



Ciencia y Tecnología
Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

ACTIVIDAD ANTIINFECCIOSA DE ACEITES
ESENCIALES DE PLANTAS NATIVAS DE LA
PENÍNSULA DE YUCATÁN SOBRE *Acinetobacter*
baumannii RESISTENTE A MÚLTIPLES FÁRMACOS

Tesis que presenta

HAZIEL ELEAZAR DZIB BAAK

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: [Opción Recursos Naturales](#))

Mérida, Yucatán, México

2025

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Haziél Eleazar Dzib Baak titulado **Actividad antiinfecciosa de aceites esenciales de plantas nativas de la Península de Yucatán sobre *Acinetobacter baumannii* resistente a múltiples fármacos**, fue realizado en la Unidad de Recursos Naturales, en la línea de investigación Agrobiodiversidad para la Sustentabilidad Ecológica y Cultural, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Luz María del Carmen Calvo Irabien dentro de la opción de Recursos Naturales, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro y la codirección de la Dra. Gloria María Molina Salinas del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Atentamente



Dr. José Luis Hernández Stefanoni
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 20 de junio de 2025

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Firma: _____

Nombre: Haziél Eleazar Dzib Baak

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de **Recursos Naturales** del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección de **la Dra. Luz María del Carmen Calvo Irabien** y codirectora **Dra. Gloria María Molina Salinas**.

PRODUCTOS ASOCIADOS

ARTÍCULO CIENTÍFICO (Enviado a la revista Chemistry & Biodiversity)

Mechanistic insights into the effect of the essential oil of *Ambrosia hispida* Pursh. against multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*.

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la beca otorgada al CVU 1256431.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán y a la Unidad de Recursos Naturales donde fue posible realizar este trabajo.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social y particularmente a la Unidad de investigación Médica Yucatán (UIMY) por permitirme trabajar en los laboratorios de la Unidad.

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mis asesoras, la Dra. Luz María del Carmen Calvo Irabien y la Dra. Gloria María Molina Salinas por su invaluable guía, paciencia y apoyo incondicional durante todo el desarrollo de este trabajo. Gracias por compartirme no solo su conocimiento, sino también su entusiasmo y compromiso, que fueron una fuente constante de inspiración para mí. Gracias por depositar toda su confianza en mí.

A los miembros de mi Comité Tutorial, Dr. Andrés Humberto Uc Cachón, Dr. Víctor Manuel Aguilar Hernández y Dr. Sergio Rubén Peraza Sánchez por su valiosa disposición, tiempo y apoyo que contribuyeron significativamente a la mejora de este trabajo.

A mis profesores de asignatura, en especial Dr. José Luis Andrade Torres y Dr. José Luis Hernández Stefanoni quienes, con su dedicación, pasión por la enseñanza y compromiso con la formación académica, dejaron una profunda huella en mi manera de entender la ciencia.

A todo el personal y estudiantes de la Unidad de Recursos Naturales del CICY por brindarme siempre el apoyo necesario con una buena disposición.

Un agradecimiento especial a mis compañeros del laboratorio de la UIMY, Ángel, Linette, y Hernando. Compartir ideas, aprendizajes y muchas risas con ustedes fue una de las experiencias más valiosas de este proceso. Gracias por estar ahí, por ayudar sin dudar y por contribuir a que todo el camino del posgrado sea mucho más llevadero.

Finalmente, a toda mi familia, Gabriela, Honorio, Felipe, Xochitl, Jelissa, María José, Marina y Benjamín por todo su apoyo, comprensión y motivación. Sin todos ellos, este trabajo no hubiera sido posible.

DEDICATORIAS

A mis padres, Gabriela y Honorio, mi hermana Xochitl y la pequeña Jelissa, quienes a pesar de la distancia siempre me hacían llegar todo su apoyo y amor. Gracias por su cariño incondicional, por cada palabra de aliento, cada llamada o mensaje que me recordaba de dónde vengo y por qué vale la pena seguir.

A mi compañera de vida, María José Martínez. Gracias por celebrar mis logros como tuyos y por sostenerme en el cansancio. Esta tesis lleva mi nombre, pero tú fuiste parte de cada línea escrita entre desvelos y cafés. Gracias por caminar a mi lado en todo este proceso, incluso cuando el camino no era claro.

Detrás de cada logro hay historias compartidas, manos que sostienen y voces que alientan. Esta tesis es también de ustedes.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	3
1.1. ANTECEDENTES	3
1.1.1. Enfermedades infecciosas y mecanismos de virulencia	3
1.1.2. Resistencia antimicrobiana.....	6
1.1.3. <i>Acinetobacter baumannii</i>	8
1.1.4. Plantas medicinales aromáticas y aceites esenciales.....	11
1.1.5. Química de los terpenos	12
1.1.6. Factores que influyen en la composición química de los aceites esenciales	14
1.1.7. Relación de la composición química de los aceites esenciales y su actividad antibacteriana.....	15
1.1.8. Mecanismos de actividad antiinfecciosa de los aceites esenciales	16
1.1.9. Plantas medicinales aromáticas seleccionadas para el análisis químico y evaluación de sus aceites esenciales.....	17
1.2. JUSTIFICACIÓN.....	27
1.3. OBJETIVO GENERAL	28
1.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
1.5. HIPÓTESIS	28
1.6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	28
CAPÍTULO II.....	30
2.1. MATERIALES Y MÉTODOS	30
2.1.1. Aceites esenciales	30
2.1.2. Caracterización de la composición química de los aceites esenciales	32
2.1.3. Actividad antiinfecciosa de los aceites esenciales	33
2.1.3.1. Actividad de los aceites esenciales sobre el crecimiento de <i>A. baumannii</i>	34
2.1.3.2. Actividad de los aceites esenciales sobre factores de virulencia bacterianos.....	36
2.1.3.3. Actividad de los aceites esenciales sobre los mecanismos de fármacorresistencia de <i>A. baumannii</i>	37
2.1.4. Actividad citotóxica de los aceites esenciales bioactivos	40

