA-51 e IMP-1 de <i>A. baumannii</i> y <i>P. aeruginosa</i> con Carvacrol, Timol e Imipenem.....	69
<b>7. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>84</b>
<b>8. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>85</b>
<b>9. REFERENCIAS.....</b>	<b>86</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Morfología macroscópica de las colonias de <i>P. aeruginosa</i> y <i>A. baumannii</i> en co-cultivo proporción 1:1000.....	48
2 Mecanismo de acción antibacteriano del aceite esencial de orégano y carvacrol.....	53
3 Mecanismo de acción de Imipenem.....	54
4 Microscopías de fluorescencia (200X) de biopelículas de <i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i> y su co-cultivo en cubreobjetos, incubadas a 37°C durante 24 h en caldo LB expuestas a ½ CMI de los tratamientos aceite esencial de <i>L. graveolens</i> (AEO), carvacrol y las combinaciones con imipenem, teñidas con Syto 9 al 0.001%.....	62
5 Desviación de la media cuadrática de las posiciones atómicas (RMSD) de los ligandos imipenem, carvacrol y timol con $\beta$ -lactamasa OXA-51.....	73
6 Interacción dinámica de imipenem y la enzima OXA-51 (4ZDX) a través del tiempo (en nanosegundos).....	76
7 Interacción dinámica de carvacrol y la enzima OXA-51 (4ZDX) a través del tiempo (en nanosegundos).....	77
8 Interacción dinámica de timol y la enzima OXA-51 (4ZDX) a través del tiempo (en nanosegundos).....	78
9 Desviación de la media cuadrática de las posiciones atómicas (RMSD) de los ligandos imipenem, carvacrol y timol con $\beta$ -lactamasa IMP-1.....	79
10 Interacción dinámica de imipenem y la enzima IMP-1 (1DDK) a través del tiempo (en nanosegundos).....	81
11 Interacción dinámica de carvacrol y la enzima IMP-1 (1DDK) a través del tiempo (en nanosegundos).....	82
12 Interacción dinámica de timol y la enzima IMP-1 (1DDK) a través del tiempo (en nanosegundos).....	83

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Casos de infección y número de muertes relacionadas con resistencia a antibióticos en Estados Unidos en 2019 y 2020.....	16
2 Lista de patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos.....	17
3 Estudios previos de la actividad antibacteriana de aceites esenciales, sus constituyentes y algunos antibióticos.....	28
4 Coordenadas del sitio activo de las enzimas OXA-51 (PDB: 4ZDX) e IMP-1 (PDB: 1DDK) preparadas en el software UCSF Chimera versión 1.16. ....	46
5 Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y bactericidas (CMB) de imipenem, aceite esencial de <i>L. graveolens</i> y carvacrol frente a <i>P. aeruginosa</i> y <i>A. baumannii</i> en forma axénica y co-cultivo en proporción 1:1000.....	51
6 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) e Índices de Concentración inhibitoria fraccional (ICIF) en las combinaciones de imipenem, aceite esencial de <i>L. graveolens</i> y carvacrol frente a <i>P. aeruginosa</i> y <i>A. baumannii</i> en forma axénica y co-cultivo que resultaron con efecto sinérgico.....	57
7 Concentraciones Mínimas Inhibitorias de Biopelículas (CMIB) de aceite esencial de <i>L. graveolens</i> , carvacrol, imipenem y sus combinaciones sobre <i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i> y su co-cultivo.....	60
8 Interacciones moleculares <i>in Silico</i> entre las enzimas OXA-51 e IMP-1 con imipenem, carvacrol y timol (Obtenido a través de Chimera 1.16 y Discovery Studio 2021).....	70



## LISTA DE FÓRMULAS

<b>Fórmula</b>	<b>Página</b>
1 Concentración Inhibitoria Fraccional (CIF) del compuesto vegetal (CV).....	43
2 Concentración Inhibitoria Fraccional (CIF) del antibiótico.....	43
3 Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional (ICIF).....	43

## RESUMEN

La resistencia a los antibióticos es un grave problema de salud pública, y *Lippia graveolens* se ha propuesto como una alternativa para tratar infecciones causadas por microorganismos resistentes, como *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*. En esta investigación se evaluó el efecto sinérgico de las combinaciones de aceite esencial de *L. graveolens* o carvacrol con imipenem en la disminución de la viabilidad y virulencia de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* cultivadas en forma axénica y en co-cultivo. Se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y bactericidas (CMB) de imipenem, aceite esencial de *L. graveolens* y carvacrol. El imipenem presentó la CMI más baja en los cultivos individuales y co-cultivos (0.0005 mg/mL) comparado con el carvacrol (0.075-0.30mg/mL) y el aceite esencial (0.1556-1.25 mg/mL). De igual forma, para las CMB establecidas, el comportamiento fue similar: imipenem requirió menos dosis (0.001-0.004 mg/mL), seguido del carvacrol (0.150- >2.25 mg/mL) y finalmente el aceite esencial (0.312- >15 mg/mL). Además, las CMI's determinadas en las combinaciones de aceite esencial/imipenem (0.03/0.000023 mg/mL para *A. baumannii*, 0.0073/0.000023 mg/mL para *P. aeruginosa* y 0.06/0.000046 mg/mL para el co-cultivo) y carvacrol/imipenem (0.007/0.000023 mg/mL para *A. baumannii*, 0.0035/0.000046 mg/mL para *P. aeruginosa* y 0.014/0.000046 mg/mL para el co-cultivo) mostraron efectos sinérgicos al inhibir el crecimiento bacteriano. Adicionalmente, se estudió su impacto en la formación de biopelículas. Para *A. baumannii* y *P. aeruginosa* se necesitaron 0.6 mg/mL de carvacrol para su inhibición y 1.2 mg/mL y 2.7 mg/mL de aceite esencial, respectivamente. Mientras tanto, el co-cultivo requirió una concentración mayor tanto de carvacrol (6 mg/mL), como de aceite esencial (3 mg/mL). A su vez, el imipenem inhibió la formación de biopelículas con menores concentraciones (0.00025-0.0009 mg/mL). Por su parte, las combinaciones aceite esencial-imipenem (concentraciones de 0.06-0.6 para el aceite y 0.0000235-0.000168 mg/mL, para imipenem) y carvacrol-imipenem (concentraciones de 0.03-1.12 para carvacrol y 0.000085-0.000141 mg/mL para imipenem) lograron inhibir la formación de biopelículas con dosis más bajas que sus componentes individuales. Estos hallazgos indican que las combinaciones de *L. graveolens* y carvacrol con imipenem pueden ser una solución eficaz contra la resistencia a antibióticos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, además de reducir las dosis necesarias para controlar la viabilidad y disminuir la virulencia bacteriana.

**Palabras clave:** *Lippia graveolens*, carvacrol, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, co-cultivos.

## ABSTRACT

Antibiotic resistance is a serious public health problem, and *Lippia graveolens* has been proposed as an alternative to treat infections caused by resistant microorganisms, such as *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. In this investigation, the synergistic effect of combinations of *L. graveolens* essential oil or carvacrol with imipenem in decreasing the viability and virulence of *P. aeruginosa* and *A. baumannii* grown axenically and in co-culture was evaluated. The minimum inhibitory concentrations (MIC) and bactericidal concentrations (MBC) of imipenem, *L. graveolens* essential oil and carvacrol were determined. Imipenem presented the lowest MIC in single and co-cultures (0.0005 mg/mL) compared to carvacrol (0.075-0.30mg/mL) and essential oil (0.1556-1.25 mg/mL). Similarly, for the established MBCs, the behavior was similar: imipenem required less doses (0.001-0.004 mg/mL), followed by carvacrol (0.150- >2.25 mg/mL) and finally essential oil (0.312- >15 mg/mL). Furthermore, the MIC's determined on the essential oil/imipenem combinations (0.03/0.000023 mg/mL for *A. baumannii*, 0.0073/0.000023 mg/mL for *P. aeruginosa* and 0.06/0.000046 mg/mL for the co-culture) and carvacrol/imipenem (0.007/0.000023 mg/mL for *A. baumannii*, 0.0035/0.000046 mg/mL for *P. aeruginosa* and 0.014/0.000046 mg/mL for co-culture) showed synergistic effects in inhibiting bacterial growth. Additionally, their impact on biofilm formation was studied. For *A. baumannii* and *P. aeruginosa*, 0.6 mg/mL of carvacrol was required for inhibition and 1.2 mg/mL and 2.7 mg/mL of essential oil, respectively. Meanwhile, the co-culture required a higher concentration of both carvacrol (6 mg/mL) and essential oil (3 mg/mL). In turn, imipenem inhibited biofilm formation at lower concentrations (0.00025-0.0009 mg/mL). On the other hand, the essential oil-imipenem (concentrations of 0.06-0.6 for the oil and 0.0000235-0.000168 mg/mL, for imipenem) and carvacrol-imipenem (concentrations of 0.03-1.12 for carvacrol and 0.000085-0.000141 mg/mL for imipenem) combinations were able to inhibit biofilm formation at lower doses than their individual components.

These findings indicate that combinations of *L. graveolens* and carvacrol with imipenem may be an effective solution against antibiotic resistance of *A. baumannii* and *P. aeruginosa*, in addition to reducing the doses needed to control viability and decrease bacterial virulence.

**Key words:** *Lippia graveolens*, carvacrol, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, co-cultures.

## 1. INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antibióticos se refiere al conjunto de mecanismos que la bacteria emplea para evitar el efecto de dichos fármacos sobre ellas. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, las 700,000 muertes anuales asociadas a enfermedades por bacterias multirresistentes podrían aumentar hasta 10 millones para el 2050 y acumular un costo global de 100 billones de dólares (Giono *et al.*, 2020; Uruén *et al.*, 2020). Preocupa de igual manera que las infecciones de este tipo requieran el uso de antibióticos de mayor espectro o más costosos, además de que extienden la agonía de quienes las padecen, prolongan su hospitalización y por supuesto, conllevan un riesgo mayor de mortalidad (Serra-Valdés, 2017; Behzadi *et al.*, 2021). Ahora bien, dentro de las principales causas de resistencia a antibióticos se encuentran la prescripción excesiva de los mismos, su ingesta inadecuada o el mal control de infecciones (CDC, 2019). De igual manera, mecanismos genéticos como bombas de eflujo y enzimas hidrolíticas, son considerados como causantes de este fenómeno (Serra-Valdés, 2017). Como resulta evidente, la resistencia a los antibióticos es un problema serio y multidisciplinario que es urgente atender, por lo que es menester proponer alternativas para su combate, y el uso de metabolitos secundarios de plantas puede ser considerada como una opción.

Analizando las investigaciones previas que emplean compuestos vegetales en el combate de la resistencia a antibióticos, se observa la falta de información substancial y profunda en lo referente a mecanismos de acción. Tal es el caso de los estudios realizados por Rubio-Ortega *et al.*, (2018), Sakkas *et al.*, (2016) y El-Said *et al.*, (2021). En los dos primeros estudios, reportaron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y bactericidas (CMB) de *Thymus vulgaris* y *L. graveolens*, y *Thymus capitatus*, L. (*Labiatae*) y *Melaleuca alternifolia*, (*Myrtaceae*), de manera respectiva. Mientras tanto, en los estudios de El-Said *et al.*, (2021) y Rubio-Ortega *et al.*, (2018) se evidenció la actividad antibacteriana a través de halos de inhibición, utilizando *Lavandula pubescens* en el primer estudio, y *T. vulgaris* y *L. graveolens* el segundo. Por otro lado, estudios como los de Porfírio *et al.*, (2017), Reyes-Jurado *et al.*, (2020) y Karumathil *et al.*, (2018) realizaron evaluaciones más consistentes, como alteración de membrana externa, actividad en biopelículas y regulación de genes de resistencia. Por lo tanto, la mayoría de las investigaciones que evalúan aceites esenciales frente a la resistencia bacteriana realizan simples valoraciones de

sensibilidad por difusión en agar y estableciendo las CMI y CMB.

Por otro lado, se observa que la mayoría de las evaluaciones se llevan a cabo sobre cultivos axénicos, e incluso contemplan una sola especie bacteriana por experimento, como *Salmonella enterica* o *A. baumannii*. Lo contrario ocurre en los estudios de El-Said *et al.*, (2021), Reyes-Jurado *et al.*, (2020) y Sakkas *et al.*, (2016), quienes contemplaron a más de una especie, pero también en cultivos axénicos. Esto puede representar una limitante, ya que, naturalmente e incluso en infecciones, el desarrollo de poblaciones bacterianas no ocurre de manera aislada. Por esta razón, sería benéfico estudiar el comportamiento en sistemas multi-especie, como lo hicieron Chan *et al.*, (2018). Ellos utilizaron la técnica de co-cultivos y observaron la regulación de la resistencia por el crecimiento conjunto. A pesar de que estas investigaciones representan un gran avance, sería beneficioso investigar el uso de fuentes vegetales en sistemas multi-especies para fortalecer esta alternativa en la lucha contra la resistencia a los antibióticos.

Por último, entre las distintas alternativas, la combinación de compuestos vegetales con antibióticos ha tomado gran relevancia, por lo que es posible considerar la posibilidad de un efecto sinérgico entre los compuestos de origen vegetal y el antibiótico convencionalmente utilizado para cada bacteria. Estudios como los de Guo *et al.*, (2021), Amaral *et al.*, (2020) y Köse (2022), han realizado dichas evaluaciones observando sinergia entre los compuestos. Los conjuntos utilizados fueron capsaicina-colistina, aceite esencial de *Origanum vulgare*-polimixina B y carvacrol-meropenem, respectivamente. De tal manera que las evaluaciones de aceite esencial de *L. graveolens* y carvacrol, en conjunto con antibióticos podría ofrecer una alternativa eficiente frente a la resistencia a los antibióticos de los patógenos de prioridad crítica.

La evidencia indica el potencial de las especies de orégano como una opción para combatir bacterias resistentes a los antibióticos; sin embargo, la mayoría de los artículos se enfocan en la especie *O. vulgare*. En México se cuenta con otras especies como *L. graveolens*, cuya composición química varía y que ha recibido menos estudio en lo relacionado a sus propiedades antimicrobianas (Díaz-De León *et al.*, 2020). Se ha demostrado que el extracto etanólico de *L. graveolens* presenta actividad antibacteriana contra *Streptococcus mutans* a una concentración desde 250 µg/mL, mientras que a concentraciones de 500 µg/mL mostró alta capacidad antibacteriana contra *Streptococcus sobrinus*, ambos patógenos implicados en enfermedades bucales (López-Villareal *et al.*, 2022). Además, Rubio-Ortega *et al.*, (2022) demostraron que emplear aceite esencial de *L. graveolens* en concentración de 0.5 mg/mL fue capaz de inhibir y erradicar la formación de

biopelículas de *S. enterica*. Ante esto, la propuesta de evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *L. graveolens* y carvacrol (componente principal de este aceite) contra *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, ya que esto permite obtener información complementaria que puede aumentar la comprensión del mecanismo de acción de dicho componente principal del aceite y así definir su eficacia.

En base a las premisas descritas se hipotetiza que las combinaciones de aceite esencial de *L. graveolens* o carvacrol con el antibiótico imipenem causarán un efecto sinérgico al disminuir la viabilidad y virulencia de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* cultivadas en forma axénica y en co-cultivos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Resistencia Bacteriana a Antibióticos: Un Problema Serio y Multidisciplinario

#### 2.1.1. Definición y Panorama de la Resistencia a Antibióticos

Ante el desarrollo de patologías infecciosas ocasionadas por microorganismos, la principal solución que se contempla es el uso de antibióticos. Estos agentes son un grupo de medicamentos encaminados a combatir las infecciones causadas por bacterias en seres humanos y animales, ya sea eliminando las mismas, o bien, dificultando su crecimiento y multiplicación (CDC, 2021a). Sin embargo, el uso de estos agentes y la eficacia en el tratamiento de las enfermedades infecciosas asociadas a bacterias, se han visto afectados de manera creciente en los últimos años debido a un fenómeno conocido como resistencia a los antibióticos. Esta se refiere al conjunto de mecanismos que le brindan la facultad a la bacteria de evitar o resistir la acción de los antibióticos, siendo el uso de estos fármacos una de las posibles causas de mutación de los microorganismos para que muestren resistencia (OMS, 2020a, Giono *et al.*, 2020). Por lo tanto, la resistencia a los antibióticos ocasiona mayor dificultad en el tratamiento de las infecciones asociadas a bacterias farmacorresistentes, ya que los agentes utilizados pierden efectividad.

A su vez, esta resistencia exhibida por las bacterias suele clasificarse en distintos niveles según el origen con que se presenta, por lo que se habla primeramente de una resistencia bacteriana intrínseca y, posteriormente, de una adquirida. La primera se caracteriza por ser constitutiva de cada especie en particular, es decir, le es natural, por lo que cada generación de esa misma especie presentará la resistencia específica, mediada por sus características físicas o biológicas. Por ejemplo, los genes codificantes y proteínas de las bombas de eflujo forman parte ya del genoma bacteriano, y así se pasa a la siguiente generación. También se menciona que ciertas particularidades de su constitución física, como la presencia de membrana externa en bacterias Gram negativas, o la carencia de pared celular en *Mycoplasma* les otorga protección a ciertos fármacos (Zgurskaya *et al.*, 2015; (Uruén *et al.*, 2020). Por su parte, la resistencia adquirida ocurre

cuando la bacteria obtiene genes que expresan esta respuesta a través de procesos como la conjugación, transformación, transducción o transposición, lo que modifica su genoma (Uruén *et al.*, 2020; Serra-Valdés, 2017). Un ejemplo de este tipo de resistencia puede ocurrir mediante la transferencia de genes codificantes para enzimas hidrolíticas, como lo mostraron Zurfluh y col (2017) al encontrar genes bla<sub>TEM 1-b</sub> en aislado de *E.coli* de aguas residuales provenientes de centros médicos. En suma, independientemente del tipo de resistencia expresado, esto deriva en una mejor capacidad de defensa frente a los antibióticos y eso es precisamente lo que genera preocupación al momento de buscar su resolución.

En concordancia a lo anterior, la resistencia a los antimicrobianos se percibe como un problema de salud pública global, y así lo exhiben tanto la Organización de las Naciones Unidas (ONU) como la Organización Mundial de la Salud (OMS). Para la ONU, «la resistencia bacteriana es una de las principales amenazas de salud [...] que pone en peligro [...] el desarrollo humano» (Giono *et al.*, 2020). Esta percepción cobra relevancia debido a los altos grados de mortalidad asociados a las infecciones por bacterias multirresistentes. Ejemplo de ello es la septicemia, pues muere el 30% de los recién nacidos que la padecen (OMS, 2021; Serra-Valdés, 2017). Por otro lado, según informes de CDC (2022), durante el primer año de la pandemia por COVID-19 en Estados Unidos, se observó un aumento de aproximadamente 15 % en infecciones y muertes asociadas con bacterias resistentes, esto de manera general. Sin embargo, de manera particular las infecciones asociadas a ciertos microorganismos resistentes como *A. baumannii* o algunas Enterobacterias, tuvieron un aumento general de hasta el 35 % del 2019 al 2020 (Cuadro 1). Por lo tanto, el alcance de la resistencia a los antibióticos es notable e involucra a todo el orbe.

**Cuadro 1.** Casos de infección y número de muertes relacionadas con resistencia a antibióticos en Estados Unidos en 2019 y 2020 (modificado de CDC, 2020).

<b>Patógeno</b>	<b>2019 (casos/muertes)</b>	<b>2020 (casos/muertes)</b>	<b>Incremento (%general / %hospitalario)</b>
<i>Acinetobacter</i> resistente a Carbapenémicos	6000 / 500	7500 / 700	35 / 78
Enterobacteriales resistentes a Carbapenémicos	11,900 / 1,000	12,700 / 1,100	- / 35
<i>Candida auris</i> resistente a antifúngicos	466 / -	754 / -	60 / -



En cuanto a la dirección de las investigaciones, ha tomado gran relevancia un conjunto de patógenos denominado como ESKAPE, por lo que varios reportes se centran en el estudio de la resistencia de cada especie que lo componen. Dicho grupo está constituido por los patógenos *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacter* spp. Las bacterias antes mencionadas son las principalmente asociadas a IAAS (Infecciones Asociadas con Atención a la Salud), siendo las responsables de hasta el 67 % de todas las infecciones y cursando con una gravedad considerable (Giono *et al.*, 2020; Behzadi *et al.*, 2021). Es por lo anterior y su creciente resistencia, que estos patógenos se consideran prioritarios (Cuadro 2) según la OMS, ya que representan una amenaza seria al desarrollo humano.

**Cuadro 2.** Lista de patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos (OMS, 2017).

Prioridad	Patógenos
<b>Crítica</b>	<p><i>Acinetobacter baumannii</i> resistente a los carbapenémicos.  <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a los carbapenémicos.  <i>Enterobacteriaceae</i> resistentes a los carbapenémicos, productoras de BLEE.</p>
<b>Elevada</b>	<p><i>Enterococcus faecium</i> resistente a la vancomicina.  <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina.  <i>Helicobacter pylori</i> resistente a la claritromicina.  <i>Campylobacter</i> spp. resistente a las fluoroquinolonas.  <i>Salmonellae</i> resistentes a las fluoroquinolonas.  <i>Neisseria gonorrhoeae</i> resistente a cefalosporinas y fluoroquinolonas.</p>
<b>Media</b>	<p><i>Streptococcus pneumoniae</i> sin sensibilidad a la penicilina.  <i>Haemophilus influenzae</i> resistente a la ampicilina.  <i>Shigella</i> spp. resistente a las fluoroquinolonas.</p>

A nivel nacional, el grupo ESKAPE también representa cierto grado de alerta, ya que se ha observado que el porcentaje de infecciones atribuidas a ello resulta considerable. Así se comprueba en varios estudios en México, como el realizado por Sosa-Hernández *et al.*, en 2019, donde se estimó que el 42.2% de las IAAS en el Hospital Juárez de México durante el periodo 2013-2017, eran atribuidas al grupo ESKAPE. A su vez, en una unidad de cuidados intensivos de Monterrey

en el 2012, este grupo representó el 64% de los aislamientos de muestras clínicas y mostró altas tasas de resistencia, pues el 86.2% de *A. baumannii* y el 28.9% de *P. aeruginosa* fueron multirresistentes (MDR) (Llaca-Díaz *et al.*, 2012). Precisamente, estos dos microorganismos se encuentran dentro del grupo de mayor preocupación en cuanto al desarrollo de infecciones por su característica de resistencia, no solo en el entorno hospitalario, sino también en la comunidad. Por lo tanto, y ya que estas dos últimas especies bacterianas son las de interés en este proyecto, se aborda a continuación de manera más específica su desarrollo epidemiológico.

2.1.1.1. *Acinetobacter baumannii*. El género *Acinetobacter* se define como “cocobacilos pleomórficos cortos que son Gram negativos, aerobios estrictos, catalasa positivos, oxidasa negativos, no fermentadores e inmóviles” (Ayoub-Moubareck y Hammoudi-Halat, 2020). Algunas especies del género *Acinetobacter* pueden encontrarse en distintos ambientes como el suelo, sin embargo, *A. baumannii* se relaciona principalmente con entornos hospitalarios, donde debido a su multiresistencia es una de las principales causas de infecciones (Ayoub-Moubareck y Hammoudi-Halat, 2020; Morris *et al.*, 2019). Así lo refleja la incidencia global, pues se le atribuyen un millón de casos de infección cada año (Wu y Hu, 2020), presentando tasas de mortalidad que varían entre 23-68 % de manera general, y en entornos comunitarios hasta del 64 % (Morris *et al.*, 2019). Es por lo anterior que *A. baumannii* comenzó a cobrar gran relevancia.

Por otro lado, las patologías que suelen atribuirse a *A. baumannii* suelen ser muy variadas y se desarrollan de distinta manera según el grado de resistencia de la cepa involucrada. Entre las principales infecciones causadas por este microorganismo figuran las del tracto respiratorio, del torrente sanguíneo, del tracto urinario y de heridas, destacando la neumonía (Karumathil *et al.*, 2018). A razón de esto, Kanafani *et al.*, (2018) en un estudio realizado en el Líbano, evidenciaron al tracto respiratorio como el sitio principal de infección por *A. baumannii* MDR, ya que este sitio representaba el 53.1 % de las infecciones totales. En cuanto a su tasa de resistencia en este tipo de infecciones, se encontró que de los aislamientos provenientes de neumonía asociada a ventilador (NAV), el 68.3 % correspondía a XDR, mientras que 13.3 % era MDR y 18.3 % PDR (Čiginskienė *et al.*, 2019). Además, un metaanálisis internacional expuso que la prevalencia de *A. baumannii* MDR relacionada con neumonía adquirida en el hospital y NAV se aproxima al 80% (Ayoub-Moubareck y Hammoudi-Halat, 2020). Son precisamente las tasas de resistencia y mortalidad en

infecciones respiratorias lo que facilita que *A. baumannii* se relacione más comúnmente con ellas, por su alto impacto.

2.1.1.2. *Pseudomonas aeruginosa*. Se define como un bacilo en forma de bastón, Gram negativo, no fermentador, móvil, oxidasa positiva y aerobio facultativo. Además, se le considera un microorganismo no fastidioso en cuanto a sus condiciones de crecimiento, lo que le da su característica ubicuidad y persistencia en ambientes como agua y suelo, aunque se le relaciona mayormente con el predominio en entornos clínicos (Behzadi *et al.*, 2021; Jurado *et al.*, 2021). Según estadísticas reportadas por Estados Unidos, del 13-19% de las infecciones nosocomiales son atribuidas a *P. aeruginosa*, afectando principalmente las UCI, pudiendo representar hasta el 23% de todas las infecciones. Su presencia se manifiesta en condiciones clínicas como la neumonía, infecciones de la piel, oídos y ojos, infecciones del tracto urinario e infección del torrente sanguíneo, siendo las más frecuentes las del tracto respiratorio (Behzadi *et al.*, 2021; Jurado *et al.*, 2021; Reynolds y Kollef, 2021). De hecho, hasta el 22% de todas las IAAS es descrito por la neumonía asociada a cuidados sanitarios y la neumonía asociada al ventilador (NAV), donde *P. aeruginosa* representa del 10-20% de los aislamientos, con una mortalidad estimada del 32-42.8% (Reynolds y Kollef, 2021).

Estos niveles de infección y mortalidad pueden asociarse en parte al rápido desarrollo de resistencia a los agentes terapéuticos. Según la Red Nacional de Seguridad de la Atención Médica, durante el 2015-2017, el 26.3% de los aislamientos de *P. aeruginosa* en pacientes de la UCI con posible neumonía, presentó resistencia a carbapenémicos (Reynolds y Kollef, 2021). Esto pone de manifiesto que la resistencia a los antibióticos es un serio problema de salud, ya que la efectividad de algunos antibióticos se ve disminuida y solo unos pocos de los recientemente desarrollados son positivos. Por lo tanto, es de carácter urgente vigilar de manera cercana el desarrollo de este fenómeno en los diferentes niveles de organización y atención, así como proponer alternativas para el combate de este.

### **2.1.2. Consecuencias de la Resistencia Bacteriana**

El impacto que presenta la resistencia a los antibióticos a nivel mundial es tan amplio que involucra varios campos, como el económico y la salud. Actualmente la OMS refiere al menos 700,000 muertes anuales a causa de enfermedades relacionadas con bacterias resistentes, previendo un aumento a 10 millones para el 2050 y la generación de un costo global acumulado de 100 billones de dólares si esto no se regula (Giono *et al.*, 2020; Uruén *et al.*, 2020). De igual manera, la resistencia a los antibióticos pudiera reducir entre 2 y 5% el Producto Interno Bruto en algunos países y generar una mayor cantidad de personas en pobreza extrema para el 2030, pudiendo ascender hasta 24 millones de afectados (Giono *et al.*, 2020; ONU, 2021). Por si fuera poco, la farmacoresistencia puede generar en el paciente un proceso más doloroso y extenso, al igual que aumentar su estancia hospitalaria, el riesgo de muerte y disminuir su calidad de vida, aunado al uso de fármacos de mayor espectro y costo (Serra-Valdés, 2017; Behzadi *et al.*, 2021). Sin embargo, el efecto de este fenómeno suele extenderse hacia otros estratos que bien son consecuencia directa de su mala regulación.

Por otro lado, la resistencia antimicrobiana también genera consecuencias negativas en áreas médicas más específicas y delicadas. Ejemplo de ello son las prácticas como las cirugías, el trasplante de órganos o la quimioterapia, que pueden volverse menos seguras si ocurren procesos infecciosos por bacterias MDR y no se cuenta con el tratamiento adecuado (OMS, 2020a). Además, es un hecho que el efecto de la resistencia antimicrobiana impacta más ampliamente a aquellos estratos de la sociedad con mayor riesgo, como son las poblaciones de edad extrema, inmunosuprimidos y los de bajos recursos (OMS, 2021). Finalmente, se debe tomar en cuenta que las consecuencias de este fenómeno no se solucionan exclusivamente con la creación de nuevos fármacos, sino con el cambio de cultura a la hora de suministrar los mismos, para evitar así el crecimiento del problema.

### **2.1.3. Factores Causantes de Resistencia Bacteriana a los Antibióticos**

Hablar de las causas de la resistencia a los antibióticos puede prestarse a dos interpretaciones.

