



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

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *In vitro* DE  
MICROPARTÍCULAS COMPUESTAS DE PECTINA Y  
CARVACROL EN BACTERIAS CAUSANTES DE  
ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES**

---

Por:

**Cristian Tonopomea Aragón**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN

Los miembros de comité designado para la revisión de la tesis de Cristian Tonopomea Aragón, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



---

Dr. Luis Quihui Cota  
Director de tesis



---

Dr. Jaime Lizardi Mendoza  
Integrante del comité de tesis



---

MC. Gloria Gpe. Morales Figueroa  
Integrante del comité de tesis



---

MC. Rosalva Pérez Morales  
Integrante del comité de tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Actividad Antibacteriana *In vitro* de Micropartículas Compuestas de Pectina y Carvacrol en Bacterias Causantes de Enfermedades Gastrointestinales" 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 de la autora Cristian Tonopomea Aragón, 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 "Graciela Caire Juvera", is written over a horizontal line.

Dra. Graciela Caire Juvera  
Directora General

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por el generoso apoyo financiero brindado durante todo el transcurso de mi posgrado. Gracias a su respaldo, pude dedicarme de lleno a mi formación académica y alcanzar nuevos horizontes en mi campo de estudio.

Mi más profundo agradecimiento al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. (CIAD) por abrirme sus puertas y permitirme continuar con mi formación en esta admirable institución.

No puedo dejar de agradecer a cada uno de los miembros del comité que me acompañaron durante este arduo trayecto. Su apoyo incondicional, paciencia y valiosas recomendaciones fueron fundamentales para enriquecer mi investigación. Expreso un agradecimiento especial a mi director de tesis, el Dr. Luis Quihui Cota, así como a mis asesores, el Dr. Jaime Lizardi Mendoza, M.C Rosalva Pérez Morales y M.C Gloria Gpe. Morales Figueroa, por su guía y dedicación.

Un sincero agradecimiento a mi equipo de trabajo en el Laboratorio de Nutrición-Infección. Agradezco a Ildefonso, Alondra y Lina por su colaboración y apoyo constante. Y, de manera especial, quiero expresar mi gratitud a M.C Javier Nicolás González González por su inquebrantable motivación y por estar siempre dispuesto a brindarme su ayuda en los momentos difíciles.

Agradezco de corazón a la M.C Karla Guadalupe Martínez y a la M.C Johanna Chi, quienes formaron parte importante de mi experiencia en el Laboratorio. Su amable disposición para resolver mis dudas y su apoyo en diferentes situaciones han sido de gran valor para mí.

A todos mis compañeros del grupo de Maestría, les agradezco de corazón por ser más que compañeros; nos convertimos en un equipo unido, apoyándonos mutuamente para ser mejores cada día. Juntos hemos crecido académica y personalmente, y eso es algo que valoro enormemente.

No puedo dejar de mencionar a mis personas especiales, Fernanda Cabrer, Alejandro Trujillo, Kathia Enríquez, Arath García, Leslie Medrano y Dulce Machado, amigos que conocí en CIAD. Su apoyo incondicional y su presencia en los momentos cruciales tanto en mi vida personal como académica han sido una verdadera bendición. Gracias por estar siempre allí cuando más los necesitaba.

## **DEDICATORIA**

Dedico esto a Dios, gracias a él he podido realizar todo esto, fue parte de mi trayecto dándome fuerza, sabiduría, perseverancia. Todos los momentos tanto satisfactorios como no tan satisfactorios se convirtieron en experiencias y enseñanzas, los cuales me ayudaron a crecer como persona. Asimismo, le agradezco a Dios por haberme cruzado en el camino con personas extraordinarias que se han convertido en mis amigos y mentores. Su presencia ha sido un regalo invaluable en mi vida, brindándome apoyo, consejo y aliento en los momentos de duda o incertidumbre.

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>DEDICATORIA</b> .....	5
<b>CONTENIDO</b> .....	6
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	7
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	9
<b>RESUMEN</b> .....	10
<b>ABSTRACT</b> .....	11
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	12
<b>2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN</b> .....	13
2.1. Infección y Resistencia Bacteriana.....	13
2.2. Mecanismos de Resistencia Bacteriana.....	14
2.3. Bacterias Resistentes a Antibióticos.....	15
2.3.1. <i>Clostridioides difficile</i> .....	15
2.3.1.1. Sintomatología y tratamiento .....	16
2.3.1.2. Resistencia bacteriana .....	17
2.3.2. <i>Escherichia coli O157:H7</i> .....	17
2.3.2.1. Sintomatología y tratamiento.....	18
2.3.2.2. Resistencia bacteriana.....	18
2.3.3. <i>Salmonella Typhimurium</i> .....	19
2.3.3.1. Sintomatología y tratamiento.....	19
2.3.3.2. Resistencia bacteriana.....	19
2.3.4. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	20
2.3.4.1. Sintomatología y tratamiento.....	20
2.3.4.2. Resistencia bacteriana.....	21
2.3.5. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	21
2.3.5.1. Sintomatología y tratamiento.....	21
2.3.5.2. Resistencia bacteriana.....	22
2.4. Carvacrol .....	22
2.5. Microencapsulación.....	25
2.6. Pectinas.....	26
2.6.1. Principales Fuentes de la Pectina.....	26
2.6.2. Características Químicas.....	27
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	29
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	30
4.1. Objetivo General.....	30

## CONTENIDO (continuación)

4.2. Objetivos Particulares.....	30
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
5.1. Elaboración de Micropartículas.....	31
5.2. Caracterización Físicoquímica de las Micropartículas de Pectina y Compuestas de Pectina y Carvacrol.....	32
5.3. Ensayo Microbiológico <i>in vitro</i> .....	33
5.3.1. Preparación del Inóculo.....	33
5.3.2. Concentración Mínima Inhibitoria y Bactericida para Carvacrol.....	34
5.3.3. CMI y CMB para las Micropartículas Compuestas.....	34
5.4. Análisis Estadístico.....	35
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>36</b>
6.1. Elaboración y Caracterización de las Micropartículas Compuestas.....	36
6.1.1. Morfología.....	36
6.1.2. Tamaño.....	37
6.2. Eficiencia de Encapsulación.....	39
6.3. Actividad Antibacteriana del Carvacrol.....	41
6.4. CMI y CMB de las Micropartículas Compuestas.....	43
<b>7. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>46</b>
<b>8. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>47</b>
<b>9. REFERENCIAS.....</b>	<b>48</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Cuadro 1. Mecanismos de resistencia de las bacterias a antibióticos.....	17
2. Cuadro 2. Efectos antibacterianos <i>in vitro</i> del carvacrol en su forma libre e integrado en un sistema de encapsulación.....	29
3. Cuadro 3 Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) del compuesto carvacrol frente a las cepas bacterianas probadas.....	44
4. Cuadro 4. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y bactericidas (CMB) de micropartículas compuestas con carvacrol y pectina contra las cepas bacterianas probadas en este estudio.....	50

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Página</b>
1. Mecanismos de resistencia de las bacterias a antibióticos.....	17
2. Efectos antibacterianos <i>in vitro</i> del carvacrol en su forma libre e integrado en un sistema de encapsulación.....	29
3. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) del compuesto carvacrol frente a las cepas bacterianas probadas.....	44
4. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y bactericidas (CMB) de micropartículas compuestas con carvacrol y pectina contra las cepas bacterianas probadas en este estudio.....	50

## RESUMEN

La resistencia a los antibióticos es un problema creciente a nivel mundial. La producción y uso indiscriminado de antibióticos ha conducido al aumento de bacterias resistentes. En Estados Unidos, se estima que cada año mueren alrededor de 700,000 personas y 200,000 recién nacidos debido a infecciones resistentes a antibióticos. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* y *Clostridioides difficile* son bacterias comunes con altos niveles de resistencia a los antibióticos. Como resultado de esta situación, se ha propuesto el uso de alternativas naturales como los aceites esenciales. El carvacrol, un aceite esencial investigado por sus propiedades antimicrobianas, ha demostrado ser efectivo contra diferentes tipos de bacterias enteropatógenas. Algunos estudios se centraron en las micropartículas de pectina y carvacrol y han evidenciado sus actividades antimicrobianas, sin embargo, son limitadas. El objetivo de este trabajo es desarrollar y evaluar las propiedades antibacterianas in vitro de micropartículas compuestas de pectina con carvacrol. Inicialmente, se prepararon soluciones de pectina al 3 y 4% en agua para elaborar micropartículas de pectina y carvacrol a 1%. Se utilizó un homogeneizador para mezclar estos componentes y se prepararon soluciones de acetato de zinc al 4 y 6% como gelificante. Se controlaron parámetros como el flujo de eyección (14 cc/h) y la presión del aire (0.5 y 0.7 kg/cm<sup>3</sup>) para la expulsión de la gota y controlar el tamaño de las micropartículas, las cuáles se sumergieron en solución de acetato de zinc por 15 minutos para la gelificación iónica, se lavaron y se guardaron en agua grado MQ. Posteriormente, se realizó una caracterización morfológica y un conteo de micropartículas en base a tamaños mediante un microscopio de luz invertida. Se calculó un diámetro promedio de  $592.64 \pm 101.50$  y  $638.72 \pm 139.77$   $\mu\text{m}$  para las micropartículas de pectina y las compuestas de pectina y carvacrol, las cuales presentaron una eficiencia de encapsulación de 95%. Además, se obtuvieron micropartículas de pectina como en las compuestas presentaron una forma esférica y semiesférica. Se obtuvieron las concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas de las micropartículas compuestas contra *C. difficile* (0.150 mg/mL; 0.150 mg/mL), *E. coli* (0.150 mg/mL; 0.200 mg/mL), *S. Typhimurium* (0.150 mg/mL; 0.350 mg/mL), *S. aureus* (0.200 mg/mL; 0.350 mg/mL) y *L. monocytogenes* (0.300 mg/mL; 0.350 mg/mL).

**Palabras clave:** Micropartículas, bacterias enteropatógenas, carvacrol.

## ABSTRACT

Antibiotic resistance is a growing global problem. The production and indiscriminate use of antibiotics have led to the rise of resistant bacteria. In the United States, it is estimated that around 700,000 people and 200,000 neonates die each year due to antibiotic-resistant infections. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, and *Clostridioides difficile* are common bacteria with prominent levels of resistance to antibiotics. As a result, to this situation, the use of natural alternatives such as essential oils have been proposed. Carvacrol, an essential oil investigated for its antimicrobial properties, has been shown to be effective against several types of enteropathogenic bacteria. Some studies focused on pectin and carvacrol microparticles have evidenced its antimicrobial activities, However, they are limited. As part of the methods, 3% and 4% pectin solutions were prepared in water for pectin micro particles and carvacrol-loaded particles. A homogenizer was used to mix them, and 4% and 6% zinc acetate solutions were prepared as gelatinizing agents. Ejection flux (14 cc/h) and air pressure (0.5 and 0.7 kg/cm<sup>3</sup>) were controlled for droplet expulsion and to control the size of the microparticles. The microparticles were immersed in zinc acetate solution for 15 minutes for ionic gelation, washed and stored in MQ grade water. Subsequently, morphological characterization and counting of the average sizes of the particles were performed using an inverted light microscope. As a summary of the results, an average diameter of  $592.64 \pm 101.50 \mu\text{m}$  and  $638.72 \pm 139.77 \mu\text{m}$  was obtained for the pectin microparticles and the pectin-carvacrol composite. Furthermore, pectin microparticles and the pectin-carvacrol microparticles exhibited spherical and semi-spherical shape. Minimum inhibitory concentrations and bactericidal were obtained the composite microparticles against *C. difficile* (0.150 mg/mL; 0.150 mg/mL), *E. coli* (0.150 mg/mL; 0.200 mg/mL), *S. Typhimurium* (0.150 mg/mL; 0.350 mg/mL), *S. aureus* (0.200 mg/mL; 0.350 mg/mL) y *L. monocytogenes* (0.300 mg/mL; 0.350 mg/mL).

**Keywords:** Microparticles, enteropathogenic bacteria, carvacrol.

## 1. INTRODUCCIÓN

La resistencia que las bacterias muestran a los antibióticos convencionales es un serio problema de salud que continúa en aumento a nivel mundial. Los antibióticos solían ser eficaces en el tratamiento de infecciones microbianas, pero la producción masiva, distribución indiscriminada y consumo irresponsable, han conducido a un aumento en la presencia de bacterias resistentes. Tan solo en los Estados Unidos, se estima que cada año mueren alrededor de 700,000 personas y 200,000 recién nacidos debido a bacterias resistentes a antibióticos (Maguiña Vargas, 2016; Tafur *et al.*, 2008). Diversos estudios han reportado tasas de resistencia de *Escherichia coli* de 36%, y de 8.4 a 92.9% contra cefalosporinas y ciprofloxacina respectivamente. *Staphylococcus aureus* es otra de las bacterias que comúnmente causan infecciones tanto en la población general como en los centros hospitalarios, y diferentes estudios han reportado una resistencia hasta de un 12.1% a la meticilina, la cual aún está en el cuadro de elección. En respuesta a esta situación, en 2019 se incluyó una nueva recomendación en el marco de vigilancia a nivel mundial, que consiste en seguir las frecuencias de septicemias causadas por *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* resistentes a los tratamientos de primera elección (OMS, 2020).

Por otro lado, se ha propuesto la búsqueda de alternativas naturales a los antibióticos convencionales, y algunas de ellas incluyen el uso de aceites esenciales debido a sus ya reconocidas propiedades antimicrobianas. Por ejemplo, Wang y colaboradores (2016) reportaron que el aceite de carvacrol era capaz de inhibir a *Escherichia coli* a una concentración de 0.400 y 0.600 mg/mL. Este aceite esencial es uno de los más investigados por su actividad antimicrobiana, aunque su volatilidad e insolubilidad en agua han limitado su aplicación. Sun y colaboradores (2019) estimaron una concentración mínima inhibitoria de microcápsulas con pectina y carvacrol de 0.25 mg/mL contra cepas resistentes de *Escherichia coli*. Estos autores no solo evidenciaron la fuerte capacidad antimicrobiana que presentaban sus micropartículas, sino que también, demostraron que la pectina puede actuar como un material de encapsulación sin inhibir la actividad antimicrobiana del carvacrol.