2.1.5. Análisis de la relación entre la actividad antiinfecciosa con la composición química de los aceites esenciales	41
CAPÍTULO III	42
3.1. RESULTADOS	42
3.1.1. Caracterización de la composición química de los aceites esenciales	42
3.1.2. Actividad de los aceites esenciales sobre el crecimiento de <i>A. baumannii</i>	57
3.1.3. Actividad antivirulencia de los aceites esenciales sobre <i>A. baumannii</i>	60
3.1.4. Actividad antifármacorresistencia de los aceites esenciales sobre <i>A. baumannii</i>	62
3.1.5. Efecto citotóxico de los aceites esenciales sobre células Vero	67
3.1.6. Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales ortogonales de la actividad antiinfecciosa	68
CAPÍTULO IV	73
4.1. DISCUSIÓN	73
CAPÍTULO V	88
5.1. CONCLUSIONES.....	88
5.2. PERSPECTIVAS.....	89
BIBLIOGRAFÍA	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Factores de virulencia bacterianos.	4
Figura 1.2. Mecanismo de quorum sensing en <i>Chromobacterium violaceum</i>	5
Figura 1.3. Mecanismos de inhibición del quorum sensing	6
Figura 1.4. Mecanismos de fármacorresistencia identificados en <i>Acinetobacter baumannii</i>	9
Figura 1.5. Estructura química del isopreno.....	13
Figura 1.6. Estructura química de compuestos bioactivos comúnmente encontrados en los aceites esenciales.....	15
Figura 1.7. Fotografía de <i>Bursera simaruba</i>	18
Figura 1.8. Fotografía de <i>Croton yucatanensis</i>	19
Figura 1.9. Fotografía de <i>Turnera diffusa</i>	20
Figura 1.10. Fotografía de <i>Lantana canescens</i>	21
Figura 1.11. Fotografía de <i>Ocimum campechianum</i>	22
Figura 1.12. Fotografía de <i>Piper auritum</i>	23
Figura 1.13. Fotografía de <i>Piper amalago</i>	23
Figura 1.14. Fotografía de <i>Hyptis suaveolens</i>	24
Figura 1.15. Fotografía de <i>Ambrosia hispida</i>	25
Figura 1.16. Fotografía de <i>Lippia origanoides</i>	26
Figura 1.17. Estrategia experimental	29
Figura 3.1. Gráfica de pastel de la proporción de clases de terpenos identificados en los aceites esenciales.....	53
Figura 3.2. Gráfico de UpSet de los metabolitos presentes en los diez aceites esenciales	54
Figura 3.3. Score plot y gráfico de cargas del análisis de componentes principales	56
Figura 3.4. Efecto de la ½ concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales y compuestos sobre <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC-1605 después del tratamiento con peróxido de hidrógeno	61
Figura 3.5. Efecto en la inhibición de formación de biopelículas del aceite esencial de <i>Ambrosia hispida</i> y el EDTA sobre <i>Acinetobacter baumannii</i> UIMY-81 visualizado por microscopio electrónico de barrido.....	63
Figura 3.6. Efecto en la inhibición de formación de biopelículas del aceite esencial de <i>Ambrosia hispida</i> y el EDTA sobre <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC-1605 visualizado por microscopio electrónico de barrido.....	64

Figura 3.7. Efecto del aceite esencial de <i>Ambrosia hispida</i> en la morfología de las células bacterianas de <i>Acinetobacter baumannii</i>	64
Figura 3.8. Efecto degradativo del aceite esencial de <i>Ambrosia hispida</i> sobre las biopelículas de <i>Acinetobacter baumannii</i>	65
Figura 3.9. Score plot y S-plot para el modelo OPLS-DA de la actividad sobre el crecimiento de <i>Acinetobacter baumannii</i>	68
Figura 3.10. Score plot y S-plot para el modelo OPLS-DA de la actividad anti-quorum sensing sobre <i>Chromobacterium violaceum</i>	69
Figura 3.11. Score plot y S-plot para el modelo OPLS-DA de la actividad anti-biopelículas y anti-catalasa sobre <i>Acinetobacter baumannii</i>	70
Figura 3.12. Score plot y S-plot para el modelo OPLS-DA para la actividad en la modulación de la resistencia vía bombas de eflujo sobre <i>Acinetobacter baumannii</i>	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos según la Organización Mundial de la Salud.	8
Tabla 1.2. Clasificación de los terpenos	13
Tabla 2.1. Especies vegetales seleccionadas para el estudio de sus aceites esenciales.	31
Tabla 2.2. Cepa de referencia y aislados clínicos seleccionados con sus perfiles de resistencia.	34
Tabla 3.1. Composición química del aceite esencial de <i>Lippia organoides</i>	42
Tabla 3.2. Composición química del aceite esencial de <i>Bursera simaruba</i>	43
Tabla 3.3. Composición química del aceite esencial de <i>Piper auritum</i>	43
Tabla 3.4. Composición química del aceite esencial de <i>Piper amalago</i>	44
Tabla 3.5. Composición química del aceite esencial de <i>Ambrosia hispida</i>	45
Tabla 3.6. Composición química del aceite esencial de <i>Hyptis suaveolens</i>	46
Tabla 3.7. Composición química del aceite esencial de <i>Croton yucatanensis</i>	47
Tabla 3.8. Composición química del aceite esencial de <i>Turnera difussa</i>	48
Tabla 3.9. Composición química del aceite esencial de <i>Lantana canescens</i>	49
Tabla 3.10. Composición química del aceite esencial de <i>Ocimum campechianum</i>	50
Tabla 3.11. Composición química de los diez aceites esenciales analizados.	51
Tabla 3.12. Concentraciones mínima inhibitoria resultante del tamizaje de la actividad anti- <i>Acinetobacter baumannii</i> de los diez aceites esenciales.	57
Tabla 3.13. Concentraciones mínima inhibitoria y mínima bactericida de los aceites esenciales activos sobre <i>Acinetobacter baumannii</i>	58
Tabla 3.14. Concentraciones mínima inhibitoria y mínima bactericida de <i>Lippia organoides</i> y compuestos puros sobre <i>Acinetobacter baumannii</i>	58
Tabla 3.15. Actividad inhibitoria de la producción de violaceína en <i>Chromobacterium violaceum</i> de los aceites esenciales y timol.	60
Tabla 3.16. Efecto del aceite esencial de <i>Ambrosia hispida</i> en la inhibición de formación de biopelícula por cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i>	62
Tabla 3.17. Concentración mínima inhibitoria de imipenem y amikacina en combinación con ½ concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales sobre dos aislados clínicos de <i>Acinetobacter baumannii</i>	66
Tabla 3.18. Citotoxicidad e índice de selectividad de los aceites esenciales bioactivos sobre células Vero.	67
Tabla 3.19. Biomarcadores identificados por OPLS-DA en los AEs antiinfecciosos.	72

LISTADO DE ABREVIATURAS

RAM: Resistencia antimicrobiana

OMS: Organización Mundial de la Salud

PMA: Plantas medicinales aromáticas

AE: Aceite esencial

QS: Quorum sensing

AHLs: N- acil-homoserina lactonas

MDR: Multidrogorresistentes

XDR: Resistencia extendida

PDR: Pandrogorresistentes

TA: Temperatura ambiente

SDS: Dodecilsulfato de sodio

PY: Península de Yucatán

PCA: Análisis de componentes principales

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CMB: concentración mínima bactericida

MH: Mueller hinton

CTS: caldo tripticasa soya

IS: Índice de selectividad

OPLS-DA: análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales ortogonales