Principalmente, se hace referencia a aquellos eventos que pueden dar pie a que las bacterias desarrollen resistencia a ciertos fármacos. Sin embargo, también es importante hablar de los mecanismos por los cuales las bacterias ejercen la resistencia. En cuanto a este último enfoque, se menciona que el fenómeno de resistencia es un proceso que se da ordinariamente en los microorganismos debido a las mutaciones, sin embargo, los primeros factores descritos se catalogan ordinariamente como las causas (OMS, 2020b). Por lo tanto, se abordan ambos principios por separado.

2.1.3.1. Mecanismos Genéticos y Tipos de Resistencia. Los mecanismos genéticos responsables de la resistencia a los antibióticos suelen dividirse en dos tipos como se menciona anteriormente, pues se habla de una resistencia bacteriana intrínseca y una adquirida. Independientemente del tipo que se presente, los mecanismos de resistencia pueden resumirse en 3 procesos generales: la regulación en la concentración del antibiótico, procesamiento enzimático del mismo y la alteración de su sitio blanco (Kyriakidis *et al.*, 2021). De manera más específica, Serra-Valdés (2017) enlista los siguientes mecanismos como los principales:

1. Bombas de eflujo o de expulsión del antibiótico del interior de la célula bacteriana.
2. Producción de enzimas hidrolíticas que modifican o inactivan al antibiótico.
3. Modificación de PBP (penicilin-binding-protein), que son proteínas de unión de ciertos antibióticos y así causar el bloqueo de la penetración del antibacteriano.
4. Alteración o disminución de la permeabilidad de la membrana celular bacteriana.
5. Desarrollo de biopelículas.
6. Sobreexpresión del sitio blanco.

En el caso de las dos bacterias de interés, los mecanismos de resistencia tienen cierto grado de especificidad. Por un lado, la resistencia en *A. baumannii* puede englobarse generalmente en reducción de permeabilidad de membrana, alteraciones de sitios blanco y modificaciones en sistemas de salida (Lucas-Kerihara *et al.*, 2020). Ejemplos de ello serían alteración de porinas como OmpA y CarO, así como la sobreexpresión de bombas de eflujo AdeABC, lo que brinda resistencia a  $\beta$ -lactámicos (Kyriakidis *et al.*, 2021). Por su parte, *P. aeruginosa* comparte algunos mecanismos con *A. baumannii*, como la sobreexpresión de bombas de eflujo, además de otros distintos como modificaciones en PBP y mutaciones en porinas, como OprD y OprH (Behzadi *et al.*, 2021).

Aunque solo se mencionan algunos, tanto *A. baumannii* como *P. aeruginosa* cuentan con gran cantidad de estrategias para hacer frente a los diversos antibióticos, destacando sobre todo la producción de enzimas hidrolíticas, por ser uno de los principales mecanismos de resistencia a los antibióticos. Estas enzimas son capaces de hidrolizar e inactivar estos fármacos dirigidos para el control bacteriano.

Una clasificación de estas enzimas corresponde a las  $\beta$ -lactamasas, que como su nombre lo indica, degradan antibióticos  $\beta$ -lactámicos, y según la clasificación molecular de Ambler se dividen en 4 grupos, según el centro activo que posea (serina o un metal), los cuales son A, B, C y D (Vrancianu *et al.*, 2020). Ejemplo de ellas son las Oxacilinasas, como OXA-51 y OXA-23 (Kyriakidis *et al.*, 2021), perteneciente a la clase D con serina en su sitio activo, y las metalo- $\beta$ -lactamasas, como la IMP-1, perteneciente a la clase B con Zinc en su sitio activo. Se ha reportado que la primera se encuentra dentro de las principales oxacilinasas en *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos. Además, su relevancia se debe, primero a que es una enzima codificada de manera cromosómica en la bacteria, y segundo, a la creciente tasa de infecciones relacionadas a aislados poseedores de esta enzima (Smith *et al.*, 2015). Por su lado, la enzima IMP-1 fue la primera MBL asociada a la resistencia a los carbapenémicos en *P. aeruginosa*, además que se asociaron brotes a ella por ser una enzima codificada por genes transferibles y una de las más distribuidas (Behzadi *et al.*, 2021; Yoon E.J. y Jeong S.H., 2021). En consecuencia, los diversos sistemas de resistencia junto con los principales factores de patogenicidad de cada microorganismo determinan el rumbo y la gravedad de las infecciones.

2.1.3.2. Determinantes Ambientales. Por otra parte, el papel que juegan las condiciones o comportamientos del medio en la resistencia a los antibióticos resulta de gran relevancia, de tal manera que la CDC (2019) enuncia la siguiente lista como los principales eventos a los que se atribuye este fenómeno:

- La prescripción excesiva de antibióticos, siendo esta la causa principal.
- Pacientes que no toman antibióticos según las prescripciones.
- Antibióticos innecesarios utilizados en agricultura.
- Mal control de infecciones en hospitales y clínicas.
- Prácticas inadecuadas de higiene y saneamiento, tanto en personas como en animales.

- Falta de pruebas rápidas de laboratorio.

Todos estos elementos determinan en diferentes magnitudes el desarrollo de la resistencia a los antibióticos, por lo que resulta de gran importancia prestarles la debida atención y considerarlos como prioridad de manera constante. Como resulta evidente, la resistencia a los antibióticos es un problema serio y multidisciplinario que es urgente atender, por lo que es menester proponer alternativas para su combate, y el uso de compuestos derivados de plantas puede considerarse como una opción viable.

## 2.2. Carencia de Información Mecanística Sobre la Acción Antibacteriana de Compuestos Vegetales

### 2.2.1. Alternativas Frente a la Resistencia a Antibióticos

Ante la creciente amenaza que implica la resistencia a antibióticos, es evidente que si no se emplean medios de solución o contención a la brevedad las consecuencias pueden ser devastadoras. En ese sentido, las infecciones causadas por bacterias como *A. baumannii* y *P. aeruginosa* MDR representan una preocupación alarmante precisamente por la resistencia a fármacos cada vez más potentes. Por esto, dentro de las técnicas alternativas a antibióticos convencionales se encuentra el uso de bacteriófagos y endolisinas, péptidos antimicrobianos, sideróforos, terapia fotodinámica, vacunas, nanopartículas, anticuerpos monoclonales y compuestos de origen natural (Behzadi *et al.*, 2021). En conjunto, estas alternativas se han propuesto para resolver por lo menos parcialmente este fenómeno, por lo que a continuación se describen de manera general aquellas más conocidas, haciendo mayor énfasis en el apartado siguiente en los compuestos vegetales.

Primeramente, el tratamiento de fagoterapia utiliza bacteriófagos con efecto bactericida, los cuales son dirigidos exclusivamente al agente de interés y pueden emplearse en combinación con antibióticos convencionales (Behzadi *et al.*, 2021). Además, representan una alternativa efectiva debido a su especificidad, toxicidad nula, bajo costo, respuesta acorde al microbioma, entre otras (Leontyev *et al.*, 2020). En relación con los fagos se encuentran las endolisinas, que se definen

como enzimas producidas por los mismos durante su replicación, cuya acción se ejerce sobre la pared celular bacteriana. Es por esto que afectan principalmente a bacterias Gram positivas, aunque al combinarse con permeabilizadores de membrana generan un efecto óptimo contra Gram negativas, al igual que aquellas endolisinas con dominios líticos especializados (Yuan *et al.*, 2021). Sin embargo, tanto el uso de fagos como endolisinas aún presentan ciertas restricciones, como la especificidad en los receptores de fagos, el estado de crecimiento bacteriano, la necesidad de estudios más profundos y sobre todo el que sean comercialmente menos rentables, por lo que su uso en humanos muestra limitaciones (Chegini *et al.*, 2020; Leontyev *et al.*, 2020).

Por su parte, otras dos alternativas son los péptidos antimicrobianos (PAM) y las nanopartículas. Los PAM pueden ser naturales o sintéticos, formados de 11 a 50 aminoácidos, de carga positiva y anfipáticos que afectan la membrana, pared, proteínas y ácidos nucleicos bacterianos (Vrancianu *et al.*, 2020). Pueden ejercer efecto bactericida y/o regulatorio de la inmunidad, dividiéndose en bacteriocinas o péptidos de defensa del huésped (PDH) (Cárdenas *et al.*, 2018). A pesar de lo que representan, aún se carece de conocimiento en cuanto a su interacción con células diana y las del huésped. Por otro lado, las nanopartículas se componen de materiales orgánicos o inorgánicos (como metales) en escala nanométrica, cuya acción se debe a mecanismos como daños a pared y membrana bacterianas, inducción de radicales libres, inhibición de proteínas y regulación génica (Rudramurthet *et al.*, 2016; Basavegowda *et al.*, 2020). Sin embargo, las nanopartículas presentan el impedimento del limitado número de ensayos aplicados que permitan conocer de manera exacta sus interacciones. Por lo tanto, a pesar de los resultados tan prometedores de estas alternativas, pueden no ser la opción más viable, principalmente por la seguridad del organismo huésped.

### **2.2.2. Aceites Esenciales Antibacterianos y sus Limitaciones: Evaluaciones con *Lippia graveolens* y *Origanum vulgare***

Dentro de las distintas alternativas antimicrobianas contra la resistencia a los antibióticos, el uso de compuestos vegetales cobra mayor relevancia. Su importancia se observa desde el uso medicinal que se les ha dado a las plantas a través del tiempo, principalmente por ciertos grupos poblacionales. Además, características como la baja toxicidad y la accesibilidad económica



también contribuyen a que su uso resulte con mayor viabilidad (Basavegowda *et al.*, 2020). Dicha acción antimicrobiana se relaciona con los metabolitos secundarios que han demostrado incluso ser eficaces contra cepas resistentes a antibióticos al actuar sobre los determinantes de resistencia (Khare *et al.*, 2021). Estos fitoquímicos pueden pertenecer a varias clases de compuestos orgánicos como alcaloides, fenoles, flavonoides, terpenos, entre otros, y suelen presentar mayor campo de acción en formulaciones complejas como extractos o aceites esenciales (Khare *et al.*, 2021; Basavegowda *et al.*, 2020). De manera reciente, estos últimos han adquirido gran popularidad debido a su efectividad antibacteriana, por lo que serán tratados con mayor detalle.

Los aceites esenciales se definen como mezclas líquidas, volátiles y liposolubles, resultado de la combinación de compuestos como fenoles, flavonoides, alcaloides, aldehídos, taninos, cumarinas y principalmente terpenos, lo que le otorga distintas propiedades biológicas (Valdivieso-Ugarte *et al.*, 2019; Basavegowda *et al.*, 2020; Leyva-López *et al.*, 2017). Aunque cada uno de estos compuestos contribuye al desarrollo de dichas bioactividades, se ha encontrado que especialmente en la acción antimicrobiana, los terpenos, por ejemplo, carvacrol y timol, son los mayormente activos, incluso frente a cepas resistentes (Valdivieso-Ugarte *et al.*, 2019). Los aceites esenciales pueden ser extraídos mediante diversas técnicas como la extracción con solventes orgánicos, fermentación o destilación, a partir de varias fracciones de las plantas, pudiendo variar su rendimiento (Basavegowda *et al.*, 2020). Debido a esto y a la gran cantidad de fuentes vegetales posibles es por lo que la actividad antimicrobiana es tan ampliamente evaluada. Por lo tanto, a continuación, se aborda la distinta evidencia que sustenta la viabilidad del uso de compuestos vegetales, con mayor énfasis en fitoquímicos derivados del orégano y/o aquellos que se han evaluado contra cepas de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*.

Para comenzar, en un artículo de revisión realizado por Kumara *et al.*, en 2016, se informó de reportes previos donde se demostró que los aceites esenciales de canela, clavo, pimiento, tomillo, orégano y romero poseen fuerte actividad antibacteriana contra *P. aeruginosa*. En esa misma revisión se menciona que el aceite esencial de *Achillea clavennae* es efectivo contra patógenos respiratorios como *P. aeruginosa*, exhibiendo fuerte actividad inhibitoria atribuida principalmente a eucaliptol y alcanfor. Por su parte, Tiwari *et al.*, (2015) realizaron una revisión exhaustiva donde informan que extractos de la planta *L. salicaria* exhiben actividad significativa frente a *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. Del mismo modo los aceites esenciales de *Syzygium aromaticum*, *Cinnamomum zeylanicum* y *Thymus* se usaron contra el fenotipo MDR del último patógeno.

En un sentido más amplio, los estudios realizados por Rubio-Ortega *et al.*, (2018), Sakkas *et al.*,

(2016) y El-Said *et al.*, (2021) permiten avanzar en el conocimiento sobre los aceites esenciales. En el primer estudio, se evaluó la actividad antibacteriana de 15 aceites esenciales mediante difusión en agar sobre cepas de *S. enterica* y se les determinó sus concentraciones mínimas inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB), destacando *T. vulgaris* y *L. graveolens*. Por su parte, Sakkas *et al.*, evaluaron 5 aceites esenciales sobre aislados MDR, resultando más efectivos los de *T. capitatus*, *L. (Labiatae)* y *Melaleuca alternifolia*, (*Myrtaceae*), pero se reporta escasa actividad contra *P. aeruginosa* (CMI de 2-4% v/v) y buena actividad contra *A. baumannii* (CMI 0.25-0.37%). Además, El-Said *et al.*, examinaron la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *L. pubescens*, *P. incisa* subsp. *candolleana* y *J. procera* contra 13 cepas Gram (+) y Gram (-) mediante difusión en agar. El único resultado favorable fue obtenido por *L. pubescens* y se observó frente a *A. baumannii*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus epidermidis*, con halos de inhibición que van desde los 10 hasta los 13 mm, presumiblemente por acción del carvacrol.

A su vez, Jan *et al.*, en 2020 evidencian la actividad antibacteriana de *O. vulgare* silvestre y cultivable frente a cepas de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, encontrando valores de CMI desde 13.78 a 62.5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , atribuyendo dicho efecto al carvacrol y timol. Para esto se emplearon las técnicas de difusión en disco y ensayo de microdilución para establecer la CMI. Por su parte, Coccimiglio *et al.*, en 2016, reportaron efectividad de los extractos etanólicos frente a aislamientos clínicos mucoides y no mucoides de *P. aeruginosa* con CMI desde 6.3- 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En cuanto al orégano mexicano, Hernández *et al.*, (2014) evaluaron la actividad antibacteriana de su aceite esencial y sus constituyentes principales en forma libre y encapsulados frente a bacterias como *Pseudomonas fragi* y *Salmonella* sp., obteniendo halos de inhibición que van desde los 24.86 a los 29.23 mm y desde 24.82 a los 24.95 mm, respectivamente. En este estudio se determinó la CMI, el efecto sinérgico de los constituyentes y la inhibición bacteriana por difusión en disco.

Por su parte, en la revisión realizada por Bautista-Hernández *et al.*, (2021) se hace alusión al aceite esencial de *L. berlandieri* (sinónimo de orégano mexicano) sobre cepas de *Escherichia coli* aplicado de manera gaseosa, donde se determinó una CMI 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Como es de notarse, son varios los estudios que han demostrado la actividad de los aceites esenciales de orégano, así como la de su componente mayoritario el carvacrol. Todos los estudios mencionados hasta aquí exponen la actividad antibacteriana de los compuestos vegetales en base a valoraciones básicas y poco profundas, como la determinación de CMI y/o CMB o difusión en agar. Esto, aunque resulta evidencia importante en la investigación de nuevas alternativas vegetales, no ayuda a comprender

los mecanismos de acción de estas sustancias.

En contraste, otros estudios han tratado de demostrar el sitio de acción de dichos compuestos, de acuerdo a los posibles distintos sitios de acción en la célula bacteriana. Para el caso de los aceites esenciales se propone primordialmente la afección a nivel de membrana y pared celular en las bacterias, causando alteraciones y aumentando la permeabilidad (Tiwari *et al.*, 2015; Coccimiglio *et al.*, 2016). Por ejemplo, la acción propuesta del carvacrol (constituyente principal del orégano) es que influye en la composición lipídica de membrana, lo que induce la pérdida de ATP, así como la inhibición de secreción de toxinas, mismo efecto observado al usar aceite esencial de orégano (Kumara *et al.*, 2016). En concordancia a lo anterior, Montagu *et al.*, (2016), demostraron la actividad antibacteriana de carvacrol (proveniente de orégano) y cinamaldehído (proveniente de canela) de manera individual y en conjunto contra aislados de *A. baumannii*. Además de determinar la MIC en cada caso, se observaron cambios en la expresión génica (principalmente de *groES*, *groEL* y *dnaK*) debido a variaciones a nivel de ARNr atribuidos al tratamiento con carvacrol.

Otro ejemplo de evaluaciones más consistentes es la de Porfírio *et al.*, (2017), que evaluó el aceite esencial de *Lippia alba*, perteneciente al mismo género y familia del orégano mexicano. En dicho estudio se evaluó la CMI y CMB (0.5 mg/mL), pero adicionalmente se establecieron los valores más bajos que pueden inhibir la formación de biopelículas (0.5 mg/mL para citral y aceite esencial 1). De igual manera, Reyes-Jurado *et al.*, (2020) estudiaron dicha propiedad del aceite esencial de *L. berlandieri* sobre biopelículas de *P. aeruginosa* y *Salmonella* Typhimurium en acero inoxidable, obteniendo concentraciones favorables de 600 mg/L y 250 mg/L, respectivamente. Por su parte, el artículo de Karumathil *et al.*, en 2018 resultó más completo, pues se midió el efecto de trans-cinamaldehído y eugenol sobre la permeabilidad de membrana y la expresión de bombas de eflujo, así como de ciertos genes de resistencia. Aunque ciertamente son varios los estudios que proponen diferentes mecanismos antibacterianos de los aceites o sus derivados, Kumara *et al.*, (2016) mencionan que su eficacia difiere entre los distintos patógenos. Por lo tanto, es imperativo investigar el mecanismo de acción específico bajo las condiciones propuestas y en los organismos de interés.

Por otro lado, se observa que generalmente la dirección en las investigaciones de actividades antibacterianas se encuentra enfocada sobre valoraciones en cultivos axénicos, tal como puede evidenciarse en las evaluaciones mencionadas anteriormente. Incluso la mayoría contemplan una sola especie bacteriana por experimento. Respecto a esta última declaración se pueden observar casos contrarios, como ocurre en los estudios realizados por El-Said *et al.*, (2021), Reyes-Jurado

*et al.*, (2020) y Sakkas *et al.*, (2016), quienes realizaron sus evaluaciones en más de una especie, pero en cultivos axénicos. Esto exhibe la falta de conocimiento que se presenta al hablar de evaluaciones conjuntas, lo que puede representar una limitante, ya que naturalmente y en las infecciones, el desarrollo de poblaciones bacterianas no ocurre de manera aislada.

Por último, una alternativa que ha tomado gran relevancia es la combinación de compuestos vegetales y antibióticos, sobre todo por el posible efecto sinérgico entre los elementos. Por mencionar algunos estudios, Guo *et al.*, (2021), Amaral *et al.*, (2020) y Köse (2022) emplearon esta técnica en sus evaluaciones y observaron resultados favorables en los conjuntos usados. Estos fueron capsaicina-colistina, polimixina B-aceite esencial de orégano y carvacrol-meropenem, respectivamente. En los 3 estudios el efecto sinérgico se determinó mediante el Índice de concentración inhibitoria fraccional (ICIF), el cual fue de 0.03-0.06 para la capsaicina-colistina, 0.18-0.37 para la polimixina B-Aceite esencial de orégano y 0.5 para la mezcla carvacrol-meropenem. Además, los 3 estudios evaluaron la actividad antibacteriana exhibida como daño a membrana, sin embargo, solo Guo *et al.*, (2021) y Köse (2022) realizaron dicha evaluación con la combinación. Además, solo el estudio realizado por Guo *et al.*, analizó la afección de sus agentes combinados en otros niveles de acción, como el efecto en la regulación de genes, donde se observó la regulación al alza de 271 genes y regulación a la baja de 327 genes; en estos conjuntos se incluían genes de resistencia (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Estudios previos de la actividad antibacteriana de aceites esenciales, sus constituyentes y algunos antibióticos.

Compuestos	Especies	Evaluación antibacteriana	Resultados	Referencias
Carvacrol Cinamaldehído	<i>A. baumannii</i>	Expresión de genes	CMI Carvacrol- Cinamaldehído: 0.16 mg/mL <i>groES, groEL dnaK</i> : sobrexpresión 3.9- 5.1 veces <i>clp B, kat E</i> : sobrexpresión 26 y 20 veces	Montagu <i>et al.</i> , 2016.
AE <i>T. vulgaris</i> AE <i>L. graveolens</i>	<i>S. enterica</i>	Zona de inhibición CMI/CMB	>20 mm 0.5-1 mg/mL	Rubio-Ortega <i>et al.</i> , 2018
AE <i>L. alba</i> y Citral	<i>S. aureus</i>	Inhibición de biopelículas	AE <i>L. alba</i> y citral: 0.5mg/mL	Porfirio <i>et al.</i> , 2017
AE <i>L. berlandieri</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Inhibición de	250-600 mg/L	Reyes-Jurado

		biopelículas		<i>et al., 2020</i>
<i>S. Typhimurium</i>				
<i>Trans-Cinamaldehído</i> <i>Eugenol</i> Antibióticos $\beta$ -lactámicos y monobactámicos	<i>A. baumannii</i>	Expresión de genes de resistencia y bombas de eflujo	CMI: 4 mM Supresión de bomba AdeABC. Reducción de <i>blaP</i> , <i>mdrp</i> 3x y <i>adeA</i> y <i>adeB</i> 3-14x	Karumathil <i>et al.</i> , 2018
AE <i>L. pubescens</i> Carvacrol	<i>A. baumannii</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>S. sonnei</i> , <i>E. faecalis</i> y <i>S. epidermidis</i>	CMI CMB Zona de inhibición	CMI y CMB AE: 78-312 $\mu$ g/mL y 156-625 $\mu$ g/mL CMI y CMB carvacrol: 250-500 $\mu$ g/mL y 500-1000 $\mu$ g/mL Zona de 12-24 mm	El-Said <i>et al.</i> , 2021
AE <i>Ocimum basilicum</i> <i>T. capitatus</i> , <i>M. alternifolia</i> y <i>T. vulgaris</i>	<i>A. baumannii</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i>	CMI CMB	<i>M. alternifolia</i> : 0.12-1.50 (%v/v). <i>T. capitatus</i> y <i>T. vulgaris</i> : 0.5->4 (%v/v). <i>O. basilicum</i> : >4 (%v/v)	Sakkas <i>et al.</i> , 2016
Capsaicina Colistin	<i>A. baumannii</i>	Sinergismo Regulación de genes	ICIF= 0.03-0.06 Incrementan 271 genes Disminuyen 327 genes Inhibición de bombas de eflujo	Guo <i>et al.</i> , 2021
Polimixina B AE <i>O. vulgare</i>	<i>A. baumannii</i>	CMI Sinergismo	CMI= 1.75-3.50 mg/mL ICIF= 0.18-0.37	Amaral <i>et al.</i> , 2020
Carvacrol Meropenem	<i>K. pneumoniae</i>	CMI Sinergismo	CMI= 32-128 $\mu$ g/mL ICIF=0.5	Köse 2022
AE <i>O. vulgare</i>	<i>A. baumannii</i> <i>P. aeruginosa</i>	CMI	13.78-62.5 $\mu$ L/mL	Jan <i>et al.</i> , 2020
Extracto de <i>O. vulgare</i>	<i>P. aeruginosa</i>	CMI	6.3-25 $\mu$ g/mL	Coccimiglio <i>et al.</i> , 2016
AE <i>L. graveolens</i>	<i>P. fragi</i> <i>Salmonella</i> sp	Zon de inhibición	24.82 – 24.95 mm 24.85 – 29.23 mm	Hernández-Hernández <i>et al.</i> , 2014

AE: Aceite Esencial

A pesar de que existen estas investigaciones más completas, son pocas las que contemplan técnicas de evaluación menos convencionales, especialmente en las especies vegetales y bacterianas de interés en este proyecto, por lo que es necesario progresar en esta área. Además, a pesar de que estos análisis representan un gran avance contra la resistencia a los antibióticos, exhiben áreas aún

no exploradas, por lo que utilizar fuentes vegetales en condiciones distintas ayudaría a que esta alternativa sea más sólida.

### 2.3. Capacidad Antibacteriana de Orégano Mexicano *Lippia graveolens* y *Origanum vulgare*

Como es de notarse, la actividad antibacteriana atribuida a los aceites esenciales de orégano, así como a uno de sus componentes principales el carvacrol, está bien documentada, incluso para las especies bacterianas de interés en la investigación, por lo que el orégano representa una buena opción frente a la resistencia a los antibióticos. La mayoría de los artículos reporta dicha actividad con la especie de orégano europeo *O. vulgare*, sin embargo, México cuenta con otras especies, como *L. graveolens*, cuya composición química varía y ha sido poco estudiada (Díaz-De León *et al.*, 2020). En estas variedades de orégano también ha sido probada su actividad antibacteriana, pero en menor proporción que su contraparte europea. Por lo tanto, esta sección se centrará en mostrar las diferencias existentes entre el *O. vulgare* y *L. graveolens*, dando mayor atención a la variante mexicana.

Aunque ambas especies suelen denominarse comúnmente como “orégano”, lo cierto es que cada una exhibe ciertas particularidades químicas que derivan en sus diferencias. Primeramente, el orégano es una planta que suele agruparse en 4 familias distintas, a saber, las familias *Lamiaceae*, *Verbenaceae*, *Asteraceae* y *Fabaceae* (Díaz-De León *et al.*, 2020). Mientras que *O. vulgare* pertenece a la familia *Lamiaceae*, *L. graveolens* lo hace a *Verbenaceae*, volviéndolos distintos, principalmente en la proporción de sus constituyentes, ya que generalmente el timol es más abundante en la primera familia y el carvacrol en la segunda (Soltani *et al.*, 2021; Díaz-De León *et al.*, 2020). Ahora bien, según su naturaleza, los compuestos bioactivos del orégano suelen dividirse en compuestos volátiles, principalmente los que constituyen los aceites esenciales, y compuestos no volátiles, como los flavonoides o ácidos fenólicos (Soltani *et al.*, 2021). Precisamente, entre los principales constituyentes de estos aceites esenciales destacan los terpenos, siendo el carvacrol, timol,  $\gamma$ -terpineno y *p*-cimeno los más abundantes, seguidos por terpinen-4-ol, linalool,  $\beta$ -mirceno, hidrato de *trans*-sabineno y  $\beta$ -cariofileno (Leyva-López *et al.*, 2017).

Aunado a los compuestos ya mencionados, Bautista-Hernández *et al.*, (2021) reportan en adición

como compuestos importantes en los aceites esenciales de *L.graveolens* al  $\alpha$ -humeleno, óxido de cariofileno y 1,8-cineol. Además, en los extractos fenólicos de los diferentes tipos de aislamiento se mencionan compuestos como O-hexósido de quercetina, luteolina-glucurónido-glucósido, ácido litospérmico, eriodictiol, naringenina, sakuranetina, cirsimaritina, crisoeriol, entre otros. Por su parte, en el artículo de Leyva-López *et al.*, (2017) se hace mención de la distinta composición química del aceite esencial de *O. vulgare*, dependiendo del sitio de estudio y la especie. Se tiene pues que algunos compuestos distintos entre los ya mencionados se encuentran el cis- $\beta$ -terpineol,  $\beta$ -citronelol, acetato de citronelol,  $\beta$ -citronelal, geraniol, germacreno D-4-ol, sabineno, éter metílico de carvacrol y espatulenol. Por su parte, otros constituyentes importantes son el ácido rosmarínico, luteolina y apigenina (Soltani *et al.*, 2021). Aunque se observe semejanza en algunos constituyentes, esas ligeras diferencias en la concentración de alguno de ellos o incluso la presencia o ausencia de otro, puede provocar cambios significativos.

De manera específica, dado que la composición química determina las distinciones entre las especies de orégano, debe tomarse en cuenta que aquella puede verse afectada por varios factores al igual que el porcentaje de rendimiento. Primeramente, se destacan las condiciones durante el desarrollo de la planta como la cuestión climática (% de humedad, temperatura, etc.), ubicación geográfica, calidad del suelo, patógenos que lo afecten, sitio anatómico de extracción, incluso la época del año (Leyva-López *et al.*, 2017; Soltani *et al.*, 2021). Además, factores como la técnica de secado y extracción, al igual que cuestiones intrínsecas (Leyva-López *et al.*, 2017; Jan *et al.*, 2020) como el polimorfismo sexual, también se ven involucrados. Por ejemplo, en la revisión llevada a cabo por Leyva-López *et al.*, (2017), se menciona que utilizar extracción por microondas permite un mayor porcentaje de rendimiento y concentración de carvacrol, en contraste con usar hidrodestilación. Por lo tanto, las variaciones en las especies de orégano parte de su composición química, sin embargo, esta se ve influida no sólo por su naturaleza *per se*, sino también por otros factores como los descritos.