Los estudios enfocados a investigar las propiedades antimicrobianas de las micropartículas compuestas con pectina y carvacrol son muy limitados e incluso estudios que investigan las propiedades de partículas elaboradas únicamente con carvacrol son escasos. Sin embargo, los hallazgos de estos estudios han revelado que la combinación de pectina y carvacrol puede ser una alternativa para tratar infecciones por cepas resistentes a los antibióticos.

## 2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

### 2.1 Infección y Resistencia Bacteriana

Una infección bacteriana ocurre cuando una bacteria actúa como oportunista multiplicándose en el hospedero, y tiene la capacidad para producir una enfermedad. Estas infecciones bacterianas se han convertido en un problema de salud pública debido a su impacto tanto en la salud general de la población, como en el económico derivado de su difícil tratamiento (Pachay Solórzano, 2018). Actualmente, se han propuesto mecanismos para explicar la resistencia bacteriana hacia los antibióticos, entre los cuales podríamos mencionar los cambios en la velocidad de la bomba de expulsión o de eflujo, baja permeabilidad de la pared bacteriana, alteración en el número o estructura de los receptores de membrana, y cambios en la producción de enzimas. (Rojas y Ulate, 2017).

Se ha reconocido que las enterobacterias forman parte de la microbiota intestinal, pero en ciertas situaciones, pueden actuar como patógenos oportunistas al invadir otras partes del cuerpo del hospedero, o simplemente ser reemplazadas de su sitio habitual en el organismo por otras cepas bacterianas patógenas. Para prevenir estos eventos, es necesario optar por medidas de higiene personal y cuidado de la sanidad ambiental, y si la infección ya está presente es recomendable consumir antibióticos con la prescripción médica apropiada (Pachay Solórzano, 2018).

Desafortunadamente, la producción, distribución masiva y mal uso de antibióticos están conduciendo a una presión selectiva de bacterias resistentes a los mismos. En el caso de las bacterias Gram negativas existen mecanismos de resistencia que incluyen la producción de betalactamasas de amplio espectro. Asimismo, las bacterias Gram positivas ya han desarrollado resistencia hacia clindamicina, meticilina y vancomicina, alterando y produciendo nuevas proteínas fijadoras de penicilina (PBP). Un estudio realizado en 2018 por Solórzano concluía que *Escherichia coli* era una de las enterobacterias más aisladas a nivel mundial y se ha reportado que el 79.4% de estos aislados producen betalactamasas de espectro extendido, las cuales rompen el anillo betalactámico de la estructura de las penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos convirtiéndolas en antibióticos inoperantes. Esto deriva en opciones limitadas de tratamiento y, por

lo tanto, se requiere promover el uso apropiado de medicamentos, y al mismo tiempo, desarrollar nuevas estrategias para reducir la resistencia bacteriana, y controlar las enfermedades que provocan. Los aceites esenciales, han sido propuestos como una opción potencial de tratamiento a las estrategias convencionales.

## 2.2 Mecanismos de Resistencia Bacteriana

Las bacterias han creado mecanismos para retener, eliminar y expulsar elementos tóxicos como los antibióticos (cuadro 1). Esta resistencia puede ser natural o adquirida. La resistencia natural puede ser expresada en la especie bacteriana, o inducida través de genes. Por otro lado, la resistencia adquirida se produce a través de la transferencia horizontal de genes de resistencia entre bacterias mediante mecanismos de transformación, transposición o conjugación (Varela *et al.*, 2021; Reygaert, W. C. 2018).

**Cuadro 1.** Mecanismos de resistencia de las bacterias a antibióticos

Mecanismo de resistencia	Acción	Antibióticos o grupos de antibióticos afectados	Referencia
<b>Inactivación antibiótico</b>	Enzimas $\beta$ -Lactamasas (Hidrólisis de anillo B-lactámico)	Betalactámicos	Reygaert W.C, 2018
	Transferencia grupo acetilo, fosforilo y adenilo	Cloranfenicol, aminoglucósidos y fluoroquinolonas	Munita y Arias, 2016
<b>Modificación del sitio blanco para el antibiótico</b>	Cambio en el número de las proteínas fijadoras de penicilina (PBP).	Betalactámicos	Skarżyńska <i>et al.</i> , 2020
	Modificación de la estructura de los precursores de peptidoglicano mediante los genes van.	Vancomicina	
	Mutaciones ribosómicas	Aminoglucósidos y macrólidos	
	Modificación de la ADN girasa o Topoisomerasa IV	Fluoroquinolonas	
	Mutaciones en enzimas	Sulfonamidas y	

	como Dihidropteroato sintasa (DHPS) y dihidrofolato reductasa (DHFR).	trimetoprima	
<b>Expulsión del antibiótico por medio de bombas eflujo</b>	Familia de transportadores ABC	Macrólidos	
	Familia de transportadores SMR	Betalactámicos y aminoglucósidos	
	Familia de transportadores RND	Tetraciclinas, macrólidos, penicilinas, cloranfenicol, macrólidos, y fluoroquinolonas.	Nishino <i>et al.</i> , 2018 ; Huang <i>et al.</i> , 2022
	Familia de transportadores MFS	Macrólidos, fluoroquinolonas, trimetoprima y cloranfenicol.	
<b>Disminución de la permeabilidad del antibiótico</b>	Familia de transportadores MATE	Fluoroquinolonas y aminoglucósidos	
	Modificación de porinas	Penicilinas, cefalosporinas, carbapenems y quinolonas.	Varela <i>et al.</i> , 2021

ADN = Ácido desoxirribonucleico; ABC= casetes de unión a ATP; SMR= Resistencia multidrogas pequeña RND = Resistencia-nodulación-división; MFS = Superfamilia de facilitadores principales; MATE = Extrusión de compuestos multidrogas y tóxicos.

### 2.3. Bacterias Resistentes a Antibióticos

#### 2.3.1. *Clostridioides difficile*

*Clostridioides difficile* (*C. difficile*) es una bacteria anaeróbica Gram positiva que produce toxinas y esporas. Esta bacteria coloniza al colon después de haber alterado la microbiota intestinal, produciendo colitis y diarrea aguda. La infección producida por esta bacteria es una de las causas más comunes de morbilidad en población adulta. Recientemente, su frecuencia ha aumentado en jóvenes y en la población en general (Cohen *et al.*, 2010; Segura *et al.*, 2021). Las personas adquieren infección por *C. difficile* al ingerir esporas bacterianas las cuales se pueden encontrar en los alimentos, animales domésticos, o en superficies que están en contacto directo con la bacteria siendo resistentes en el medio ambiente, lo que les permite permanecer como estadios infectivos

por meses (Orenstein *et al.*, 2019).

El uso inapropiado de cefalosporinas y clindamicina, se la ha considerado como un factor asociado al desarrollo de infección por *C. difficile* resistente a los antibióticos (Orenstein *et al.*, 2019). El consumo de medicamentos inhibidores de la bomba de protones crean un ambiente gástrico menos ácido facilitando la invasión y establecimiento de la bacteria en el hospedero (Bavishi y DuPont, 2011). Por otra parte, las personas en edad avanzada también son vulnerables a esta infección debido a que ya no tienen una respuesta inmunitaria adecuada o bien tienen una modificación en la composición de la microbiota intestinal (Orenstein *et al.*, 2019; Urquiza Ayala y Arteaga Coarite, 2018).

2.3.1.1 Sintomatología y tratamiento . La infección por *C. difficile* se caracteriza principalmente por la presencia de diarrea, pero pueden presentarse otras manifestaciones clínicas lo cual dependerá de la relación hospedero-patógeno (Redding *et al.*, 2022). Se considera una infección leve cuando existe diarrea acuosa en una frecuencia mayor o igual a 3 deposiciones en un lapso de 24 horas. Entre los síntomas también se encuentran dolor y calambres en la parte baja del abdomen, náuseas, anorexia y fiebre. El episodio inicial grave de la infección se caracteriza por cuentas leucocitarias mayores a 15,000/ $\mu$ L o creatina sérica mayor a 1.5 mg/dL. Cuando existen síntomas como fiebre mayor o igual a 38.5 °C; íleon o distensión abdominal significativa, cambios en el estado mental, lactato sérico mayor a 202 mmol/L, cuentas leucocitarias mayores de 35,000/ $\mu$ L y falla orgánica, se considera una infección grave complicada (Cruz-López *et al.*, 2022) lo cual está relacionado con una alta tasa de mortalidad.

La infección de leve a moderada por *C. difficile* se trata comúnmente con metronidazol y vancomicina que tienen una eficacia del 90% y 98%, respectivamente, administrados oralmente. La dosis de metronidazol es de 500 mg por tres veces al día durante 10 días. En caso de que no se observen cambios, se administra vancomicina oral como tratamiento de segunda elección, en dosis de 126 mg cada 6 horas durante 10 días (Meyer *et al.*, 2014). Las dosis varían según la gravedad de la infección. Si la infección es grave desde el inicio, el tratamiento de elección es la vancomicina, en dosis de 125 a 250 mg cada 6 horas durante 10 a 14 días. En cambio, si la infección de inicio compromete la vida del paciente, se combinan los tratamientos con vancomicina de 250 a 500 mg cada 6 horas y metronidazol 500 mg cada 8 horas de manera intravenosa. Si hay distensión

abdominal, se administra vancomicina por sonda rectal cada 6 horas (Cohen *et al.*, 2010).

2.3.1.2. Resistencia bacteriana. *C. difficile* ha desarrollado resistencia a ciertos antibióticos, pertenecientes al grupo de las cefalosporinas como cefoxitina (95%), ceftriaxona (31.4%), cefotaxima (100%) y ceftazidima (76%). También, ha demostrado resistencia a las fluoroquinolonas, incluyendo a ciprofloxacino (99%), moxifloxacino (35.7%) y gatifloxacino (68.3%). Sin embargo, estos porcentajes de resistencia pueden variar según las regiones geográficas y la facilidad de acceso a los antibióticos. Aparentemente, *C. difficile* usa múltiples mecanismos de resistencia a los antibióticos tales como la activación de genes que codifican proteínas similares a las  $\beta$ -lactamasas, lo que provoca resistencia a los  $\beta$ -lactámicos como la penicilina y cefalosporina. Por otra parte, están los transposones, los cuales facilitan la propagación de genes de resistencia mediante la conjugación, transducción y transformación de *C. difficile*, que inducen resistencia a las tetraciclinas y cloranfenicol. Otro mecanismo de resistencia es la alteración de la diana sobre la cual actúan los antibióticos, como las fluoroquinolonas y rifampicina (Spigaglia *et al.*, 2018).

### **2.3.2. *Escherichia coli* O157:H7**

*Escherichia coli* (*E. coli*) es un organismo enterohemorrágico frecuente, productor de toxina *Shiga*, que puede causar diarrea sanguinolenta y el síndrome hemolítico urémico. *E. coli* O157:H7 produce dos tipos de *Shiga*, Stx1 y Stx2 (Puligundla y Lim 2022). La infección por *E. coli* O157:H7 se ha relacionado con el consumo de carne de res con cocción inapropiada y productos lácteos. Las bacterias son resistentes a la acidez gástrica por lo que llegan al colon con facilidad, adhiriéndose a los enterocitos. La transmisión de persona a persona es muy frecuente en guarderías e instituciones que atienden a personas con discapacidades físicas, de aprendizaje, demencia y centros hospitalarios. Los productos frescos también pueden ser un factor de riesgo ya que pueden contaminarse durante la producción primaria por exposición a estiércol y agua contaminada (Rani *et al.*, 2021). Durante el periodo del 2003 al 2012 en Estados Unidos, se registraron 390 brotes por

*E. coli* O157:H7, causando 4928 enfermedades, 1272 hospitalizaciones y 33 muertes (Heiman *et al.*, 2015).

2.3.2.1. Sintomatología y tratamiento. Durante la infección por *E. coli*, el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) puede ocurrir aproximadamente entre el 10-15% de las personas infectadas, siendo más común en menores de 5 años. Este síndrome es agudo desde el inicio y se caracteriza por insuficiencia renal, lo que resulta en elevadas concentraciones séricas de urea y creatina, y anemia hemolítica que conduce a concentraciones de hemoglobinas menores a 10 g/dL. La diarrea sanguinolenta es otro de los signos principales debido al daño local en los vasos del colon producido por la toxina Stx (Fernández-Brando *et al.*, 2011). Para las personas que presentan SUH son sometidas a un control de fluidos, electrolitos y de hipertensión, uso de diálisis y transfusiones de sangre (Fernández-Brando *et al.*, 2011). La selección del tratamiento con antibióticos sigue siendo controversial, ya que un estudio prospectivo por Wong y colaboradores (2000) concluyeron que el tratamiento con antibióticos de la familia de las sulfas y betalactámicos en niños con *E. coli*, tienen mayor probabilidad de desarrollar síndrome urémico hemolítico (SUH)

2.3.2.2. Resistencia bacteriana. El uso inapropiado de cefalosporinas y quinolonas, así como el uso prolongado de antibióticos, son factores de riesgo a la presencia de infecciones resistentes a infecciones por *E. coli*. Se ha propuesto que esta bacteria produzca betalactamasas que inactivan a penicilinas y cefalosporinas (Mosquito *et al.*, 2011). También, puede tener genes como el *tetA* y *tetB* que codifican sistemas de eflujo más rápido para tetraciclina desde el interior de la bacteria (Chopra y Roberts, 2001). En el caso del mecanismo de resistencia a cloranfenicol pueden activarse genes como *cmIA* y *floR* que son los exportadores de cloranfenicol hacia fuera de la célula (Munita y Arias, 2016). Para trimetoprima la presencia de genes como *dfr* codifican formas mutantes de la enzima diana (Dahmen *et al.*, 2010; Mosquito *et al.*, 2011). Un estudio realizado en México aisló 97 cepas de *E. coli* provenientes de localidades del centro y del suroeste del país y reportó que el 92.5% eran resistentes a ampicilina, 62.6% a cefuroxima, 57% a cefotaxima, 57% a ceftazidima, 63.5% a ácido nalidíxico, 70.1% a trimetoprima/sulfametoxazol 76.6% y a tetraciclina (Miranda-Estrada *et al.*, 2017).