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

MEB: Microscopio electrónico de barrido

IMP: Imipenem

AMK: Amikacina

TET: Tetraciclina

FMA: Factor de modulación de antibiótico

CG-EM: Cromatografía de gases-espectrometría de masas

RESUMEN

En los últimos años, la creciente aparición de bacterias resistentes a los antimicrobianos ha comprometido significativamente la salud pública a nivel global. Ante esta amenaza, la Organización Mundial de la Salud ha identificado un grupo de bacterias prioritarias para la investigación y el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, destacando *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos como prioridad de atención crítica. En este contexto, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana, antifármacorresistencia y antivirulencia de diez aceites esenciales de plantas nativas sobre cepas de referencia y aislados clínicos *A. baumannii*, así como explorar la relación entre la composición química del aceite esencial y su actividad antiinfecciosa. Los aceites esenciales de *Lippia origanoides*, *Bursera simaruba* y *Piper auritum* presentaron un compuesto mayoritario distintivo (mayor al 40% de porcentaje de área del cromatograma), siendo éstos el timol, α -pineno y safrol, respectivamente. En contraste, los demás aceites esenciales mostraron una composición rica en sesquiterpenos. En cuanto a la actividad antimicrobiana, los aceites esenciales de *L. origanoides* (Concentración mínima inhibitoria = 125-250 $\mu\text{g/mL}$), *P. auritum* (concentración mínima inhibitoria = 1000 $\mu\text{g/mL}$), *P. amalago* (concentración mínima inhibitoria = 1000 $\mu\text{g/mL}$) y *Ambrosia hispida* (concentración mínima inhibitoria = 1000 $\mu\text{g/mL}$) fueron los únicos que inhibieron el crecimiento de *A. baumannii*. Además, los aceites esenciales de *L. origanoides* (concentración inhibitoria del 50% = 43.9 $\mu\text{g/mL}$) y *A. hispida* (concentración inhibitoria del 50% = 126.4 $\mu\text{g/mL}$) exhibieron una potente actividad en la inhibición de la producción de violaceína en *Chromobacterium violaceum*. En particular, *A. hispida* demostró una notable actividad anti-catalasa (concentración inhibitoria 50% = 292.5 $\mu\text{g/mL}$) y anti-biopelículas (concentración inhibitoria 50% = 166.3-188.2 $\mu\text{g/mL}$). Mediante microscopia electrónica de barrido se encontraron cambios en la estructura y densidad de las biopelículas de *A. baumannii* tratadas con aceite esencial de *A. hispida*. Por otro lado, las concentraciones citotóxicas de los aceites esenciales de *L. origanoides* y *A. hispida* fueron más altas que las concentraciones efectivas sobre *A. baumannii*. Adicionalmente, se llevaron a cabo análisis quimiométricos para identificar los posibles metabolitos responsables de la actividad antiinfecciosa de los aceites esenciales. Algunos de ellos fueron: timol, *p*-cimeno, safrol, α -pineno, espatulenol. En este trabajo se describe por primera vez la actividad antiinfecciosa del aceite esencial de varias especies nativas de la península de Yucatán. Los hallazgos de esta investigación sugieren que los aceites esenciales pueden constituir una estrategia prometedora para enfrentar la resistencia antimicrobiana.

ABSTRACT

In recent years, the increasing emergence of antimicrobial-resistant bacteria has significantly compromised the global public health. In response to this threat, the World Health Organization has identified a group of priority bacteria for research and development of novel therapeutic strategies, highlighting carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* as a critical priority. A promising approach for discovering new therapeutic alternatives involves investigating the essential oils of aromatic medicinal plants native to the Yucatán peninsula. In this context, the present study aimed to evaluate the antimicrobial, antibiotic resistance-modulating, and antivirulence activities of ten essential oils from native plants against reference strains and clinical isolates of *A. baumannii*, and to explore the relationship between their chemical composition and anti-infective activity. The chemical composition of the essential oils was characterized using gas chromatography-mass spectrometry. The essential oils of *Lippia origanoides* (thymol), *Bursera simaruba* (α -pinene), and *Piper auritum* (safrole) exhibited a distinctive major compound, whereas the remaining essential oils were rich in sesquiterpenes in low proportions. Regarding antimicrobial activity, the EOs of *L. origanoides* (MIC=125-250 $\mu\text{g/mL}$), *P. auritum* (MIC=1000 $\mu\text{g/mL}$), *P. amalago* (MIC=1000 $\mu\text{g/mL}$), and *Ambrosia hispida* (MIC=1000 $\mu\text{g/mL}$) were the only ones that inhibited *A. baumannii* growth. Furthermore, the essential oils of *L. origanoides* (IC₅₀=43.9 $\mu\text{g/mL}$) and *A. hispida* (IC₅₀=126.4 $\mu\text{g/mL}$) exhibited potent anti-quorum sensing (QS) activity. Notably, *A. hispida* demonstrated remarkable anti-catalase (IC₅₀=292.5 $\mu\text{g/mL}$) and antibiofilm (IC₅₀=166.3-188.2 $\mu\text{g/mL}$) activities. The antibiofilm activity of *A. hispida* essential oil was confirmed by scanning electron microscopy. Concerning resistance modulation, the essential oils of *L. origanoides* and *P. auritum* significantly reduced the minimum Inhibitory concentration of amikacin and imipenem. Additionally, cytotoxicity assays indicated that the concentrations of *L. origanoides* (CC₅₀=139.5 $\mu\text{g/mL}$) and *A. hispida* (CC₅₀=259.8 $\mu\text{g/mL}$) essential oils responsible for antivirulence and antibiotic resistance-modulating activities were below the toxic threshold for Vero cells. Chemometric analyses were performed to identify metabolites responsible for the anti-infective activity of bioactive essential oils. The findings of this study suggest that essential oils may serve as a promising strategy for combating antimicrobial resistance.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas representan un desafío significativo para la salud pública debido a que no se ha logrado un control efectivo de estas enfermedades que siguen afectando a millones de personas en todo el mundo. Dentro de las enfermedades infecciosas, las bacterias son los agentes etiológicos más frecuentes (Palomo *et al.*, 2010). El tratamiento de estas infecciones involucra el uso de agentes antimicrobianos que inhiben el crecimiento de las bacterias causantes. Sin embargo, en los últimos años la resistencia a los antimicrobianos (RAM) está comprometiendo dramáticamente el éxito de estos tratamientos, así como la salud humana global (Magiorakos *et al.*, 2012).

La RAM es la capacidad que adquieren las bacterias para evadir la acción de los fármacos antimicrobianos, ésta es un problema mundial creciente y se ha convertido en un obstáculo importante en el tratamiento de las infecciones. La RAM conlleva al incremento de los costos médicos, estancias hospitalarias más largas y un aumento en la mortalidad (Dadgostar, 2019). Se estima que las muertes asociadas a patógenos resistentes ascenderán a 10 millones para el año 2050. En respuesta a esta creciente amenaza, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha identificado bacterias de atención prioritaria para la investigación y desarrollo de nuevos tratamientos eficaces, basándose en criterios como la mortalidad, la carga comunitaria, la prevalencia de resistencia y la transmisibilidad. En esta lista destaca *Acinetobacter baumannii* (OMS, 2024).

Se ha documentado la capacidad de *A. baumannii* de adquirir diferentes mecanismos de resistencia como la formación de biopelículas y la expresión de bombas de eflujo. Además, destaca por las escasas opciones terapéuticas disponibles para su tratamiento, así como por los elevados índices de mortalidad de las infecciones ocasionadas por esta bacteria (Sarshar *et al.*, 2021). En México, se ha documentado la elevada prevalencia de *A. baumannii* resistente a múltiples fármacos en diferentes estados del país incluida nuestra región (Uc-Cachón *et al.*, 2023, Garza-González *et al.*, 2019; Uc-Cachón *et al.*, 2019).

Ante el escaso desarrollo de nuevos antimicrobianos, es crucial buscar alternativas terapéuticas que además de inhibir el crecimiento de cepas resistentes, también actúen sobre los mecanismos de resistencia y factores de virulencia bacteriana, reduciendo así su patogenicidad (Ugboko *et al.*, 2020).

Una alternativa para abordar esta problemática es la búsqueda de estos agentes antimicrobianos a partir de extractos vegetales. Las plantas medicinales aromáticas (PMA) han sido reconocidas

como una valiosa fuente de compuestos bioactivos con propiedades terapéuticas. Los aceites esenciales (AEs) que se extraen a partir de las PMA han demostrado tener actividad antimicrobiana. Además, una de las ventajas del uso de los AEs reside en su capacidad para obstaculizar el desarrollo de RAM, debido a su compleja composición química. Por ello, se presentan como una alternativa para la búsqueda de nuevas opciones de tratamiento contra infecciones causadas por *A. baumannii* resistente a múltiples fármacos (Valdivieso *et al.*, 2019; Yap *et al.*, 2014).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antibacteriana, antifármacorresistencia y antivirulencia de AEs de plantas nativas de la península de Yucatán sobre cepas de *A. baumannii* resistentes a múltiples fármacos y dilucidar la relación entre esta actividad y la composición química de los AEs.