En concordancia a lo anterior, los compuestos derivados de plantas se han utilizado de manera tradicional en diversas aplicaciones, tanto en el ámbito de la salud como en la alimentación. Es precisamente por esto que la composición química de estos productos cobra relevancia, pues ésta es la responsable de la variedad en las propiedades biológicas (Cortés-Chitala *et al.*, 2021). El orégano, independientemente de la especie, suele utilizarse como condimento, saborizante y remedio casero en varias condiciones médicas, como enfermedades respiratorias, estomacales y

urinarias, así como analgésicos en condiciones articulares (Soltani *et al.*, 2021). Esta versatilidad se debe a sus variadas propiedades biológicas, destacando los potenciales efectos antioxidantes, conservadores, antiinflamatorios, antiproliferativos, inmunomoduladores, antialérgicos, antipiréticos, abortivos, antiparasitarios, antifúngicos y antibacterianos (Lu *et al.*, 2018; González-Trujano *et al.*, 2017; Bautista-Hernández. *et al.*, 2021). Es debido a tales propiedades que el orégano ha destacado como una planta promisoriosa y ha permitido su estudio en varios campos de interés.

El número de investigaciones sobre las capacidades biológicas del orégano ha sido bien documentado, por lo que se destacan algunos de estos estudios. En cuanto a la actividad antiproliferativa, Irrera *et al.*, (2020) demostraron que el  $\beta$ -cariofileno fue capaz de reducir la viabilidad de células de glioblastoma, a partir de la inhibición del ciclo celular y el aumento de apoptosis. Además, también se observó acción antiinflamatoria por reducción de NF- $\kappa$ B, activación de PPAR $\gamma$  y disminución de TNF- $\alpha$ . Por su parte, el estudio realizado por Jan *et al.*, (2020) demostró la capacidad antioxidante de *O. vulgare*, observándose eliminación significativa de ABTS<sup>+</sup> con valores del 15-49% para el aceite esencial. De igual manera, Cortés-Chitala *et al.*, (2021) demostraron valores de DPPH de 7.54 a 8.80 mg EqTx/mL (equivalentes Trolox) en *L. graveolens*. Además, la capacidad ansiolítica de los extractos de esta especie se observó a partir de concentraciones de 1mg/kg, y un mayor porcentaje de timol en el extracto con hexano (González-Trujano *et al.*, 2017). Aunque el orégano presenta otras propiedades, estos ejemplos permiten conocer un poco de su amplitud, sin embargo, en esta investigación el interés se centra en la actividad antibacteriana, por lo que se abordarán algunos detalles.

Tomando como referencia los estudios citados en la sección 3, y en base a algunos otros, como los de Soltani *et al.*, (2021) y Lu *et al.*, (2018), no cabe duda de que el aceite esencial de orégano ha demostrado ser efectivo contra diferentes especies bacterianas. Ahora bien, es importante dilucidar la razón por la cual el orégano presenta esta capacidad. Tanto en *O. vulgare* como *L. graveolens*, dicha actividad es atribuida en gran medida a sus componentes principales, el carvacrol y timol, aunque los demás constituyentes sin duda juegan un papel importante y potencian el efecto antibacteriano (Reyes-Jurado *et al.*, 2020; Leyva-López *et al.*, 2017). Más precisamente, algunos estudios han profundizado sobre cómo estos compuestos llevan a cabo su actividad. En la revisión de Sarrazin *et al.*, en 2015, se menciona como elemento clave “el grupo hidroxilo y la presencia [...] de electrones deslocalizados”, pues su distribución vuelve más hidrofóbicos a los compuestos,



lo que se relaciona con mayor interacción en membrana. Esta propuesta permitiría entender porque el aceite esencial de orégano es capaz de eliminar tanto a bacterias Gram negativas como positivas. Adicionalmente, se han realizado otros estudios que permiten ampliar el conocimiento relacionado a los aceites esenciales de orégano. Es importante enfatizar, como lo mencionan Reyes-Jurado *et al.*, (2020), que la capacidad antibacteriana de estos compuestos resulta de un conjunto de acciones sobre diferentes objetivos que finalmente derivan en dicho efecto. En este mismo artículo se propone que el aceite esencial de orégano actúa sobre la membrana celular, especialmente en proteínas y lípidos, lo que conlleva una afección en los diversos sistemas asociados a la misma, como el energético. De igual manera, se menciona que el carvacrol es capaz de causar variaciones en la permeabilidad iónica de la misma, principalmente de  $K^+$  e  $H^+$ , lo cual termina llevándolas a la muerte. Algunos otros procesos implicados en la actividad antibacteriana de estos aceites son la inhibición de ciertas enzimas y mecanismos de resistencia, como bombas de eflujo, así como la eliminación de biopelículas y daños a la pared celular (Soltani *et al.*, 2021). En suma, esta información sobre la actividad antibacteriana del orégano permite una mejor comprensión de su efectividad, sin embargo, algunas de estas áreas aún requieren de investigaciones más precisas.

#### 2.4. Efecto Potencial de *Lippia graveolens* Contra Complejos Bacterianos Multiespecie y de su Acción Sinérgica con Antibióticos Convencionales

Ante la creciente problemática de las bacterias farmacorresistentes y la variedad en las condiciones que se presentan o pudieran hacerlo, resulta relevante y urgente atender dicho fenómeno sobre todo en patógenos de prioridad crítica como *A. baumannii* y *P. aeruginosa*. Estas son especialmente de interés dado que su tratamiento es cada vez más difícil y las tasas de mortalidad son muy elevadas. Es por esto que las valoraciones antibacterianas donde se involucren compuestos vegetales necesitan ampliar sus horizontes y contemplar áreas distintas, incluso poco exploradas, como las evaluaciones conjuntas con medicamentos o bien, las evaluaciones en complejos multiespecie. Dado que la actividad antibacteriana mostrada por *L. graveolens* es evidente, esta especie resulta una excelente propuesta para este tipo de valoraciones. Por lo tanto, esta sección está encaminada a reflejar el potencial de *L. graveolens* como una alternativa eficiente.

### 2.4.1. Relevancia y Características de los Co-cultivos

La manera cotidiana de iniciar el proceso de caracterización de las especies microbiológicas suele ser la técnica de cultivo en medios artificiales sólidos o líquidos. Si el interés es el de evaluar solo una especie o cepa en particular, lo que se busca es lograr un aislamiento individual sin contaminación para así comenzar su estudio, y esta técnica recibe el nombre de cultivos axénicos (Lee *et al.*, 2021). Esta práctica es lo que se realiza de manera cotidiana desde hace tiempo, sin embargo, el crecimiento de los microorganismos en la naturaleza no se presenta de la misma manera, por lo que el estudio bajo estas condiciones resulta limitado. Una técnica alternativa para hacer frente a estas variaciones recibe el nombre de co-cultivos, cuyo objetivo es tratar de imitar en el laboratorio el ambiente de desarrollo natural de los microorganismos de estudio, contemplando el crecimiento conjunto de más de una especie (Maglangit *et al.*, 2020). El co-cultivo es capaz de brindar información valiosa sobre el comportamiento bacteriano, por lo que resulta imprescindible ahondar en su relevancia como medio de conocimiento.

Más allá de las condiciones ambientales cotidianas como temperatura, humedad y nutrientes, uno de los principales factores que influyen en el crecimiento de microorganismos es la existencia de otros en el mismo entorno. En el medio ambiente, el crecimiento aislado de bacterias es raro, más bien se encuentran en constante interacción con otros microorganismos, lo que conlleva a que su comportamiento físico y bioquímico sea distinto al que se observa en un cultivo axénico de laboratorio (Maglangit *et al.*, 2020). Como respuesta a esta interacción, las bacterias exhiben cambios en su comportamiento fenotípico para adaptarse a las nuevas condiciones, permitiendo la aparición de relaciones antagónicas, mutualistas o comensales, e incluso la síntesis de productos bioactivos (Khan *et al.*, 2018; Maglangit *et al.*, 2020). Precisamente para comprender cómo es que se presentan dichas interacciones, en el laboratorio se emplea la técnica de co-cultivos, los cuales pueden realizarse tanto en medios sólidos como líquidos (Chan *et al.*, 2018; Maglangit *et al.*, 2020). Sin embargo, al momento de realizar este procedimiento es necesario contemplar otras variantes, las cuales se mencionan a continuación.

Primeramente, se debe delimitar cuáles serán las especies que integrarán el co-cultivo, lo cual suele estar en función de lo que se pretenda investigar, ya que la propia naturaleza de las bacterias puede influir en el desarrollo del sistema (Gao *et al.*, 2021). Además, deben elegirse las condiciones

ambientales de cultivo adecuadas que permitan el crecimiento, como la fuente de nutrientes, la temperatura, entre otros, ya que esto puede determinar el tipo de relación entre ellas (Khan *et al.*, 2018). Otra de las consideraciones es la concentración inicial de los agentes biológicos en el co-cultivo, ya que comúnmente la relación entre estos no siempre conserva sus proporciones en el desarrollo de la técnica. Se ha demostrado que estas influyen significativamente en la regulación de la capacidad metabólica (Gao *et al.*, 2021). También debe definirse la finalidad de la técnica, ya sea evaluar la interacción entre las especies o la recuperación de los metabolitos producidos, en cuyo caso pueden realizarse co-cultivos que separen físicamente a los microorganismos, pero permita el intercambio de sustancias (Maglangit *et al.*, 2020). No regular de manera eficiente condiciones como las anteriores puede derivar en resultados poco adecuados y no reflejar las condiciones más complejas presentadas en las coinfecciones o la naturaleza.

Los co-cultivos son relevantes ya que permiten “el estudio de las interacciones entre especies, el desarrollo de biofilms multiespecies, la regulación de la dinámica de la comunidad bacteriana y la construcción de comunidades sintéticas con funcionalidades específicas” (Gao *et al.*, 2021). Sin embargo, la razón más obvia responde a que el uso de co-cultivos puede mostrar cómo sería la interacción entre varios microorganismos involucrados en una infección, de manera directa o indirecta, siendo los patógenos resistentes los de mayor interés (Chan *et al.*, 2018). Estos procesos de co-infección, también conocidos como infecciones polimicrobianas, suelen ser más difíciles de tratar y ocasionan mayor daño, ya que como se ha observado en formaciones de biopelículas interespecie, en ocasiones se presenta una mayor resistencia (Cendra *et al.*, 2019; Barraza y Whiteley, 2021). Por lo tanto, los avances que el uso de esta técnica podría otorgar en la resolución de los problemas de infección y resistencia son considerables, pues se tendría mayor campo de conocimiento.

En cuanto a los modelos de estudio reportados, estos han sido variados y la mayoría se han enfocado en el análisis de características como la producción de metabolitos secundarios o la interacción de las especies involucradas, más que evaluaciones antimicrobianas. Por citar algunos, Khan *et al.*, (2018) estudiaron el cambio en las interacciones entre *Halomonas* sp. HL-48 y *Marinobacter* sp. HL-58 al utilizar distintas fuentes de carbono (glucosa y xilosa), observando cambios en los fenotipos moleculares por dicha variación. Por su lado, Chan *et al.*, (2018) realizaron combinaciones de co-cultivo entre un patógeno MDR y otro agente alternando entre otro MDR, un microorganismo comensal, un probiótico y fibroblastos humanos. Fue de especial interés

el co-cultivo entre *K. pneumoniae* y *A. baumannii* MDR, mostrando regulación de 909 y 388 genes, respectivamente, observándose regulación hacia arriba de genes de MDR en *A. baumannii*. Además, Maglangit *et al.*, (2020) reportaron el co-cultivo de *Streptomyces* sp.MA37 con *Pseudomonas* sp. donde se observaba la producción del metabolito alcaloide de pirroloindolocarbazol, BE-13793C, el cual era característico sólo del co-cultivo, pero no de los monocultivos.

Ahora bien, en cuanto a las evaluaciones antibacterianas, los modelos reportados son escasos, sobre todo en el uso de compuestos vegetales. El estudio realizado por Barraza y Whiteley (2021) informó que en el co-cultivo entre *P. aeruginosa* y *S. aureus* se producía N-óxido de 2-heptil-4-hidroxiquinolina, que afecta la fisiología de *S. aureus* y aumenta la susceptibilidad a ciertos antimicrobianos. Aunque propiamente no se buscó estudiar dicho compuesto para aplicaciones como agente antibacteriano, esta característica se presentó y fue evaluada. Por su parte, Tamanai-Shacoori *et al.*, (2014) informaron que la combinación de zeolita de plata con extractos fenólicos de *Ascophyllum nodosum* era capaz de reducir la biopelícula resultante del co-cultivo entre *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus gordonii*. A su vez, Boulanger *et al.*, (2015) evaluaron la adición del alcaloide vegetal tomatidina sobre un co-cultivo de *P. aeruginosa* y *S. aureus*, donde se observó un efecto bactericida significativo. Aunque el estudio de otros elementos antimicrobianos en estas condiciones de cultivos es escaso, permite sentar precedentes que sirvan de guía para futuras evaluaciones.

Aunque se habla de una evaluación en biopelícula formada por *P. aeruginosa* y *A. baumannii* (Zhang *et al.*, 2017) no se ha informado como tal un co-cultivo por lo que esta práctica permitirá evaluar la actividad de *L. graveolens* ante las nuevas condiciones de crecimiento. Sin embargo, se observa que los reportes de coinfección entre estos patógenos son escasos e incluso no se ahonda lo suficiente, como lo reporta Medell-Gago *et al.*, (2012), donde solo el 8.33% de los pacientes presentaban esta condición. Una posible explicación al casi nulo aislamiento conjunto de estos dos microorganismos en condiciones clínicas puede ser la propuesta por Wu y Hu (2020) que informa la ausencia de coinfección como un factor predisponente de la instalación de *A. baumannii*. Como puede notarse, a pesar de que la capacidad antibacteriana de algunos compuestos ha sido probada, aún hacen falta modelos que involucren las especies de interés bajo condiciones distintas, no obstante, el efecto potencial de *L. graveolens* también se justifica por su capacidad en monocultivos.

## 2.4.2. Evaluaciones Conjuntas de Compuesto Vegetal-Antibiótico

Resulta evidente que los compuestos vegetales poseen gran cantidad de propiedades bioactivas, sin embargo, esta investigación destaca la capacidad antibacteriana puesto que la crisis de resistencia a los antibióticos obliga a la búsqueda de nuevas soluciones. En este sentido, los aceites esenciales son capaces de mostrar una actividad antibacteriana significativa, incluso mayor que sus componentes individuales, pero estos a su vez contribuyen a la efectividad de aquellos a través de acciones conjuntas. Es en esta idea que se basa la formación de complejos antibacterianos a través de la combinación de este tipo de agentes. Sin embargo, en estos complejos pueden presentarse diferentes efectos derivados de la combinación, pudiendo ser estos sinérgicos, antagónicos e indiferentes. En el efecto antagónico, la actividad antibacteriana de la combinación es menor que las actividades de los compuestos individuales; a su vez, el efecto indiferente se refiere a aquel fenómeno donde la actividad antibacteriana de la combinación es la resultante solo del antibacteriano más efectivo. Finalmente, el efecto sinérgico es definido cuando la actividad antibacteriana final de la combinación es mayor que la estimada por la suma de cada acción individual de los agentes (Cho *et al.*, 2020; Canut-Blasco *et al.*, 2020).

En aquellas combinaciones que presenten actividad sinérgica se fundamenta la idea de que la formación de complejos antimicrobianos puede potenciar la actividad de los mismos o hacerlos más efectivos. Además, se ha observado que al llevar a cabo estas combinaciones se reducen riesgos debido a algún posible efecto adverso de los compuestos o incluso, se aumenta la sensibilidad a algunos agentes antibacterianos en los microorganismos (Basavegowda *et al.*, 2020). Por lo tanto, es posible considerar el efecto sinérgico entre los compuestos de origen vegetal, (ej. aceite esencial de *L. graveolens*) y antibióticos, esto como una alternativa que aumente la sensibilidad a los mismos. Esta orientación en el campo de las terapias antimicrobianas se muestra como una opción necesaria y prometedora que ha logrado destacar por sus resultados experimentales.

Varios investigadores han profundizado en el área que contempla la evaluación conjunta de agentes antimicrobianos. En este campo, las terapias de antibióticos combinados es lo más usual y estudiado. No obstante, los compuestos vegetales, parecen de especial interés ya que se propone que la combinación de aceites esenciales con otros antimicrobianos puede actuar de manera distinta

y conjunta, lo cual actúa a favor en la lucha contra la resistencia (Basavegowda *et al.*, 2020). Esto es lo que se ha demostrado en algunos estudios como el realizado por Guo *et al.*, (2021), donde se utilizó la combinación de capsaicina y colistina frente a cepas de referencia y aislados clínicos de *A. baumannii*, observando un aumento en la sensibilidad al antibiótico, daño a membrana y regulación de la resistencia. Sobre la misma especie bacteriana, otro estudio probó la actividad sinérgica de polimixina B con aceite esencial de *O. vulgare* y observaron una reducción de 16 veces en la CMI del medicamento debido a la combinación con el compuesto vegetal (Amaral *et al.*, 2021).

Por otro lado, en cuanto al uso de compuestos individuales, Karumathil *et al.*, (2018) llevaron a cabo el estudio del efecto sinérgico producido por el eugenol y trans-cinamaldehído al ser combinado cada uno con 7 antibióticos  $\beta$ -lactámicos sobre aislados de *A. baumannii* MDR. Se observó que estas combinaciones aumentan la sensibilidad de las cepas a dichos antibióticos, inhiben la bomba de expulsión AdeABC y regulación a la baja de algunos genes de resistencia, como blaP. A su vez, Köse (2022), probó la combinación carvacrol-meropenem sobre cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos observando sinergia entre estos agentes en 8 de las 25 cepas. Además, se obtuvo un porcentaje de viabilidad de 35.47% después de 24 horas de exposición. Según la información disponible hasta el momento, el uso de aceite esencial de *L. graveolens* en combinación con algún antibiótico no ha sido reportado.

No obstante, con base a la evidencia en su análogo europeo y el carvacrol, se puede afirmar que esta especie es una fuente antibacteriana efectiva contra *P. aeruginosa* y *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos y que podría producir un efecto sinérgico al ser evaluado con algún antibiótico de esta familia. Es con base a lo anterior que surge la pregunta de investigación: ¿Cuál es el efecto de las combinaciones de aceite esencial de *Lippia graveolens* o carvacrol con el antibiótico imipenem sobre la viabilidad y virulencia de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* cultivadas en forma axénica y en co-cultivos?

### 3. HIPÓTESIS

Las combinaciones de aceite esencial de *Lippia graveolens* o carvacrol con el antibiótico imipenem causarán un efecto sinérgico al disminuir la viabilidad y virulencia de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* cultivadas en forma axénica y en co-cultivos.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Evaluar el efecto sinérgico de las combinaciones de aceite esencial de *Lippia graveolens* o carvacrol con imipenem en la disminución de la viabilidad y virulencia de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* cultivadas en forma axénica y en co-cultivos.

### 4.2. Objetivos Específicos

- Evaluar la capacidad antibacteriana del aceite esencial de *L. graveolens*, carvacrol e imipenem sobre *P. aeruginosa* y *A. baumannii* en cultivos axénicos y co-cultivos.
- Determinar el efecto de las combinaciones de aceite esencial *L. graveolens*-imipenem y carvacrol-imipenem sobre *P. aeruginosa* y *A. baumannii* cultivadas en forma axénica y co-cultivo.
- Analizar el efecto de la combinación de aceite esencial de *L. graveolens*-imipenem y carvacrol-imipenem sobre la formación de biopelículas *P. aeruginosa* y *A. baumannii* y su co-cultivo en tubos endotraqueales
- Evaluar *In Silico* las interacciones entre las enzimas OXA-51 e IMP-1 con los ligandos carvacrol, timol e imipenem.



## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Evaluación de la Capacidad Antibacteriana del Aceite Esencial de *L. graveolens*, Carvacrol e Imipenem Sobre *P. aeruginosa* y *A. baumannii* en Cultivo Axénico y Co-cultivo.

#### 5.1.1. Condiciones Para el Co-cultivo

Para establecer el crecimiento de co-cultivo se tomó como base la metodología propuesta por Chan *et al.*, en (2018), Gao *et al.*, (2021), realizando algunas modificaciones. Las cepas utilizadas fueron *A. baumannii* (ATCC® 19606) y *P. aeruginosa* (ATCC® 10145), las cuales se cultivaron inicial e individualmente en caldo Luria Bertani (LB, Sigma Aldrich, México) por 18-24 h a 37 °C y posteriormente se ajustó cada inóculo a densidad óptica (D.O.) 600nm hasta una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/mL en fase logarítmica de crecimiento. Posteriormente, se tomaron concentraciones iguales en proporciones de volumen 1:2, 1:1000 y 1000:1 de cada especie para combinarse y dejarse incubando a 37 °C por 18-24 h. Finalmente, se realizaron diluciones seriadas para disminuir concentración en  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-7}$  y se inocularon 100  $\mu$ L del co-cultivo por siembra masiva a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/mL en placa de agar LB por triplicado, incubándose a 37 °C por 18-24 h. Para comprobar el éxito del co-cultivo se realizó una detección de ambas cepas por medio de inspección visual de las diferentes morfologías coloniales.

#### 5.1.2. Establecimiento de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) y Bactericidas (CMB) de *L. graveolens*, Carvacrol e Imipenem Sobre *P. aeruginosa* y *A. baumannii*.

Para determinar la CMI y CMB del aceite esencial de *L. graveolens* (Ore aceite de orégano de Chihuahua), carvacrol (Sigma Aldrich, México) e imipenem (Sensimitina, México, 500 mg/500 mg polvo para solución) se tomaron como base las metodologías propuestas por Bernal (2019), modificada del CLSI. Las diversas concentraciones de carvacrol (0-2.25 mg/mL), aceite esencial de *L. graveolens* (0-20 mg/mL) e imipenem (0-2  $\mu$ g) fueron evaluadas individualmente contra las

cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* en su forma axénica y co-cultivadas. En estas pruebas se utilizó la técnica de microdiluciones seriadas. Para esto, se usó una microplaca (Costar 96 de poliestireno) donde en cada pocillo se inocularon 5µL de un cultivo ajustado a  $10^8$  UFC/mL para obtener una concentración final de  $10^5$  UFC/mL y se añadieron 300 µL de cada antibacteriano a las diferentes concentraciones propuestas, incubándose a 37 °C por 24 h. Los antibacterianos se prepararon en caldo LB (Merck) y se utilizaron 100 µL de DMSO (Merck) para lograr una mejor solubilidad del aceite y carvacrol. Se identificaron las diluciones donde se observó inhibición, y se inocularon 20 µL de cada dilución identificada en placas con 20 mL de agar Mueller-Hinton libre del agente antimicrobiano. La CMI se estableció como la menor concentración de los tratamientos capaz de inhibir completamente el crecimiento bacteriano. Por otro lado, para la CMB se definió como aquella concentración más baja de los antibacterianos que inhibió completamente el crecimiento, causando pérdida de viabilidad. Estas determinaciones se hicieron por triplicado.

## 5.2. Efecto de las Combinaciones de Aceite Esencial *L. graveolens*-Imipenem y Carvacrol-Imipenem Sobre Cultivos Axénicos y Co-cultivos de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*

Para el análisis de las combinaciones de los antibacterianos se empleó el método propuesto por Guo *et al.*, (2021) y Canut-Blasco *et al.*, (2020) de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, adaptado a los nuevos elementos. Se establecieron diferentes fracciones de concentración en base al CMI de cada agente antibacteriano frente a los cultivos utilizados. Se utilizó una placa de microtitulación de 96 pocillos (Costar 96: Lector Fluostar Omega, BMG Labtech de 12 columnas y 8 filas) y se inocularon los pocillos correspondientes con 100 µL de una suspensión bacteriana a la concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/mL de la cepa a evaluar. Por su parte, el carvacrol, al igual que el aceite esencial, fueron distribuidos en cada columna, mientras que las concentraciones de imipenem se colocaron en cada fila. A cada pocillo con el inóculo ajustado, se le agregó la concentración requerida de antibacteriano hasta un volumen final de 200 µL (50 µL de cada antibacteriano). Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h y finalmente se determinó la densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro Fluostar Omega, BMG Labtech. Para el cálculo de la concentración inhibitoria fraccional (CIF) de cada antibacteriano se usaron las siguientes fórmulas:

$$CIF \text{ del compuesto vegetal (CV)} = \frac{CMI \text{ del CV en combinación con el antibiótico}}{CMI \text{ del CV}} \quad (1)$$

$$CIF \text{ del antibiótico} = \frac{CMI \text{ del antibiótico en combinación con el CV}}{CMI \text{ del antibiótico}} \quad (2)$$

Donde, CV es el aceite de *L. graveolens* o el carvacrol, respectivamente. Para obtener el Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional (ICIF) de la combinación se usa la siguiente ecuación (3):

$$ICIF = CIF \text{ CV} + CIF \text{ antibiótico} \quad (3)$$

Y se interpreta como sigue ( $\sum CIF = ICIF$ ):

- $\sum CIF \leq 0.5$ : combinación con efecto sinérgico.
- $0.5 < \sum CIF \leq 4$ : combinación indiferente o sin interacción.
- $\sum CIF > 4$ : combinación con efecto antagónico.

### 5.3. Efecto de la Evaluación Individual de Aceite Esencial de *L. graveolens* y Carvacrol, así Como su Combinación con Imipenem Sobre las Biopelículas de *P. aeruginosa*, *A. baumannii* y su Co-Cultivo Sobre Tubos Endotraqueales.

Para realizar las siguientes dos metodologías se tomó como base el procedimiento propuesto por Bernal (2019) y Tapia (2018), con algunas modificaciones.

### **5.3.1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de Biopelículas de *L. graveolens*, Carvacrol y su Combinación con Imipenem Sobre *P. aeruginosa* y *A. baumannii*.**

Para la formación de biopelículas, se colocaron asépticamente porciones de 1 cm de longitud de tubo endotraqueal (14 mm) dentro de tubos de ensayo con 5 mL de caldo LB. En la evaluación del aceite esencial, a cada tubo se le agregó una concentración diferente (de 0.15-7.5 mg/mL) preparado con 4 % de DMSO. Para el carvacrol, se tomaron concentraciones de 0.15-6 mg/mL (Tapia, 2018), mientras que para la combinación compuesto vegetal-antibiótico se tomaron como base los resultados obtenidos de la técnica de tablero de ajedrez. Posteriormente, inóculos bacterianos previamente incubados por 19 h a 37 °C en caldo LB, se ajustaron en los tubos hasta una concentración final de  $1 \times 10^6$  UFC/mL y se incubaron durante 24 h a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo, las porciones de tubo endotraqueal se retiraron del medio para ser lavadas con agua destilada y se colocaron en 5 mL de solución salina para someterse a ultrasonido (42 KHz) por 5 min a 25 °C. Con el material resultante se realizaron diluciones seriadas para determinar la cantidad de bacterias adheridas por unidad de área (Log UFC/cm<sup>2</sup>), para lo cual se inocularon en agar LB por 24 h a 37 °C. La concentración mínima inhibitoria de formación de biopelícula (CMIB) se estableció como la concentración más baja del agente antibacteriano que inhibe la adhesión de la bacteria sin afectar la viabilidad de células planctónicas.

### **5.3.2. Análisis de Cambios Morfológicos de biopelículas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* Expuestas a Carvacrol, Aceite esencial de *L. graveolens* y su Combinación con Imipenem por Microscopía de Fluorescencia**

Para observar las variaciones en la constitución morfológica de las biopelículas formadas por estos microorganismos al ser expuestas al aceite esencial, al carvacrol y sus combinaciones con imipenem, se tomaron como base los procedimientos propuestos por Bernal (2019) y Tapia (2018). Con fines de lograr una mejor visualización se usaron superficies de vidrio de 1 cm<sup>2</sup> (cubreobjetos) para formar las biopelículas. Este material se colocó en un recipiente estéril con caldo LB y se añadió primeramente un inóculo bacteriano ajustando la concentración a  $1 \times 10^6$  UFC/mL, para incubarse a una temperatura de 37°C por un periodo de 24 h. Estas biopelículas se desarrollaron

mientras son expuestas a una concentración menor que la CMIB de cada compuesto vegetal o su combinación con el antibiótico. Se usó como referencia una biopelícula formada sin la adición de los componentes antibacterianos. Una vez transcurrido el tiempo propuesto, las superficies de vidrio se lavaron con agua destilada y se tiñeron con Syto 9 al 0.001 % (Invitrogen, ThermoFisher, USA) por un periodo de 30 min, esto con el fin de poder visualizar las bacterias viables. Se utilizó el microscopio invertido de fluorescencia Axio Vert 1 (Carl-Zeiss, EUA) para observar las preparaciones con el objetivo 40x, filtro Alexa Fluor.

#### 5.4. Anclaje Molecular *in Silico* (Docking) de Enzimas OXA-51 e IMP-1 de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* con Carvacrol y Timol.

Para este análisis se realizó un acoplamiento molecular (docking) contemplando los panoramas competitivos con el fin de evaluar los probables sitios de interacción entre las proteínas OXA-51 e IMP-1 expresadas en *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, respectivamente, con el carvacrol, imipenem y timol. Para esto, se tomaron las estructuras de las proteínas OXA-51 (PDB 4ZDX) e-IMP-1 (PDB 1DDK), además de los ligandos carvacrol (PubChem 10364), imipenem (PubChem 104838) y Timol (PubChem 6989) y se realizó el anclaje molecular con el programa AutoDocvina, en el software UCSF Chimera versión 1.16 como visualizador. Para esto, se utilizaron como cuadrículas de afinidad los sitios geométricos formados por las coordenadas mostradas en el cuadro 6 para cada enzima en formato “x”, “y” y “z”. Estos sitios se determinaron basados en aminoácidos clave y sus vecinos, considerando las estructuras cristalográficas previas y su relevancia en la actividad enzimática (Smith, *et al.*, 2015; Concha, *et al.*, 2000). En el cuadro 4 se reporta la información antes mencionada.