### 2.3.3. *Salmonella Typhimurium*

*Salmonella Typhimurium* (*S. Typhimurium*) es una bacteria anaeróbica intracelular Gram negativa que causa una inflamación grave en la mucosa intestinal, resultando en gastroenteritis. *S. Typhimurium* está presente en humanos, animales domésticos y salvajes. Su patogenia es a través del mecanismo de virulencia primaria del sistema de secreción de tipo III (T3SS). Este sistema incluye dos T3SS codificados por dos regiones del cromosoma bacteriano denominadas Isla patógena 1 de *Salmonella* e Isla patógena 2 de *Salmonella* (SPI-1 y SPI-2) (Patel y McCormick, 2014). *S. Typhimurium* 14028 es una bacteria que se transmite con frecuencia a través del consumo de harina de trigo, cacahuates y nueces, dado a que esta bacteria prolifera en ambientes secos (Liang *et al.*, 2021). Está presente en humanos, animales domésticos y salvajes. La gastroenteritis causada por esta bacteria es una de las principales razones de morbilidad y mortalidad a nivel mundial (Kosek *et al.*, 2003).

2.3.3.1. Sintomatología y tratamiento. Las infecciones por *S. Typhimurium* se manifiestan comúnmente con fiebre, diarrea y dolor de estómago, y su duración en promedio es alrededor de una semana, aunque algunos casos pueden requerir hospitalización. Los animales pueden ser reservorios de la bacteria *Salmonella* spp, por lo que las personas se pueden infectar a través de alimentos contaminados y/o alimentos sin la cocción inadecuada (Campos *et al.*, 2019). En ausencia de un diagnóstico confirmatorio por cultivo y antibiograma, así como sospecha de fiebre tifoidea, es necesario administrar tratamiento con quinolonas o cefalosporinas. Las quinolonas son muy activas contra la *S. Typhimurium*, y ciprofloxacina se administra en dosis de 500 mg vía oral, dos veces al día, durante 10 días. También se considera la ceftriaxona administrada por vía intravenosa o muscular en dosis de 1 a 2 g por 10 a 14 días (Ibarra Gómez *et al.*, 2005).

2.3.3.2 Resistencia bacteriana. La resistencia a múltiples fármacos es transmitida por la transferencia de plásmidos en las bacterias intestinales (Brooks *et al.*, 2011). *Salmonella* desarrolla mecanismos de resistencia que consisten en producir enzimas que interfieren con la acción de los antibióticos,

la activación de bombas de expulsión y la producción de  $\beta$ -lactamasas (Wang et al., 2019). En un estudio retrospectivo realizado en España por Gil-Setas y colaboradores (2002) encontraron resistencias de 76.6% a la ampicilina, 63.0% a cloranfenicol, y 80.3% a tetraciclinas por *S. Typhimurium*

#### **2.3.4. *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) se clasifica como Gram-positiva y ha sido reportado como parte de la microbiota humana normal, principalmente en la piel, nasofaringe, pliegues inguinales y axilares. Tiene forma de coco y es visible en pares, cadenas o racimos. Su diámetro oscila entre 0,8 a 1,5 micrómetros (Mehraj et al., 2016). Esta colonización es un factor de la diseminación de la bacteria y generación de infecciones comunitarias y hospitalarias por *S. aureus*. Además, provoca una variedad de infecciones, que pueden oscilar entre casos leves, como las infecciones cutáneas y de tejidos blandos, hasta enfermedades sistémicas. Debido al estado inmunológico y características de la atención, la población pediátrica es altamente susceptible a este tipo de infecciones (Toapanta y Natali, 2017).

2.3.4.1. Sintomatología y tratamiento. *S. aureus* es un importante patógeno humano que causa sepsis, endocarditis y síndrome de choque tóxico potencialmente mortal. El síndrome de choque térmico se manifiesta por fiebre alta, vómito, diarrea y mialgias. También puede presentarse osteomielitis hematógena aguda, meningitis e infección pulmonar. Cuando el daño se localiza en un órgano o sistema puede existir disfunción orgánica y supuración focal intensa (Brooks et al., 2011). Cloxacilina y cefazolina han demostrado ser mejores que la vancomicina para el tratamiento de una bacteriemia por *S. aureus* sensibles a meticilina (SASM). Sin embargo; la cloxacilina es mejor que la cefazolina en el tratamiento de la endocarditis. La bacteriemia por SASM responde positivamente a valores de CMI mayores de 1 mg/L de vancomicina, pero no ha respondido al tratamiento con betalactámicos a CMI  $\leq 1$  mg/L. Por lo tanto, la vancomicina pudiera ser el tratamiento de elección contra las infecciones producidas por SASM (Llinares et al., 2013).

2.3.4.2. Resistencia bacteriana. *S. aureus* es resistente a la meticilina. Esta capacidad de resistencia está vinculada al gen *mecA*, el cual se encuentra alojado en elemento genético móvil conocido como casete estafilococo cromosómico *mec*. El gen *mecA* codifica para una proteína conocida como PBP2a, que confiere poca afinidad hacia los antibióticos betalactámicos (Ricardo-Caldera *et al.*, 2015). Otros mecanismos de resistencia incluyen la producción de betalactamasas inactivando penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos, o bien produciendo proteínas modificadas a las cuales se une la penicilina inactivándola. Igualmente, puede sintetizar una nueva proteína a la cual la meticilina y  $\beta$ -lactámicos tienen poca afinidad (García *et al.*, 2019).

### **2.3.5. *Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) es una bacteria Gram-positiva y tiene forma de bastón (Radoshevich y Cossart, 2018). Esta bacteria sobrevive a procesos de acidificación y bajas temperaturas, que usa para difundirse con facilidad en la naturaleza. *L. monocytogenes* produce 2 tipos de listeriosis, la gastrointestinal no invasora y la listeriosis invasora (Rodríguez- Aoud, 2018). La infección por *L. monocytogenes* se presenta cuando se consumen productos procedentes del mar, como marisco, huevas de bacalao crudas, pescado crudo y salmón ahumado. Esta bacteria puede desarrollarse en altas concentraciones de sal y a temperaturas menores a 3°C, por lo cual es vital que se aplique un tratamiento térmico. Las poblaciones más susceptibles son los neonatos, mujeres embarazadas y adultos mayores (Banos *et al.*, 2016).

2.3.5.1. Sintomatología y tratamiento. *L. monocytogenes* provoca sepsis, meningitis, y meningoencefalitis a diferencia de otros microorganismos patógenos de origen alimentario que normalmente causan enfermedades gastrointestinales. Al inicio la infección por *L. monocytogenes* se presenta como un resfriado leve pero también es capaz de alcanzar el sistema nervioso central (Ansolin *et al.*, 2016). Para tratar la infección por *L. monocytogenes*, la ampicilina se considera el antibiótico de primera elección en combinación con un aminoglucósido como la gentamicina o la amikacina. En el caso de que los niños presenten una alteración en la función de los linfocitos T,

la ampicilina se administra a dosis de 200 mg/kg/día (Mendoza *et al.*, 2011).

2.3.5.2. Resistencia bacteriana. Los serogrupos de *L. monocytogenes* tienen la capacidad para intercambiar determinantes de resistencia con otras bacterias. El plásmido pAM  $\beta$ 1 (pAM $\beta$ 1) puede transferirse de *Streptococcus faecalis* a *L. monocytogenes*. Esta bacteria también tiene la capacidad de formar biopelículas, es decir bacterias unidas entre sí en una superficie cubierta con una matriz de proteínas, polisacáridos y ADN extracelular. Las bombas de eflujo también forman parte de los mecanismos de resistencia de *L. monocytogenes* (Materike y Okoh, 2020). Sosnowski y colaboradores (2019) aislaron 146 serogrupos de *L. monocytogenes*, y reportaron que el 90% de 132 serogrupos fueron resistentes a oxacilina, 54.1% a clindamicina, y solo 3.4% a linezolid.

## 2.4. Carvacrol

Desde la antigüedad, las personas han utilizado sustancias naturales extraídas de las plantas, como los aceites esenciales, para combatir enfermedades y conservar los alimentos. En los últimos años, se han realizado múltiples investigaciones sobre la actividad antibacteriana de los aceites esenciales, especialmente los extraídos de los cítricos (Martínez *et al.*, 2003). La actividad antibacteriana de los aceites esenciales está relacionada con su composición química. Uno de los principales intereses hacia estas sustancias es el de emplearlos como posibles agentes antibacterianos y conservadores de los alimentos (Masqui *et al.*, 2022). En relación con sus propiedades antibacterianas es su hidrofobicidad. Por lo tanto, se debe obtener una mezcla uniforme del antibacteriano y un medio de disolución eficaz, para obtener una emulsión.

Carvacrol es uno de los aceites esenciales más comúnmente usado y un compuesto natural que constituye alrededor del 11 al 70% de los aceites de las plantas aromáticas como el orégano y tomillo. Tiene propiedades antibacterianas antioxidantes, antimutagénicas, antígenotóxicas y antihepatotóxicas. Estas propiedades antibacterianas se le pueden atribuir a su grupo hidroxilo y a su hidrofobicidad (Ben *et al.*, 2006) (Figura 1).

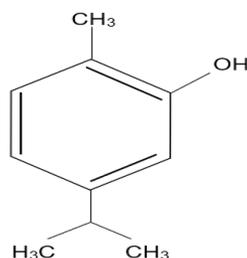


Figura 1. Estructura del carvacrol

Se han descrito diversos mecanismos de acción del carvacrol frente a las bacterias, que incluyen su capacidad para dañar la capa externa y la membrana citoplasmática, o posiblemente a algunas enzimas y proteínas. Se ha propuesto que el compuesto puede inducir alteraciones estructurales y funcionales en la membrana bacteriana, interactuando con los fosfolípidos provocando una disrupción de la estructura y aumento de la permeabilidad, lo que induce a la salida de sustancias esenciales para la célula. Entre las posibles enzimas afectadas está la ATPasa y el citocromo oxidasa, ambas esenciales para el metabolismo y la supervivencia celular. Carvacrol se considera como GRAS para su uso en la industria alimentaria por la Administración y Alimentos de los EE.UU. y actúa como antibacteriano contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, (cuadro 2) (Liu *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2022).

**Cuadro 2.** Efectos antibacterianos *in vitro* del carvacrol en su forma libre e integrado en un sistema de encapsulación

	Sistema	Resultados	Referencia
<b>Microcápsulas de carvacrol con matriz de pectina-alginato</b>	Microcápsulas	<i>Escherichia coli</i> CMI= 0.25 mg/mL	Sun <i>et al.</i> , 2019
<b>Microencapsulación de carvacrol con matriz de maltodextrina como herramienta eficaz para combatir biofilms de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Enterococcus faecalis</i></b>	Microcápsulas	CMI y CMB  <i>Pseudomonas aeruginosa:</i> (L-CARV= 5 mg/mL, E-CARV= 1.25 mg/mL)  <i>Enterococcus faecalis:</i> (L-CARV=0.625 mg/mL E-CARV=0.625 mg/mL)	Mechmechani <i>et al.</i> , 2022
		Potencial antibiofilm	

		CMI ( $\approx 5 \log$ CFU mL)	
<b>Actividad antibacteriana y antibiofilm del carvacrol frente a <i>Salmonella entérica</i> serotipo Typhimurium</b>	Libre	CMI y CMB (312 $\mu\text{g/mL}$ )	Trevisan <i>et al.</i> , 2018
		Potencial antibiofilm Reducción de 0.089 OD <sub>550</sub> , 0.076 OD <sub>550</sub> y 0.053 OD <sub>550</sub>	
		MIC (312 $\mu\text{g/mL}$ ), 2 x MIC (624 $\mu\text{g/mL}$ ), 4 x MIC (1250 $\mu\text{g/mL}$ )	
<b>Propiedades antibacterianas y antibiofilm del carvacrol solo y en combinación con cefixima frente a <i>Escherichia coli</i></b>	Libre	CMI y CMB (250 $\mu\text{g/mL}$ )	Asadi <i>et al.</i> , 2023
		Efecto sinérgico de carvacrol con cefixima ( $P < 0.05$ )	
		Potencial antibiofilm CMI/2 (125.0 y 62.5 $\mu\text{g/mL}$ ), CMI/4 (62.5 y 31.25 $\mu\text{g/mL}$ ) y CMI/8 (31.25 y 15.625 $\mu\text{g/mL}$ )	

CMI: concentración mínima inhibitoria, CMB: concentración mínima bactericida, L-CARV: Carvacrol libre, E-CARV: Carvacrol encapsulado, OD: Densidad óptica

Con base a ensayos realizados con *Pseudomona aeruginosas* y *Staphylococcus*, se ha propuesto que el mecanismo de acción antimicrobiana del carvacrol puede conducir, al menos parcialmente, a una alteración de la permeabilidad de la membrana celular por acumulación del carvacrol. La acumulación del carvacrol provoca reducción en el pH por almacenamiento de protones, lo cual limita el gradiente de la membrana citoplasmática conduciendo a una caída de la fuerza de la carga protónica y de los almacenes de ATP resultando en lisis de la membrana celular (Kachur y Suntres, 2019). Por lo tanto, el carvacrol podría representar una alternativa natural prometedora para el tratamiento de infecciones bacterianas, especialmente en el contexto de la creciente resistencia a los antibióticos de elección. Sin embargo, se requieren más investigaciones para describir y comprender los efectos del carvacrol y sus posibles aplicaciones tanto en el área hospitalaria como en la pública.