CAPÍTULO I

1.1. ANTECEDENTES

1.1.1. Enfermedades infecciosas y mecanismos de virulencia

Las enfermedades infecciosas son trastornos causados por la presencia y multiplicación de organismos patógenos, como bacterias, virus, hongos, protozoos o parásitos, en un hospedero (Palomo *et al.*, 2010). Un proceso infeccioso representa la interacción de un microorganismo con un macroorganismo (e.g. el humano) bajo ciertas condiciones ambientales. Esta interacción puede ser variable dependiendo de factores como las características del microorganismo, la cantidad del inóculo y factores dependientes del huésped como la respuesta inmunitaria. A pesar de los notables avances en el desarrollo de antimicrobianos y la aplicación de la inmunoterapia, en las últimas décadas, no se ha logrado un control efectivo de estas enfermedades, que continúan afectando a una cifra considerable de individuos, sobre todo en países en vías de desarrollo (Lee *et al.*, 2020; Gayer *et al.*, 2007). Además, las enfermedades infecciosas son consideradas un importante problema de salud pública (Palomo *et al.*, 2010).

Dentro de las enfermedades infecciosas, las bacterias son los agentes etiológicos más frecuentes. Las bacterias poseen mecanismos de patogenicidad específicos que desarrollan para superar las defensas de un hospedero y causar infección (Doron y Gorbach, 2008). Estas características les permiten invadir el ambiente del hospedero, expresar receptores superficiales especializados para su adhesión, permanecer en estos sitios a través de procesos de colonización, evadir al sistema inmune y finalmente causar daño tisular con el fin de lograr acceso a fuentes de nutrientes necesarios para su crecimiento y reproducción. Estos mecanismos también se conocen como factores de virulencia (Pontes *et al.*, 2020), que la bacteria expresa de forma específica en condiciones de infección, no son esenciales para su viabilidad, pero son necesarios para la patogénesis. Los factores de virulencia son parte integral de la enfermedad y en su ausencia, generalmente las bacterias no pueden causar la infección (Díaz-Núñez *et al.*, 2021).

La virulencia se describe como la capacidad de un organismo para infectar al huésped y causar una enfermedad. Los factores de virulencia son las moléculas que ayudan a la bacteria a colonizar al huésped a nivel celular. Estos factores son de naturaleza secretora, asociada a membrana o citosólica. Los factores citosólicos facilitan que la bacteria experimente rápidos cambios adaptativos: metabólicos, fisiológicos y morfológicos. Los factores de virulencia asociados a la membrana ayudan a la bacteria a adherirse y evadir la célula huésped. Los factores secretores

son componentes importantes del arsenal bacteriano que ayudan a la bacteria a atravesar la respuesta inmune innata y adaptativa montada dentro del huésped (Sharma *et al.*, 2017). Estos mecanismos son, por ejemplo, la producción de adhesinas, que se adhieren a las células del hospedero y facilitan la colonización; toxinas, que provocan la muerte celular o alteran las vías de señalización en las células de mamíferos; sistemas de secreción especializados para liberar moléculas efectoras; enzimas de virulencia que participan en la degradación de componentes importantes de las células inmunitarias del huésped, como las catalasas, que degradan las especies reactivas de oxígeno producidas por los neutrófilos (Głowacka *et al.*, 2018) (Figura 1.1).

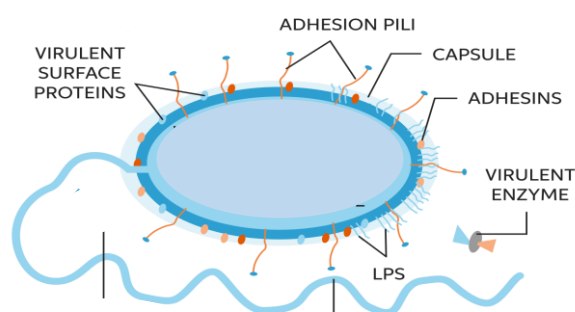


Figura 1.1. Factores de virulencia bacterianos (tomado de Leitão, 2020).

Se ha documentado que varios de estos mecanismos de virulencia son regulados por un sistema de señalización denominado quorum sensing (QS) (Jiang *et al.*, 2019). Las bacterias sintetizan compuestos químicos que facilitan la comunicación entre ellas y, además, poseen la capacidad de percibir las condiciones del entorno y compartir información mediante moléculas señalizadoras. Las bacterias son capaces de detectar la concentración de dichos compuestos para activar la expresión de genes específicos y desencadenar una respuesta coordinada. Las moléculas señal más frecuentemente encontradas son las N- acil-homoserina lactonas (AHLs), que consisten en un anillo de homoserina lactona unido a un ácido graso a través de un enlace amida, formando una cadena lateral de longitud variable. El sistema predominante de AHLs en bacterias Gram negativas es mediado por las proteínas LuxI y LuxR. Las moléculas señal AHLs, producidas por la enzima sintasa LuxI, se difunden al interior de la célula y se acumulan hasta alcanzar una concentración suficiente. En este punto, las AHLs se unen a la proteína reguladora LuxR, lo que desencadena la activación o represión de los genes específicos relacionados con el QS (Mukherjee y Bassler, 2019) (Figura 1.2).

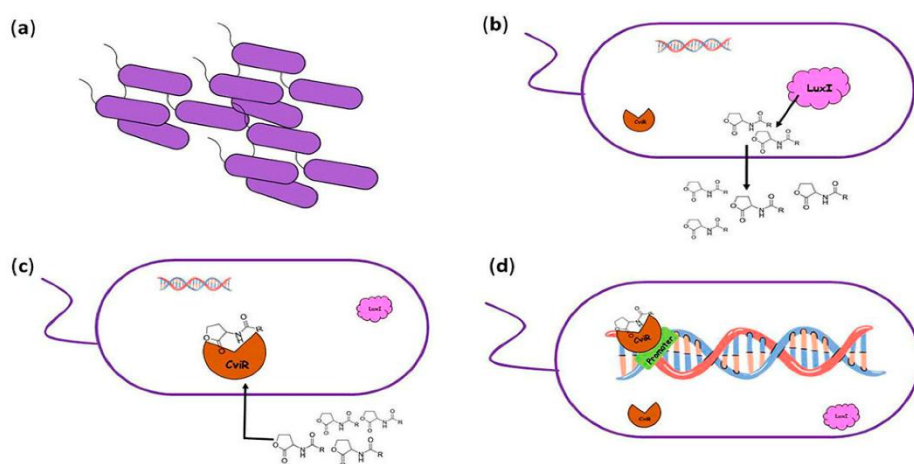


Figura 1.2. Mecanismo de quorum sensing en *Chromobacterium violaceum* (tomado de Dimitrova *et al.*, 2023).