**Cuadro 4.** Coordenadas del sitio activo de las enzimas OXA-51 (PDB: 4ZDX) e IMP-1 (PDB: 1DDK) preparadas en el software UCSF Chimera versión 1.16. Se incluyen los aminoácidos presentes en cada región.

Enzima	Centro	Tamaño	Aminoácidos
<b>OXA-51</b>	23.1202 (x)	28.5741 (x)	Lys83, Ser127, Trp166, Lys217,
	30.4202 (y)	30.8404 (y)	Arg260, Ser80, Phe111, Trp114,
	21.6143 (z)	37.1683 (z)	Ile129, Leu167, Ser218, Trp220, Trp222
<b>IMP-1</b>	11.997 (x)	26.9028 (x)	Glu23, Val25, Trp28, Phe51,
	4.0829 (y)	20.7375 (y)	Asp81, His79, His197, His77,
	57.6211 (z)	15.905 (z)	Cys158, His139, Lys161

Con la información anterior, mediante el programa AutoDocvina, se estimaron las energías de afinidad (Kcal/mol) que permitieron determinar las posiciones más favorables entre los potenciales inhibidores y las enzimas en cada interacción. Posteriormente, se utilizó el software Discovery Studio 2021 Client para determinar los tipos de interacciones presentes entre el ligando y la enzima, así como los aminoácidos y átomos participantes en ellas. Finalmente, con el objetivo de analizar el comportamiento del complejo enzima-ligando a través del tiempo y los cambios en su estabilidad, se realizó un análisis de la dinámica molecular mediante el software GROMACS (versión 2023.4) (Van Der Spoel *et al.*, 2005). Para esto las topologías de los ligandos y proteínas se obtuvieron mediante el servidor CHARMM-GUI (<https://www.charmm-gui.org/>), empleando los parámetros de campos de fuerza CHARMM36. El sistema de simulación se definió dentro de 1nm de distancia del complejo proteína-ligando en cada plano, se solvató con modelo de agua TIP3P y neutralizó con iones Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> (0.15 M). Además, el sistema se equilibró y minimizó a través de dos simulaciones de 200 ps a 30 °C, una con NVT (número constante de partículas, volumen y temperatura) y otra con NPT (número constante de partículas, presión y temperatura). Consecutivamente, el tiempo de análisis de la simulación de los sistemas proteína-ligando ya preparados se estableció a 50 nanosegundos en condiciones de 1 atm de presión y 30 °C. Los archivos de trayectoria generados se utilizaron para obtener el RMSD (root mean square deviation, por sus siglas en inglés) y puentes de hidrógeno del complejo proteína-ligando, a través de las herramientas *gmx rms* y *gmx hbond*, y backbone RMSD, radio de giro (*gmx gyrate*), y RMSF (root mean square fluctuation, *gmx rmsf*) de los residuos de la proteína, con el uso de Gromacs. Las gráficas correspondientes se realizaron en el software qtgrace (<https://sourceforge.net/projects/qtgrace/>).

## 5.5. Diseño Experimental y Análisis de Datos

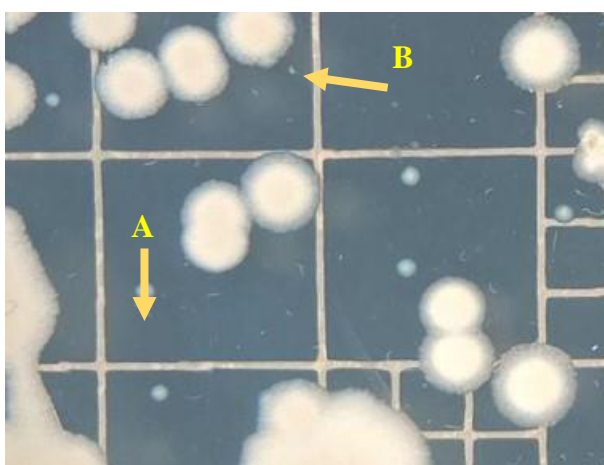
Para el análisis estadístico y experimental de esta investigación se aplicó un manejo de estadística descriptiva. En el apartado 5.1, para la formación del co-cultivo, la variable respuesta fue las UFC/mL de cada bacteria en el co-cultivo y el factor de variación la proporción de inóculo en el co-cultivo. Mientras tanto, en la actividad antibacteriana las variables respuesta fueron las CMI y CMB y los factores de variación las diferentes concentraciones de los antibacterianos. Para la sección 5.2 que contempla la determinación del efecto por las combinaciones de los compuestos vegetales con imipenem, los factores de variación fueron las diferentes concentraciones de los antibacterianos, mientras que la variable respuesta fue el ICIF. Por su lado, el apartado 5.3, el cual contempla el análisis del efecto del carvacrol, el aceite esencial de *L. graveolens* y sus combinaciones con imipenem sobre la formación de biopelículas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, los factores experimentales fueron las diferentes concentraciones de los antibacterianos, mientras que la variable respuesta fue la CMIB.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Evaluación de la Capacidad Antibacteriana del Aceite Esencial de *L. graveolens*, Carvacrol e Imipenem Sobre *P. aeruginosa* y *A. baumannii* en Cultivo Axénico y Co-cultivo.

#### 6.1.1. Formación del Co-cultivo

Con base a su crecimiento axénico, se identificaron dos colonias con características morfológicas distintas (Figura 1), distinguiendo las dos bacterias (Alharbi *et al.*, 2023; Kuei-Hsiang *et al.*, 2012; Valcek *et al.*, 2022; Verma & Verma, 2018; Acharya, 2022); las colonias grandes, circulares, blancas, elevadas y cremosas se identificaron como *A. baumannii*, mientras que las colonias pequeñas, puntuales, circulares, blancas y poco traslucidas se establecieron como *P. aeruginosa*. Se determinó que la proporción 1:1000 con 1  $\mu$ L de *P. aeruginosa* y 999  $\mu$ L de *A. baumannii* permitió el crecimiento óptimo de ambas bacterias en el medio, por lo que las siguientes evaluaciones se realizaron utilizando dicha proporción.



**Figura 1.** Morfología macroscópica de las colonias de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* en co-cultivo proporción 1:1000. A) Colonia particular de *P. aeruginosa* con morfología circular, puntual, pequeña y blanquecina. B) Colonia particular de *A. baumannii* con morfología circular, cremosa, grande y blanquecina.



Posteriormente, se determinó un conteo de colonias del co-cultivo elegido (proporción 1:1000) para establecer la interacción de ambas bacterias, observando una variación en el crecimiento desde 970,000 a 1,100,000 UFC/mL para *A. baumannii* y desde 850,000 a 1,300,000 UFC/mL para *P. aeruginosa*. Expresado en porcentaje, *A. baumannii* representó un 48.89 % del crecimiento total bacteriano, mientras que *P. aeruginosa* obtuvo un 51.11 %, que en comparación con el inóculo inicial, hubo un reajuste a la baja en *A. baumannii* y uno al alza en *P. aeruginosa*. Esto permitió corroborar que efectivamente la proporción utilizada era la adecuada para el crecimiento de ambas bacterias en conjunto, ya que se buscaba que una especie no desplazara a la otra. Según las investigaciones relacionadas a la técnica de co-cultivos, se ha mencionado como un punto determinante la proporción de inóculo inicial para lograr establecer el crecimiento conjunto de los microorganismos implicados, pues se debe contemplar que el crecimiento puede variar en el periodo de incubación y sufrir varias regulaciones hacia la etapa final. Esto mismo se observó en nuestra investigación, pues la concentración final tanto de *A. baumannii* como de *P. aeruginosa* fue diferente al inicio del co-cultivo. Otros de los factores involucrados para establecer eficazmente los co-cultivos son las fuentes de nutrientes a los que se tiene acceso en el medio, ya que su disponibilidad puede regular la población bacteriana por competencia, o bien, favorecer el desarrollo por proceso de comensalismo (Gao *et al.*, 2020; Wu y Hu, 2020).

En este caso particular, el aumento en los niveles de *P. aeruginosa* en comparación con los de *A. baumannii* puede deberse a los múltiples factores de virulencia con los que cuenta aquella bacteria y la producción de sustancias tóxicas para los microorganismos cercanos. Barraza y Whitley (2021) reportaron que en co-cultivos de *P. aeruginosa* y *S. aureus*, la primera de ellas producía ciertos compuestos tóxicos, como N-óxido de 2-heptil-4-hidroxiquinolina, que resultaba en un daño fisiológico para *S. aureus*, lo que derivaba en una mayor susceptibilidad a las condiciones y ocasionaba pérdida de viabilidad. De igual manera, se han reportado estudios de dichas interacciones donde ha ocurrido la lisis de *S. aureus* por acción de LasA (proteínasa alcalina) producida por *P. aeruginosa*. Sin embargo, algunos estudios también han observado interacciones de colaboración, donde *P. aeruginosa* ha brindado protección a *S. aureus* contra daños como la fagocitosis al promover la formación de biopelículas mixtas, o bien, el peptidoglicano producido por *S. aureus* es capaz de aumentar la capacidad lítica y de virulencia de *P. aeruginosa* (Tognon *et al.*, 2019; Michelsen *et al.*, 2014).

Además, Wu y Hu (2020) reportaron que un posible requerimiento para el establecimiento de una

infección por *A. baumannii* puede ser la ausencia de otro microorganismo al inicio del proceso infeccioso. En el co-cultivo planteado, ambos microorganismos se pusieron en contacto al mismo tiempo de desarrollo por lo que esto pudo disminuir la adaptabilidad de *A. baumannii*. Sin embargo, el presente estudio muestra que estas dos bacterias pueden convivir evidenciando un riesgo para la salud humana, ya que ambos microorganismos son responsables de graves enfermedades respiratorias y altas tasas de mortalidad, por lo que su presencia conjunta pudiera significar un peor pronóstico para el paciente. El haber establecido el co-cultivo de ambos microorganismos nos facilita el estudio como un modelo de coinfección y el posible comportamiento de los patógenos. Además, las proporciones establecidas de cada inóculo bacteriano nos permitieron identificar el co-cultivo que se utilizó en las siguientes evaluaciones antibacterianas de los compuestos combinados.

#### **6.1.2. Establecimiento de las CMI y CMB de *L. graveolens*, Carvacrol e Imipenem Sobre *P. aeruginosa* y *A. baumannii* en forma axénica y co-cultivo**

En el cuadro 5 se muestran las dosis de CMI y CMB determinadas. Con base a estos resultados, se observó que fue necesario utilizar mayores dosis de los antibacterianos para establecer las CMB en comparación con las requeridas para las CMI. En *A. baumannii*, la CMB de imipenem fue 2 veces mayor que la CMI; para el aceite esencial, la CMB fue 24 veces mayor en comparación con la CMI, mientras que en el carvacrol la CMB fue 15 veces mayor que la CMI. A su vez, para causar la eliminación del crecimiento de *P. aeruginosa*, se requirió aumentar la dosis de inhibición de imipenem 4 veces. En cuanto al aceite esencial, fue necesario utilizar 2 veces la concentración inhibitoria para causar el efecto bactericida y este mismo comportamiento se observó en el carvacrol donde la CMB guarda una relación 2:1 respecto a la CMI. Por otro lado, se descubrió que se requiere una mayor concentración de los antibacterianos para inhibir y eliminar el crecimiento de *A. baumannii* en comparación con las dosis requeridas en *P. aeruginosa*. Esto se observó en las CMI, pues para inhibir a *P. aeruginosa* con aceite esencial, solo se necesitó el 25% de la concentración utilizada para *A. baumannii*. En el caso del carvacrol, la CMI en *A. baumannii* fue establecida como el doble de la CMI para *P. aeruginosa*, evidenciando que esta última bacteria

fue más sensible. Sin embargo, este comportamiento no fue observado en el antibiótico imipenem, pues las dosis requeridas en ambas bacterias fue la misma.

Además, se determinaron las concentraciones de imipenem, aceite esencial de orégano y carvacrol necesarias para inhibir y eliminar el crecimiento del co-cultivo. Como se muestra en el cuadro 5, las dosis requeridas para el tratamiento de los co-cultivos son mayores en comparación con la dosis de antibacterianos para causar los mismos efectos en los cultivos individuales de cada bacteria. Para el imipenem, se requirió utilizar 2 y 4 veces más antibiótico en el co-cultivo para causar un efecto bactericida en comparación con las dosis utilizadas individualmente en *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, respectivamente. Por otro lado, para el aceite esencial se observó que la CMI del co-cultivo fue 8 veces mayor que la establecida para *P. aeruginosa* y 2 veces mayor que la encontrada para *A. baumannii*. Finalmente, para inhibir el crecimiento conjunto, la dosis requerida de carvacrol representó el doble de la CMI de *A. baumannii*, o bien, el cuádruple de la reportada para *P. aeruginosa*.

**Cuadro 5.** Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y bactericidas (CMB) de imipenem, aceite esencial de *L. graveolens* y carvacrol frente a *P. aeruginosa* y *A. baumannii* en forma axénica y co-cultivo en proporción 1:1000.

Antibacteriano (mg/mL)	<i>A. baumannii</i>		<i>P. aeruginosa</i>		Co-cultivo	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<b>Imipenem</b>	$5 \times 10^{-4}$	$1 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-4}$	$>2 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-4}$	$4 \times 10^{-3}$
<b>Aceite esencial de <i>L. graveolens</i></b>	0.625	>15	0.156	0.312	1.25	>15
<b>Carvacrol</b>	0.150	>2.25	0.075	0.150	0.30	>2.25

Número de replicas >3

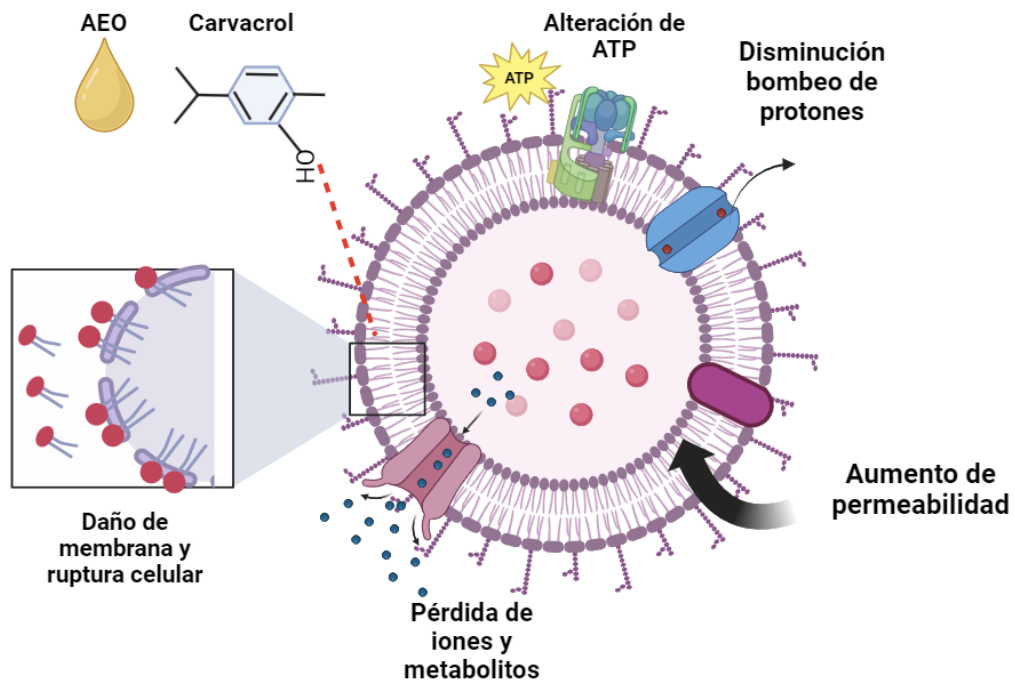
Según el CLSI (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio), se han establecido puntos de corte de imipenem para estos microorganismos basados en sus CMI, de tal manera que para un valor menor o igual a  $2 \times 10^{-3}$  mg/mL, tanto *A. baumannii* como *P. aeruginosa* se clasifican como

microorganismos sensibles (CLSI, 2020). Por lo tanto, las cepas evaluadas en esta investigación presentan sensibilidad al antibiótico imipenem de acuerdo con sus CMI. En cuanto a los otros antibacterianos evaluados, investigaciones previas han reportado las CMI de orégano (*O. vulgare*) frente a estas bacterias y los hallazgos obtenidos en nuestra investigación pueden estimarse dentro de un rango coincidente. Tal es el caso de Lu *et al.*, (2018) quienes estimaron una CMI entre 0.16-0.64 mg/mL para *A. baumannii*, mientras que, De Martino *et al.*, (2009) establecieron la CMI mayor a 0.100 mg/mL para *P. aeruginosa*. Por su parte, para el carvacrol Montagu *et al.*, (2016) estimaron la CMI frente *A. baumannii* en 0.16 mg/mL, mientras que Mechmechani *et al.*, (2022) reportaron una CMI para *P. aeruginosa* de 5 mg/mL. Tal variación en este último resultado puede sugerirse debido a la técnica empleada para dicho análisis, pues estos últimos investigadores utilizaron una carga bacteriana de  $10^{10}$  UFC/mL, en comparación con la utilizada en el presente estudio que fue de  $10^8$  UFC/mL, por lo que se sugiere que al aumentar el número de microorganismos presentes es necesario utilizar dosis mayores del antibacteriano.

Las diferencias en las concentraciones utilizadas de los antibacterianos para causar su efecto pueden explicarse principalmente debido a dos razones: los mecanismos de acción de los compuestos y los factores de virulencia de las bacterias. Se sabe que los compuestos vegetales, como los aceites esenciales y el carvacrol, tienen mayor afinidad a las membranas lipídicas, razón por la cual se facilita su interacción (Mutlu-Ingok *et al.*, 2020). En el caso del aceite esencial de orégano dicha actividad antimicrobiana se estima como un proceso múltiple donde se involucra la interacción de todos sus constituyentes, principalmente el carvacrol, frente a varios sitios de interacción relacionados con su carácter hidrofóbico (Reyes-Jurado *et al.*, 2020). Se ha propuesto que el protón del grupo hidroxilo del carvacrol es capaz de distribuirse en la red electrónica del anillo aromático potenciando el carácter hidrofóbico del compuesto y facilitando su interacción con la membrana bacteriana (Sarrazin *et al.*, 2015). De hecho, se identifica a la membrana como su principal sitio de acción y, al causar daño en esta, se interrumpen otros procesos asociados a la misma como la producción de energía, aumento de la permeabilidad, fuga de iones como el  $H^+$  y el  $K^+$ , lo que deriva en la ruptura celular y la muerte de la bacteria (Reyes-Jurado *et al.*, 2020).

Dicha interacción con membrana también puede explicarse desde el coeficiente de reparto en octanol/agua (LogP) del carvacrol, el cual es de 3.1 lo que indica un mejor reparto entre los ácidos grasos que conforman las membranas de las bacterias (PubChem, 2022; Kachur y Suntres, 2019). De igual manera, al desestabilizar la membrana y causar aumento en su permeabilidad, el efecto

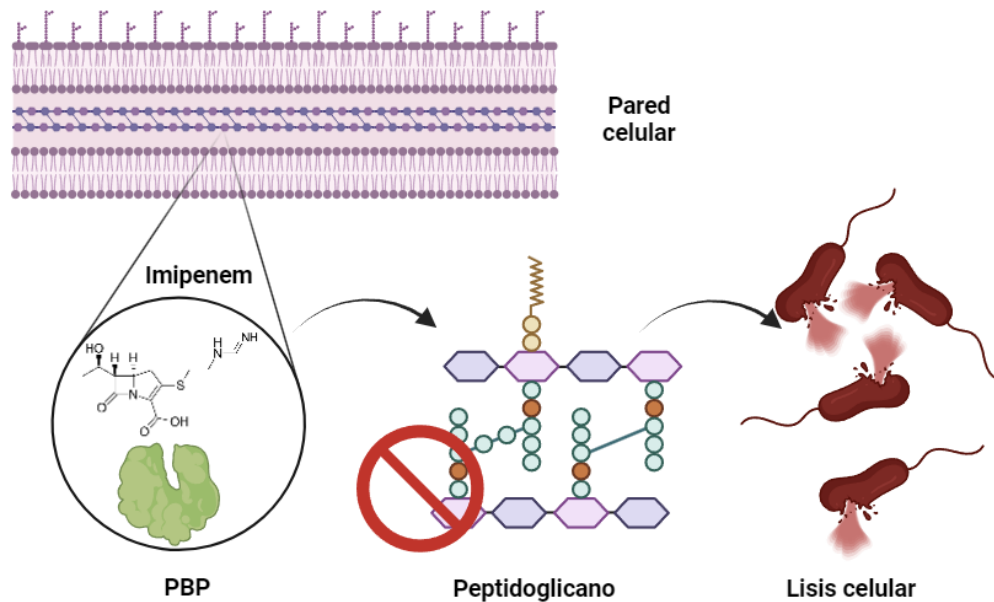
de los aceites esenciales se extiende a otros niveles como la liberación de iones y metabolitos, dificultar el bombeo de protones, alterar la producción de ATP, además de afectar el funcionamiento proteico asociado a membrana (Figura 2), pues se ha visto que el carvacrol puede afectar los sistemas de plegamiento de proteínas *GroEL* y *DnaK*, encargados de replegamiento o eliminación de proteínas dañadas durante estímulos de estrés (Swam*et al.*, 2016; Montagu *et al.*, 2016). Debe contemplarse que tanto el tiempo y la concentración de exposición al compuesto vegetal juegan un papel determinante, aunado a la carga bacteriana a evaluar, pues el número de células dirige la cantidad de antimicrobiano a utilizar.



**Figura 2.** Mecanismo de acción antibacteriano del aceite esencial de orégano (AEO) y carvacrol. El sitio blanco de estos compuestos es la membrana plasmática donde causan distintas alteraciones, como la pérdida de iones, disminución en la síntesis de ATP, al igual que en bombeo de protones, cada uno relacionado con un aumento en la permeabilidad de membrana causada por una interacción con los ácidos grasos de la bicapa lipídica (Elaboración propia en BioRender 2022).

Por su parte, el imipenem tiene como sitio de acción la pared celular bacteriana (Figura 3). Se trata de un carbapenémico que se une a las PBP, causando su inactivación e inhibiendo así la síntesis de la pared celular, lo que deriva en la ruptura de la célula bacteriana (Heo, 2021). Las PBP's son proteínas que se ubican al interior de la pared celular y participan en la síntesis del peptidoglicano

donde juegan un papel importante al transportar los componentes del mismo a través de la membrana. El imipenem, penetra la pared celular y afecta la última fase de síntesis, uniéndose a la PBP evitando que esta forme los tetrapéptidos, con la consecuente inhibición de la síntesis de pared (Suárez y Gudiol, 2009; IQB 2012).



**Figura 3.** Mecanismo de acción de imipenem. Los antibióticos pertenecientes a la familia de los  $\beta$ -lactámicos, como el imipenem actúan a nivel de pared celular con el objetivo de causar la ruptura bacteriana. El imipenem se une a las PBP (Penicilina Binding Protein) inhibiendo la síntesis de peptidoglicano en su última etapa y por ende la formación de la pared celular. Así una pared débil no es suficiente para delimitar el contenido celular provocándose la ruptura de esta (Elaboración propia en BioRender 2022).

El segundo elemento que determina la concentración que se requiere de antibacteriano son los factores de virulencia de cada especie. En nuestra investigación se observó que se requirieron mayores dosis de aceite esencial y carvacrol para causar la inhibición y eliminación de *A. baumannii*, en comparación con las requeridas para *P. aeruginosa*. La causa principal a la que se atribuye este comportamiento es la cápsula de polisacáridos que posee *A. baumannii*. Esta estructura rodea a la bacteria y cumple la función de brindarle protección a los agentes antimicrobianos y puede presentar tal variación en su estructura por la combinación de diversos azúcares (Ayoub-Moubareck y Hammoudi-Halat, 2020; Singh *et al.*, 2019).

Finalmente, con relación al co-cultivo, el crecimiento conjunto de microorganismos supone una interacción entre ellos, misma que puede prever de cambios en el metabolismo de las especies implicadas. Chan *et al.*, (2018) observaron regulaciones importantes en genes implicados en resistencia a agentes antibacterianos en microorganismos MDR cuando los co-cultivaron. Uno de ellos fue *A. baumannii*, pues se observó que genes codificantes de  $\beta$ -lactamasas aumentaron su expresión. Un comportamiento muy similar ocurre en co-cultivos donde participa *P. aeruginosa*, pues se ha reportado que en crecimientos conjuntos con *S. aureus*, la virulencia de estos microorganismos aumenta a la par que se vuelven menos sensibles a los antibióticos (Tognon *et al.*, 2019).

Aunque, hasta el momento, no se tiene evidencia de un sistema multiespecie donde se vean involucrados *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, el comportamiento mostrado de ambas especies en el co-cultivo de nuestro estudio concuerda con el comportamiento esperado con base a la participación de estas especies en otros sistemas de co-cultivos. Sin embargo, esto permitió establecer que efectivamente puede ocurrir una colonización por ambos microorganismos y, además, puede indicar que su crecimiento conjunto conlleva un ajuste en sus factores de resistencia a agentes antibacterianos, lo que puede traducirse en un tratamiento más complicado que requiera de mayores dosis de estos para causar el efecto de inhibición o eliminación, como se observó en nuestra investigación. Este hallazgo sienta las bases y permitirá el estudio futuro de ambas especies en conjunto, respondiendo de manera más detallada el análisis de algunas incógnitas como, ¿Cuál será el comportamiento de crecimiento de ambas bacterias en un sistema *in vivo*? ¿Cómo se verá afectada su convivencia por la presencia de otros componentes celulares? ¿Cuáles genes de resistencia y virulencia pudieran estarse regulando en el co-cultivo? ¿Existe la producción de algún metabolito o sustancia por parte de alguna de las bacterias que influya en el crecimiento de la otra? Los resultados obtenidos en esta etapa permitieron determinar las concentraciones inhibitorias de cada antibacteriano frente a las bacterias *A. baumannii* y *P. aeruginosa* cultivadas individualmente y en co-cultivo. Estas concentraciones se utilizaron en los ensayos de combinación de antibacterianos para establecer su efecto sobre la viabilidad y virulencia de las dos bacterias objeto de investigación.

## 6.2. Efecto de las Combinaciones de Aceite Esencial *L. graveolens*-Imipenem y Carvacrol-Imipenem Sobre Cultivos Axénicos y Mixtos de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*.

En el cuadro 6 se muestran los Índices de Concentración Inhibitoria Fraccional (ICIF) de las combinaciones de los compuestos vegetales con el antibiótico para cada bacteria en particular y su crecimiento conjunto. Dicho parámetro se obtuvo de la sumatoria de la Concentración Inhibitoria Fraccional (CIF) de cada agente involucrado en cada combinación que, a su vez, se obtiene de la relación entre la CMI del antibacteriano en la combinación y la CMI individual. Respecto a *A. baumannii*, tanto para las combinaciones aceite esencial de orégano-imipenem, como carvacrol-imipenem, utilizar dosis 21 veces menor de la CMI de cada agente fue suficiente para inhibir el crecimiento bacteriano. En el caso de *P. aeruginosa*, se observó el mismo patrón de comportamiento en la combinación aceite esencial-imipenem, pues se requirieron 21.4 veces menos cantidad de la CMI de cada agente. Sin embargo, para la combinación carvacrol-imipenem, fue necesario utilizar 21.4 veces menos cantidad de la CMI de carvacrol y una concentración 10.7 veces menor de la CMI de imipenem para inhibir el crecimiento bacteriano.

Las combinaciones de aceite esencial-imipenem y carvacrol-imipenem en co-cultivo mostraron una tendencia similar a la determinación de la CMI, ya que se requirió una mayor cantidad de los antibacterianos para inhibir el crecimiento conjunto en comparación con los cultivos individuales. Se observó que en la combinación con el antibiótico fue necesario utilizar el doble de concentración de aceite esencial de orégano respecto al empleado en la combinación contra *A. baumannii* y 8 veces más en comparación con el requerido contra *P. aeruginosa*. Mientras tanto, la concentración de imipenem empleada al combinarse con aceite de orégano fue 2 veces mayor en el co-cultivo que la necesaria para inhibir el crecimiento axénico de ambas bacterias. El mismo comportamiento tuvo el antibiótico en la combinación con carvacrol al compararse con la concentración requerida en *A. baumannii*. Finalmente, en la prueba de combinación fue necesario utilizar el doble de la concentración del carvacrol para el co-cultivo respecto a *A. baumannii*, mientras que en comparación con *P. aeruginosa* se requirió 4 veces más de la concentración en el sistema conjunto. Con dichos resultados se puede observar que el sistema del co-cultivo presentaba una mayor resistencia a los antibacterianos comparado con los cultivos axénicos, Sin embargo, fue evidente que las combinaciones de los tratamientos fueron capaces de reducir considerablemente las dosis empleadas para la inhibición en ambos tipos de sistema.