## 2.5 Microencapsulación

La mayoría de los aceites esenciales son utilizados en el ámbito alimentario, agrícola, cosmética y farmacéutica. Sin embargo, sus características fisicoquímicas como su alta volatilidad e insolubilidad en agua limitan su uso. Son altamente inestables y pueden sufrir cambios debido a factores externos como la luz, la temperatura, el oxígeno y la humedad. La técnica de microencapsulación puede ser una solución efectiva para conservar las propiedades funcionales y biológicas de los aceites y controlar su liberación. La microencapsulación consiste en recubrir partículas líquidas, sólidas o gaseosas con agentes encapsulantes que actúan como una barrera y aísla el material interno del ambiente externo, proporcionando una protección efectiva contra los factores ambientales. (Xiao *et al.*, 2014).

El desarrollo de un sistema de microencapsulación depende de su propósito lo cual implica definir características como la forma, tamaño, permeabilidad y biodegradabilidad, así como sus propiedades físicas y mecánicas considerando la resistencia y flexibilidad, y la capacidad de controlar la liberación del principio activo a través de mecanismos de difusión o ruptura de la pared de la micropartícula, activada por los cambios de temperatura, solubilidad, pH o biodegradabilidad del material encapsulante (Sousa *et al.*, 2022).

En el área alimentaria, la encapsulación de aceites esenciales o saborizantes es muy usada con el fin de evitar daño a las características físicas de la sustancia activa. (Pasin *et al.*, 2012). La industria farmacéutica se enfoca en un sistema de liberación controlada para algún tipo de fármaco usando microcápsulas con el propósito de reducir la toxicidad e irritación del estómago, o bien para mejorar el sabor de medicamentos y prevenir la vaporización de drogas volátiles (Timilsena *et al.*, 2019). La elección del material que recubre es un factor clave para garantizar la estabilidad del material interno en la microencapsulación. Los agentes más utilizados como encapsulantes son los biopolímeros como la goma arábiga, el alginato, las proteínas, las dextrinas y las pectinas. En general, la microencapsulación nos permite proteger y controlar la liberación de sustancias activas y así preservar sus propiedades funcionales y biológicas (Pasin *et al.*, 2012).

## 2.6 Pectinas

La pectina es un polisacárido natural prometedor que se utiliza para la formación de microcápsulas debido a su capacidad para gelificar, baja toxicidad y biocompatibilidad. Este biopolímero tiene numerosas aplicaciones potenciales en la industria de alimentos, productos farmacéuticos y biomédicos, por lo que se considera un recurso importante para el desarrollo de alternativas sostenibles. En la industria, la pectina tiene múltiples funciones como agente gelificante, espesante, texturizante, emulsionante y estabilizador. Es un sustituto de la grasa en productos alimenticios bajos en calorías y se utiliza ampliamente en la producción de mermeladas y jaleas. La pectina también se usa en la producción de películas dobles y de emulsionantes alimentarios. Su multifuncionalidad puede ser atribuida a la presencia de regiones polares y no polares en su molécula. (Seyfried *et al.*, 2016). La pectina, al igual que otros polisacáridos, puede atravesar la mayor parte del tracto gastrointestinal sin cambios, pero en el colon puede ser alterada. Las enzimas producidas por bacterias en ese lugar son las responsables de fermentar la pectina para formar gases como hidrógeno, dióxido de carbono y metano, así como ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato, butirato, lactato), que tienen efecto protector en trastornos intestinales agudos o crónicos (Crispín *et al.*, 2012).

### 2.6.1. Principales Fuentes de la Pectina

La pectina está presente en grandes cantidades en la estructura celular de vegetales y en frutas que no son gramíneas (particularmente en el pericarpio), esta sustancia funciona como un adhesivo que ayuda en el proceso de unión y separación de las células. La mayoría de las pectinas se obtienen de frutas cítricas como la naranja, el limón, la toronja y la manzana. Estas frutas albergan una cantidad considerable de sustancias pépticas. Es importante señalar que el color puede variar según la fuente de la que se obtenga. Frutas como el membrillo, las ciruelas y las grosellas ostentan una proporción considerablemente mayor de pectina en contraste con frutas de textura más blanda, a saber, las cerezas, las uvas y las fresas. Usualmente, la pulpa deshidratada de la manzana contiene entre un 15 y un 20 % de pectina, mientras que la cáscara deshidratada de frutas cítricas oscila entre

el 30 y el 35 % . Por otro lado, en frutas como los duraznos, las cerezas, las naranjas y las zanahorias, los niveles típicos de pectina representan el 1%, 0,4%, 0,5-3,5% y 1,4%, referente al peso fresco (Lara-Espinoza *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2015; Srivastava y Malviya, 2011).

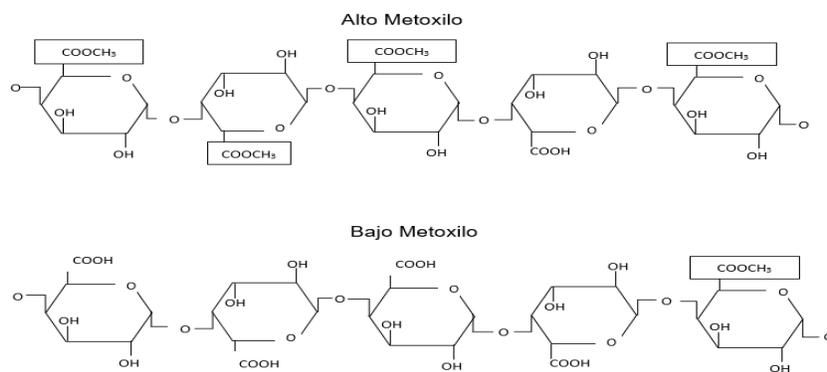
La remolacha azucarera también se ha observado que tiene alrededor del 23% de pectina, sin embargo, no posee una capacidad de gelificación significativa ya que contiene un cantidad considerable de grupos acetilo, bajo peso molecular, uniones covalentes de proteínas y azúcares neutros en abundancia. Las pectinas extraídas del orujo de oliva y de la remolacha comparten similitudes en su composición, caracterizadas por su bajo peso molecular y una notable presencia de azúcares neutros. A pesar de su capacidad gelificante limitada, estas pectinas tienen la capacidad de formar geles al interactuar con iones de calcio. Este proceso de gelificación difiere de las pectinas comerciales convencionales y es posiblemente influenciado por otras interacciones entre moléculas que contribuyen a la estabilidad de la estructura gelatinosa resultante (Lara-Espinoza *et al.*, 2018; Cardoso *et al.*, 2003).

### **2.6.2. Características Químicas**

La pectina representa un carbohidrato complejo que consiste en, al menos, un 65 % de unidades compuestas por ácido galacturónico,  $C_6H_{10}O_7$ . Las cadenas de pectina se constituyen a partir de anillos compuestos de este ácido, con masas moleculares que oscilan entre aproximadamente 50 000 y 150 000 dalton (Zegada Franco, 2015). Esta cadena también incluye azúcares neutros como D-galactosa, L-arabinosa y L-ramnosa. Por lo tanto, se considera un polisacárido de peso molecular alto. El empleo de la pectina enfrenta limitaciones significativas. Por ejemplo, su estabilidad física puede ser variable y tiende a hidratarse rápidamente, lo que puede provocar hinchamiento cuando entra en contacto con el agua. Además, las películas fabricadas exclusivamente con pectina pura no muestran una actividad antibacteriana y antioxidante clara, y sus propiedades mecánicas pueden ser deficientes (Nguyen *et al.*, 2023).

Las características gelificantes de las pectinas dependen en gran medida de su nivel de esterificación, conocido como GE, el cual se representa en términos porcentuales. Es precisamente este factor el que dirige en gran parte las propiedades de gelificación de las pectinas, y es por ello por lo que se procede a su clasificación en base a dicho nivel de esterificación, debido a su impacto

fundamental en esta capacidad gelificante. Las pectinas de alto metoxilo son aquellas donde más del 50% de los grupos carboxilo están esterificados con grupos metoxilos. (Figura 2). Este tipo de pectinas tienen capacidad gelificante en entornos ácidos a pH de 2.8 a 3.5, y con la presencia de altas concentraciones de azúcar del 60 al 70%. Esta capacidad de gelificación se aprovecha en la industria alimentaria para espesar y dar consistencia a mermeladas y productos lácteos. (Lara-Espinoza *et al.*, 20). Las pectinas de bajo metoxilo tienen grupos carboxilos esterificados en una proporción de 50% o menos con metoxilo. (Figura 2). Estas pectinas forman geles a pH's de 1.0 a 7 y en presencia de cationes como calcio. La cantidad de calcio requerida dependerá de la cantidad de sólidos disueltos. Por ejemplo, en un medio con 30% de sólidos disueltos, se requieren de 40 a 100 mg de calcio (Maoly, 2022, Zegada Franco, 2015).



**Figura 2.** Estructura de la pectina de alto con grado de esterificación (>50%) y bajo metoxilo (<50%)

Esta investigación representa un antecedente crucial en la generación de nuevo conocimiento, abordando las limitaciones y oportunidades inherentes. En un enfoque que busca ampliar nuestra comprensión de las propiedades microbianas y su potencial aplicación de un sistema de micropartículas compuestas por pectina y carvacrol. Como parte integral de este estudio, se diseñan y ejecutan pruebas microbiológicas específicas para analizar las propiedades y la efectividad de las micropartículas. Estas micropartículas se podrían concebir como una herramienta prometedora contra diversas cepas bacterianas causantes de enfermedades gastrointestinales, planteando así un posible tratamiento coadyuvante.

### 3. HIPÓTESIS

Las micropartículas compuestas de carvacrol y pectina tienen propiedades antibacterianas *in vitro* contra cepas de *Clostridioides difficile*, *Listeria monocytogenes* 7644, *Staphylococcus aureus* 25923, *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* Typhimurium 14028.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Evaluar las propiedades antibacterianas *in vitro* de micropartículas compuestas de pectina y carvacrol contra *Clostridioides difficile*, *Listeria monocytogenes* 7644, *Staphylococcus aureus* 25923, *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* Typhimurium 14028.

### 4.2. Objetivos Particulares

- Evaluar las propiedades antibacterianas *in vitro* del carvacrol contra cepas de *Clostridioides difficile* 700057, *Listeria monocytogenes* 7644, *Staphylococcus aureus* 25923, *Escherichia coli* O157:H7, y *Salmonella* Typhimurium 14028.
- Elaborar y analizar las propiedades fisicoquímicas de las micropartículas de pectina y micropartículas compuestas de pectina y carvacrol.
- Evaluar las propiedades antibacterianas *in vitro* de las micropartículas compuestas de pectina y carvacrol contra cepas de *Clostridioides Difficile* 700057, *Listeria monocytogenes* 7644, *Staphylococcus aureus* 25923, *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* Typhimurium 14028

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Para elaborar las micropartículas compuestas se utilizaron 4 g de pectina cítrica  $\geq 74\%$  (Sigma Aldrich, Alemania) y 1 mL de carvacrol (Sigma Aldrich, Alemania) con 98% de pureza, ambos materiales proporcionados por la Universidad de Sonora. Para llevar a cabo la gelificación iónica de micropartículas se utilizó una solución al 3% de pectina, una solución compuesta por pectina al 4% y carvacrol a 1%, y 18 y 36 g de acetato de zinc. Para el análisis microbiológico se utilizaron cepas ATCC de *Clostridoides difficile* 700057, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium 14028, *Staphylococcus aureus* 25923 y *Listeria monocytogenes* 7644 facilitadas por el Laboratorio de Microbiología Molecular del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD). Estas cepas fueron reactivadas con 30 mL de caldo Mueller-Hinton (MH) (Difco, Francia) y posteriormente sembradas en agar MH (Difco, Francia). Como control positivo se utilizó la cepa inoculada en caldo Mueller -Hinton y como control negativo caldo Mueller-Hinton.

### 5.1 Elaboración de Micropartículas

Se preparó una solución de pectina al 3% en 50 mL de agua bidestilada para elaborar las micropartículas de pectina, y otra solución de pectina al 4% en 50 ml de agua bidestilada agitada suavemente en una placa por 48 horas para elaborar las micropartículas compuestas, (Thermo Scientific SP142020-33Q). Luego, se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de carvacrol y se homogenizaron a 12,000 RPM utilizando un homogeneizador (Ika Ultra-turraz 18 basic, Alemania). Al mismo tiempo, se preparó una solución de acetato de zinc al 4 y 6% para su uso como gelificante. Ya preparadas ambas soluciones, se usó una bomba de inyección (Razel R99-EJ, EE.UU.) para controlar el flujo de eyección de la solución de pectina, y una bomba de aire para controlar el flujo de aire. Se adaptó un sistema de goteo controlado con salida de aire simulando una dispersión de la solución en spray para ajustar el tamaño de las micropartículas. La solución de acetato de zinc fue vertida a un recipiente que se agitaba suavemente, para recibir las micropartículas de pectina. Este proceso se

muestra gráficamente en la Figura 3. Las micropartículas permanecieron en la solución de acetato durante 15 minutos para completar el proceso de gelificación iónica, seguido de un lavado con agua bidestilada. Una vez obtenidas, fueron mantenidas en agua Milli-Q.