La interrupción de las vías del QS en la bacteria es una estrategia atractiva de amplio espectro para reducir la patogénesis bacteriana y promover la susceptibilidad a las defensas inmunitarias del huésped, esto sin provocar ninguna presión evolutiva que genere la aparición de mecanismos de resistencia a los antimicrobianos (Sionov, y Steinber, 2022). Actualmente, se sabe que el sistema QS es un objetivo prometedor para inhibir y controlar la patogénesis bacteriana. La evolución de diferentes moléculas naturales o sintéticas utilizadas como antagonistas del sistema QS puede ser la próxima generación de sustancias terapéuticas utilizadas para luchar contra la resistencia a los antibióticos (Dimitrova *et al.*, 2023). Los compuestos que suprimen la cascada bacteriana de QS por cualquier mecanismo se denominan inhibidores de detección de quórum. Estos compuestos actúan interrumpiendo las vías de señalización, controlando los factores de virulencia y la supervivencia microbiana. Los inhibidores de quorum son moléculas con el potencial de inhibir procesos regulados por QS, como la bioluminiscencia, la fluorescencia, la formación y dispersión de biopelículas, la producción de pigmentos y la actividad enzimática, deteniendo así la comunicación bacteriana que, a su vez, conduce al control de la patogenicidad. En los últimos años, uno de los microorganismos más populares utilizados en las investigaciones de la inhibición del sistema de QS ha sido la bacteria *Chromobacterium violaceum* cuyo mecanismo QS es análogo al presentado por las bacterias Gram negativas. Su capacidad indicadora, relacionada con la biosíntesis de violaceína, una característica regulada por el sistema de QS, la convierte en un microorganismo adecuado para identificar vías de señalización entre células. Esta característica puede resultar útil para la realización de diversos ensayos

cualitativos y cuantitativos para describir y caracterizar la comunicación y regulación bacteriana (Mion *et al.*, 2021). Los metabolitos y compuestos pueden afectar el sistema QS de tres maneras: (1) inhibiendo la función LuxI sintasa, (2) degradando las moléculas de señalización y, por último, (3) interrumpiendo el proceso de señalización dirigiéndose al receptor Cvir análogo de LuxR (Figura 1.3.).

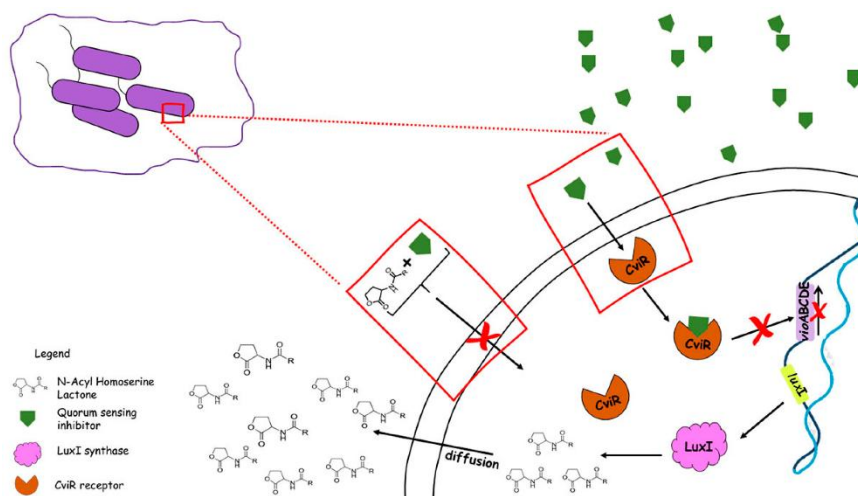


Figura 1.3. Mecanismos de inhibición del quorum sensing (tomado de Dimitrova *et al.*, 2023).

1.1.2. Resistencia antimicrobiana

El tratamiento de las infecciones generalmente implica el uso de agentes antimicrobianos, fármacos especializados en la inhibición del crecimiento bacteriano o la muerte celular. Los antimicrobianos actúan de diferentes formas. Algunos interfieren con la capacidad de las bacterias para sintetizar su pared celular, lo que debilita su estructura y las hace más susceptibles a la lisis celular. Otros tipos de antimicrobianos pueden interferir con procesos metabólicos esenciales, inhibiendo su capacidad de reproducción y supervivencia. Además, pueden atacar específicamente componentes claves para su mantenimiento, como sus proteínas o ácidos nucleicos (Chokshi *et al.*, 2019). Aunque los agentes antimicrobianos han demostrado ser efectivos contra las infecciones, las opciones terapéuticas disminuyen con la aparición de la RAM.

La RAM, que ocurre cuando cambios genéticos y estructurales en las bacterias ocasionan que los fármacos utilizados para tratar infecciones se vuelvan menos efectivos, se ha convertido en una de las principales amenazas para la salud pública mundial (Magiorakos *et al.*, 2012). Esto debido a la escasez o ausencia de agentes antimicrobianos eficaces disponibles para tratar las

infecciones causadas por bacterias resistentes, lo que se traduce en un aumento de las estancias hospitalarias, los costos médicos y la mortalidad (Dadgostar, 2019). El panorama se agrava con la aparición de cepas multidrogorresistentes (MDR, por sus siglas en inglés), que presentan resistencia a tres o más grupos químicos de fármacos antimicrobianos; de drogorresistencia extendida (XDR, por sus siglas en inglés) que presentan resistencia a todos los grupos químicos de antimicrobianos a excepción de uno o dos; pandrogorresistentes (PDR, por sus siglas en inglés) que presentan resistencia a todos los grupos de antimicrobianos conocidos (Magiorakos *et al.*, 2012). Las bacterias resistentes pueden afectar tanto entornos comunitarios como hospitalarios y pueden estar involucradas en cualquier tipo de infección, incluyendo infecciones respiratorias, del tracto urinario, del torrente sanguíneo (sepsis), posquirúrgicas (heridas) y neumonías, por mencionar algunas (Gnimatin, 2022).

Una revisión sobre la RAM, encargada por el gobierno del Reino Unido, argumentó que las infecciones causadas por bacterias resistentes podrían matar a 10 millones de personas por año para 2050, superando a otras enfermedades como la diabetes o el cáncer (O'Neill, 2016). Datos recientes reflejan un panorama de 1.27 millones de muertes anuales que se atribuyen directamente a infecciones causadas por bacterias resistentes (Murray *et al.*, 2022). Según la OMS, la RAM es una de las mayores amenazas para la salud global, la seguridad alimentaria y el desarrollo sostenible. En consecuencia, en 2024 la OMS publicó un listado de las bacterias de atención prioritaria para la investigación y desarrollo de tratamientos nuevos y eficaces. La selección de dichas bacterias se basó en los siguientes criterios: mortalidad por todas las causas, asistencia sanitaria y carga comunitaria, prevalencia de resistencia, tendencia de resistencia en 10 años, transmisibilidad, capacidad de prevención en entornos hospitalarios y comunitarios (OMS, 2024). En el nivel de prioridad crítica se distingue *A. baumannii* (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos según la Organización Mundial de la Salud (2024).