**Cuadro 6.** Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) e Índices de Concentración Inhibitoria fraccional (ICIF) en las combinaciones de imipenem, aceite esencial de *L. graveolens* y carvacrol frente a *P. aeruginosa* y *A. baumannii* en forma axénica y co-cultivo que resultaron con efecto sinérgico.

Tipo de cultivo	Combinación 1			Combinación 2		
	CMI AE <i>L. graveolens</i> (mg/mL)	CMI Imipenem (mg/mL)	Efecto (ICIF)	CMI Carvacrol (mg/mL)	CMI Imipenem (mg/mL)	Efecto (ICIF)
<i>A. baumannii</i> axénico	0.03	2.34x10 <sup>-5</sup>	<b>Sinergia (0.09)</b>	7x10 <sup>-3</sup>	2.34x10 <sup>-5</sup>	<b>Sinergia (0.09)</b>
<i>P. aeruginosa</i> axénico	7.30x10 <sup>-3</sup>	2.34x10 <sup>-5</sup>	<b>Sinergia (0.09)</b>	3.50x10 <sup>-3</sup>	4.69x10 <sup>-5</sup>	<b>Sinergia (0.14)</b>
Co-cultivo	0.06	4.69x10 <sup>-5</sup>	<b>Sinergia (0.14)</b>	0.014	4.69x10 <sup>-5</sup>	<b>Sinergia (0.14)</b>

Número de réplicas >3. AE: Aceite esencial.

Los ICIF de las concentraciones menores se establecieron entre 0.0934 y 0.14041, indicando que las combinaciones propuestas tuvieron un efecto sinérgico al inhibir el crecimiento bacteriano. La combinación de agentes antibacterianos ha sido una práctica que ha adquirido gran relevancia, respaldada por la efectividad que ha demostrado en cuanto al control bacteriano. Esto se debe a un efecto sinérgico el cual representa una actividad antibacteriana mayor respecto al efecto de cada componente individual (Cho *et al.*, 2020). En ese sentido, el uso de antibacterianos combinados con compuestos naturales representa un avance promisorio para la terapia clínica respecto al tema de la resistencia bacteriana, pues se ha observado que los fitoquímicos muestran un efecto sinérgico en la acción de los antibióticos comunes (Dera *et al.* 2021). Estudios previos han demostrado dicha eficacia logrando la inhibición bacteriana con el uso de dosis menores de los compuestos. Así lo mostraron Amaral *et al.*, (2020) probando la combinación de aceite esencial de *O. vulgare* con Polimixina B. Ellos determinaron que al combinar 1.5x10<sup>-5</sup> mg/mL de Polimixina B con 0.43 mg/mL de aceite de *O. vulgare* se lograba la inhibición de un aislado de *A. baumannii*. Además, respecto a las CMI determinadas por estos investigadores, se observó que las dosis utilizadas en la combinación representaron una disminución de 16 veces en la CMI de Polimixina B y de 8 veces en la CMI de aceite de *O. vulgare*, en comparación con las CMI individuales de cada compuesto.

Con base a estos resultados establecieron un ICIF de 0.18, lo que muestra un claro efecto sinérgico entre los compuestos.

A su vez, Guo *et al.*, (2021) probaron la combinación de diferentes concentraciones de capsaicina (0.016-0.256 mg/mL) con colistina en aislados de *A. baumannii* resistentes a este antibiótico. Encontraron que estas interacciones mostraban un efecto sinérgico con un valor de ICIF entre 0.03 a 0.06, lo que a su vez se tradujo en una disminución de CMI de la colistina dependiente de la dosis de capsaicina en los aislados bacterianos evaluados (pasando de una CMI de 1.024 a  $5 \times 10^{-4}$  mg/mL). Por su parte, Topa *et al.*, (2020) evaluaron el efecto inhibitorio de la combinación de cinamaldehído una concentración de 3 mM con colistina sobre aislados de *P. aeruginosa*, observando una reducción de 4 veces en la CMI del antibiótico (de 6.8 mM a 1.7 mM), además de un claro efecto sinérgico (ICIF= 0.5). Aunque hasta el momento no se ha reportado la combinación de aceite de *L. graveolens* con imipenem, los estudios mencionados demuestran la efectividad de la combinación de compuestos naturales con antibióticos convencionales. Este enfoque es precisamente la razón principal para emplear el uso de terapia combinada, su sentido es reducir las dosis que se utilizan de cada agente y generar un efecto antibacteriano similar o mayor al de los componentes individuales. Además, una de las principales razones de utilizar imipenem para la combinación surge de la prioridad y uso que se le da a este, ya que es uno de los medicamentos que se empleaban comúnmente para tratar las infecciones por estas bacterias. Por lo tanto, realizar las combinaciones propuestas permitiría seguir utilizando este antibiótico, mejorando su efectividad y disminuyendo la tasa de resistencia. Aunado a esto, al ser una combinación nueva de elementos reconocidos por su capacidad antibacteriana, generaría mayor conocimiento en el área y sería precedente para otros posibles tratamientos, incluso de otras bacterias, sin mencionar que permitiría el aprovechamiento de recursos endémicos, como el orégano.

La sinergia observada en las combinaciones de nuestro estudio se debe a que cada agente antibacteriano posee un mecanismo de acción distinto dirigido en contra de los microorganismos. En el caso del carvacrol y el aceite esencial de *L. graveolens*, se ha informado que, debido a su afinidad hacia la membrana bacteriana, son capaces de dañar a la misma, aumentando su permeabilidad y alterando su fluidez. Esto deriva en alteraciones de procesos como la respiración y el transporte de iones, aunado a que el carvacrol logra disminuir el pH intracelular y disminuir la cantidad de ATP (Rani *et al.*, 2022). Por su parte, el imipenem inhibe la síntesis de la pared celular al evitar el entrecruzamiento del peptidoglicano, lo que eventualmente termina lisando a las

bacterias (Heo, 2021). De tal manera que al utilizar complejos antibacterianos como el propuesto, las bacterias se ven afectadas en diferentes sitios blancos, causando con una mayor posibilidad su inhibición o eliminación.

Ahora bien, las combinaciones mostradas en el cuadro 6 no fueron las únicas evaluadas, sino que se presentaron algunas otras posibles donde se observaron efectos indiferentes o en algunas de ellas sinérgicos. En el caso de aquellas que presentaron sinergia, el punto de decisión se estructuró con base a los criterios de resistencia, accesibilidad y cual resultaba más conveniente en el tratamiento. En general, el utilizar menores dosis de antibacterianos supone una inversión económica menor, dado que las cantidades se ven disminuidas. Pero más allá del pensamiento lógico, se ha determinado que los compuestos vegetales son de fácil y económica disponibilidad, además de que en su mayoría poseen baja o nula toxicidad celular, como en el caso del orégano (Chadha *et al.*, 2022; Cheesman *et al.*, 2017). Además, la evidencia muestra poca o nula presencia de resistencia por parte de las bacterias a los compuestos vegetales, en comparación con la resistencia a los antibióticos (Abers *et al.*, 2021; Cheesman *et al.*, 2017; Lu *et al.*, 2018). Dado que este fenómeno se agrava debido al uso excesivo y frecuente de los mismos, el usarlos en combinación con otros agentes y en menores dosis abonaría a la lucha contra la resistencia a los antibióticos, minimizando sus consecuencias (Dera *et al.*, 2021).

Por estas razones, no es conveniente utilizar una combinación sinérgica que implique el uso de mayor concentración de antibiótico en comparación con otra combinación que cause el mismo efecto utilizando dosis menores. Por lo tanto, se optó por utilizar la combinación que fue más reproducible y con la concentración más baja posible del antibiótico. Los resultados obtenidos en esta fase demostraron que la combinación de aceite de *L. graveolens*-imipenem y carvacrol-imipenem presentan un efecto sinérgico frente la inhibición de las bacterias *A. baumannii* y *P. aeruginosa* en las dos formas de cultivo, estableciendo además las concentraciones requeridas de cada agente para causar dicho resultado. Las concentraciones de los agentes combinados e individuales se utilizaron en ensayos posteriores para establecer su acción frente a un mecanismo de virulencia y resistencia de ambas bacterias.

6.3. Efecto de la Evaluación Individual de Aceite Esencial de *L. graveolens* y Carvacrol, así Como su Combinación con Imipenem Sobre las Biopelículas de *P. aeruginosa*, *A. baumannii* y su Co-Cultivo Sobre Tubos Endotraqueales.

En el cuadro 7 se muestran las concentraciones requeridas de aceite esencial de *L. graveolens*, carvacrol, imipenem y sus combinaciones para causar la inhibición de la formación de biopelículas de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y su co-cultivo. De acuerdo con los datos presentados, es posible notar que se requirió utilizar mayor concentración de antibacterianos en la mayoría de los casos para inhibir la formación de las biopelículas de *P. aeruginosa* en comparación con las biopelículas formadas por *A. baumannii*, ambas cultivadas de forma axénica. Esto se cumple para el caso del aceite esencial de *L. graveolens* (una concentración 2.25 veces mayor en *P. aeruginosa*), el Imipenem (1.8 veces más) y la combinación AEO/Imipenem, mientras que en la exposición a carvacrol la dosis establecida fue la misma. Entre ellos, el elemento más llamativo es la concentración de imipenem, pues se observó considerablemente más grande. Esto puede deberse a que, según estudios previos, se ha reportado que el aumento de resistencia a este antibiótico en biopelículas de *P. aeruginosa* está relacionado a que estas altas concentraciones de imipenem induzcan un aumento en la expresión de  $\beta$ -lactamasas (Zhang *et al.*, 2020), lo que se traduce lógicamente en la necesidad de seguir utilizando mayores concentraciones del antibiótico.

**Cuadro 7.** Concentraciones Mínimas Inhibitorias de Biopelículas (CMIB) de aceite esencial de *L. graveolens*, carvacrol, imipenem y sus combinaciones sobre *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y su co-cultivo.

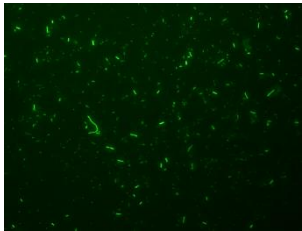
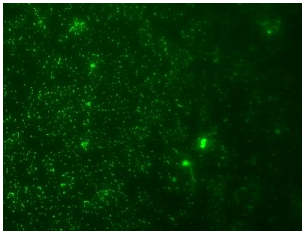
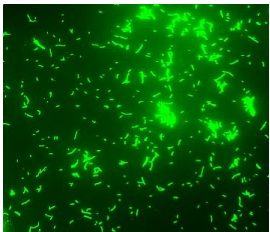
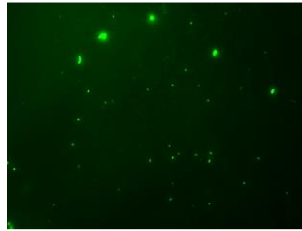
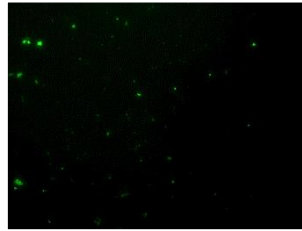
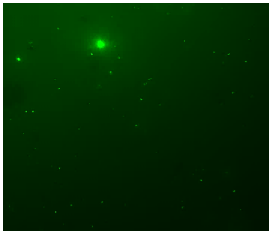
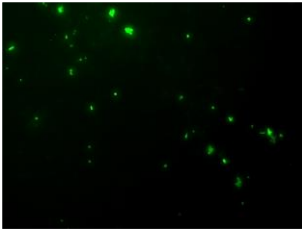
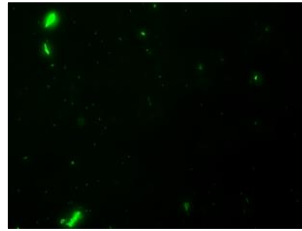
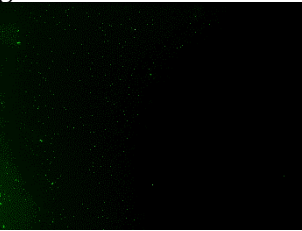
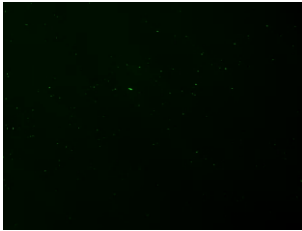
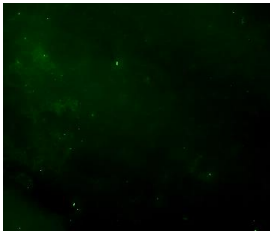
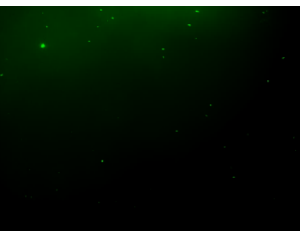
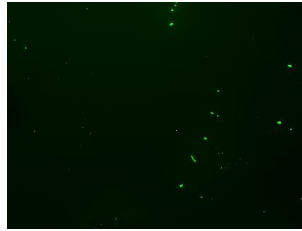
<b>Antimicrobiano</b>	<b>AEO</b>	<b>Carvacrol</b>	<b>Imipenem</b>	<b>AEO/Imipenem</b>	<b>Carvacrol/Imipenem</b>
<b>Tipo de cultivo</b>	<b>(mg/mL)</b>				
<i>A. baumannii</i> axénico	1.2	0.6	$5 \times 10^{-4}$	0.06/ $2.35 \times 10^{-5}$	0.18/ $1.41 \times 10^{-4}$
<i>P. aeruginosa</i> axénico	2.7	0.6	$9 \times 10^{-4}$	0.48/ $1.68 \times 10^{-4}$	0.03/ $8.5 \times 10^{-5}$
Co-cultivo	3	6	$2.5 \times 10^{-4}$	0.6/ $9.4 \times 10^{-5}$	1.12/ $9.4 \times 10^{-5}$

Número de réplicas >3. AEO= Aceite Esencial de *L. graveolens*

En cuanto a las combinaciones de antibacterianos, se observó que al combinar 0.06 mg/mL de aceite de orégano con  $2.35 \times 10^{-5}$  mg/mL de imipenem, las biopelículas de *A. baumannii* no pudieron establecerse. Estas concentraciones representaron una reducción de 20 y 21 veces de las dosis de los antibacterianos, respectivamente, en comparación con sus concentraciones en estado individual para las biopelículas. En el caso de la combinación de carvacrol/imipenem las concentraciones requeridas fueron 3.3 y 3.5 veces menores, de manera respectiva, que las utilizadas para inhibir la formación de biopelículas cuando estos compuestos se usaron de manera individual. De igual manera, en *P. aeruginosa*, tanto la combinación aceite esencial/imipenem como la combinación carvacrol/imipenem permitieron utilizar dosis menores de cada antibacteriano para la inhibición de biopelículas. Se observó una reducción de 5.6 y 5.3 veces en la combinación aceite esencial/imipenem de cada compuesto, en dicho orden. Así mismo, se observó una reducción de 20 y 10.5 veces de carvacrol e imipenem, respectivamente, una vez que estos fueron combinados para tratar las células bacterianas.

Esta tendencia de los antibacterianos combinados se mantuvo en el sistema de co-cultivo, pues al exponerlo a un tratamiento con 0.6 mg/mL de aceite de *L. graveolens* combinado con una dosis de  $9.4 \times 10^{-5}$  mg/mL de imipenem, las biopelículas eran inhibidas, lo que significó una reducción de 5 veces la dosis necesaria de aceite y casi 3 veces la dosis de imipenem que se utilizó para tratar las mismas biopelículas, pero con los antibacterianos por separado. Esta directriz prevaleció en la combinación carvacrol/imipenem, pues se observó el mismo factor de reducción en las concentraciones de los compuestos combinados, comparados con sus concentraciones inhibitorias individuales.

Dicho comportamiento de inhibición y eficacia observado en las combinaciones de los antibacterianos se ratificó mediante microscopía de fluorescencia. Se expusieron cultivos de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y su co-cultivo en una superficie de vidrio a dosis de  $\frac{1}{2}$  CMI de *L. graveolens*, carvacrol y sus combinaciones con imipenem, con el fin de visualizar sus efectos sobre la formación de biopelículas. La figura 4 muestra la formación de biopelículas de los microorganismos a las 24 horas de exposición a los tratamientos. En dicha figura se observa que el porcentaje de biopelículas de los cultivos bacterianos adheridas al cubreobjetos es mayor al no utilizar ningún antimicrobiano (figuras 4a, 4b y 4c) en comparación con las bacterias expuestas a aceite esencial de *L. graveolens*, (figuras 4d, 4e y 4f) y carvacrol (figura 4g, 4h y 4i). Además, es posible notar que las combinaciones AEO-imipenem (figuras 4j, 4k y 4l) y carvacrol-imipenem (figuras 4m, 4n y 4ñ), redujeron considerablemente la cantidad de biopelícula formada.

Tratamiento $\frac{1}{2}$ CMI (mg/mL)	Tipo de cultivo		
	<i>A. baumannii</i> axénico	<i>P. aeruginosa</i> axénico	Co-cultivo
Control			
Aceite esencial <i>L. graveolens</i>			
	Carvacrol		
Combinación AEO-Imipenem			
	Combinación Carvacrol- Imipenem		

**Figura 4:** Microscopías de fluorescencia (200X) de biopelículas de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y su co-cultivo en cubreobjetos, incubadas a 37 ° C durante 24 h en caldo LB expuestas a  $\frac{1}{2}$  CMI de los tratamientos aceite esencial de *L. graveolens* (AEO), carvacrol y las combinaciones con imipenem, teñidas con Syto 9 al 0.001%. a) Control *A. baumannii*, b) Control *P. aeruginosa*, c) Control co-cultivo, d) Biopelícula de *A. baumannii* expuesta a 0.312 mg/mL de AEO, e) Biopelícula de *P. aeruginosa* expuesta a 0.078 mg/mL de AEO, f) Biopelícula de co-cultivo

expuesta a 0.625 mg/mL de AEO, g) Biopelícula de *A. baumannii* expuesta a 0.075mg/mL, de carvacrol, h) Biopelícula de *P. aeruginosa* expuesta a 0.0375 mg/mL de carvacrol, i) Biopelícula de co-cultivo expuesta a 0.15 mg/mL de carvacrol, j) Biopelícula de *A. baumannii* expuesta a la combinación AEO-Imipenem de 0.015/  $1.17 \times 10^{-5}$  mg/mL, k) Biopelícula de *P. aeruginosa* expuesta a la combinación AEO-Imipenem de  $3.65 \times 10^{-3}/1.17 \times 10^{-5}$  mg/mL, l) Biopelícula de co-cultivo expuesta a la combinación AEO-Imipenem de 0.03/ $2.34 \times 10^{-5}$  mg/mL, m) Biopelícula de *A. baumannii* expuesta a la combinación carvacrol-Imipenem de  $3.5 \times 10^{-3}/1.17 \times 10^{-5}$  mg/mL, n) Biopelícula de *P. aeruginosa* expuesta a la combinación carvacrol-Imipenem de  $1.75 \times 10^{-3}/2.34 \times 10^{-5}$  mg/mL, ñ) Biopelícula de co-cultivo expuesta a la combinación carvacrol-Imipenem de 0.007/ $2.34 \times 10^{-5}$  mg/mL.

A su vez, también es importante resaltar es que las concentraciones requeridas de los tratamientos para el co-cultivo, generalmente fueron mayores que las utilizadas para el tratamiento de las biopelículas de cada especie por separado. Esto era de esperarse ya que se ha documentado que en las comunidades polimicrobianas existe una sinergia que pudiera estar asociada a la variabilidad genética y esto deriva en un aumento en la producción de biopelículas, así como la adquisición de estrategias simbióticas que favorezcan el crecimiento de las especies involucradas (Eze *et al.*, 2018). Además, como ya se ha establecido por la mayor protección de las biopelículas, una comunidad formada por varias especies implicaría un mayor esfuerzo en el tratamiento clínico.

Por otro lado, como resulta evidente, se debe enfatizar que independientemente del sistema axénico o co-cultivo, las concentraciones de los antibacterianos que fueron requeridas para inhibir la formación de biopelículas fueron mayores que las utilizadas para inhibir el crecimiento bacteriano en su estado planctónico. Se observó que la dosis de aceite esencial de *L. graveolens* para inhibir el crecimiento de biopelículas (CMIB) de *A. baumannii* fue el doble que la necesaria para causar su inhibición en estado planctónico. Por su lado, fue necesario utilizar una dosis 4 veces mayor de carvacrol para inhibir a esta bacteria en su estado sésil en comparación con su CMI en estado planctónico. Algo a destacar es que la concentración de Imipenem que se requirió para causar la inhibición de la biopelícula de *A. baumannii* es la misma que se determinó como su CMI anteriormente. En cuanto a *P. aeruginosa*, se determinó que la concentración necesaria de aceite esencial de *L. graveolens* para inhibir la formación de biopelículas fue 17 veces mayor en comparación con la CMI obtenida para dicha bacteria. A su vez, se observó un aumento de 8 veces la concentración de carvacrol y casi 2 veces más la dosis de imipenem para poder inhibir la formación de biopelículas de esta bacteria tomando como referencia las dosis utilizadas para inhibir su crecimiento planctónico.

Finalmente, para inhibir la formación de biopelículas en el sistema de co-cultivo se requirió utilizar 2.4 veces más concentración de aceite esencial de *L. graveolens* que la utilizada para inhibir su crecimiento planctónico, mientras que el carvacrol requirió aumentar la dosis en 20 veces más. Sin embargo, para el Imipenem la dosis capaz de inhibir la formación de las biopelículas del co-cultivo fue la mitad de la CMI utilizada. En este caso particular, se sabe que usualmente las dosis sub-inhedoras de antibióticos propician el desarrollo de biopelículas por inducción de genes, sin embargo, esto no se cumple así en todos los casos, pues depende del antibiótico, ya que el efecto dosis-respuesta puede no ser lineal entre el estímulo dado y la inhibición de biopelícula (Songtanin *et al.*, 2022). Aunado a esto, el comportamiento de las especies bacterianas frente a los antibióticos puede variar dependiendo de la cepa, pues se ha documentado que la CMIB puede coincidir o ser menor que la CMI, incluso para la misma especie y el mismo antibiótico. Así se observó en un estudio realizado por Piri-Gharaghie *et al.*, (2022) donde determinaron la CMI y CMIB del imipenem frente a cepas de *S. epidermidis* y aunque en algunos casos la CMIB correspondía a la mitad de la CMI (2 µg/mL frente a 4 µg/mL), en otros casos ambos valores eran coincidentes (2 µg/mL).

Por otro lado, el hecho de haber utilizado mayores concentraciones de la mayoría de los tratamientos en la inhibición de las biopelículas puede deberse a que las células formadoras de este consorcio muestran un metabolismo ralentizado, lo que se traduce en una menor susceptibilidad a los agentes antibacterianos. Por ejemplo, se ha observado que en células de biopelículas de *A. baumannii*, los genes involucrados en el ciclo del ácido cítrico se encuentran regulados a la baja, al igual que genes relacionados con la respiración aeróbica como aquellos que expresan proteínas de síntesis de lípidos y almacenamiento de hierro (Shenkutie *et al.*, 2022). El hecho de que las bacterias involucradas en estado sésil posean un metabolismo más lento puede derivar en células con mayor tolerancia a los antibacterianos, de ahí la necesidad de utilizar mayores dosis para inhibir su crecimiento.

De acuerdo con los hallazgos en el presente estudio, y ya que se observó la necesidad de utilizar mayores concentraciones de antibacterianos en el tratamiento de biopelículas, en sintonía con otros autores, se ha propuesto que una de las mejores alternativas para abordar las biopelículas es utilizar combinaciones de antibacterianos (Roet *et al.*, 2022). En nuestra investigación, la estrategia de combinar los compuestos vegetales con el antibiótico, además de ser capaz de inhibir la formación de biopelículas, también permitió la reducción de las dosis efectivas de los tres agentes



antibacterianos en proporciones desde 3 hasta 21 veces menos, en comparación con las concentraciones individuales, sin perder su eficacia.

En sintonía, algunos investigadores han evidenciado la efectividad inhibitoria de biopelículas de algunos compuestos, sin embargo, son pocos los reportes donde se evalúa el efecto conjunto de combinar antibióticos con otros agentes antibacterianos con el fin de inhibir la formación de biopelículas. Tal es el caso de Asadi *et al.*, (2023), quienes observaron que la combinación de 125 µg/mL de carvacrol con 62.5 µg/mL de cefexima, presentaba un efecto sinérgico y además podían reducir de manera significativa la formación de biopelículas de *E. coli*. Sin embargo, no se evaluó el efecto conjunto de estos antibacterianos en este tipo de crecimiento. A su vez, el lactato de zinc, el fluoruro de estaño y la furanona en concentraciones sub-inhedorias de 256, 256 y 32 µg/mL, respectivamente, fueron capaces de inhibir significativamente la formación de biopelículas en aislado XDR de *A. baumannii*. Además, al combinar estos compuestos con imipenem, se observó un efecto sinérgico en el 33% de los aislados para los 2 primeros y un efecto aditivo en el 100% de los aislamientos para la combinación furanona-imipenem (Peng *et al.*, 2020). Sin embargo, tampoco se investigó el impacto en la formación de biopelículas con las dosis establecidas de la combinación de antibacterianos.

De manera contraria, algunas investigaciones analizaron el efecto de compuestos combinados en la inhibición de biopelículas e incluso propusieron un posible mecanismo de acción. De la Fuente *et al.*, (2015) sintetizaron los péptidos D-enantioméricos DJK5 y DJK6 y los probaron en combinación con varios antibióticos sobre cultivos de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. Se observó que estos péptidos fueron capaces de prevenir la formación de biopelículas y su CMIB<sub>50</sub> fue de 1 µg/mL y 0.5 µg/mL, respectivamente, para *P. aeruginosa* y de 4 µg/mL y 2 µg/mL para *A. baumannii*. Sin embargo, al combinarlos con imipenem, se observó una reducción desde 2 hasta 4 veces en la concentración del antibiótico en la CIF, y esto se traduce en una disminución de la CMIB del antibiótico. A su vez, Chanda *et al.*, (2017) utilizaron combinaciones de ácido linolénico (LNA) y Tobramicina para evaluar su efecto sobre la inhibición e inactivación de biopelículas en *P. aeruginosa*. Observaron que al combinar 1.17 mg/mL de LNA junto con 0.078 mg/mL de Tobramicina se presentaba un 48% de inhibición de formación de biopelícula comparado con las células no tratadas y además que este efecto era dependiente de las concentraciones utilizadas. A la par se evidenció nuevamente que combinar antibacterianos permite reducir las dosis de antibióticos utilizados y causar el mismo efecto regulatorio, como se observó en este estudio donde

se estableció una reducción de 4 veces la dosis de CMI de Tobramicina (de 0.3125 a 0.078 mg/mL). Los autores proponen que uno de los mecanismos anti-biopelícula de este tratamiento combinado se debe a su efecto en la expresión de genes relacionados con el QS, pues se observó una regulación negativa de 91 veces en *lasI* y 20 veces en *lasR*. Además, también toman en cuenta las propiedades fisicoquímicas de LNA y su capacidad de interactuar a nivel membrana.

Ahora bien, estas comunidades bacterianas son reconocidas como una estrategia que les permite a las bacterias perdurar mayor tiempo en el ambiente y ser más resistentes a la desinfección o eliminación. Esta comunidad se forma a partir de 4 etapas, a saber, adhesión, construcción de microcolonias, maduración y diferenciación del consorcio bacteriano y finalmente la dispersión celular (Roet *et al.*, 2018), siendo precisamente estas etapas los puntos clave de acción de los antibacterianos con actividad antivirulencia. En este caso, se ha informado que el carvacrol puede intervenir en las diferentes etapas de la formación de biopelículas. Por ejemplo, este terpeno puede interactuar con las proteínas bacterianas implicadas en la adhesión superficial, como las adhesinas, entre otras, haciendo que las bacterias pierdan o disminuyen su capacidad de adherencia y así afectar la etapa inicial de la formación de biopelícula. A su vez, la capacidad de movimiento de las bacterias también puede verse afectada, lo que pudiera limitar el desplazamiento e interacción de las bacterias con las superficies, no permitiendo el desarrollo de la etapa inicial de la biopelícula (Bernal-Mercado *et al.*, 2022). Estos mismos investigadores informaron que al exponer a *P. aeruginosa* a nanopartículas de quitosano cargadas con 2.4 mg/mL de carvacrol, se reducía su capacidad de motilidad. Esto pudiera explicarse por el hecho de que se ha reportado que tanto el carvacrol y otros aceites esenciales son capaces de cambiar la forma bacilar de las bacterias disminuyendo su capacidad de adhesión, además de afectar la funcionalidad de flagelos en las bacterias, estructuras clave en el primer paso de formación de biopelículas (Leja *et al.*, 2019; Van Alphen *et al.*, 2012).