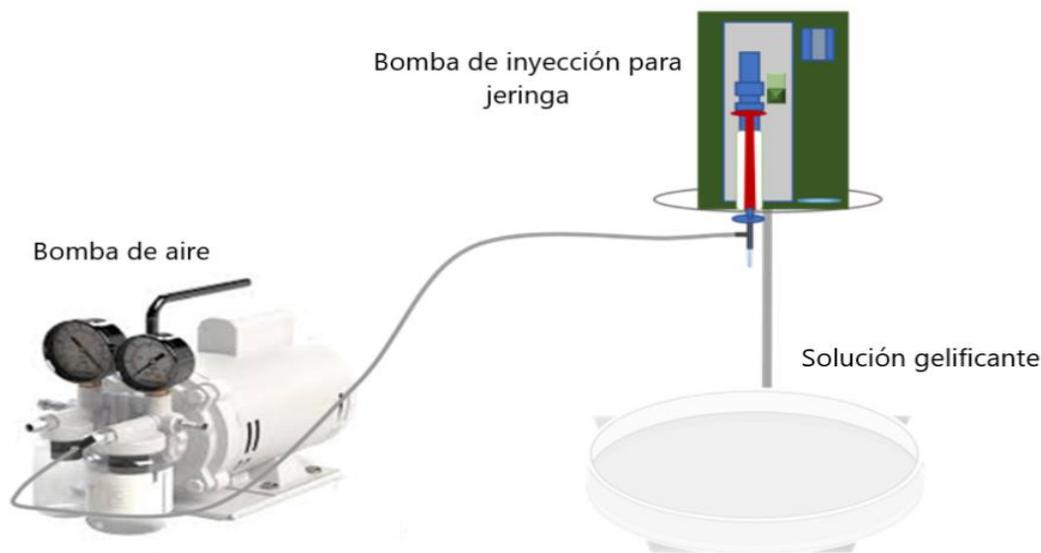


Figura 3. Sistema de elaboración de micropartículas de pectina y las compuestas de pectina y carvacrol

## 5.2 Caracterización Fisicoquímica de las Micropartículas de Pectina y Compuestas de Pectina y Carvacrol

La morfología (diámetro y forma) de las micropartículas se realizó mediante un microscopio óptico de luz invertida (AmScope XSB-1<sup>a</sup>, China) con los objetivos 4x y 10x, acoplado a una computadora con el software toupView 3.7. Para determinar la eficiencia de encapsulación de las micropartículas compuestas de pectina y carvacrol, se empleó un espectrofotómetro de UV-visible Thermo Scientific (Genesys 10 UV scanning, EE. UU.). Se prepararon diferentes concentraciones de carvacrol, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 y 0.05  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , con el objetivo de determinar la pérdida del compuesto durante el proceso de encapsulación con pectina. Se utilizaron como blancos el espectro de absorbancia de la solución de acetato de zinc donde se suspendieron las micropartículas durante

30 minutos, y también la del agua de lavado utilizada después de retirarlas de la solución. Se registraron lecturas en UV-visible a una absorbancia de longitud de onda a 276 nm, utilizando celdas de cuarzo de 1 cm<sup>3</sup>. Luego, se procedió a ajustar los datos obtenidos para obtener una ecuación de regresión que relacionara la absorbancia con la concentración de carvacrol presente en las muestras. De esta manera, fue posible cuantificar la cantidad de carvacrol en cada una de las concentraciones estudiadas. Todas las lecturas se realizaron por triplicado.

### 5.3. Ensayo Microbiológico *in vitro*

#### 5.3.1. Preparación del Inóculo

Para el análisis microbiológico se utilizaron las cepas ATCC de *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium 14028, *Staphylococcus aureus* 25923, *Listeria monocytogenes* 7644 y *Clostridium difficile* 700057. Las primeras 4 cepas fueron reactivadas tomando un inóculo de cada una de ellas contenidas en placas con agar Mueller-Hinton y se colocaron en tubos de 5 mL con caldo Mueller-Hinton (MH). Se incubaron a 37° C por 24 h (Thermo Scientific Heratherm 66L, EE.UU.). Posteriormente, se tomó un inóculo de cada tubo con un asa estéril y se sembraron con la técnica de siembra en estría por agotamiento en agar Mueller-Hinton (MH) a 37° C por 24 h. Para el caso de *C. difficile*, un inóculo de la cepa liofilizada fue colocada en tubos de 5 mL con caldo Mueller Hinton (MH). Después se inoculó de nuevo a 37 °C por 24 h en una jarra anaeróbica, agregando un sobre de Gas Pack. Posteriormente se sembró en agar base sangre utilizando la siembra por estriado e incubando a 37 °C por 24 h para su reactivación . Seguido se tomó un inoculo para agregarlo al caldo BHI (Infusión cerebro corazón) e incubarlo a 37°C por 24 h. Los inóculos de cada una de las cepas bacterianas se ajustaron a 0.1 de absorbancia (1 x 10<sup>8</sup> UFC/mL).

### **5.3.2. Concentración Mínima Inhibitoria y Bactericida para Carvacrol**

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de carvacrol se utilizó el método de micro dilución en caldo. Se realizó una solución madre de carvacrol mezclando 10 mL de agua bidestilada con 20.49  $\mu\text{L}$  de carvacrol y 50  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO). Se determinó la densidad óptica a 620 nm de las bacterias ajustando a 0.1 de absorbancia ( $1 \times 10^8$  UFC/mL). Posteriormente se prepararon diluciones de carvacrol a concentraciones de 0.500, 0.450, 0.400, 0.350, 0.300, 0.275, 0.250, 0.225, 0.200 y 0.175 mg/mL (Khan *et al.*, 2017). Entonces, en cada pocillo de una microplaca se agregaron 295  $\mu\text{L}$  de cada una de las concentraciones de carvacrol y 5  $\mu\text{L}$  de la bacteria y se incubaron a 37° C por 24 h. De aquí, se tomaron 20  $\mu\text{L}$  de cada pocillo, se colocaron en placas Petri con agar Mueller-Hinton, y se incubaron a 37° C por 24 horas para determinar la CMI y CMB. Este ensayo microbiológico se realizó por duplicado. La CMI fue determinada como la concentración más baja que logró inhibir crecimiento bacteriano observado, y la CMB como la concentración más baja que inhibió más del 99% del crecimiento bacteriano.

### **5.3.3. CMI y CMB para las Micropartículas Compuestas**

Se determinó la CMI y CMB de las micropartículas con carvacrol y pectina usando el método de dilución en caldo. Se utilizaron tubos estériles con 2 mL de caldo de cultivo MH inoculados con 5  $\mu\text{L}$  de cada una de las cepas descritas y ajustadas a 0.1 de absorbancia ( $1 \times 10^8$  UFC/mL). Se prepararon diferentes diluciones de micropartículas compuestas en concentraciones de 0.150, 0.200, 0.250, 0.300, 0.350 y 0.400 mg/mL. Posteriormente, se incubaron a 37° C por 24 h (Sun *et al.*, 2019). Se colocaron y sembraron alícuotas de 20  $\mu\text{L}$  de cada una de las concentraciones en placas de Petri con agar Mueller Hinton, y se incubaron a 37°C por 24 horas. El caldo MH inoculado con cada cepa bacteriana se usó como control positivo y el caldo MH como control negativo. Este ensayo microbiológico se realizó por duplicado con cada cepa.

#### 5.4 Análisis Estadístico

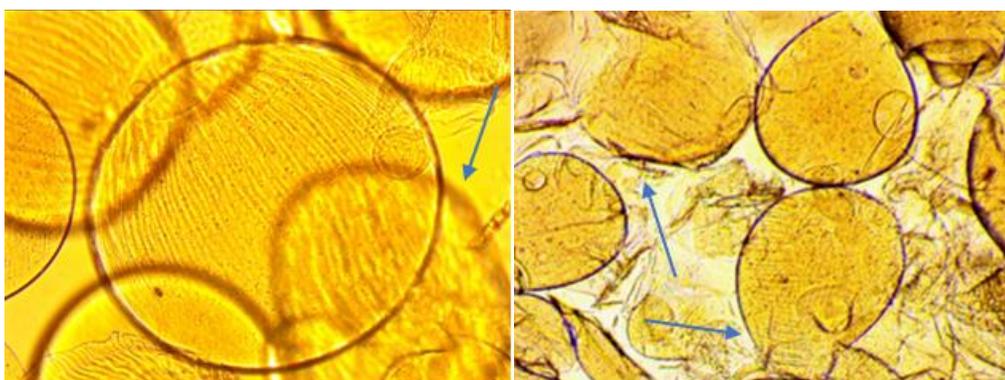
Se utilizó estadística descriptiva para calcular el valor medio y desviación estándar. La prueba t-Student se usó para comparar los tamaños entre las micropartículas de pectina y las micropartículas compuestas con carvacrol y pectina. Todo los datos fueron analizados utilizando el paquete estadístico STATA versión 2012 con un nivel de significancia  $P < 0.05$ .

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Elaboración y Caracterización de las Micropartículas Compuestas

#### 6.1.1 Morfología

El análisis de superficie mediante microscopía óptica de luz invertida reveló que tanto las micropartículas de pectina como las compuestas presentaban forma esférica y semiesférica tal como se muestran en la Figura 5. Sin embargo, en las micropartículas compuestas se pueden apreciar películas o membranas que no llegaron a gelificarse completamente. Esto podría atribuirse a que ciertas gotas expulsadas tenían una mayor concentración de aceite y una menor concentración de pectina, lo que condujo a una gelificación parcial. Algunas de estas micropartículas presentaron daños en su estructura, las que se muestran mediante las flechas. Estas irregularidades también pueden deberse a la concentración del entrecruzante, la distancia de la aguja, al tiempo, tipo de agitación y a la misma técnica de gelificación iónica.



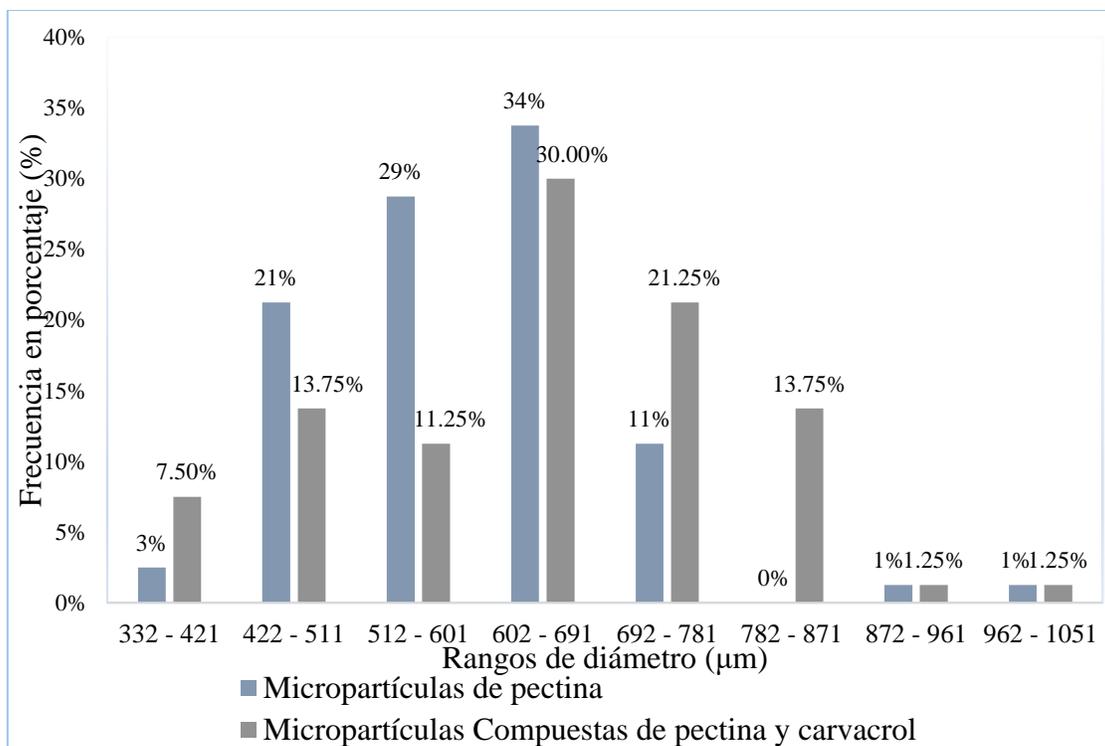
**Figura 5.** Imágenes de microscopía obtenidas con los objetivos de 10x y 4x de las micropartículas de pectina (A) y compuestas de carvacrol y pectina (B)

Es importante destacar que el sistema de gelificación iónica tiene algunas desventajas como la falta

de control de la tasa de gelificación, es sensible a las condiciones ambientales y a la presencia de impurezas en la solución. Por lo tanto, se requiere de un cuidadoso monitoreo y ajuste de las variables durante el proceso de elaboración de las micropartículas (Kuo y Ma, 2002). Sin embargo, también es un método que tiene algunas ventajas como el de minimizar la pérdida por volatilización, debido a la interacción entre un polímero y un polícatión o polianión, lo que es recomendable cuando el ingrediente activo es hidrofóbico (Pino y Aragüés, 2021).

### **6.1.2. Tamaño**

Las micropartículas de pectina presentaron tamaños con un diámetro promedio de  $592.64 \pm 101.50$   $\mu\text{m}$ , mientras que las micropartículas compuestas con carvacrol y pectina exhibieron un diámetro de  $638.72 \pm 139.77$   $\mu\text{m}$ . En la Figura 3, se muestra la distribución del tamaño de estas micropartículas por rangos de diámetro. Se puede observar que un mayor porcentaje de micropartículas de pectina (34%) y de las compuestas carvacrol y pectina (30%) presentaron rangos de diámetros de 602  $\mu\text{m}$  a 691  $\mu\text{m}$ . Se han reportado tamaños de micropartículas de alginato-pectina con diámetros de  $720 \pm 810$   $\mu\text{m}$  (Chakraborty *et al.*, 2010). La variación en el tamaño de las micropartículas depende de factores como la presión de atomización, temperatura del aire de entrada, la extensión del entrecruzamiento, el tamaño de la aguja, y la concentración del biopolímero usado. Se menciona que, al aumentar la concentración del biopolímero, su viscosidad también aumenta, lo que resulta en una mayor cantidad de sitios de unión disponibles para el entrecruzante en las cadenas del polímero, lo que deriva en un mayor tamaño de la micropartícula (Mitra y Dey 2011; Sreekumar *et al.*, 2018).