Prioridad	Especie y resistencia
Crítica	<i>Acinetobacter baumannii</i>, resistente a los carbapenémicos Enterobacteriaceae resistentes a cefalosporinas de 3ª generación y carbapenémicos <i>Mycobacterium tuberculosis</i> resistente a rifampicina
Alta	<i>Salmonella Typhi</i>., resistentes a las fluoroquinolonas <i>Shigella</i> spp., resistente a las fluoroquinolonas <i>Enterococcus faecium</i>, resistente a la vancomicina <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a carbapenémicos <i>Salmonella</i> no tifoidea resistentes a las fluoroquinolonas <i>Neisseria gonorrhoeae</i>, resistente a la cefalosporina y fluoroquinolonas <i>Staphylococcus aureus</i>, resistente a la meticilina
Media	Estreptococos del Grupo A resistente a macrólidos <i>Streptococcus pneumoniae</i>, resistente a macrólidos <i>Haemophilus influenzae</i>, resistente a la ampicilina Estreptococos del Grupo B resistentes a penicilinas

1.1.3. *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii es un cocobacilo, Gram negativo, patógeno oportunista y aerobio estricto. La mayoría de las especies del género *Acinetobacter* son microorganismos que se encuentran en el ambiente natural e incluso forman parte del microbioma de la piel. Sin embargo, *A. baumannii* es particularmente prevalente en entornos hospitalarios. *A. baumannii* puede causar una variedad de infecciones en humanos, especialmente en pacientes hospitalizados con sistemas inmunológicos comprometidos. Con menos frecuencia, *A. baumannii* también puede causar infecciones adquiridas en la comunidad, como neumonía o infecciones cutáneas. (Whiteway *et al.*, 2022; Antunes *et al.*, 2014).

Mientras que en la década de 1970 se pensaba que *A. baumannii* era sensible a la mayoría de los antimicrobianos, hoy en día exhibe resistencia a un gran número de grupos farmacológicos como los aminoglucósidos, fluoroquinolonas y carbapenémicos (Sarshar *et al.*, 2021). La aparición de cepas resistentes a los agentes antimicrobianos ampliamente prescritos conduce a una alta tasa de fracaso terapéutico y a una mayor tasa de mortalidad de infecciones causadas

por *A. baumannii*. El mal pronóstico de las infecciones coloca a esta bacteria entre la lista de patógenos de "principal amenaza crítica" aunado a que se han aislado cepas PDR en varios países (Karakonstantis *et al.*, 2020; Göttig *et al.*, 2014). Se ha reportado que la mortalidad puede ser hasta del 80% cuando existe infección por *A. baumannii* resistente a carbapenémicos en pacientes hospitalizados (OMS, 2024; Vanegas-Múnera *et al.*, 2014). En 2022, se estimó que las muertes atribuibles a infecciones causadas por *A. baumannii* resistente alcanzaron cifras de 287,397 casos a nivel global con una tendencia al aumento (Whiteway *et al.*, 2022).

En México, se ha documentado la elevada prevalencia de *A. baumannii* resistente a múltiples fármacos en varios estudios (Morfin-Otero *et al.*, 2018; Alcantar-Curiel *et al.*, 2014; Morfin-Otero *et al.*, 2012). También destaca el reporte de brotes de infecciones causadas por *A. baumannii* en unidades hospitalarias asociados con altos índices de mortalidad (Portillo-Gallo *et al.*, 2022; Cardiel *et al.*, 2021). Recientemente, un estudio multicéntrico realizó un análisis de casi 23,000 cepas bacterianas en 45 centros clínicos de 20 entidades del país, en el que se reportó que un 53% del total de cepas analizadas de *A. baumannii* fueron resistentes a múltiples fármacos (Garza-González *et al.*, 2019). En Yucatán, se ha documentado en dos estudios una elevada prevalencia (mayor al 80%) de *A. baumannii* MDR aislado de pacientes en unidades de cuidados intensivos en un hospital de tercer nivel (Uc-Cachón *et al.*, 2023; Uc-Cachón *et al.*, 2019).

Las cepas de *A. baumannii* pueden desarrollar resistencia a los antimicrobianos por diferentes mecanismos (Figura 1.4.), entre ellos:

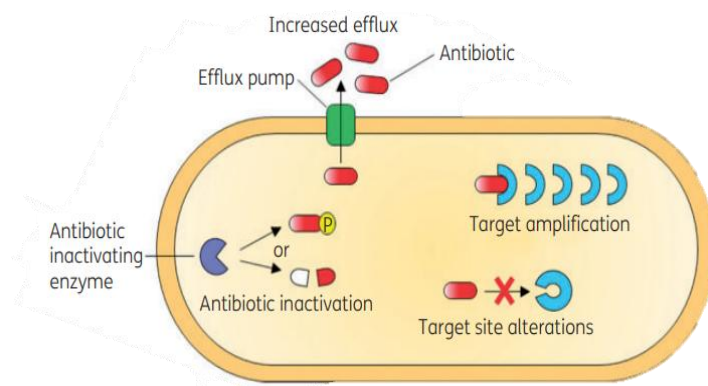


Figura 1.4. Mecanismos de fármacorresistencia identificados en *Acinetobacter baumannii* (tomado de Namyslowska *et al.*, 2015).

- a) Formación de biopelículas: estructuras complejas formadas por comunidades de bacterias adheridas a una superficie y envueltas en una matriz polimérica. Estas comunidades bacterianas pueden formar biopelículas en una amplia variedad de superficies, como

dispositivos médicos o tejidos biológicos. Las biopelículas bacterianas son altamente organizadas y tienen una estructura tridimensional. La matriz polimérica que las envuelve está compuesta principalmente por polisacáridos, aunque también puede contener proteínas, ADN y lípidos. La matriz de las biopelículas confiere un escudo mecánico y bioquímico que crea un entorno propicio para reducir la eficacia de los antimicrobianos. Este entorno se caracteriza por la presencia de bajas concentraciones de oxígeno, un pH bajo, niveles elevados de dióxido de carbono y una disponibilidad reducida de agua (Singh *et al.*, 2017). La capacidad de las cepas de *A. baumannii* para formar biopelículas facilita su colonización en superficies, incluidos instrumentos médicos como catéteres permanentes y tubos endotraqueales (Badave y Kulkarni, 2015).

- b) Bombas de eflujo: proteínas de membrana que tienen la capacidad de expulsar los antibióticos al espacio extracelular. Este mecanismo ocurre de forma activa, gracias a la energía de protones, derivada del potencial electroquímico a uno y otro lado de la membrana citoplasmática, o por un sistema relacionado con el ATP (Abdi *et al.*, 2015). Las bombas de eflujo también podrían participar en una etapa temprana de la infección, como la adhesión a las células huésped y la posterior colonización en el huésped. Las bombas eliminan de la célula moléculas farmacológicas generalmente utilizadas en la terapia. Los genes y las proteínas de la bomba de eflujo existen en todos los microorganismos y varios estudios han demostrado que las bombas de expulsión en bacterias pueden reducir la susceptibilidad a los antibióticos. Las bombas de eflujo pueden ser específicas para un sustrato o pueden transportar una variedad de compuestos estructuralmente diferentes, así como también antibióticos de diferentes clases químicas. Específicamente, la capacidad de *A. baumannii* para resistir múltiples fármacos se ha relacionado con el aumento en la actividad de las bombas de eflujo, lo que limita la eficacia de los tratamientos. Por lo tanto, para abordar este desafío, los investigadores están enfocando sus estudios en la búsqueda de sustancias, ya sean naturales o sintéticas, que puedan inhibir o modular estas bombas de eflujo (Ardehali *et al.*, 2019).
- c) Inactivación enzimática de los fármacos: La mayoría de los antimicrobianos actúan uniéndose específicamente a sitios diana dentro de la célula bacteriana. Sin embargo, algunas bacterias han desarrollado múltiples enzimas que inactivan antimicrobianos clínicamente relevantes como los betalactámicos, los carbapenémicos y los aminoglucósidos. La producción de enzimas conocidas como β -lactamasas es uno de los principales mecanismos de resistencia bacteriana; éstas hidrolizan el anillo β -lactámico de los fármacos antimicrobianos (penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y

carbapenémicos) inactivándolos (Rasko y Esperandio, 2010). Otras enzimas relevantes son las carbapenemasas, que inactivan exclusivamente los fármacos carbapenémicos (imipenem, meropenem, ertapenem y doripenem) (Saranathan *et al.*, 2015).