Además, se ha determinado que el carvacrol puede ejercer su acción antibacteriana en las etapas 2 y 3 de la formación de biopelículas mediante la interrupción del *Quorum Sensing* (QS), un mecanismo de comunicación intercelular. Se ha mencionado que esta interacción propiciada por el aumento en la densidad bacteriana está mediada por un conjunto de moléculas y sistemas proteicos expresados por las mismas bacterias, conocidos como Acil-homoserina lactonas (AHL) y los sistemas LasI-LasR para *P. aeruginosa*, y AbaI-AbaR para *A. baumannii* (Venkateswaran *et al.*, 2023). Investigaciones previas han especulado que el carvacrol es capaz de interferir en el sistema

de QS Exp1/ExpR de *Pectobacterium carotovorum*, el cual está involucrado en la síntesis de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), provocando una disminución en la producción de polisacáridos. Además, el sistema QS está involucrado en la funcionalidad de estructuras de adhesión como fimbrias, pilis y curlis, por lo que al afectarse el QS puede limitar la funcionalidad de estas estructuras e impedir la adhesión bacteriana (Gutiérrez-Pacheco *et al.*, 2018). En el caso de *P. aeruginosa*, se observó que el carvacrol a una concentración de 1.9 mM fue capaz de interferir el sistema QS, al disminuir la producción de C12-AHL (oxododecanoil-homoserina-lactona) en un 60%, indicando la afectación proteica de LasI, a la par de la reducción en la expresión relativa del gen *lasR*, disminuyendo significativamente la producción de biopelículas (Tapia-Rodríguez *et al.*, 2019).

Aunque se han realizado investigaciones donde se demuestra que el carvacrol es capaz de actuar en las distintas etapas de la formación de biopelículas, hasta el momento existen pocos reportes o estudios muy limitados que aborden el efecto de este terpeno en la formación de biopelículas de *A. baumannii* de manera tan específica. Orhan-Yanikan *et al.*, (2019) demostraron que el tratamiento con carvacrol a concentraciones entre 0.1-0.15 mg/mL, logró reducir hasta en un 60% la formación de biopelículas de *A. baumannii*, mostrando un efecto inhibitorio. Con base en la información anterior, se propone que los efectos anti-biopelícula del carvacrol y el aceite esencial de *L. graveolens* no solo se deben a sus posibles puntos de regulación antes mencionados, sino que también, al ser agentes hidrofóbicos, estos pueden interactuar a nivel membrana bacteriana y así permeabilizarla, lo que permitiría que el antibiótico sea capaz de ejercer su acción en la célula, incluso si se encuentra en estado sénil.

En este sentido, por lo que se refiere a las biopelículas establecidas por estos microorganismos, la estructura de estas básicamente se compone de una matriz extracelular que puede estar formada por proteínas, lípidos, material genético extracelular como ADN cromosómico y ARN, polisacáridos, biopolímeros y agua (Uruén *et al.*, 2020). Esta conformación prevé de protección a las bacterias frente a las amenazas ambientales y el estrés externo, como daños por agentes desinfectantes y respuestas inmunes del huésped, aunque esto no impide necesariamente la entrada de antibacterianos (Asma *et al.*, 2022; Uruén *et al.*, 2020). Aunado a esto, la composición de las biopelículas puede variar dependiendo de la especie bacteriana que la forma, incluso habiendo cambios entre diferentes cepas. Son precisamente las propiedades estructurales de las biopelículas las que influyen de manera directa en su persistencia y resistencia frente a agentes antibacterianos.

De manera particular, las biopelículas de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, se diferencian, entre otras cosas, por la composición de sustancias poliméricas.

Primeramente, las biopelículas de *A. baumannii* se componen por diversos carbohidratos, como glucosa, manosa, xilosa y, principalmente, el polisacárido N-Acetil-glucosamina (PNAG), el cual se ha documentado que participa en la unión entre células, así como a la superficie (Roet *et al.*, 2022; Uruén *et al.*, 2020). Por su parte, las biopelículas de *P. aeruginosa* pueden estar formadas por diferentes exopolisacáridos, dependiendo del fenotipo de la cepa involucrado, por lo que se ha determinado que estas biopelículas pueden estar conformadas por alginato, Psl o Pel. El primer polímero está conformado por ácido manurónico con enlaces  $\beta$ -1-4 y  $\alpha$ -L-guluronato y está asociado a cepas patógenas, favoreciendo la formación de micro colonias y previendo de estabilidad a la biopelícula. Por su parte, el polisacárido Psl se estructura pentaméricamente por subunidades de D-glucosa, D-manosa y L-ramnosa, y este se relación con la unión de las células a superficies bióticas. Finalmente, el polisacárido Pel se encuentra formado por N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina unidas por enlaces 1-4 (Uruén *et al.*, 2020). Tanto el PNAG en *A. baumannii*, como el alginato en *P. aeruginosa*, cumplen la funcionalidad de otorgar protección, estabilidad y firmeza a la biopelícula mediante la formación de una red (Upmanyu *et al.*, 2022; Uruén *et al.*, 2020). Sin embargo, se ha evidenciado que un alginato compuesto por una mayor cantidad de bloques de ácido gulurónico resulta ser mucho más rígido, lo que puede traducirse en mayor estabilidad, estableciendo que las biopelículas conformadas por él, como las de *P. aeruginosa*, sean más estables y protegidas hacia agentes externos, posiblemente por sus múltiples cargas negativas, aunque pueden estar involucrados otros factores aun no dilucidados (Troy *et al.*, 2021; Jacobs *et al.*, 2022). Esto, a su vez, se traduce en la necesidad de utilizar dosis más elevadas de un antibacteriano para causar su inhibición, comparadas con las biopelículas de *A. baumannii*. Por lo tanto, en nuestra investigación se estima que el comportamiento de que se requiera mayor concentración de los compuestos para inhibir las biopelículas de *P. aeruginosa* puede ser explicado, entre otros aspectos, debido a los componentes que integran las biopelículas formadas por estos microorganismos y como estos se van desarrollando desde las primeras etapas. Los resultados obtenidos en este apartado demostraron que tanto el aceite esencial de *L. graveolens* así como el carvacrol, son compuestos eficaces frente al mecanismo de virulencia de formación de biopelículas en *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y su co-cultivo. Además, se evidenció que las combinaciones de los compuestos vegetales con imipenem actuaban de manera conjunta y son más

eficaces en la inhibición de biopelículas, aunado a que se requieren dosis menores de cada antibacteriano. Finalmente, se lograron determinar las concentraciones de aceite esencial, carvacrol, imipenem y sus combinaciones que fueron capaces de inhibir la formación de biopelículas.

#### 6.4. Anclaje Molecular *in Silico* (Docking) de Enzimas OXA-51 e IMP-1 de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* con Carvacrol, Timol e Imipenem

En este apartado se propuso un anclaje molecular competitivo para investigar las interacciones en el sitio activo de las enzimas. El parámetro principal por evaluar fue la energía de afinidad, la cual representa la medición de la fuerza de unión entre un ligando y su receptor, es decir, indica que tan fuerte o estable es el complejo formado. Entre más negativo sea dicho valor, existe mayor afinidad entre los componentes lo que indica que la unión es más fuerte y probable (Arrieta-Galindo, 2020). Al realizar el acoplamiento molecular de los ligandos carvacrol, timol e imipenem con las 2 enzimas mencionadas se observó que existe interacción específica entre los sustratos y el sitio activo de las enzimas, variando la energía de afinidad para cada uno de ellos. En el cuadro 8 se muestran las diversas interacciones químicas presentadas, así como los aminoácidos identificados en cada participación. Es importante recalcar que el imipenem fue tomado como ligando de referencia por ser el sustrato natural de ambas enzimas. Tanto para la OXA-51 presente en *A. baumannii*, como para la enzima IMP-1 presente en *P. aeruginosa*, el imipenem tuvo el mejor acoplamiento comparado con los terpenos carvacrol y timol, lo cual era de esperarse. Su energía de afinidad fue -6.1 Kcal/mol en OXA-51 y -5.5 Kcal/mol en IMP-1. A su vez, el carvacrol tuvo una energía de afinidad ligeramente más alta que el timol en ambas enzimas, siendo -5.5 Kcal/mol para OXA-51 y -4.9 Kcal/mol en IMP-1, comparado con la fuerza de unión del timol de -5.4 Kcal/mol en la enzima OXA-51 y -4.8 Kcal/mol en la enzima IMP-1. De tal manera que puede afirmarse que, entre los terpenos analizados, el carvacrol se unió de manera más fuerte a las enzimas y su complejo es más estable en comparación con el timol.

**Cuadro 8.** Interacciones moleculares *in Silico* entre las enzimas OXA-51 e IMP-1 con imipenem, carvacrol y timol, en panorama competitivo (Obtenido a través de Chimera 1.16 y Discovery Studio 2021).

Enzima	Molécula	Energía de afinidad (Kcal/mol)	Interacciones	Aminoácidos
<b>OXA-51</b>	Imipenem	-6.1	-Puente de Hidrógeno Convencional -Puente de Hidrógeno-Carbono -Pi-Azufre -Pi-Alquil	- <u>Arg 260*</u> -Ser 218 -Gly 219 - <u>Ser 80*</u> - <u>Phe 111*</u> - <u>Trp 114*</u> -Trp 222
	Carvacrol	-5.5	- Puente de Hidrógeno Convencional -Pi-Sigma -Pi-Pi en forma de T	- <u>Arg 260*</u> - <u>Phe 111*</u>
	Timol	-5.4	-Pi-Pi Apilado - Pi-Alquil	- <u>Phe 111*</u> -Trp 220 - <u>Trp 114*</u> -Tep 222
<b>IMP-1</b>	Imipenem	-5.5	- Puente de Hidrógeno Convencional -Puente de Hidrógeno-Carbono -Alquil -Pi-Alquil	-Asp 81 - <u>Asn 167*</u> - <u>His 139*</u> - <u>Val 25*</u> - <u>Val 31*</u> -His197
	Carvacrol	-4.9	- Puente de Hidrógeno Convencional - Enlace de Hidrógeno Pi-Donante -Pi-Sigma -Pi-Azufre - Pi-Alquil	-Asp 81 - <u>His 139*</u> - <u>Asn 167*</u> -His 197 - <u>His 79*</u> -Cys 158
	Timol	-4.8	- Puente de Hidrógeno Convencional -Enlace de Hidrógeno Pi-Donante -Donante-Donante No Favorable -Pi-Sigma -Pi-Alquil	- <u>His 77*</u> - <u>Asn 167*</u> -His 197 - <u>His 79*</u> - <u>His 139*</u>

\*Aminoácidos mayormente relacionados con el sitio activo de las enzimas OXA-51 e IMP-1 o que participan más activamente. También se indican mediante el subrayado.

Ahora bien, de manera general, en el acoplamiento molecular *in Silico* existen 2 tipos de interacciones, aquellas que median la unión específica del ligando con el receptor y, por otra parte,

aquellas que brindan estabilidad una vez que el complejo ya se ha formado. Ejemplo de las primeras son los puentes de Hidrógeno, que en los *docking* se consideran interacciones fuertes, mientras que las de tipo Pi son representativas del segundo tipo de interacción y se consideran un poco más débiles (Mohamed *et al.*, 2023). En ese sentido, para la enzima OXA-51, se ha reportado que los aminoácidos Arg260 y Ser80 son los mayormente relacionados con la actividad de la enzima y, como se determinó en nuestra investigación, son los que más participan en las interacciones. La Arg260 es la responsable de anclar al imipenem a la enzima y llevar a cabo su unión al formar un puente de hidrógeno con el oxígeno presente en el anillo betalactámico. De igual manera, la Ser80 también se considera un aminoácido catalítico conservado en el sitio activo y también forma enlaces de hidrógeno con el oxígeno del grupo hidroxilo del antibiótico, siendo la serina el donador de hidrógeno. A su vez, los sustratos muestran interacciones hidrofóbicas con dos residuos aromáticos: Phe111 y Trp114. La fenilalanina puede formar un túnel hidrofóbico a través de la boca del sitio activo, gracias a sus interacciones tipo Pi con el átomo de azufre del antibiótico. Esto es posible debido a la interacción de la nube electrónica Pi del anillo aromático de la fenilalanina. Por otro lado, Trp114 interactúa con uno de los carbonos de la cadena alquílica del antibiótico mediante su anillo aromático a través de una interacción tipo Pi-Alquil.

Por su parte, el carvacrol presentó interacciones donde participan 2 residuos conservados presentes en la interacción con imipenem. Aquí la Arg260 establece esta unión mediante la donación de su hidrógeno con el grupo hidroxilo de carvacrol, lo que confirma la unión más favorable entre este ligando y su receptor. Mientras que la Phe111 forma interacciones de estabilidad para el complejo enzima-ligando, siendo las principales la interacción Pi-sigma, con el isopropilo del carvacrol, y a su vez, la interacción Pi-pi dada por la nube electrónica de los anillos aromáticos de ambas moléculas. Finalmente, el timol presenta interacciones menos específicas y fuertes comparados con el carvacrol, pues en este nuevo complejo ya no participa la unión al aminoácido de anclaje (Arg260) ni la serina del sitio catalítico (Ser80), lo que pudiera explicar porque resultó en una unión menos fuerte a la enzima. En este caso, las interacciones dadas son de tipo Pi, presentando la Phe111 un apilamiento Pi-Pi entre su anillo aromático y el del timol. Además, el Trp114 abona a la estabilización del complejo formando una interacción Pi-alquil entre su anillo aromático y el grupo metilo terminal del timol.

Ahora bien, en el caso de la enzima IMP-1 de *P. aeruginosa*, observamos de igual manera que el imipenem se une más fuertemente a ella, dado que también es susceptible a sufrir la acción

hidrolítica. Y se observa nuevamente la tendencia de que el carvacrol presenta la mayor fuerza de unión comparado con el timol. En la actividad catalítica de la enzima, el aminoácido que participa mayormente es la Asn167, ubicada en el sitio activo. Se puede observar que, para el imipenem, la Asn167 forma 2 puentes de hidrógeno, ya que el nitrógeno amídico de la cadena principal del aminoácido interactúa con el anillo  $\beta$ -lactámico y el carboxilo contiguo. Adicionalmente, la His139, también presente en el sitio activo y coordinada con el centro metálico, forma un puente de hidrógeno con dicha estructura. En cuanto los aminoácidos Valina, destacados en la interacción con imipenem, estos se encuentran en un bolsillo hidrofóbico de la enzima y esto favorece las interacciones tipo Pi o alquil con la cadena principal del antibiótico.

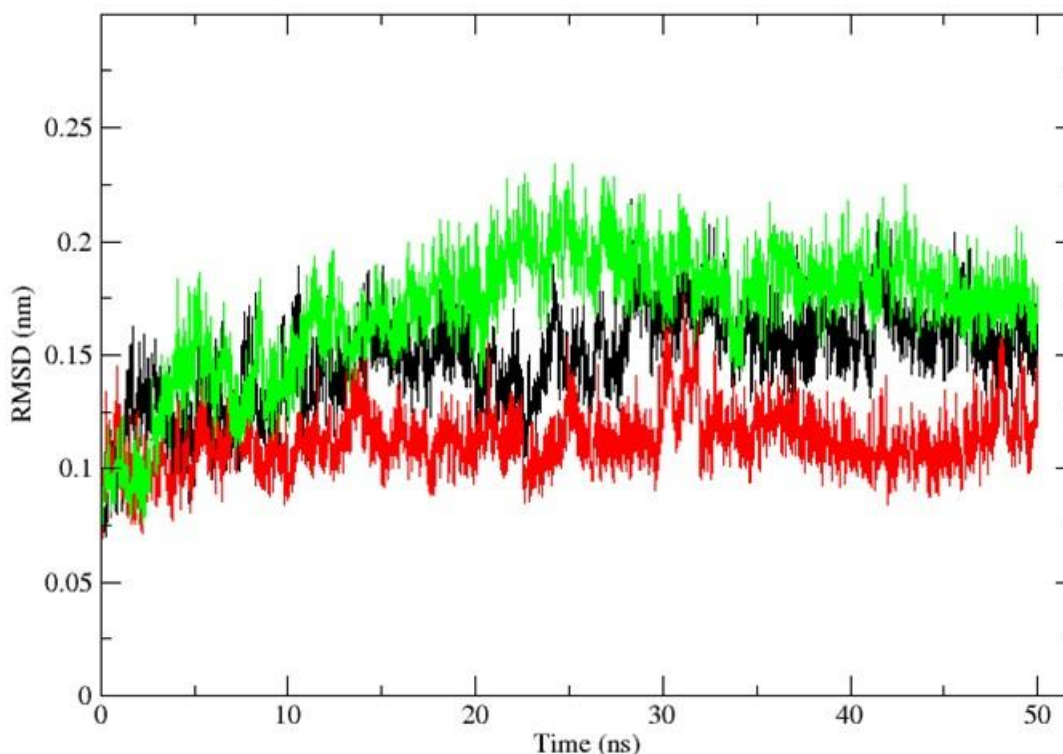
Para el carvacrol se conserva los enlaces de hidrógeno que permite la especificidad de unión por la His139 y Asn167, razón por la cual se observa una mayor energía de afinidad en el carvacrol comparado con el timol, pues la unión es más fuerte. Además, con el carvacrol se presentan 3 tipos distintos de interacciones Pi de estabilización, lo cual no se observa en el timol, pues se presentan solo 2 de este tipo de interacciones. Finalmente, en el caso del timol, de los 2 aminoácidos involucrados en las interacciones de formación de complejo, solo la Asn167 conservó su interacción de puente de hidrógeno. Sin embargo, la interacción que más resaltó fue la no favorable donador-donador mediada por la His139. Esto es importante destacar ya que este tipo de interacciones afecta la capacidad de unión del ligando al receptor, pues se generan fuerzas de repulsión, lo que pudiera explicar por qué el timol presenta menos afinidad a la enzima respecto al carvacrol e imipenem.

Cabe destacar que la información sobre acoplamiento molecular de compuestos vegetales en proteínas microbianas relacionadas con resistencia o virulencia aún es escasa para los terpenos y enzimas en nuestra investigación, sin embargo, se ha observado que el anclaje molecular con compuestos naturales permite analizar más fielmente las posibles interacciones. Tal es el caso de Silva-Trujillo *et al.*, (2022), quienes estudiaron la interacción del carvacrol con la proteína E del Virus del Dengue serotipo 2. Descubrieron que el carvacrol se unía al bolsillo  $\beta$ OG con una energía de afinidad de -7.31 kcal/mol, formando puentes de hidrógeno e inhibiendo la actividad enzimática. Estos investigadores vincularon la actividad antiviral de los aceites esenciales con el carvacrol, ya que su fuerza de unión a la proteína fue mayor que la mayoría de los otros monoterpenos estudiados. En relación con una de las clases de enzimas de interés en nuestra investigación, Salari-Jazi *et al.*, (2021) realizaron acoplamiento molecular de compuestos naturales con la enzima NDM-



1, una MBL reportada en *P. aeruginosa*. Encontraron que el compuesto NPC-18185 mostraba una energía de afinidad de -22.8 kcal/mol al unirse al sitio activo de la enzima, lo que sugiere que podría ser un inhibidor de su actividad hidrolítica.

Ahora bien, es poco probable que las interacciones de los ligandos con las enzimas ocurran solo de manera estática. Dicho de otra manera, a través del tiempo, estas interacciones iniciales van modificándose, ya sea por la misma actividad del receptor, o bien, por la estabilidad de las interacciones formadas. Es por eso que, para lograr un análisis más completo de estas asociaciones, se sugirió el estudio del comportamiento dinámico de los ligandos imipenem, carvacrol y timol con las enzimas antes mencionadas. Para esto, en la figura 5 se muestra la desviación de la media cuadrática de las posiciones atómicas (RMSD). Este gráfico indica la estabilidad de la interacción entre el ligando y el receptor basado en el comportamiento de aquel al unirse con la proteína, y como varía este en un periodo de tiempo mientras ocurre la reacción.

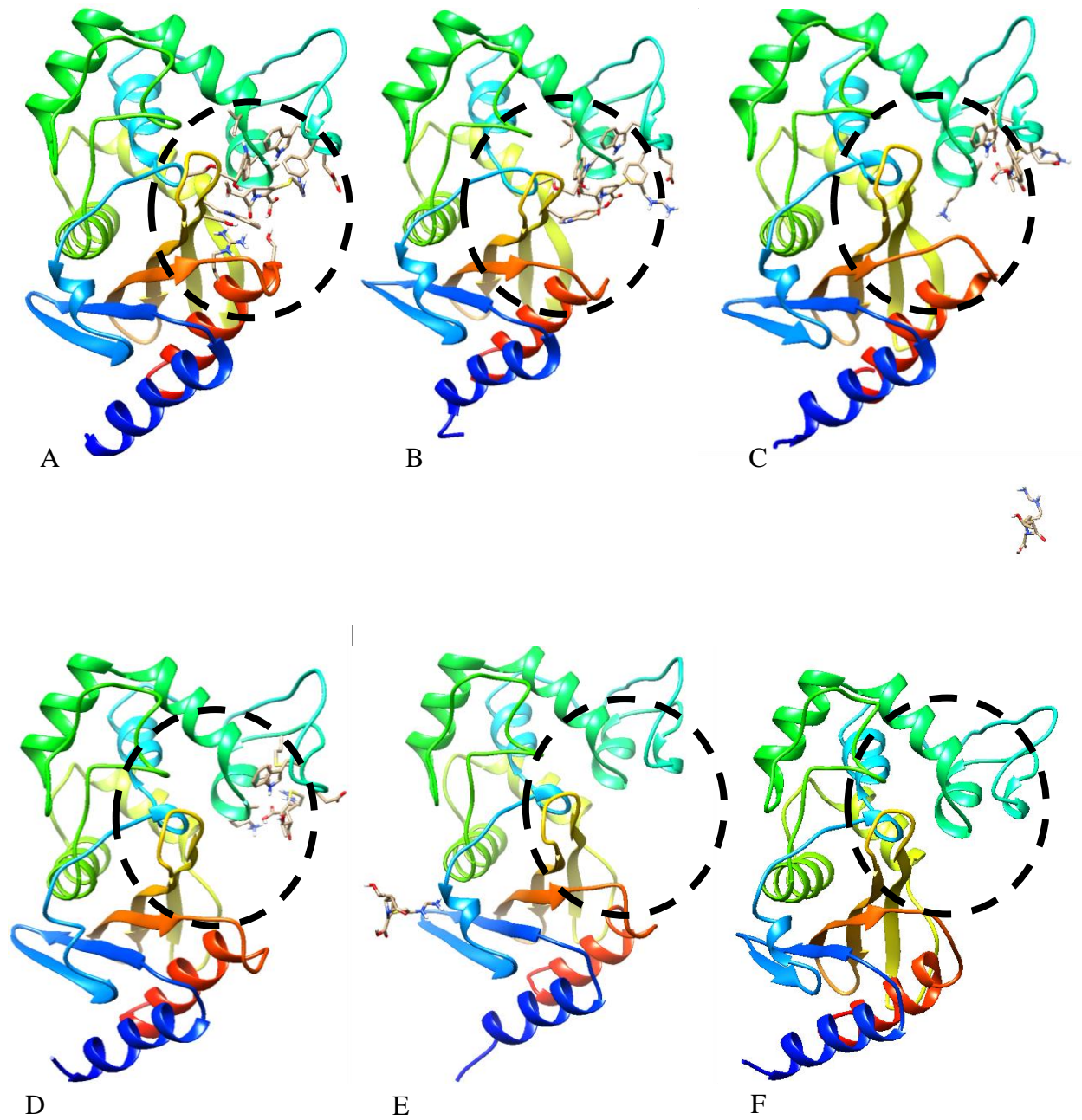


**Figura 5.** Desviación de la media cuadrática de las posiciones atómicas (RMSD) de los ligandos imipenem, carvacrol y timol con  $\beta$ -lactamasa OXA-51. El comportamiento del imipenem se muestra en color negro (—), el carvacrol en rojo (—) y el timol en verde (—).

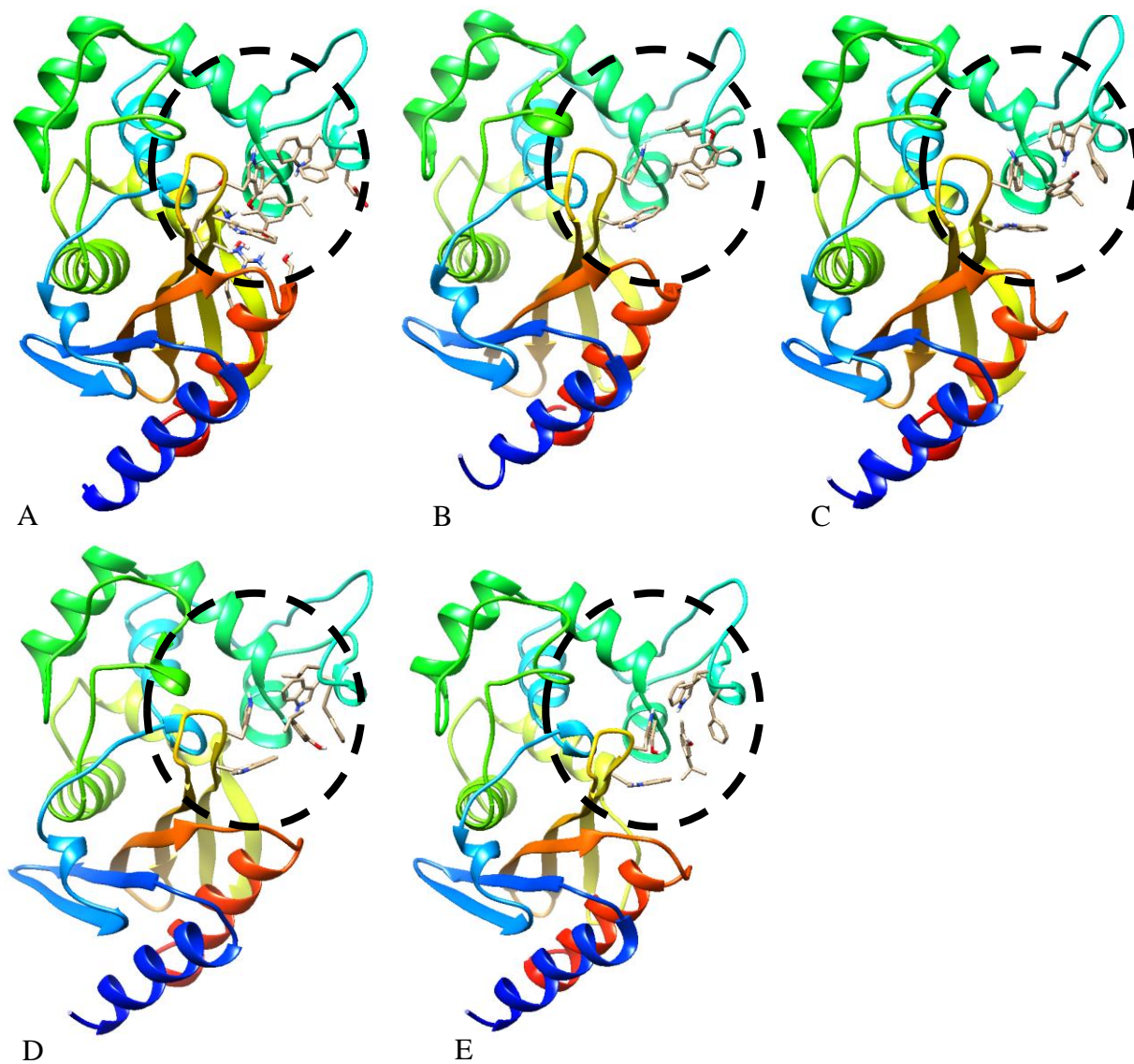
El comportamiento de la curva es directamente proporcional a la estabilidad del ligando al interactuar con la enzima. Al transcurrir la reacción, el ligando puede sufrir cambios en su posicionamiento con respecto a la enzima al momento inicial, lo que puede traducirse en variaciones en la estabilidad. Mientras más estática y sin fluctuaciones aparentes se mantenga la curva indica una mayor estabilidad en la interacción ligando-proteína y esta se mantiene a lo largo del tiempo; al contrario, si esta curva varía ampliamente y presenta fluctuaciones descendentes y ascendentes constantes, indica una fuerza de unión más débil y menos estable entre ligando-proteína. Para la enzima OXA-51 (Figura 5), el imipenem (curva color negro) parece mantener una estabilidad relativamente sostenible, mostrando una fluctuación más grande a los 40 ns, lo que deriva en un movimiento evidente a los 50 ns con respecto al tiempo inicial. Por su parte, el carvacrol (curva color rojo) presenta la curva con menos fluctuaciones, además de ubicarse en la posición más baja, lo que pudiera indicar una relativa estabilidad en su interacción a lo largo del tiempo, comparado con los otros dos ligandos. Finalmente, el timol (curva color verde) fue el compuesto que presentó mayor fluctuación a lo largo de la interacción, pues mantuvo un comportamiento relativamente estable antes de los 3 ns, mientras que después de los 5 ns presentó mayor movimiento que el imipenem, alcanzando el punto más alto de fluctuación a los 25 ns. Este comportamiento puede indicar una menor estabilidad del timol en esta interacción, sin embargo, no se relaciona necesariamente con una fuerza de unión débil o que la reacción no perdure a lo largo del tiempo, sino que puede deberse a cambios de dirección, orientación o posicionamiento del ligando.