**Figura 4.** Distribución de los tamaños promedios de micropartículas de pectina y micropartículas compuestas con carvacrol y pectina

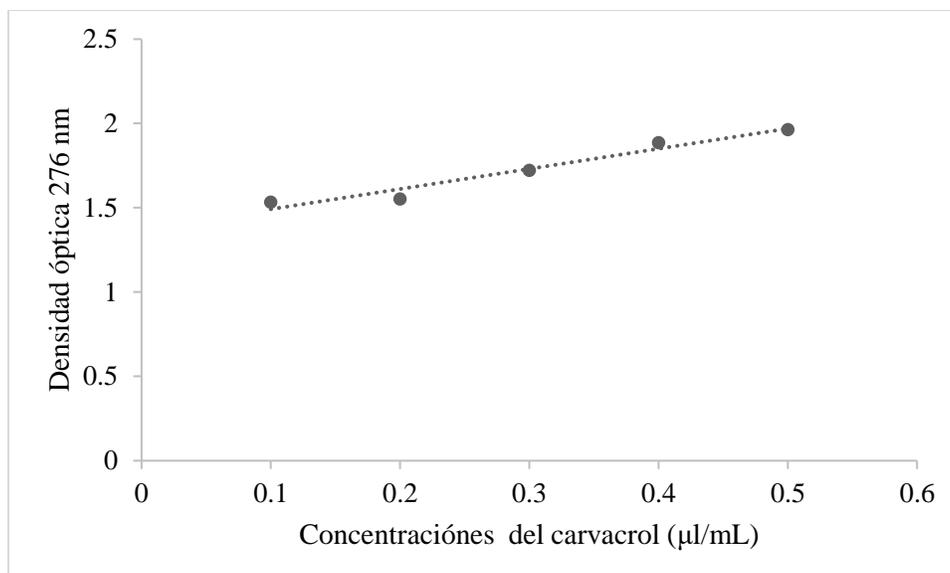
Guo y colaboradores (2022) elaboraron microcápsulas de pectina y proteína cargadas con carvacrol con un tamaño promedio de 1.08 µm. En donde observaron que las relaciones pared/núcleo influían en la morfología, tamaño y eficiencia de encapsulación. Las relaciones de 1:1, 1:2 y 1:4 de la mezcla, las microcápsulas tenían forma esférica y una superficie lisa, y exhibieron tamaños mucho más pequeños y uniformes que las otras proporciones de pared/núcleo. Los autores concluyeron que la relación pared/núcleo afecta la eficiencia de encapsulación cuando observaron que la relación 1:2 era significativamente ( $P < 0.05$ ) más alta a aquellas con otras relaciones pared/núcleo ( $77.48 \pm 0.03\%$ ). En 2021, Stachowiak y colaboradores, desarrollaron micropartículas de pectina-alginato de sodio con un tamaño de  $560 \pm 0.094$  µm. También elaboraron micropartículas de alginato, las cuales presentaron un tamaño ligeramente menor  $474.9 \pm 0.112$  µm. Al comparar ambos tipos de partículas, se observó que aquellas compuestas de alginato de sodio y pectina presentaron una distribución de tamaño más estrecha en su forma esférica en comparación con aquellas de alginato de sodio.

El tamaño de las micropartículas puede influenciar la cinética de liberación de un fármaco. Las

partículas más pequeñas tienen una mayor superficie de contacto con el medio, lo que puede conducir a una liberación más rápida y completa del fármaco. Sin embargo, también es posible que formen agregados o aglomerados que pueden limitar la liberación de la sustancia. Además, la biodisponibilidad del fármaco también es influenciada por el tamaño de partículas ya que las partículas de menor tamaño se absorben fácilmente en el cuerpo. Por lo tanto, es necesario elegir un tamaño óptimo de la micropartícula en función de la formulación y adición de fármacos, como también sus características morfológicas. (Lascol *et al.*, 2018).

## 6.2 Eficiencia de Encapsulación

Se determinó una eficiencia de encapsulación del 95% (Figura 6). En el acetato de zinc que se utilizó para gelificar se encontró una pérdida del carvacrol de 0.4269  $\mu\text{g/mL}$  y en el agua de lavado de las micropartículas no se encontró pérdida del compuesto esto se podría deber ya que en el acetato de zinc se dejaron reposar por 30 minutos para terminar la gelificación de las micropartículas y agua de lavado solo se utilizó para enjuagarlas. Estos datos indican que la pectina, utilizada como material encapsulante, demostró ser efectiva para encapsular carvacrol, ya que la pectina forma un gel con la presencia de cationes, en este caso con el acetato de zinc, permitiendo formar una red tridimensional interaccionando grupos carboxilos libres de la pectina con el acetato de zinc, estas características funcionan para proteger compuestos hidrofóbicos como el carvacrol. Además, la pectina podría actuar como emulsionante cuando se agregan compuestos lipofílicos. La técnica de goteo y el baño de gelificación con acetato de zinc utilizadas demostraron ser apropiadas para la obtención de micropartículas tanto de pectina como las compuestas. Esta metodología ha permitido obtener micropartículas con una alta eficiencia de encapsulación, lo que confirma su viabilidad y su potencial en aplicaciones futuras.



**Figura 5.** Cuantificación de la pérdida de las micropartículas compuestas

Zheng y colaboradores (2022), evaluaron la eficiencia de encapsulación (EE) de nanopartículas de zeína/caseinato de sodio cargadas con carvacrol en diferentes proporciones de masa. Reportaron que la relación de 2:1 de zeína/ caseinato tuvo una EE de 77.96%, mientras que para la proporción de 1:1, se obtuvo una EE de 78.03%. Por otro lado, la proporción de 4:1 tuvo una EE del 81.09 %, y para 1:2, se obtuvo la mayor EE con un valor de 82.19%. Cabe destacar que estas nanopartículas fueron obtenidas mediante el método de control de pH, y presentaron un tamaño promedio en el rango de 70 nm hasta 200 nm.

Los valores obtenidos de eficiencia de encapsulación, tanto en el estudio de Zheng y colaborados como en el nuestro, indicaron una buena capacidad de encapsulación de los sistemas encapsulantes utilizados, lo que sugiere su potencial aplicación en la protección del carvacrol. Sin embargo, es importante destacar que obtuvimos una eficiencia de encapsulación del 95%, mientras que el estudio de Zheng y colaboradores reportaron una EE en el rango del 77.96 % al 82.19%. La disparidad entre ambos estudios puede ser atribuido a que los materiales utilizados para encapsular el carvacrol. Ambos materiales tienen propiedades que pueden influir en la eficiencia de encapsulación. Los autores mencionan que la proporción de masa de zeína/caseinato influyó en la eficiencia de encapsulación.

Según Jyothi y colaboradores (2010), la eficiencia de encapsulación está influenciada por la concentración del biopolímero utilizado. Específicamente, se ha observado que la concentración

del polisacárido empleado para encapsular desempeña un papel crucial en la eficiencia del proceso. Se ha encontrado que, al aumentar la concentración del polímero desde un 20% hasta un 32.5%, la eficiencia de encapsulación puede mejorar significativamente en un rango que oscila entre un 53.1% y un 70.9%. Este fenómeno se atribuye al rápido proceso de precipitación del polisacárido hacia la fase dispersa, lo que previene la pérdida del agente a encapsular. Asimismo, el aumento en la viscosidad que resulta de una mayor concentración del polímero favorece la retención del principio activo dentro de las partículas formadas durante el proceso de encapsulación. Guo y colaboradores (2022), formularon microcápsulas cargadas con carvacrol mediante coacervación compleja con ácido tánico de aislado de proteína de suero de leche y pectina en una relación de 4:1 y 5:1, proporcionando una eficiencia de encapsulación de  $77.48 \pm 0.03$  % con un tamaño promedio de 1.08  $\mu\text{m}$ .

### 6.3 Actividad Antibacteriana del Carvacrol

En el Cuadro 3 se muestran los valores de CMI's y CMB's de carvacrol contra las cepas bacterianas probadas en este estudio. Se obtuvieron valores de CMI y CMB entre 0.175 a 0.225 mg/mL y 0.200 a 0.400 mg/mL, respectivamente. *Salmonella* Typhimurium fue más sensible al carvacrol con una CMI de 0.175 mg/mL y una CMB de 0.200 mg/mL mientras que *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* requirieron de valores más altos (CMI's y CMB's de 0.200 mg/mL y de 0.300 mg/mL). Estos valores se usaron como base para elaborar las micropartículas compuestas con carvacrol y pectina.

**Cuadro 3** Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) del compuesto carvacrol frente a las cepas bacterianas probadas

Cepas bacterianas	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	0.175	0.225
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0.200	0.300
<i>Clostridioides difficile</i> ATCC 700057	0.200	0.400
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	0.200	0.300
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	0.175	0.200

ATCC: American Type Culture Collection

En 2016, Wang y colaboradores evaluaron la propiedad antibacteriana de compuestos fenólicos, incluyendo el carvacrol a concentraciones de 0.50 a 1000 mg/mL mediante el método de dilución en caldo. Las CMI's y CMB's para *E. coli* ATCC 10798 fueron de 0.400 y 0.600 mg/mL, y para *S. aureus* resistente a la meticilina de 0.400 y 0.400 mg/mL, respectivamente. Comparando los resultados observamos que las CMI's y CMB's en nuestro estudio son menores a las reportadas por Wang y colaboradores. Esto podría ser atribuido al tipo de cepas bacterianas probadas y a la pureza del carvacrol. A pesar de las diferencias en los datos, ambos estudios destacan la capacidad antibacteriana que tiene el carvacrol. Estos datos son relevantes para el desarrollo de productos con mejores propiedades antibacterianas, aunque se requieren de estudios adicionales para determinar su efectividad contra cepas bacterianas diferentes.

En el año 2018, Trevisan y colaboradores llevaron a cabo un análisis para la determinación de la actividad antibacteriana y antibiofilm del carvacrol contra *Salmonella* Typhimurium, haciendo uso de la técnica de microdilución en caldo. Los resultados obtenidos subrayaron de manera concluyente que tanto la CMI como la CMB fue de 312 µg/mL. además, se observó que el carvacrol, en estas concentraciones, logró ejercer su capacidad de eliminación sobre las células de *S. Typhimurium* en un lapso de 6 y 1 hora respectivamente, de acuerdo con el análisis de la curva temporal de eliminación. Por otra parte, Keyvan y Tutu, 2019, expusieron a 31 cepas de *S. aureus* a concentraciones de carvacrol para determinar la CMI mediante el método de dilución en caldo, el carvacrol presentó un efecto antibacteriano dentro de los valores de 0.058 a 0.234 mg/mL.

Es importante destacar que las CMI's y las CMB's del carvacrol en estos estudio fueron similares tanto para las bacterias Gram positivas como Gram negativas, lo que indica que ambos tipos de bacterias son sensibles a diferentes concentraciones del compuesto. Esta propiedad es útil para desarrollar nuevas alternativas naturales, donde el carvacrol puede considerarse como una opción terapéutica para combatir diferentes tipos de infecciones bacterianas.

Churklam y colaboradores (2020) investigaron el efecto antibacteriano del carvacrol sobre *L. monocytogenes* 10403S y reportaron una CMI de 250 µg/mL y una CMB de 250-500 µg/mL. Además, observaron que la combinación del carvacrol con nisina producía efectos antibacterianos sinérgicos reportando valores de CMI y CMB de carvacrol (62.5 µg/mL) y nisina (25 µg/mL), respectivamente. Como la nisina es un aditivo alimentario estándar se ha sugerido que la mezcla de carvacrol y nisina se podría utilizar como un preservativo potencial para controlar *L. monocytogenes* en salchichas. Por otro lado, Berdejo y colaboradores en 2022, reportaron una CMI de 150 µL/L y una CMB de 250 µL/L contra aislamientos de variantes genéticas resistentes (VR)

de *L. monocytogenes*. Además, observaron que las VR requirieron de una dosis más alta de carvacrol con una CMI de 175 µl/L y CMB de 350 µl/L . Es importante resaltar que el efecto del carvacrol es influenciado por la cantidad del compuesto usado, su pureza, tipo de cepa bacteriana usada, cantidad de su inóculo y fase de crecimiento.

Por otro lado, Mooyottu y colaboradores (2017) evaluaron el efecto del carvacrol en el crecimiento y esporulación de *C. difficile in vitro*, determinando una CMI de 1.2 mM y una concentración sub-inhibitoria de 0.9 mM y 0.6 mM. Los resultados mostraron que estas concentraciones redujeron significativamente la producción de esporas en intervalos de incubación de 48, 72 y 96 h. Sin embargo, no se observó reducción en la germinación de las esporas. Es importante destacar que las células vegetativas de las esporas recién germinadas mostraron ser más susceptibles al carvacrol en comparación con las células vegetativas de *C. difficile* cultivadas previamente. También Mooyottu y su equipo, (2017) determinaron el efecto antibacteriano *in vitro* del carvacrol obteniendo una concentración sub-inhibitoria del compuesto contra *C. difficile* de 0.10 mg/mL.