- d) Modificación de sitios diana: Algunas bacterias tienen la capacidad de modificar de manera específica la estructura molecular de los sitios diana de los fármacos antimicrobianos. Las modificaciones de estos sitios generalmente son resultado de procesos mutacionales en el genoma bacteriano. Estas mutaciones se producen de manera espontánea en los genes que codifican los sitios de destino y, con frecuencia, surgen como respuesta a la presión selectiva ejercida por la presencia de agentes antimicrobianos. Entre las alteraciones más comunes se encuentran las mutaciones en los genes que codifican la ARN polimerasa y la ADN girasa, las cuales confieren a la bacteria resistencia a las fluoroquinolonas (Martínez-Trejo *et al.*, 2022).

La alta incidencia de infecciones causadas por *A. baumannii* resistente a múltiples fármacos y el escaso desarrollo de nuevos antibióticos ha puesto en evidencia la necesidad de buscar nuevos agentes farmacológicos que además de inhibir el crecimiento de cepas resistentes, tengan un efecto sobre los mecanismos de virulencia y resistencia bacteriana disminuyendo su patogenicidad. Las PMA han sido reconocidas como una valiosa fuente de compuestos bioactivos con propiedades terapéuticas (Ugboko *et al.*, 2020).

1.1.4. Plantas medicinales aromáticas y aceites esenciales

En México, se han reportado entre 3,000 a 5,000 especies de plantas medicinales, tanto nativas como introducidas, utilizadas por los pueblos originarios. Este conocimiento ancestral, además de su valor cultural, representa la base de la medicina tradicional mexicana (MTM) (González-Stuart, 2009). La importancia de las plantas medicinales radica en su contribución como proveedora de atención primaria de salud a nivel comunitario (OMS, 2022). Un grupo importante de plantas utilizadas en la MTM se encuentra representado por plantas aromáticas, especies que producen compuestos volátiles, que, al ser liberados, les confieren un aroma característico (Calvo-Irabien *et al.*, 2022). Las PMA abarcan una gran variedad de especies principalmente de las familias Asteraceae, Verbenaceae, Lamiaceae y Solanaceae. Éstas tienen un papel fundamental como una fuente primordial en la búsqueda de compuestos con actividad antibacteriana (Ghavam *et al.*, 2022; Khoury *et al.*, 2016; Christaki *et al.*, 2012). Se ha logrado demostrar que una amplia variedad de extractos y compuestos derivados de PMA exhiben una actividad efectiva frente a bacterias resistentes causantes de enfermedades infecciosas (Grigore-Gurgu *et al.*, 2022; Christaki *et al.*, 2012). Esta evidencia confirma el potencial terapéutico de los

compuestos obtenidos de estas especies en el tratamiento de infecciones y resalta la importancia de explorar más a fondo su actividad farmacológica (Munda *et al.*, 2019).

Los AEs constituyen mezclas complejas y variables de metabolitos, principalmente pertenecientes al grupo de los terpenos. Asimismo, incluyen compuestos aromáticos derivados de fenilpropanos y pueden contener productos degradados de metabolitos no volátiles como ácidos y fitoesteres. Estos aceites se caracterizan por ser líquidos a temperatura ambiente (TA), presentando densidades generalmente inferiores a la del agua. Poseen un índice de refracción elevado y la gran mayoría exhibe la propiedad de rotar el plano de la luz polarizada. Adicionalmente, se consideran liposolubles y solubles en disolventes orgánicos (Sadgrove *et al.*, 2022). Éstos se extraen de partes vegetales (generalmente hojas y flores) por medio de la técnica de hidrodestilación, que consiste en el calentamiento de la muestra vegetal en agua, generando vapor que arrastra los compuestos volátiles presentes en la planta, este vapor se condensa posteriormente, obteniendo así una mezcla de agua y AE, que luego se separa por medio de decantación (Katekar *et al.*, 2022).

Los AEs se caracterizan químicamente por ser mezclas de entre 20 y hasta 300 o más componentes volátiles, los cuales se encuentran presentes en concentraciones significativamente variables. En estas mezclas, algunos compuestos se encuentran en concentraciones elevadas, alcanzando porcentajes que oscilan entre el 30 y el 70% del perfil cromatográfico, mientras que otros se encuentran en cantidades mínimas o trazas (menor al 1%) (Barbosa *et al.*, 2016).

1.1.5. Química de los terpenos

Los terpenos son el principal grupo de metabolitos secundarios encontrados en los AEs, son la clase de metabolitos secundarios más grande y se encuentra ampliamente distribuida en los seres vivos, principalmente en plantas (Gershenzon y Dudareva, 2007). La biosíntesis de los terpenos se realiza principalmente a través de dos rutas metabólicas: la ruta del ácido mevalónico que se lleva a cabo en el citosol y la ruta del 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato, cuyo proceso ocurre en los plastidios. Ambas rutas son responsables de sintetizar el isopentenil pirofosfato y el dimetilalil pirofosfato, que son los precursores universales para la formación de todos los terpenos. Una vez que se han producido estos precursores, se utilizan para la biosíntesis de terpenos mediante reacciones de polimerización y ciclización (Perveen y Taweel, 2018). Los terpenos están basados estructuralmente en unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) (Dewick, 2009) (Figura 1.5).

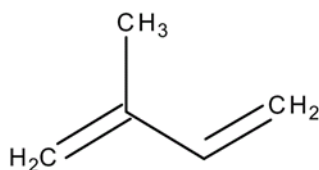


Figura 1.5. Estructura química del isopreno.

Los terpenos se clasifican de acuerdo con el número de unidades de isopreno que los conforman, como se describe en la tabla 1.2. (Mabou y Yossa, 2021).

Tabla 1.2. Clasificación de los terpenos.

Número de carbonos	Nombre	Características
5	hemiterpenos	Formados por una unidad de isopreno y cuyo precursor es el dimetilalil pirofosfato.
10	monoterpenos	Formados por dos unidades de isopreno y cuyo precursor es el geranil pirofosfato. Están ampliamente distribuidos en la naturaleza, particularmente en aceites esenciales.
15	sesquiterpenos	Formados por tres unidades de isopreno y cuyo precursor es el farnesil pirofosfato. Estos se encuentran principalmente en plantas superiores.
20	diterpenos	Formados por cuatro unidades de isopreno y cuyo precursor es el geranil pirofosfato. Se encuentran en casi todas las familias de plantas.
30	triterpenos	Formados por seis unidades de isopreno.

Los monoterpenos son el grupo de la serie terpénica más volátil y constituyen una de las fracciones más importantes en los AEs de muchas plantas. Los monoterpenos se dividen en dos grandes grupos: los hidrocarbonados, que no contienen átomos de oxígeno, y los monoterpenos oxigenados, que incluyen grupos funcionales como alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y éteres. Entre los monoterpenos hidrocarbonados más comunes se encuentran el α -pineno, el limoneno, el terpineno y el geraniol, los cuales presentan una amplia gama de propiedades farmacológicas, que incluyen actividades antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes y analgésicas (Ashour *et al.*, 2010). La biosíntesis de los monoterpenos ocurre principalmente en los plastidios, a través de la ruta del 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato, aunque también puede generarse en menor medida a través de la vía del ácido mevalónico en el citoplasma. La estructura de estos compuestos puede ser lineal, como en el caso del limoneno, o cíclica, como en el α -pineno, lo que influye directamente en su reactividad y en las propiedades organolépticas. Además, los monoterpenos pueden sufrir transformaciones oxidativas o de hidrogenación, lo que da lugar a terpenoides oxigenados como timol o carvacrol con mayores propiedades antibacterianas (Dehsheikh *et al.*, 2020).