Es con base en estos comportamientos que se estimó analizar la interacción de cada ligando con la enzima OXA-51 en los tiempos clave mostrados por el RMSD. Las figuras 6, 7 y 8 muestran la posición de los ligandos imipenem, carvacrol y timol, respectivamente, a distintos tiempos durante la interacción. Para el caso del imipenem y dado que la enzima OXA-51 es una  $\beta$ -lactamasa, se espera que esta escinda a la molécula de una manera relativamente eficiente, lo que se traduce en un tiempo corto. Se puede observar que desde los 10 ns, el imipenem comienza a salir levemente del sitio activo (Figura 6C) y para los 40 ns, el antibiótico ya se encuentra fuera dicha estructura (Figura 6D). Incluso, a los 50 ns el imipenem se ubica alejado de la enzima, por detrás del sitio activo. Esto concuerda con el gráfico RMSD, pues efectivamente a los 40 ns se refleja esta pérdida en la estabilidad de la interacción que puede indicar que la enzima ya realizó su acción hidrolítica y el ligando se mueve de posición porque ya se encuentra roto el anillo  $\beta$ -lactámico. En el caso del

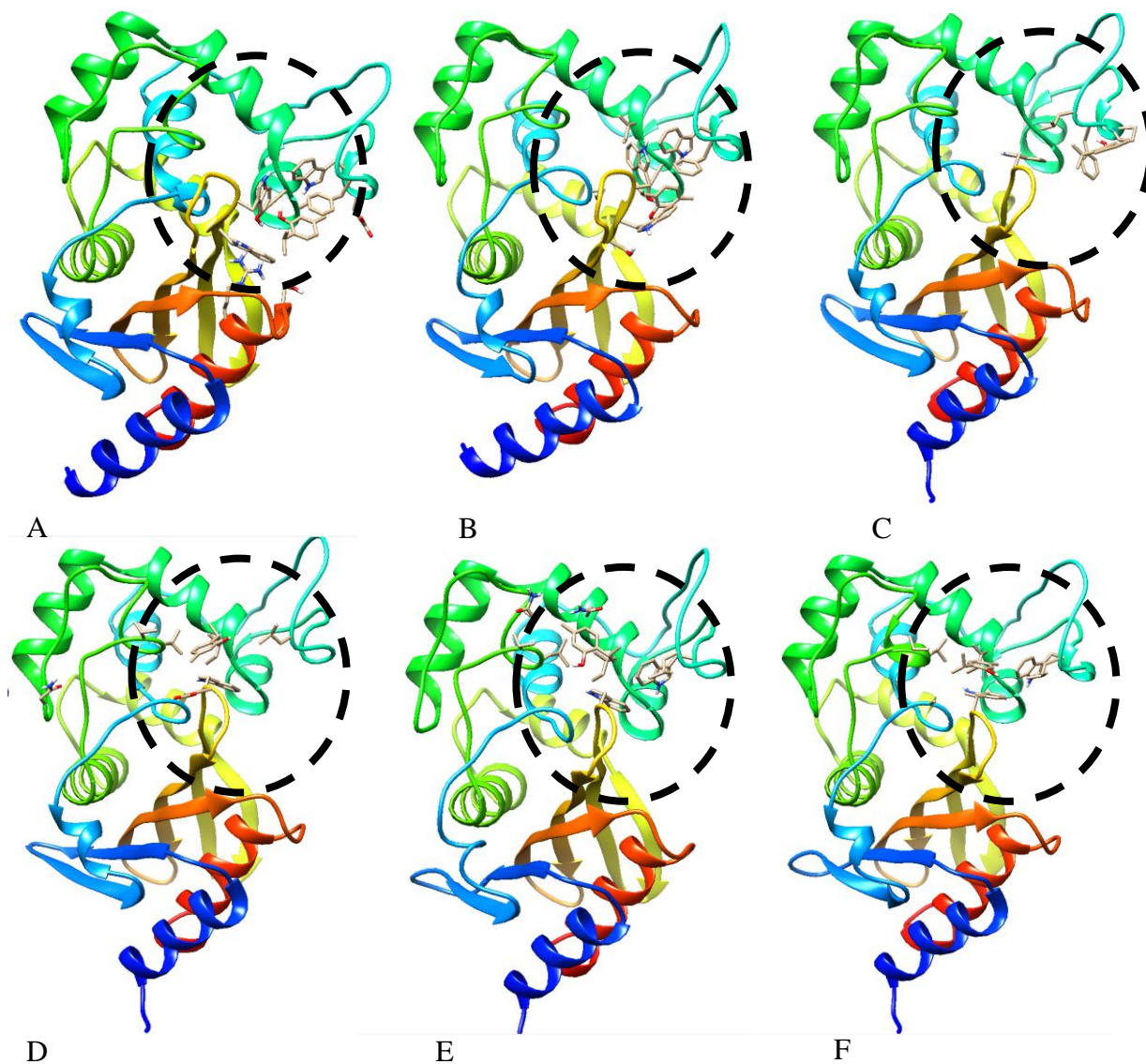
carvacrol, este resultó ser una de las moléculas más estables, ya que incluso, ni siquiera se desplazó fuera del sitio activo a los 50 ns de la reacción (Figura 7E). Los cambios en su RMSD no reflejan cambios de estabilidad por posicionamiento de ligando, sino más bien de orientación, pues se observa que a los 30 ns (Figura 7C) el carvacrol gira en el eje Z hacia atrás y mantiene relativamente esa posición en el tiempo analizado restante. Finalmente, el timol resultó tener la mayor variación de movimiento con respecto a los otros dos ligandos, pues desde los 5 ns (Figura 8B) comenzó a sufrir cambios en su orientación y posicionamiento en el área del sitio activo. Si bien, el timol tampoco sobrepasó este sitio, presentó un mayor desplazamiento dentro del área además de movimientos en todos los planos, variando evidentemente respecto a su posición inicial y propiciando su interacción con otros aminoácidos en la proteína. De acuerdo a su gráfico de RMSD, a los 25 ns (Figura 8C) presentó la menor estabilidad y esto puede deberse a que es el tiempo en el cual se ubicaba más cerca del límite del sitio activo.



**Figura 6.** Interacción dinámica de Imipenem y la enzima OXA-51 (4ZDX) a través del tiempo (en nanosegundos). A) Inicio de interacción, B) 3 ns, C) 10 ns, D) 20 ns, E) 40 ns, F) 50 ns.

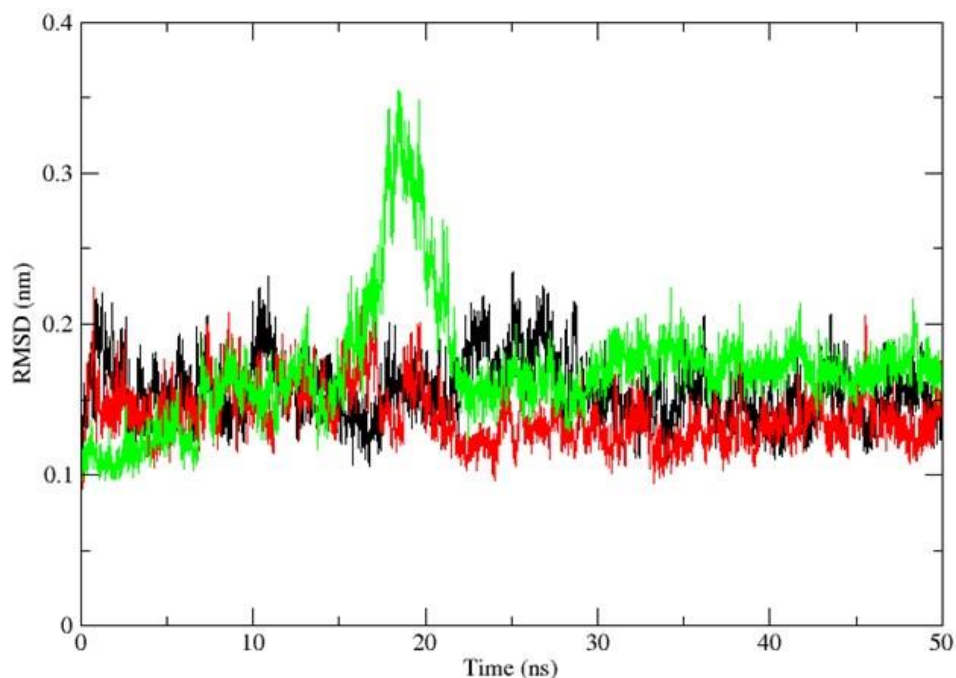


**Figura 7.** Interacción dinámica de carvacrol y la enzima OXA-51 (4ZDX) a través del tiempo (en nanosegundos). A) Inicio de interacción, B) 15 ns, C) 30 ns, D) 40 ns, E) 50 ns.



**Figura 8.** Interacción dinámica de timol y la enzima OXA-51 (4ZDX) a través del tiempo (en nanosegundos). A) Inicio de interacción, B) 5 ns, C) 25 ns, D) 34 ns, E) 40 ns, F) 50 ns.

De igual manera, fue posible analizar el comportamiento ligando-receptor del imipenem, carvacrol y timol con la enzima IMP-1 presente en *P. aeruginosa* (Figura 9). Asimismo, se muestra el comportamiento progresivo a través del tiempo de los ligandos en la interacción enzimática (Figuras 10, 11 y 12).

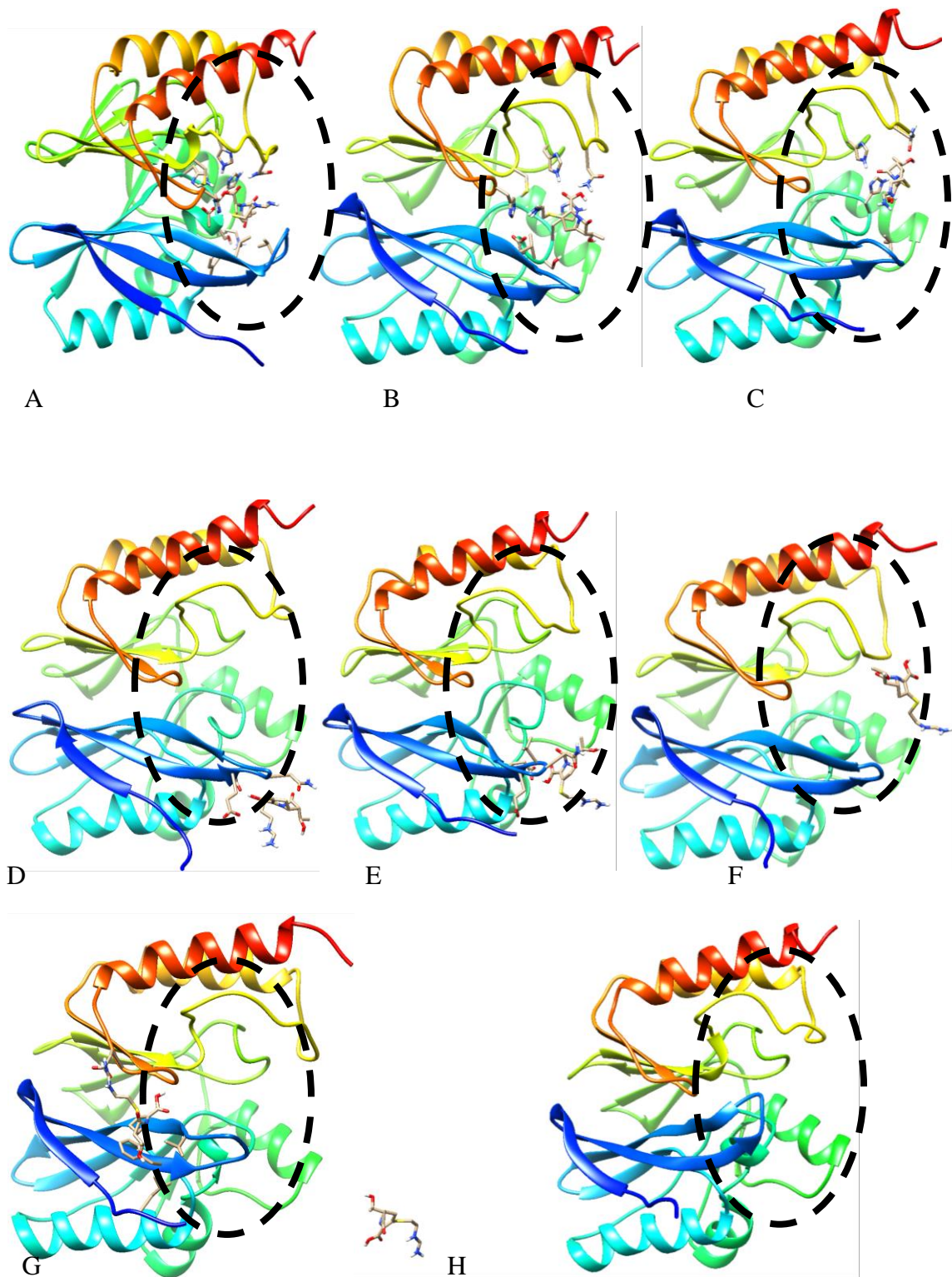


**Figura 9.** Desviación de la media cuadrática de las posiciones atómicas (RMSD) de los ligandos imipenem, carvacrol y timol con  $\beta$ -lactamasa IMP-1. El comportamiento del imipenem se muestra en color negro (-----), el carvacrol en rojo (-----) y el timol en verde (-----).

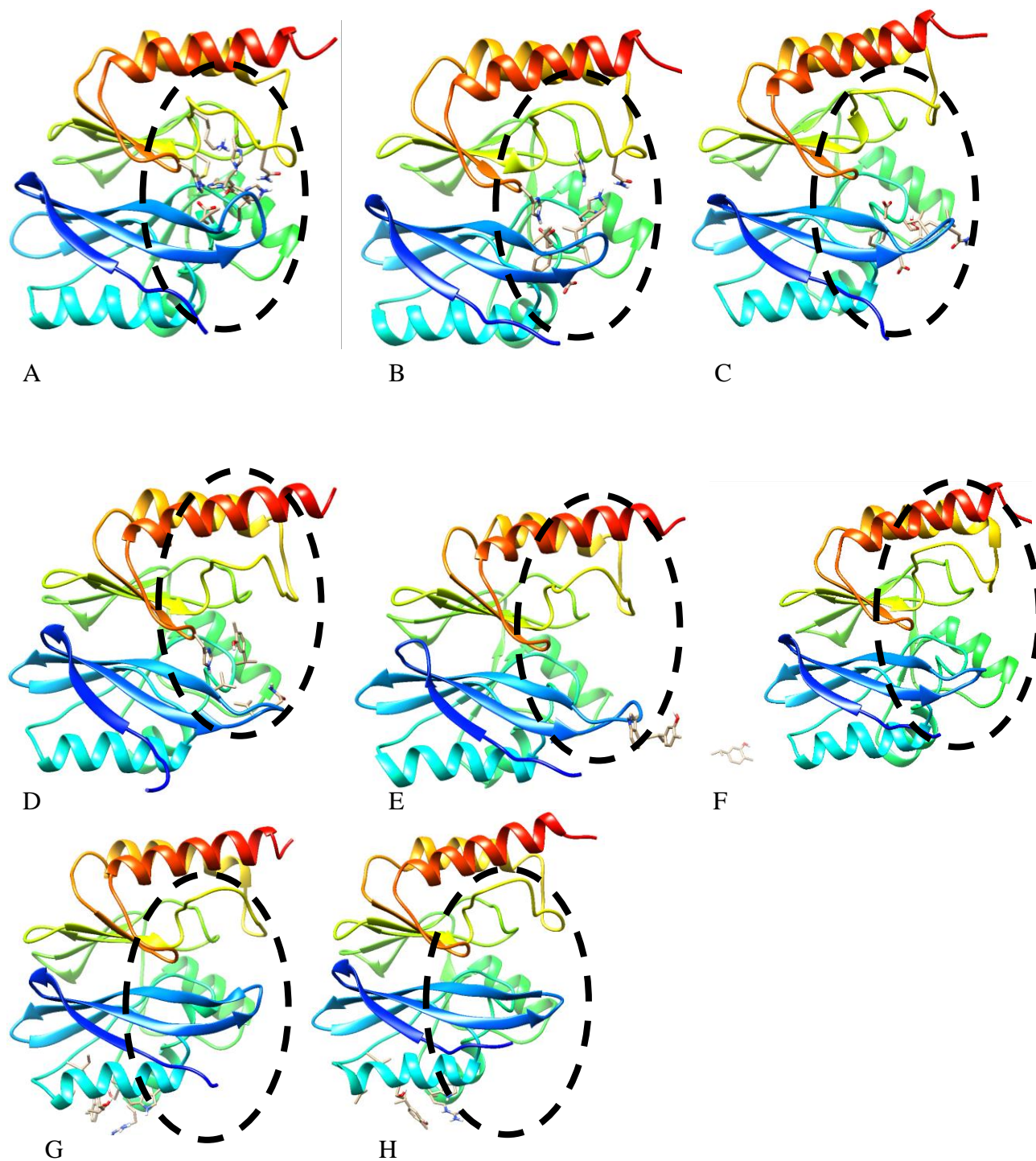
Según el gráfico RMSD (Figura 9), tanto el imipenem como el carvacrol mostraron interacciones muy estables y similares con la enzima IMP-1; el punto con menor estabilidad del imipenem fue a los 10 ns y como se logra observar en la figura 10D, es el tiempo al cual el imipenem se encuentra fuera del sitio activo de la enzima, pudiendo inferir que para este tiempo el antibiótico ya ha sido hidrolizado. A partir de ahí, parece mantener cierta cercanía con el sitio activo, pero es poco probable que interactúe como tal ya que no sería la molécula total. Por su parte, el carvacrol presenta una fluctuación relativamente controlada los primeros 20 ns, con algunos puntos más variantes como son a los 10 ns. Esto puede ser reflejo al cambio en la posición y orientación del ligando respecto a su unión inicial. Sin embargo, después de los 20 ns, el gráfico muestra un descenso del RMSD que indica que la interacción es menos fluctuante y esto se debe a que para los 21 ns (Figura 11E) el carvacrol ha salido del sitio activo de la enzima dejando de interactuar con ella. Cabe destacar que se ha observado un comportamiento interesante, pues en concordancia con el gráfico, a los 47 ns se detectó una nueva fluctuación en esta interacción y esta puede ser explicada debido a que en ese tiempo el carvacrol estableció nuevamente una interacción con la

enzima, pero en un sitio alejado y distinto al sitio activo. Finalmente, el timol fue la molécula que presentó la mayor variación según el gráfico de RMSD mostrando las fluctuaciones más evidentes respecto a la posición inicial, principalmente a los tiempos de 10 y 20 ns, mostrando la mayor inestabilidad a este segundo tiempo. Esto puede ser un indicio de que la fuerza de unión está por perderse y que el complejo ligando-proteína puede deshacerse, ya que después de los 20 ns, el ligando sale del sitio activo y se desprende de la enzima (Figuras 12 D-F).

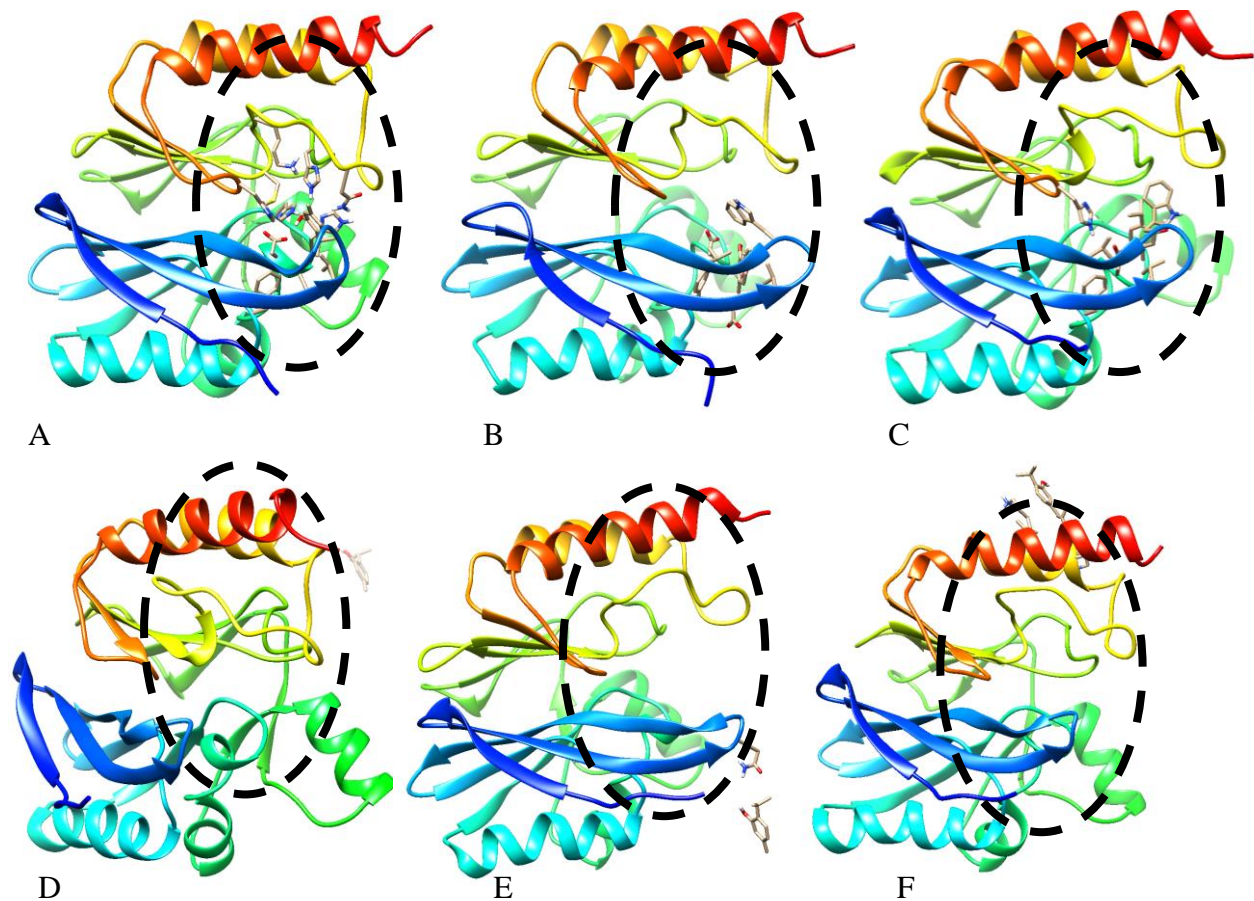




**Figura 10.** Interacción dinámica de imipenem y la enzima IMP-1 (1DDK) a través del tiempo (en nanosegundos). A) Inicio de interacción, B) 2 ns, C) 5 ns, D) 10 ns, E) 15 ns, F) 25 ns, G) 45 ns H) 50 ns



**Figura 11.** Interacción dinámica de carvacrol y la enzima IMP-1 (1DDK) a través del tiempo (en nanosegundos). A) Inicio de interacción, B) 5 ns, C) 10 ns, D) 19 ns, E) 21 ns, F) 25 ns, G) 47 ns H) 50 ns



**Figura 12.** Interacción dinámica de timol y la enzima IMP-1 (1DDK) a través del tiempo (en nanosegundos). A) Inicio de interacción, B) 10 ns, C) 20 ns, D) 30 ns, E) 40 ns, F) 50 ns.

Hasta este punto, el análisis de las interacciones moleculares entre estas enzimas hidrolíticas y los compuestos vegetales permiten afirmar que estos pueden unirse a las enzimas de manera favorable, e incluso bloquear su sitio activo y de esta manera evitar la degradación del fármaco, lo cual sería un enfoque para explicar que el uso combinado del antibiótico con estos compuestos resultaría en una disminución de la actividad de este factor de resistencia. Los resultados obtenidos en esta etapa permiten proponer que el uso de compuestos vegetales puede representar una opción efectiva frente a la resistencia a los antibióticos, disminuyendo la virulencia de las bacterias. Además, esto refuerza la idea de que utilizar tratamientos donde se combinen antibacterianos es una opción prometedora en la lucha contra la resistencia

## 7. CONCLUSIÓN

El aceite esencial de *L. graveolens*, el carvacrol y el antibiótico imipenem demostraron una clara actividad antibacteriana contra las células planctónicas de *P. aeruginosa*, *A. baumannii* y su co-cultivo. Se observó que se requerían concentraciones más altas de cada tratamiento para lograr el efecto deseado en este último sistema. Además, las combinaciones de aceite esencial de orégano-imipenem y carvacrol-imipenem mostraron un efecto sinérgico en la reducción de la viabilidad bacteriana, lo que permitió el uso de dosis menores de cada compuesto en la combinación. De igual manera, tanto los compuestos individuales como sus combinaciones pudieron inhibir la formación de biopelículas en ambos sistemas de cultivo en los tubos endotraqueales. Finalmente, en el acoplamiento molecular competitivo, se observó que el carvacrol tenía una mayor afinidad energética que el timol hacia las enzimas OXA-51 e IMP-1, lo que sugiere una unión favorable y una posible atenuación enzimática. En consecuencia, las combinaciones de aceite esencial de *L. graveolens* o carvacrol con imipenem resultaron ser más efectivas para reducir la viabilidad y la virulencia de *P. aeruginosa*, *A. baumannii* y su co-cultivo debido a su efecto sinérgico.

## 8. RECOMENDACIONES

Con el objetivo de profundizar y abonar al conocimiento de investigaciones futuras, se sugiere el uso de cromogares para comprobar el crecimiento conjunto de ambas bacterias en el co-cultivo, haciendo resiembras individuales de estos microorganismos co-cultivados en los medios propuestos. Además, pueden realizarse pruebas rápidas a las colonias por separado para confirmar la presencia de ambas bacterias, como oxidasa, movilidad, etc. Por otra parte, se sugiere profundizar en otros mecanismos de acción de los compuestos vegetales, por ejemplo, su interacción *in vitro* con las enzimas implicadas en la resistencia de ambos patógenos, como OXA-51, OXA-23, IMP-1 y VIM. De igual manera, se sugiere estudiar otros mecanismos de resistencia importantes, como las bombas de eflujo (OmpA, por ejemplo) y realizar evaluaciones a nivel de expresión genética para identificar si los genes que codifican dichos mecanismos de resistencia pueden ser afectados a este nivel.

Finalmente, como posible aplicación, se sugiere evaluar el efecto antibacteriano de *L. graveolens*, carvacrol y sus combinaciones con antibióticos  $\beta$ -lactámicos sobre otros microorganismos patógenos prioritarios y comúnmente encontrados en procesos de coinfección en el ámbito nosocomial, como los otros miembros del grupo ESKAPE. De igual manera, se recomienda la evaluación de toxicidad de los compuestos utilizados, principalmente de la combinación de antibacterianos, sobre modelos de toxicidad, para finalmente pasar a su evaluación en modelos de infección *in vivo*, como los modelos murinos.

## 9. REFERENCIAS

- Abers M., Schroeder S., Goelz L., Sulser A., St Rose T., Puchalski K. y Langland J. 2021. Antimicrobial activity of the volatile substances from essential oils. *BMC Complement Med Ther.* 21(1):124.
- Acharya, T. (2022). *Pseudomonas aeruginosa*: Infections, Pathogenesis and Lab Diagnosis. Nepal: Microbe Online. Recuperado de: <https://microbeonline.com/pseudomonas-aeruginosa-infection-mortality-pathogenesis-and-diagnosis/>
- Alharbi M.A., Alrehaili A.A., Albureikan M.O.I., Gharib A.F, Daghistani H., Bakhuraysah M.M., Aloraini G.S., Bazuhair M.A., Alhuthali H.M. y Ghareeb A. 2023. *In vitro* studies on the pharmacological potential, anti-tumor, antimicrobial, and acetylcholinesterase inhibitory activity of marine-derived *Bacillus velezensis* AG6 exopolysaccharide. *RSC Adv.* 13(38):26406-26417
- Amaral S.C., Pruski B.B., de Freitas S.B., Allend S.O., Ferreira M.R.A., Moreira C. Jr., Pereira D.I.B., Junior A.S.V. y Hartwig D.D. 2020. *Origanum vulgare* essential oil: antibacterial activities and synergistic effect with polymyxin B against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Mol Biol Rep.* 47(12):9615-9625.
- Arrieta-Galindo, J.D. (2020). Acoplamiento molecular: una herramienta computacional para el estudio de complejos quimioterapéuticos anticancerosos basados en Paladio (II) (tesis de pregrado). Universidad de Córdoba, Montería, Colombia.
- Asadi S., Nayeri-Fasaei B., Zahraei-Salehi T., Yahya-Rayat R., Shams N. y Sharifi A. 2023. Antibacterial and anti-biofilm properties of carvacrol alone and in combination with cefixime against *Escherichia coli*. *BMC Microbiol.* 3;23(1):55.
- Asma S.T., Imre K., Morar A., Herman V., Acaroz U., Mukhtar H., Arslan-Acaroz D., Shah S.R.A. y Gerlach R. 2022. An overview of biofilm formation-combating strategies and mechanisms of action of antibiofilm Agents. *Life (Basel).* 12(8):1110.
- Ayoub-Moubareck C. y Hammoudi-Halat D. 2020. Insights into *Acinetobacter baumannii*: A review of microbiological, virulence, and resistance traits in a threatening nosocomial pathogen. *Antibiotics.* 9(3): 119.
- Barraza J.P. y Whiteley M. 2021. A *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial affects the biogeography but not fitness of *Staphylococcus aureus* during coculture. *mBio.* 12(2): e00047-21.
- Basavegowda N., Patra J.K. y 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): 1058.
- Bautista-Hernández I., Aguilar C.N., Martínez-Ávila G.C.G., Torres-León C., Ilina A., Flores-Gallegos A.C., Kumar-Verma D. y Chávez-González M.L. 2021. Mexican oregano (*Lippia graveolens* Kunth) as source of bioactive compounds: A review. *Molecules.* 26(17): 5156.
- Behzadi P., Baráth Z. y Gajdács M. 2021. It's not easy being green: A narrative review on the

microbiology, virulence and therapeutic prospects of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics*. 10(1): 42.