#### 6.4. CMI y CMB de las Micropartículas Compuestas

Los resultados de las pruebas antibacterianas se muestran en el Cuadro 4. Las cepas bacterianas mostraron inhibición cuando entraron en contacto con las micropartículas compuestas. Es interesante destacar que la sensibilidad bacteriana a las micropartículas varió entre las diferentes cepas evaluadas. La bacteria Gram negativa *Escherichia coli* O157:H7 demostró ser la más sensible con una CMI de 0.150 mg/mL y una CMB de 0.200 mg/mL. Estos resultados sugieren que las micropartículas compuestas de carvacrol y pectina tienen una fuerte actividad antibacteriana contra esta cepa específica. Por el contrario, la bacteria Gram positiva *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 presentó menor sensibilidad con una CMI de 0.300 mg/mL y una CMB de 0.350 mg/mL.

**Cuadro 4.** Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y bactericidas (CMB) de micropartículas compuestas con carvacrol y pectina contra las cepas bacterianas probadas en este estudio

Cepas bacterianas	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	0.150	0.200
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	0.150	0.350
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0.200	0.350

<b><i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644</b>	0.300	0.350
<b><i>Clostridioides difficile</i> ATCC 700057</b>	0.150	0.150

ATCC: American Type Culture Collection

En 2019, Sun y colaboradores evaluaron la actividad antimicrobiana del carvacrol libre y el encapsulado en una matriz de pectina y alginato (1:1) sintetizadas mediante la técnica spray-drying contra *Escherichia coli*, obteniendo CMI's similares (0.250 mg/mL) para ambos tipos de micropartículas. Se concluyó que el encapsulamiento no afectaba la actividad antimicrobiana del carvacrol. Por otro lado, Santos y colaboradores (2015), encapsularon carvacrol en una matriz de hidroxipropil-beta-ciclodextrina para evaluar su actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* K12 y *Salmonella* Typhimurium LT2, usando las técnicas de amasado (KN) y el liofilizado (FD). Las CMI's y CMB's s estimadas contra *Salmonella* Typhimurium con la técnica FD fueron de 350 µg/mL y 800 µg/mL y con la técnica (KN), de 300 µg/mL; 800 µg/mL respectivamente, y contra *Escherichia coli* K12 con la técnica FD de 350 µg/mL; 750 µg/mL y con la técnica de KN de 300 µg/mL; 750 µg/mL, respectivamente.

Keawchaon y Yoksan (2011) utilizaron nanopartículas cargadas con carvacrol contra diferentes cepas bacterianas. Estimaron CMB's de 4.113 mg/mL, 2.056 mg/mL y 8.225 mg/mL contra *Staphylococcus aureus*, *B. cereus* y *Escherichia coli*, respectivamente. Estos autores emplearon el método de dilución en caldo Mueller-Hinton, ajustando las concentraciones bacterianas a  $1 \times 10^8$  UFC/mL y diluyendo a  $1 \times 10^6$  UFC/mL, utilizando diferentes relaciones en peso de quitosano/carcacrol. Se pudieron observar CMB's más altas que aquellas con las micropartículas compuestas de nuestro estudio. Estas diferencias pueden deberse a la eficiencia de encapsulación obtenida, que varió del 13.6 % al 31.4 % en comparación con la nuestra, que fue del 95 %. También pudo influir el tamaño, ya que entre más grande sea la partícula, mayor será la cantidad de carvacrol presente. Comparando los tamaños de 40 a 80 nm con los que obtuvimos, que fueron de  $638.72 \pm 139.77$  nm, podría explicarse la disparidad observada.

Wang y colaboradores en 2009 evaluaron la actividad del carvacrol encapsulado en una matriz de alginato contra *Escherichia coli* reportando una CMB de 200 µL/L. y con carvacrol libre de 200 µL/L. Los autores concluyeron que la encapsulación no afectaba la actividad antibacteriana del carvacrol. Además, Heckler y colaboradores en 2020 encapsularon carvacrol con fosfatidilcolina de soja obteniendo nano liposomas, y lo usaron contra *Salmonella* spp. reportando una CMI y de

CMB de 663  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 1325  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente, reduciendo a 0.5-0.9 log UFC/mL. Los valores de la CMI y CMB obtenidos son superiores a los nuestros y esto podría estar relacionado a la existencia una fuerte unión del carvacrol con los liposomas, provocando una menor liberación del compuesto. En combinación, los estudios de Wang y colaboradores y la reciente investigación de Heckler y su equipo aportan conocimientos sobre las perspectivas de encapsulación del carvacrol en diversas matrices sin afectar su actividad antibacteriana.

## 7. CONCLUSIÓN

Mediante el método de goteo con dispersión de la solución por atomización se obtuvieron micropartículas compuestas de carvacrol y pectina con un tamaño de  $638.72 \pm 139.77 \mu\text{m}$  a un flujo de eyección (14 cc/h) y presión del aire (0.5 y 0.7 kg/cm<sup>3</sup>). Estas micropartículas presentaron una forma semiesférica y una eficiencia de encapsulación del 95%. El método de aspersion demostró ser eficaz para obtener micropartículas con propiedades antibacterianas contra *C. difficile* 700057, *L. monocytogenes* 7644, *S. aureus* 25923, *E. coli* O157:H7 y *S. Typhimurium* 14028. Cabe destacar que *C. difficile* 700057 fue la bacteria más sensible a las micropartículas, mientras que *L. monocytogenes* fue la menos sensible. Se concluye que las micropartículas compuestas de pectina y carvacrol pueden ser una alternativa para el tratamiento de bacterias patógenas presentes tanto en el área comunitaria como hospitalaria.

## 8. RECOMENDACIONES

Es necesario probar las micropartículas compuestas de pectina y carvacrol contra otras cepas bacterianas, para saber si tendrán el mismo efecto inhibitorio y bactericida.

Someter a las micropartículas compuestas de carvacrol y pectina a diferentes condiciones de pH para observar su comportamiento y la liberación del compuesto.

Realizar ensayos *in vivo* con el fin de buscar las dosificaciones eficaces o efectivas de las micropartículas compuestas de carvacrol y pectina referente a su actividad antibacteriana.

## 9. REFERENCIAS

- Ansolin, A., Cagnini, M. R., Debiasi, M. M., & D'Agostini, F. M. (2016). Meningite por *listeria monocytogenes*–sinais e sintomas em cinco casos clínicos. *Anais de Medicina*.
- Arias, C. A., Panesso, D., & Zúñiga, M. (2003). Guías para el uso racional de antibióticos beta-lactámicos: mecanismos de resistencia y su interpretación clínica. *Biomédica*, 23(2), 134-40.
- Asadi, S., Nayeri-Fasaei, B., Zahraei-Salehi, T. *et al.* Propiedades antibacterianas y antibiofilm del carvacrol solo y en combinación con cefixima frente a *Escherichia coli* . *BMC Microbiol* 23 , 55 (2023).
- Banos, A., Garcia-Lopez, J. D., Nunez, C., Martinez-Bueno, M., Maqueda, M., & Valdivia, E. (2016). Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in fish by enterocin AS-48 and *Listeria* lytic bacteriophage P100. *Lwt-Food Science and Technology*, 66, 672-677.
- Bavishi, C., & DuPont, H. L. (2011). Systematic review: the use of proton pump inhibitors and increased susceptibility to enteric infection. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 34(11-12), 1269-1281.
- Ben Arfa, A., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N., & Chalier, P. (2006). Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in applied microbiology*, 43(2), 149-154.
- Ansolin, A., Cagnini, M. R., Debiasi, M. M., & D'Agostini, F. M. (2016). Meningite por *listeria monocytogenes*–sinais e sintomas em cinco casos clínicos. *Anais de Medicina*.
- Berdejo, D., Gayán, E., Pagán, E., Merino, N., Campillo, R., Pagán, R., & García-Gonzalo, D. (2022). Carvacrol Selective Pressure Allows the Occurrence of Genetic Resistant Variants of *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Foods*, 11(20), 3282.
- Brooks, G., Carrooll, K., Butel, J., Morse, S., & Mietzener, T. (2011). Microbiología médica.(Jawetz, Melnick, & Adelberg, Eds.). In: México: McGraw-Hill Interamericana Editores.
- Campos, J., Mourão, J., Peixe, L., & Antunes, P. (2019). Non-typhoidal *Salmonella* in the pig production chain: a comprehensive analysis of its impact on human health. *Pathogens*, 8(1), 19.
- Cardoso, SM, Coimbra, MA y Da Silva, JL (2003). Gelificación mediada por calcio de un extracto péctico de orujo de oliva. *Polímeros de carbohidratos* , 52 (2), 125-133.
- Chakraborty, S., Khandai, M., Sharma, A., Khanam, N., Patra, C., Dinda, S., & Sen, K. (2010). Preparation, and evaluation of algino-pectinate bioadhesive microspheres: An investigation of the effects of polymers using multiple comparison analysis. *Acta pharmaceutica*, 60(3), 255-266.
- Chan, E. S. (2011). Preparation of Ca-alginate beads containing high oil content: Influence of process variables on encapsulation efficiency and bead properties. *Carbohydrate polymers*, 84(4), 1267-1275.
- Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and molecular biology*

reviews, 65(2), 232-260.

- Churklam, W., Chaturongakul, S., Ngamwongsatit, B., & Aunpad, R. (2020). The mechanisms of action of carvacrol and its synergism with nisin against *Listeria monocytogenes* on sliced bologna sausage. *Food Control*, 108, 106864.
- Cohen, S. H., Gerding, D. N., Johnson, S., Kelly, C. P., Loo, V. G., McDonald, L. C., Wilcox, M. H. (2010). Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA). *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 31(5), 431-455.
- Crispín, P. L. M., Caro, R. R., & Ochoa, M. D. V. (2012). Pectina: usos farmacéuticos y aplicaciones terapéuticas. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*,
- Cruz-López, F., Sánchez-Muñoz, A., & Martínez-Meléndez, A. (2022). *Clostridioides difficile*: un patógeno peculiar. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 6(1), 962-970.
- Dahmen, S., Mansour, W., Boujaafar, N., Arlet, G., & Bouallegue, O. (2010). Distribution of Cotrimoxazole Resistance Genes Associated with Class 1 Integrons in Clinical Isolates of Enterobacteriaceae in a University Hospital in Tunisia. *Microbial Drug Resistance*, 16(1), 43-47.
- Fernández-Brando, R. J., Bentancor, L. V., Mejías, M. P., Panek, A. C., Cabrera, G. G., Exeni, R. A., & Palermo, M. S. (2011). Actualización en el tratamiento del síndrome urémico hemolítico endémico: Patogénesis y tratamiento de la complicación sistémica más grave de las infecciones por *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Medicina (Buenos Aires)*, 71(4), 383-389.
- García, A., Martínez, C., Juárez, R. I., Téllez, R., Paredes, M. A., Herrera, M. D. R., & Giono, S. (2019). Resistencia a la meticilina y producción de biopelícula en aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa* negativa en México. *Biomédica*, 39(3), 513-523.
- Gil-Setas, A., Mazón Ramos, A., Martín Salas, C., Urtiaga Domínguez, M., & Inza Elia, M. (2002). *Salmonellosis* no tifoidea en un área de salud de Navarra, España. *Revista española de salud pública*, 76(1), 49-56.
- Guo, Q., Li, S., Du, G., Chen, H., Yan, X., Chang, S., ... & Yuan, Y. (2022). Formulation and characterization of microcapsules encapsulating carvacrol using complex coacervation crosslinked with tannic acid. *Lwt*, 165, 113683.
- Heckler, C., Silva, C. M. M., Cacciatore, F. A., Daroit, D. J., & da Silva Malheiros, P. (2020). Thymol and carvacrol in nanoliposomes: Characterization and a comparison with free counterparts against planktonic and glass-adhered *Salmonella*. *Lwt*, 127, 109382.
- Heiman, K. E., Mody, R. K., Johnson, S. D., Griffin, P. M., & Gould, L. H. (2015). *Escherichia coli* O157 outbreaks in the United States, 2003–2012. *Emerging infectious diseases*, 21(8), 1293.
- Huang, L. L., Wu, C. R., Gao, H. J., Xu, C., Dai, M. H., Hao, H. H., . . . Cheng, G. Y. (2022). Bacterial Multidrug Efflux Pumps at the Frontline of Antimicrobial Resistance: An Overview. *Antibiotics-Basel*, 11(4), Article 520.

- Ibarra Gómez, F., Bascopé Maida, S. C., Bazan Antezana, Y., Bejarano Forqueras, H. A., Bustamante Butrón, R. C., Cadima Terrazas, M. A., & Peláez Molina, C. (2005). Sensibilidad y resistencia de las *salmonellas* a los antimicrobianos en la ciudad de Cochabamba. *Gaceta Médica Boliviana*, 28(1), 3-7.
- Jyothi, N. V. N., Prasanna, P. M., Sakarkar, S. N., Prabha, K. S., Ramaiah, P. S., & Srawan, G. Y. (2010). Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *Journal of microencapsulation*, 27(3), 187-197.
- Kachur, K., & Suntres, Z. (2020). The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(18), 3042-3053.
- Keawchaon, L., & Yoksan, R. (2011). Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 84(1), 163-171.
- Keyvan, E. R. H. A. N., & Tutun, H. (2019). Effects of carvacrol on *Staphylococcus aureus* isolated from bulk tank milk. *Med Weter*, 75, 238-241.
- Khan, I., Bahuguna, A., Kumar, P., Bajpai, V. K., & Kang, S. C. (2017). Antimicrobial potential of carvacrol against uropathogenic *Escherichia coli* via membrane disruption, depolarization, and reactive oxygen species generation. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2421.
- Kosek, M., Bern, C., & Guerrant, R. L. (2003). The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bulletin of the World Health Organization*, 81(3), 197-204.
- Lara-Espinoza, C., Carvajal-Millán, E., Balandrán-Quintana, R., López-Franco, Y., & Rascón-Chu, A. (2018). Pectin and pectin-based composite materials: Beyond food texture. *Molecules*, 23(4), 942.
- Lara-Espinoza, C., Carvajal-Millán, E., Balandrán-Quintana, R., López-Franco, Y., & Rascón-Chu, A. (2018). Pectin and pectin-based composite materials: Beyond food texture. *Molecules*, 23(4), 942.
- Lascol, M., Bourgeois, S., Barratier, C., Marote, P., Lantéri, P., & Bordes, C. (2018). Development of pectin microparticles by using ionotropic gelation with chlorhexidine as cross-linking agent. *International Journal of Pharmaceutics*, 542(1-2), 205-212.
- Li, DQ, Du, GM, Jing, WW, Li, JF, Yan, JY y Liu, ZY (2015). Efectos combinados de variables independientes sobre el rendimiento y contenido de proteína de pectina extraída de pulpa de remolacha azucarera por ácido cítrico. *Polímeros de carbohidratos*, 129, 108-114.
- Liang, K., Zhang, R., Luo, H. Y., Zhang, J. L., Tian, Z. Y., Zhang, X. F., . . . Kong, Q. K. (2021). Optimized Attenuated *Salmonella Typhimurium* Suppressed Tumor Growth and Improved Survival in Mice. *Frontiers in Microbiology*, 12, Article 774490.
- Liu, T., Feng, C., Li, Z., Gu, Z., Ban, X., Hong, Y., ... & Li, C. (2021). Efficient formation of carvacrol inclusion complexes during  $\beta$ -cyclodextrin glycosyltransferase-catalyzed cyclodextrin synthesis. *Food Control*, 130, 108296.
- Llinares, P., Barberán, J., Montejo, M., Salavert, M., Alvarez-Rocha, L., Maseda, E., Parra10, J. (2013). Guía de tratamiento antimicrobiano de la infección por *Staphylococcus aureus*. *Rev Esp Quimioter*, 26(1), 1-84.