- Bernal, A. (2019). Combinación de compuestos fenólicos para inhibir la formación de biopelículas de *Escherichia coli* uropatógena en superficies de silicona. (Tesis de doctorado). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora.
- Bernal-Mercado A.T., Juárez J., Valdez M.A., Ayala-Zavala J.F., Del-Toro-Sánchez C.L. y Encinas-Basurto D. 2022. Hydrophobic chitosan nanoparticles loaded with carvacrol against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Molecules*. 27(3):699
- Boulanger S., Mitchell G., Bouarab K., Marsault E., Cantin A, Frost E.H., Déziel E. y Malouin F. 2015. Bactericidal effect of tomatidine-tobramycin combination against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* is enhanced by interspecific small-molecule interactions. *Antimicrob Agents Chemother*. 59(12): 7458–7464.
- Canut-Blasco A., Collazos-Blanco A., Díez-Aguilar M., Morosini-Reilly M.I., Rodríguez-Gascón A. y Seral-García C. 2020. Métodos microbiológicos para la determinación *in vitro* de la actividad de combinaciones de antimicrobianos. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). España. Recuperado de <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimiento70.pdf>
- Cárdenas J., Castillo O., De Cámara C. y González V. 2018. Combatiendo la resistencia bacteriana: una revisión sobre las terapias alternas a los antibióticos convencionales. *Bol Venez Infectol*. 29 (1): 11-19
- Cendra M.M., Blanco-Cabra N., Pedraz L. y Torrents E. 2019. Optimal environmental and culture conditions allow the *in vitro* coexistence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in stable biofilms. *Sci Rep*. 9: 16284.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2019). Infographic: Antibiotic resistance the global threat. USA: Global Health. Recuperado de [https://www.cdc.gov/globalhealth/infographics/antibiotic-resistance/antibiotic\\_resistance\\_global\\_threat.htm](https://www.cdc.gov/globalhealth/infographics/antibiotic-resistance/antibiotic_resistance_global_threat.htm)
- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). 2021a. Preguntas y respuestas sobre el uso de antibióticos. USA. CDC. Recuperado de <https://www.cdc.gov/antibiotic-use/sp/should-know.html>
- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). 2022. COVID-19: U.S. Impact on Antimicrobial Resistance, Special Report 2022. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/drugresistance/covid19.html>
- Chadha J., Harjai K. y Chhibber S. 2022. Repurposing phytochemicals as anti-virulent agents to attenuate quorum sensing-regulated virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Biotechnol*. 15(6):1695-1718.
- Chan A.P., Choi Y., Brinkac L.M., Krishnakumar R., DePew J., Kim M., Hinkle M.K., Lesho E.P. y Fouts D.E. 2018. Multidrug resistant pathogens respond differently to the presence of co-pathogen, commensal, probiotic and host cells. *Sci Rep*. 8: 8656.

- Chanda W., Joseph T.P., Padhiar A.A., Guo X., Min L., Wang W., Lolokote S., Ning A., Cao J., Huang M. y Zhong M. 2017. Combined effect of linolenic acid and tobramycin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and quorum sensing. *Exp Ther Med*.14(5):4328-4338
- Cheesman M.J., Ilanko A., Blonk B. y Cock I.E. 2017. Developing new antimicrobial therapies: Are synergistic combinations of plant extracts/compounds with conventional antibiotics the solution? *Pharmacogn Rev*. 11(22):57-72
- Chegini Z., Khoshbayan A., Taati-Moghadam M., Farahani I., Jazireian P. y Shariati A. 2020. Bacteriophage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a review. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*.19(1):45.
- Cho T.J., Park S.M., Yu H., Seo G.H., Kim H.W., Kim S.A. y Rhee M.S. 2020. Recent Advances in the Application of Antibacterial Complexes Using Essential Oils. *Molecules*. 25(7):1752
- Čiginskienė A., Dambrauskienė A., Rello J. y Adukauskienė D. 2019. Ventilator-associated pneumonia due to drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: Risk factors and mortality relation with resistance profiles, and independent predictors of in-hospital mortality. *Medicina (Kaunas)*. 55(2): 49.
- CLSI. (2020). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 30<sup>th</sup> ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. Recuperado de <https://www.nih.org.pk/wp-content/uploads/2021/02/CLSI-2020.pdf>
- Coccimiglio J., Alipour M., Jiang Z.H., Gottardo C. y Suntutres Z. 2016. Antioxidant, antibacterial and cytotoxic activities of the ethanolic *Origanum vulgare* extract and its major constituents. *Oxid Med Cell Longev*. 1404505
- Concha N.O., Janson C.A., Rowling P., Pearson S., Cheever C.A, Clarke B.P, Lewis C., Galleni M., Frère J.M., Payne D.J, Bateson J.H. y Abdel-Meguid S.S. 2000. Crystal structure of the IMP-1 metallo beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its complex with a mercaptocarboxylate inhibitor: binding determinants of a potent, broad-spectrum inhibitor. *Biochemistry*. 39(15):4288-98.
- Cortés-Chitala M.C., Flores-Martínez H., Orozco-Ávila I, León-Campos C., Suárez-Jacobo A., Estarrón-Espinosa M. y López-Muraira I. 2021. Identification and quantification of phenolic compounds from mexican oregano (*Lippia graveolens* HBK) hydroethanolic extracts and evaluation of its antioxidant capacity. *Molecules*. 26(3): 702.
- De la Fuente-Núñez C., Reffuveille F., Mansour S.C., Reckseidler-Zenteno S.L., Hernández D., Brackman G., Coenye T. y Hancock R.E. 2015. D-enantiomeric peptides that eradicate wild-type and multidrug-resistant biofilms and protect against lethal *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Chem Biol*. 22(2):196-205
- De Martino L., De Feo V., Formisano C., Mignola E. y Senatore F. 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from three chemotypes of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart growing wild in Campania (Southern Italy). *Molecules*. 14(8):2735-46.
- Dera A.A., Ahmad I., Rajagopalan P., Shahrani M.A., Saif A., Alshahrani M.Y., Alraey Y., Alamri A.M., Alasmari S., Makkawi M., Alkhatami A.G., Zaman G., Hakami A., Alhefzi R. y Alfhili M.A. 2021. Synergistic efficacies of thymoquinone and standard antibiotics against



multi-drug resistant isolates. Saudi Med J. 42(2):196-204.

- Díaz-De León C.I., González-Álvarez M., Guzmán-Lucio M.A., Núñez-Guzmán G.R. y Moreno-Limón S. 2020. El orégano de los géneros *Lippia* (*Verbenaceae*) y *Poliomintha* (*Lamiaceae*) en el Estado de Nuevo León, México. Polibotánica. 50.
- El-Said H., Ashgar S.S., Bader A., AlQathama A., Halwani M., Ascrizzi, R. y Flamini G. 2021. Essential oil analysis and antimicrobial evaluation of three aromatic plant species growing in Saudi Arabia. Molecules. 26(4): 959.
- Eze E.C., Chenia H.Y. y El Zowalaty M.E. 2018. *Acinetobacter baumannii* biofilms: effects of physicochemical factors, virulence, antibiotic resistance determinants, gene regulation, and future antimicrobial treatments. Infect Drug Resist. 11:2277-2299.
- Gao C.H., Cao H., Cai P. y Sørensen S.J. 2021. The initial inoculation ratio regulates bacterial coculture interactions and metabolic capacity. ISME J. 15(1): 29–40.
- Giono-Cerezo S., Santos-Preciado J.I., Morfín-Otero M.R., Torres López F.J. y Alcántar-Curiel, M.D. 2020. Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. Gac. Méd. Méx. 156(2).
- González-Trujano M.E., Hernández-Sánchez L.Y., Muñoz-Ocotero V., Dorazco-González A., Guevara-Fefer P. y Aguirre-Hernández E. 2017. Pharmacological evaluation of the anxiolytic-like effects of *Lippia graveolens* and bioactive compounds. Pharm Biol. 55(1): 1569–1576.
- Guo T., Li M., Sun X., Wang Y., Yang L., Jiao H. y Li G. 2021. Synergistic activity of capsaicin and colistin against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: *In vitro/vivo* efficacy and mode of action. Front Pharmacol. 12: 744494.
- Gutierrez-Pacheco M.M., Gonzalez-Aguilar G.A., Martinez-Tellez M.A., Lizardi-Mendoza J., Madera-Santana T.J., Bernal-Mercado A.T., Vazquez-Armenta F.J. y Ayala-Zavala J.F. 2018. Carvacrol inhibits biofilm formation and production of extracellular polymeric substances of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Food Control. 89: 210-218.
- Hernández-Hernández E., Regalado-González C., Vázquez-Landaverde P., Guerrero-Legarreta I. y García-Almendárez B.E. 2014. Microencapsulation, chemical characterization, and antimicrobial activity of Mexican (*Lippia graveolens* H.B.K.) and European (*Origanum vulgare* L.) oregano essential oils. ScientificWorldJournal. 2014: 641814.
- Heo YA. 2021. Imipenem/Cilastatin/Relebactam: A review in Gram-negative bacterial infections. Drugs. 81(3):377-388.
- IQB (Centro colaborador de La Administración Nacional de Medicamentos, alimentos y Tecnología Médica -ANMAT-). (2012). Imipenem + Cilastatina. Argentina: IQB. Recuperado de <https://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/c052.htm#>
- Irrera N., D'Ascola A., Pallio G., Bitto A., Mannino F., Arcoraci V., Rottura M., Ieni A., Minutoli L., Metro D., Vaccaro M., Altavilla D. y Squadrito F. 2020.  $\beta$ -Caryophyllene inhibits cell proliferation through a direct modulation of CB2 receptors in glioblastoma cells. Cancers (Basel). 12(4): 1038.
- Jacobs H.M., O'Neal L., Lopatto E., Wozniak D.J., Bjarnsholt T. y Parsek M.R. 2022. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* Can Produce Calcium-Gelled Biofilms Independent of the Matrix

Components Psl and CdrA. J Bacteriol. 204(5):e0056821.

- Jan S., Rashid M., Abd\_Allah E.F. y Ahmad P. 2020. Biological efficacy of essential oils and plant extracts of cultivated and wild ecotypes of *Origanum vulgare* L. Biomed Res Int. 2020: 8751718.
- Jurado-Martín I., Sainz-Mejías M. y McClean S. 2021. *Pseudomonas aeruginosa*: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. Int J Mol Sci. 22(6):3128
- Kachur K. y Suntres Z. 2019. The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. Critical reviews in food science and nutrition. 60(18): 3042-3053.
- Kanafani Z.A., Zahreddine N., Tayyar R., Sfeir J., Araj G.F., Matar G.M. y Kanj S.S. 2018. Multi-drug resistant *Acinetobacter* species: a seven-year experience from a tertiary care center in Lebanon. Antimicrob Resist Infect Control. 7: 9.
- Karumathil D.P., Nair M.S., Gaffney J., Kollanoor-Johny A. y Venkitanarayanan K. 2018. Trans-cinnamaldehyde and eugenol increase *Acinetobacter baumannii* sensitivity to beta-lactam antibiotics. Front Microbiol. 9: 1011.
- Khan N., Maezato Y., McClure R.S., Brislawn C.J., Mobberley J.M., Isern N., Chrisler W.B., Markillie L.M., Barney B.M., Song H.S., Nelson W.C. y Bernstein H.C. 2018. Phenotypic responses to interspecies competition and commensalism in a naturally-derived microbial co-culture. Sci Rep; 8: 297.
- Khare T., Anaud U., Dey A., Assaraf Y.G., Zhe-Sheng C., Liu Z. y Kumar V. 2021. Exploring phytochemicals for combating antibiotic resistance in microbial pathogens. Front Pharmacol. 12: 720726.
- Kuei-Hsiang H., Ming-Cheng W., Ay-Huey H., Jing-Jou Y. y Jiunn-Jong W. 2012. Heteroresistance to cephalosporins and penicillins in *Acinetobacter baumannii*. ASM Journals  
Journal of Clinical Microbiology. 50(3).
- Kumara S.M., Akhtar M.S. y Sinniah U.R. 2016. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. Evid Based Complement Alternat Med. 3012462.
- Kyriakidis I., Vasileiou E., Pana D. y Tragiannidise A. 2021. *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms. Pathogens. 10(3): 373.
- Lee T.C.H., Chan P.L., Tam N.F.Y., Xu S.J.L y Lee F.W.F. 2021. Establish axenic cultures of armored and unarmored marine dinoflagellate species using density separation, antibacterial treatments and stepwise dilution selection. Sci Rep. 11: 202.
- Leja K., Drożdżyńska A., Majcher M., Kowalczewski P. y Czaczyk, K. 2019. Influence of sub-inhibitory concentration of selected plant essential oils on the physical and biochemical properties of *Pseudomonas orientalis*. Open Chemistry. 17(1): 492-505.
- Leontyev A.E., Pavlenko I.V., Kovalishena O.V., Saperkin N.V., Tulupov A.A. y Beschastnov V.V. 2020. Application of phagotherapy in the treatment of burn patients (Review). Sovrem Tekhnologii Med. 12(3): 95–103.
- Leyva-López N., Gutiérrez-Grijalva E.P., Vazquez-Olivo G. y Heredia J.B. 2017. Essential oils of

- oregano: Biological activity beyond their antimicrobial properties. *Molecules*. 22(6): 989.
- Llaca-Díaz J.M., Mendoza-Olazarán S., Camacho-Ortiz A., Flores S. y Garza-González E. 2012. One-year surveillance of ESKAPE pathogens in an intensive care unit of Monterrey, Mexico. *Chemotherapy*. 58 (6):475-481
- López-Villarreal S.M., Elizondo-Luévano J.H., Pérez-Hernández R.A., Sánchez-García E., Verde Star M.J., Castro-Ríos R., Garza-Tapia M., Rodríguez-Luis O.E. y Chávez-Montes A. 2022. Preliminary study of the antimicrobial, anticoagulant, antioxidant, cytotoxic, and anti-inflammatory activity of five selected plants with therapeutic application in dentistry. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 19: 7927.
- Lu M., Dai T., Murray C.K y Wul M.X. 2018. Bactericidal property of oregano oil against multidrug-resistant clinical isolates. *Front Microbiol*. 9: 2329.
- Lucas-Kerihara M.N., Oliveira-De Sales R., Esther-Da Silva K., Glaucel-Maciel W. y Simionattoet S. 2020. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreaks: a global problem in healthcare settings. *Rev Soc Bras Med Trop*. 53: e20200248.
- Maglangit F., Fang Q., Kyeremeh K., Sternberg J.M., Ebel R. y Deng H. 2020. A Co-culturing approach enables discovery and biosynthesis of a bioactive indole alkaloid metabolite. *Molecules*. 25(2): 256.
- Mechmechani S., Gharsallaoui A., Fadel A., El-Omari K., Khelissa S., Hamze M. y Chihib N.E. 2022. Microencapsulation of carvacrol as an efficient tool to fight *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis* biofilms. *PLoS One*. 17(7): e0270200.
- Medell-Gago, M., Hart-Casares M. y Mora Diaz I. 2012. *Acinetobacter baumannii* versus *Pseudomonas aeruginosa*. Comportamiento en pacientes críticos con ventilación mecánica. *Rev cubana med*. 51(3).
- Michelsen C.F., Christensen A.M., Bojer M.S., Høiby N., Ingmer H. y Jelsbak L. 2014. *Staphylococcus aureus* alters growth activity, autolysis, and antibiotic tolerance in a human host-adapted *Pseudomonas aeruginosa* lineage. *J Bacteriol*. 196(22):3903-11.
- Mohamed E.A.R., Abdel-Rahman I.M., Zaki M.E.A., Al-Khdhairawi A., Abdelhamid M.M., Alqaisi A.M., Rahim L.B.A., Abu-Hussein B., El-Sheikh A.A.K., Abdelwahab S.F. y Hassan H.A. 2023. *In silico* prediction of potential inhibitors for SARS-CoV-2 Omicron variant using molecular docking and dynamics simulation-based drug repurposing. *J Mol Model*. 29(3):70
- Montagu A., Joly-Guillou M.L., Rossines E., Cayon J., Kempf M. y Saulnier P. 2016. Stress conditions induced by carvacrol and cinnamaldehyde on *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol*. 7: 1133.
- Morris F.C., Dexter C., Kostoulias X., Uddin M.I., y Peleg A.Y. 2019. The mechanisms of disease caused by *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol*; 10: 1601.
- Mutlu-Ingok A., Devecioglu D., Dikmetas D.N., Karbancioglu-Guler F. y Capanoglu E. 2020. Antibacterial, antifungal, antimycotoxigenic, and antioxidant activities of essential oils: An Updated review. *Molecules*. 25(20):4711.
- National Library of Medicine. (2022). Carvacrol. USA. PubChem. Recuperado de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10364>

- Köse E.O. 2022. *In vitro* activity of carvacrol in combination with meropenem against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Folia Microbiol (Praha). 67(1):143-156.
- Organización de las Naciones Unidas (ONU). (2021). La resistencia a los antibióticos supone un riesgo para las personas, los animales y el medio ambiente. ONU. Recuperado de <https://news.un.org/es/story/2021/04/1491502>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2017). La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. OMS. Recuperado de <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2020a). Resistencia a los antibióticos. OMS. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2020b). Resistencia a los antimicrobianos. OMS. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2021). La escasez mundial de antibióticos innovadores favorece la aparición y propagación de la farmacorresistencia. OMS. Recuperado de <https://www.who.int/es/news/item/15-04-2021-global-shortage-of-innovative-antibiotics-fuels-emergence-and-spread-of-drug-resistance>
- Orhan-Yanikan E., da Silva-Janeiro S., Ruiz-Rico M., Ayhan K. y Barat J.M. 2019. Essential oils compounds as antimicrobial and antibiofilm agents against strains present in the meat industry. Food Control.101: 29-38
- Peng Q., Lin F.y Ling B. 2020. In vitro activity of biofilm inhibitors in combination with antibacterial drugs against extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Sci Rep. 10(1):18097.
- Piri-Gharaghie T., Jegargoshe-Shirin N., Saremi-Nouri S., Khademhosseini S.H, Hoseinnezhad-Lazarjani E., Mousavi A., Kabiri H., Rajaei N., Riahi A., Farhadi-Biregani A. y Fatehi-Ghahfarokhi S. 2022. Effects of Imipenem-containing Niosome nanoparticles against high prevalence methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* biofilm formed. Sci Rep. 12(1):5140.
- Porfírio E.M., Melo H.M., Pereira A.M.G., Cavalcante T.T.A., Gomes G.A., de Carvalho M.G., Costa R.A. y Júnior F.E.A.C. 2017. *In vitro* Antibacterial and antibiofilm activity of *Lippia alba* essential oil, citral, and carvone against *Staphylococcus aureus*. Sci. World J. 2017:4962707.
- Rani S., Singh H. y Ram C. 2022. Efficacy and mechanism of carvacrol with octanoic acid against mastitis causing multi-drug-resistant pathogens. Braz J Microbiol. 53(1):385-399.
- Reyes-Jurado F., Munguía-Pérez R., Cid-Pérez T.S., Hernández-Carranza P., Ochoa-Velasco C.E. y Avila-Sosa R. 2020. Inhibitory effect of mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) essential oil on *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella* Typhimurium biofilm formation. Front. Sustain. Food Syst. 4:36.
- Reynolds D. y Kollef M. 2021. The epidemiology and pathogenesis and treatment of *Pseudomonas*

*aeruginosa* infections: An update. *Drugs*. 81(18): 2117–2131.

- Roy R., Tiwari M., Donelli G. y Tiwari V. 2018. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*. 9(1):522-554
- Roy S., Chowdhury G., Mukhopadhyay A.K., Dutta S. y Basu S. 2022. Convergence of biofilm formation and antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* Infection. *Front Med (Lausanne)*. 9:793615.
- Rubio-Ortega A., Travieso-Novelles M.C., Riverón-Alemán Y., Martínez-Vasallo A., Peña-Rodríguez J., Espinosa-Castaño I. y Pino-Pérez O. 2018. Actividad antibacteriana de aceites esenciales de plantas cultivadas en Cuba sobre cepas de *Salmonella enterica*. *Salud Anim*. 40(3).
- Rubio-Ortega A., Álvarez-Pita B., Travieso-Novelles M., Martínez-Vasallo A., Pino-Pérez, O. y Espinosa-Castaño I. 2022. Efecto del aceite esencial de *Lippia graveolens* Kunth (orégano mexicano) sobre la biopelícula de *Salmonella Typhimurium*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 27(2).
- Rudramurthy G.R., Swamy M.K., Sinniah U.R. y Ghasemzadeh A. 2016. Nanoparticles: alternatives against drug-resistant pathogenic microbes. *Molecules*. 21(7): 836.
- Sakkas H., Gousia P., Economou V., Sakkas V., Petsios S. y Papadopoulou C. 2016. In vitro antimicrobial activity of five essential oils on multidrug resistant Gram-negative clinical isolates. *J Intercult Ethnopharmacol*. 5(3): 212–218.
- Salari-Jazi A., Mahnam K., Sadeghi P., Damavandi M.S. y Faghri J. 2021. Discovery of potential inhibitors against New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1 from natural compounds: *in Silico*-based methods. *Sci Rep*. 11(1):2390
- Sarrazin S.L.F., Andrade-Da Silva L., De Assunção A.P.F., Oliveira R.B., Calao V.Y.P., Da Silva R., Stashenko E.E., Maia J.G.S. y Mourão R.H.V. 2015. Antimicrobial and seasonal evaluation of the carvacrol-chemotype oil from *Lippia origanoides* Kunth. *Molecules*. 20(2): 1860–1871.
- Serra-Valdés M.A. 2017. La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política microbiana. *Rev. Habanera de Ciencias Médicas*. 16(3).
- Shenkutie A.M., Zhang J., Yao M., Asrat D., Chow F.W.N. y Leung P.H.M. 2022. Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of imipenem and colistin on expression of biofilm-specific antibiotic resistance and virulence genes in *Acinetobacter baumannii* sequence type 1894. *Int J Mol Sci*. 23(20):12705.
- Silva-Trujillo L., Quintero-Rueda E., Stashenko E.E., Conde-Ocazonez S., Rondón-Villarreal P. y Ocazonez R.E. 2022. Essential oils from colombian plants: Antiviral potential against Dengue virus based on chemical composition, *in Vitro* and *in Silico* analyses. *Molecules*. 27(20):6844
- Singh J.K., Adams F.G. y Brown M.H. 2019. Diversity and function of capsular polysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol*. 9:3301.
- Smith C.A., Antunes N.T., Stewart N.K., Frase H., Toth M., Kantardjieff K.A. y Vakulenko S. 2015. Structural basis for enhancement of carbapenemase activity in the OXA-51 family of

class D  $\beta$ -lactamases. ACS Chem Biol. 10(8):1791-6

- Soltani S., Shakeri A., Iranshahi M. y Boozari M. 2021. A Review of the phytochemistry and antimicrobial properties of *Origanum vulgare* L. and subspecies. Iran J Pharm Res. 20(2): 268–285.
- Songtanin B., Peterson C.J., Molehin A.J. y Nugent K. 2022. Biofilms and benign colonic diseases. Int J Mol Sci. 23(22):14259.
- Sosa-Hernández O., Matías-Téllez B., González-Martínez J., Juárez-Vargas R., Estrada-Hernández A., Sánchez-Rivas M.P. y Cureño-Díaz M.A. 2019. Infecciones asociadas a la atención de la salud por bacterias del grupo ESKAPE en un hospital de la Ciudad de México 2013-2017. Enf. Inf. Microbiol. 39 (2): 59-64.
- Suárez C. y Gudiol F. 2009. Antibióticos betalactámicos. Enferm. Infecc y Microbiol. Clin. 27(2): 116-129.
- Swamy M.K., Akhtar M.S. y Sinniah U.R. 2016. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. Evid Based Complement Alternat Med. 2016:3012462.
- Tamanai-Shacoori Z., Chandad F., Rébillard A., Cillard J. y Bonnaure-Mallet M. 2014. Silver-Zeolite combined to polyphenol-rich extracts of *Ascophyllum nodosum*: Potential active role in prevention of periodontal diseases. PLoS One. 9(10): e105475.
- Tapia, M. (2018). Carvacrol como inhibidor de comunicación intercelular responsable de la formación de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*. (Tesis de doctorado). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora.
- Tapia-Rodriguez M.R., Bernal-Mercado A.T., Gutierrez-Pacheco M.M., Vazquez-Armenta F.J., Hernandez-Mendoza A., Gonzalez-Aguilar G.A., Martinez-Tellez M.A., Nazzaro F. y Ayala-Zavala J.F. 2019. Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* exposed to carvacrol: alterations of the Quorum sensing at enzymatic and gene levels. J Cell Commun Signal.13(4):531-537.
- Tiwari V., Roy R. y Tiwari M. 2015. Antimicrobial active herbal compounds against *Acinetobacter baumannii* and other pathogens. Front Microbiol. 6: 618.
- Tognon M., Köhler T., Luscher A. y van Delden C. 2019. Transcriptional profiling of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* during in vitro co-culture. BMC Genomics. 20(1) :30
- Topa S.H., Palombo E.A., Kingshott P. y Blackall L.L. 2020. Activity of Cinnamaldehyde on Quorum Sensing and Biofilm Susceptibility to Antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. Microorganisms 8, 455.
- Troy E., Tilbury M.A., Power A.M. y Wall J.G. 2021. Nature-Based Biomaterials and Their Application in Biomedicine. Polymers (Basel). 13(19):3321.
- Uruén C., Chopo-Escuin G., Tommassen J., Mainar-Jaime R.C. y Arenas J. 2020. Biofilms as promoters of bacterial antibiotic resistance and tolerance. Rev. Antibiotics (Basel). 10(1):3
- Upmanyu K., Haq Q.M.R. y Singh R. 2022. Factors mediating *Acinetobacter baumannii* biofilm formation: Opportunities for developing therapeutics. Curr Res Microb Sci. 3:100131.
- Valcek A., Philippe C., Whiteway C., Robino E., Nesporova K., Bové M., Coenye T., De Pooter

- T., De Coster W., Strazisar M. y Van der Henst C. 2022. Phenotypic characterization and heterogeneity among modern clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. ASM Journals. Microbiology Spectrum. 11(1)
- Valdivieso-Ugarte M., Gomez-Llorente C., Plaza-Díaz J. y Gil A. 2019. Antimicrobial, antioxidant, and immunomodulatory properties of essential oils: A systematic review. Nutrients. 11(11): 2786.
- Van-Alphen L.B., Burt S.A., Veenendaal A.K., Bleumink-Pluym N.M., van Putten J.P. 2012. The natural antimicrobial carvacrol inhibits *Campylobacter jejuni* motility and infection of epithelial cells. PLoS One. 7(9):e45343.
- Van Der Spoel D., Lindahl E., Hess B., Groenhof G., Mark A. E., y Berendsen H. J. 2005. GROMACS: fast, flexible, and free. J Comput Chem 26(16): 1701-1718.
- Venkateswaran P., Vasudevan S., David H., Shaktivel A., Shanmugam K., Neelakantan P. y Solomon A.P. 2023. Revisiting ESKAPE pathogens: virulence, resistance, and combating strategies focusing on quorum sensing. Front Cell Infect Microbiol.13:1159798
- Verma P. y Verma M.K. 2018. Antimicrobial activity of antibiotics and antiseptics (Dettol and Betadine) against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Int. J. Life. Sci. Scienti. Res. 4(1):1589-1598.
- Vrancianu C.O., Gheorghe I., Czobor I.B. y Chifiriuc M.C. 2020. Antibiotic resistance profiles, molecular mechanisms and innovative treatment strategies of *Acinetobacter baumannii*. Microorganisms. 8(6): 935.
- Wu F. y Hu R. 2020. Risk factors for pneumonia caused by antimicrobial drug-resistant or drug-sensitive *Acinetobacter baumannii* infections: A retrospective study. Medicine (Baltimore). 99(28): e21051.
- Yoon E.J. y Jeong S.H. 2021. Mobile carbapenemase genes in *Pseudomonas aeruginosa*. Front Microbiol. 12:614058.
- Yuan Y., Li X., Wang L., Li G., Cong C., Li R., Cui H., Murtaza B. y Xu Y. 2021. The endolysin of the *Acinetobacter baumannii* phage vB\_AbaP\_D2 shows broad antibacterial activity. Microb Biotechnol. 14(2): 403–418.
- Zgurskaya H.I., López C.A. y Gnanakaran S. 2015. Permeability barrier of Gram-Negative cell envelopes and approaches to bypass it. ACS Infect Dis. 1(11):512-522.
- Zhang K., Li X., Yu C. y Wang Y. 2020. Promising therapeutic strategies against microbial biofilm challenges. Front Cell Infect Microbiol.10:359
- Zhang Y., Brackman G. y Coenye T. 2017. Pitfalls associated with evaluating enzymatic quorum quenching activity: the case of MomL and its effect on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* biofilms. PeerJ. 5: e3251.