- Maguiña Vargas, C. (2016). Infecciones nosocomiales. *Acta Medica Peruana*, 33(3), 175-177.
- MAOLY, F. C. I. (2022). Obtención de pectina a partir de la cáscara de pepino (*Cucumis sativus*) mediante hidrólisis ácida como aprovechamiento de residuos hortícolas (Doctoral dissertation, Universidad agraria del Ecuador).
- Martínez, J., Sulbarán de Ferrer, B., Ojeda de Rodríguez, G., Ferrer, A., & Nava, R. (2003). Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 20(4), 502-512.
- Masqui, M., Gavilánez, J., Pilco, K., & Jácome, C. (2022). Aceites esenciales con efecto antimicrobiano obtenido de cítricos para la conservación de alimentos. *Journal of Agro-industry Sciences*, 4(1), 37-44.
- Matereke, L. T., & Okoh, A. I. (2020). *Listeria monocytogenes* virulence, antimicrobial resistance and environmental persistence: A review. *Patógenas*, 9(7), 528.
- Mechmechani, S., Gharsallaoui, A., Fadel, A., El Omari, K., Khelissa, S., Hamze, M., & Chihib, N. E. (2022). Microencapsulation of carvacrol as an efficient tool to fight *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis* biofilms. *Plos one*, 17(7), e0270200.
- Mehraj, J., Witte, W., Akmatov, M. K., Layer, F., Werner, G., & Krause, G. (2016). Epidemiology of *Staphylococcus aureus* nasal carriage patterns in the community. How to Overcome the Antibiotic Crisis, 55-87.
- Mendoza, F. J. O., Colín, V. A. M., Dueñas, J. A. C., Novelo, F. M., Jiménez, G. E. E., & Saldaña, N. G. (2011). Meningitis bacteriana por *Listeria monocytogenes*: presentación de un caso y revisión de la literatura. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*, 24(95), 118-120.
- Meyer, S. L., Espinoza, A. R., & Quera, P. R. (2014). Infección por *Clostridium difficile*: epidemiología, diagnóstico y estrategias terapéuticas. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25(3), 473-484.
- Miranda-Estrada, L. I., Ruíz-Rosas, M., Molina-López, J., Parra-Rojas, I., González-Villalobos, E., & Castro-Alarcón, N. (2017). Relationship between virulence factors, resistance to antibiotics and phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* in two locations in Mexico. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica (English ed.)*, 35(7), 426-433.
- Mitra, A., & Dey, B. (2011). Chitosan microspheres in novel drug delivery systems. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 73(4), 355.
- Morejón García, M. (2013). Betalactamasas de espectro extendido. *Revista Cubana de Medicina*, 52(4), 272-280.
- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J. L., & Ochoa, T. J. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, 28, 648-656.
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology spectrum*, 4(2), 4.2. 15.
- Nguyen, T. T. T., Tran, N. T. K., Le, T. Q., Nguyen, T. T. A., Nguyen, L. T. M., & Van Tran, T. (2023). Passion fruit peel pectin/chitosan based antibacterial films incorporated with biosynthesized silver nanoparticles for wound healing application. *Alexandria Engineering Journal*, 69, 419-430.

- Nishino, K., Yamasaki, S., Nakashima, R., Zwama, M., & Hayashi-Nishino, M. (2021). Function and Inhibitory Mechanisms of Multidrug Efflux Pumps. *Frontiers in Microbiology*, 12, Article 737288.
- Orenstein, R., Patron, R. L., & Seville, M. T. (2019). Why Does *Clostridium difficile* Infection Recur? *Journal of the American Osteopathic Association*, 119(5), 322-326.
- Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antimicrobianos WHO: 2020, disponible en <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Pachay Solórzano, J. W. (2018). Las infecciones bacterianas y su resistencia a los antibióticos. Caso de estudio: Hospital Oncológico “Dr. Julio Villacreses Colmont Solca”, Portoviejo. *Revista Universidad y Sociedad*, 10(5), 219-223.
- Parvekar P., Palaskar J., Metgud S., Maria R. y Dutta S. (2020). The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus*. *Biomater Investig Dent*. 23;7(1):105-109.
- Pasin, B. L., Azón, C. G., & Garriga, A. M. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3(1), 130-151.
- Patel, S., & McCormick, B. A. (2014). Mucosal inflammatory response to *Salmonella typhimurium* infection. *Frontiers in Immunology*, 5, Article 311. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00311>
- Pino, J. A., & Aragüez, Y. (2021). Conocimientos actuales acerca de la encapsulación de aceites esenciales. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 52(1), 10-25.
- Puligundla, P., & Lim, S. (2022). Biocontrol Approaches against *Escherichia coli* O157: H7 in Foods. *Foods*, 11(5), 756.
- Qi L., Xu Z., Jiang X., Hu C., Zou X. (2004). Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research*, 339(16), 2693–2700.
- Radoshevich, L., & Cossart, P. (2018). *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 16(1), 32-46.
- Ramírez, L. S., & Castaño, D. M. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 15(42), 263-268.
- Rani, A., Ravindran, V. B., Surapaneni, A., Mantri, N., & Ball, A. S. (2021). Review: Trends in point-of-care diagnosis for *Escherichia coli* O157:H7 in food and water. *International Journal of Food Microbiology*, 349, Article 109233.
- Redding, L. E., Tu, V., Abbas, A., Alvarez, M., Zackular, J. P., Gu, C., ... & Bittinger, K. L. (2022). Genetic and phenotypic characteristics of *Clostridium (Clostridioides) difficile* from canine, bovine, and pediatric populations. *Anaerobe*, 102539.
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiology*, 4(3), 482.
- Ricardo-Caldera, D. M., Buelvas-Doria, F. A., Escobar-Pérez, J. A., & Tovar-Acero, C. (2015). Colonización y factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en una población infantil de Montería. *Iatreia*, 28(3), 259-268.

- Rodríguez-Auad, J. P. (2018). Panorama de la infección por *Listeria monocytogenes*. Revista chilena de infectología, 35(6), 649-657.
- Rojas, G. C. n., & Ulate, L. A. (2017). Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. Revista médica de costa rica y Centroamérica, 73(621), 757-763.
- Santos, E. H., Kamimura, J. A., Hill, L. E., & Gomes, C. L. (2015). Characterization of carvacrol beta-cyclodextrin inclusion complexes as delivery systems for antibacterial and antioxidant applications. *LWT-Food Science and Technology*, 60(1), 583-592.
- Segura, M. A. C., Durán, L. V. B., & Sancho, D. M. R. (2021). Infección por *Clostridium difficile* y el papel del trasplante de microbiota fecal. Revista Médica Sinergia, 6(6), e681-e681.
- Seyfried, M., Soldera-Silva, A., Bovo, F., Stevan-Hancke, F., Maurer, J., & Zawadzki-Baggio, S. (2016). Pectinas de plantas medicinais: características estruturais e atividades imunomoduladoras. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, 18, 201-214.
- Skarżyńska, M, Zając, M. & Wasyl, D. (2020). Antibiotics And Bacteria: Mechanisms of Action and Resistance Strategies. Postępy Mikrobiologii - Advancements of Microbiology 59(1) 49-62.
- Sosnowski, M., Lachtara, B., Wieczorek, K., & Osek, J. (2019). Antimicrobial resistance and genotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from food in Poland. International journal of food microbiology, 289, 1-6.
- Sousa, V. I., Parente, J. F., Marques, J. F., Forte, M. A., & Tavares, C. J. (2022). Microencapsulation of essential oils: A review. *Polymers*, 14(9), 1730.
- Spigaglia, P., Mastrantonio, P., & Barbanti, F. (2018). Antibiotic Resistances of Clostridium difficile. *Updates on Clostridium Difficile in Europe: Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health, Vol 8, 1050*, 137-159.
- Sreekumar, S., Goycoolea, F. M., Moerschbacher, B. M., & Rivera-Rodriguez, G. R. (2018). Parameters influencing the size of chitosan-TPP nano-and microparticles. *Scientific reports*, 8(1), 4695.
- Srivastava, P. y Malviya, R. (2011). Fuentes de pectina, extracción y sus aplicaciones en la industria farmacéutica: una descripción general.
- Stachowiak, N., Kowalonek, J., & Kozłowska, J. (2021). Freeze-dried matrices composed of degradable polymers with surfactant-loaded microparticles based on pectin and sodium alginate. *Materials*, 14(11), 3044.
- Sun, X. X., Cameron, R. G., & Bai, J. H. (2019). Microencapsulation and antimicrobial activity of carvacrol in a pectin-alginate matrix. *Food Hydrocolloids*, 92, 69-73.
- Tafur, J. D., Torres, J. A., & Villegas, M. V. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infection* 12(3), 227-232.
- Timilsena, Y. P., Akanbi, T. O., Khalid, N., Adhikari, B., & Barrow, C. J. (2019). Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation. *International journal of biological macromolecules*, 121, 1276-1286.
- Toapanta, C., & Natali, W. (2017). Identificación del *staphylococcus aureus* y *candida albicans*

en los equipos extraorales y áreas de trabajo en la clínica de imagenología de la Facultad de Odontología de la Universidad Central del Ecuador Quito: UCE].

- Trevisan, D. A. C., Silva, A. F. D., Negri, M., Abreu Filho, B. A. D., Machinski Junior, M., Patussi, E. V., ... & Mikcha, J. M. G. (2018). Antibacterial and antibiofilm activity of carvacrol against *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54.
- Urquiza Ayala, G., & Arteaga Coarite, R. (2018). Uso de inhibidores de la bomba de protones en la práctica clínica: ¿terapia adecuada para todos? *Revista Médica La Paz*, 24(1), 70-77.
- Varela, M. F., Stephen, J., Lekshmi, M., Ojha, M., Wenzel, N., Sanford, L. M., . . . Kumar, S. H. (2021). Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. *Antibiotics-Basel*, 10(5), Article 593.
- Velázquez C., Navarro M., Acosta A., Angulo A., Domínguez Z., Robles R., Robles-Zepeda R., Lugo E., Goycoolea F.M., Velázquez E.F., Aztiazarán H., Hernández J. (2007). Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *J Appl Microbiol*. 103 (5): 1747-56.
- Wang, Q., Gong, J., Huang, X., Yu, H., & Xue, F. (2009). In vitro evaluation of the activity of microencapsulated carvacrol against *Escherichia coli* with K88 pili. *Journal of applied microbiology*, 107(6), 1781-1788.
- Wang, T. H., Hsia, S. M., Wu, C. H., Ko, S. Y., Chen, M. Y., Shih, Y. H., ... & Wu, C. Y. (2016). Evaluation of the antibacterial potential of liquid and vapor phase phenolic essential oil compounds against oral microorganisms. *PLoS One*, 11(9), e0163147.
- Wang, X., Biswas, S., Paudyal, N., Pan, H., Li, X., Fang, W., & Yue, M. (2019). Antibiotic resistance in *Salmonella Typhimurium* isolates recovered from the food chain through national antimicrobial resistance monitoring system between 1996 and 2016. *Frontiers in microbiology*, 10, 985.
- Wong, C. S., Jelacic, S., Habeeb, R. L., Watkins, S. L., & Tarr, P. I. (2000). The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157: H7 infections. *New England Journal of Medicine*, 342(26), 1930-1936.
- Xiao, Z., Liu, W., Zhu, G., Zhou, R., & Niu, Y. (2014). A review of the preparation and application of flavour and essential oils microcapsules based on complex coacervation technology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(8), 1482-1494.
- Zegada Franco, V. Y. (2015). Extracción de pectina de residuos de cáscara de naranja por hidrólisis ácida asistida por microondas (hmo). *riyd Investigación & Desarrollo*, 1 (15), 65-76.
- Zhao, X., Wei, S., Tian, Q., Peng, W., Tao, Y., Bo, R., ... & Li, J. (2022). Eugenol exposure in vitro inhibits the expressions of T3SS and TIF virulence genes in *Salmonella Typhimurium* and reduces its pathogenicity to chickens. *Microbial pathogenesis*, 162, 105314.
- Zheng, H., Wang, J., You, F., Zhou, M., & Shi, S. (2022). Fabrication, characterization, and antimicrobial activity of carvacrol-loaded zein nanoparticles using the pH-driven method. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 9227.