Los sesquiterpenos están compuestos por quince átomos de carbono, derivados de la unión de tres unidades de isopreno. De la misma forma que los monoterpenos, los sesquiterpenos también pueden clasificarse como hidrocarbonados y oxigenados. Químicamente, los sesquiterpenos presentan una diversidad estructural notable que incluye compuestos lineales, monocíclicos, bicíclicos e incluso tricíclicos, y muchos de ellos poseen grupos funcionales oxigenados como alcoholes, cetonas y aldehídos. Ejemplos comunes incluyen el β -cariofileno, un sesquiterpeno bicíclico con propiedades antiinflamatorias; el biciclogermacreno y el α -humuleno, conocidos por sus efectos analgésicos y anticancerígenos (Ashour *et al.*, 2010). Los sesquiterpenos desempeñan roles ecológicos fundamentales en las plantas, actuando como mediadores en interacciones bióticas y abióticas: pueden servir como repelentes de herbívoros, atrayentes de polinizadores, y agentes defensivos frente a microorganismos patógenos (Feng *et al.*, 2022).

Los diterpenos, si bien su presencia en los AEs es menos frecuente en comparación con los monoterpenos y sesquiterpenos, desempeñan un papel significativo en la química de estos extractos debido a su estructura compleja y sus propiedades bioactivas. Estos compuestos se caracterizan por ser menos volátiles que los monoterpenos y sesquiterpenos, lo que limita su contribución al aroma de los AEs, pero amplifica su importancia en términos de bioactividad. Ejemplos prominentes incluyen el fitol, un diterpeno lineal que es precursor de la clorofila y el ácido abietánico, característico de coníferas y conocido por sus propiedades antimicrobianas. Estos compuestos suelen contener grupos funcionales como alcoholes, ácidos carboxílicos, ésteres y lactonas, que les confieren diversas propiedades biológicas (Islam *et al.*, 2016).

1.1.6. Factores que influyen en la composición química de los aceites esenciales

La composición química de los AEs es el resultado de una interacción compleja entre factores genéticos, ambientales y experimentales, por lo que es frecuente encontrar variaciones importantes en su composición, ya sea en la presencia-ausencia de moléculas o en concentraciones contrastantes de las moléculas, lo que, en gran medida, determina sus propiedades biológicas. Los factores genéticos son determinantes fundamentales en la síntesis y acumulación de los metabolitos en las plantas. Dentro de una misma especie, las diferencias genéticas dan lugar a la presencia de quimiotipos que producen perfiles contrastantes de compuestos volátiles (Moghaddam y Mehdizadeh, 2017). Por otro lado, las condiciones ambientales en las que crece una planta tienen un impacto significativo en el rendimiento y la calidad del AE. Algunas variables como el clima, la humedad, altitud y el tipo de suelo pueden influir en la variabilidad de la composición química del AE. Otra variable importante es la estacionalidad, ya que la acumulación de compuestos volátiles suele ser mayor en etapas

específicas del desarrollo, como la floración o fructificación. También el manejo agronómico de las especies puede influir en la selección de perfiles específicos de metabolitos volátiles (Tsusaka *et al.*, 2019). Adicionalmente, factores experimentales como las condiciones de extracción de los AEs también son un factor que influye en su composición química. En la hidrodestilación o en la destilación por arrastre de vapor, las condiciones de temperatura, presión y tiempo afectan la volatilización y estabilidad de los metabolitos. Algunos compuestos pueden degradarse o transformarse en otras moléculas durante procesos prolongados de extracción o en altas temperaturas, como ocurre con la oxidación de β -cariofileno a óxido de cariofileno durante el proceso de extracción de los AEs (Figueiredo *et al.*, 2008).

1.1.7. Relación de la composición química de los aceites esenciales y su actividad antibacteriana

En la literatura se ha propuesto que los metabolitos presentes en altas concentraciones desempeñan un papel fundamental en el efecto antimicrobiano de los AEs (Chua *et al.*, 2019). No obstante, los componentes menores juegan también un papel importante, ya que pueden potenciar los efectos de los componentes mayoritarios, aunque también se han observado efectos antagónicos y aditivos (Miladinović *et al.*, 2021; González-Mas *et al.*, 2019). Basolé y Juliani (2012) proponen que los AEs con compuestos oxigenados como componentes mayoritarios, como el linalol (a), citronelal (c), mentol (d), eucaliptol (h), alcanfor (i), eugenol (k) o elemol (l) son los más efectivos en la actividad antibacteriana (Figura 1.6).

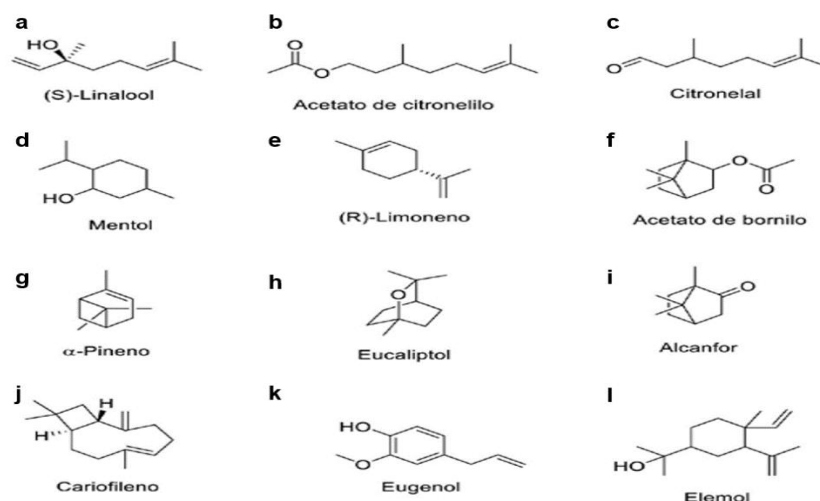


Figura 1.6. Estructura química de compuestos bioactivos comúnmente encontrados en los aceites esenciales (Alavez y Cruz, 2022).

La composición química del AE, así como los efectos sinérgicos generados por los metabolitos presentes en la mezcla, desempeñan un papel crucial en el desarrollo de formulaciones farmacéuticas efectivas. Por consiguiente, es imprescindible obtener un conocimiento detallado de la composición química del AE (Baser y Buchbauer, 2009). Una caracterización precisa de la composición química nos brinda una base sólida para optimizar y aprovechar plenamente las propiedades terapéuticas de los AEs en el diseño de intervenciones médicas exitosas, así como dilucidar las bases detrás de la actividad antibacteriana de los AEs (Freires *et al.*, 2015).

1.1.8. Mecanismos de actividad antiinfecciosa de los aceites esenciales

La actividad antibacteriana de los AEs está ampliamente reportada (Carev *et al.*, 2023; Shehabeldine *et al.*, 2023; Ribeiro *et al.*, 2021; Chouhan *et al.*, 2017; Barreto *et al.*, 2014). Sin embargo, el o los mecanismos de acción de estos aún no están claros. Uno de los principales modos de acción postulado para los AEs es su capacidad para modificar la estructura y permeabilidad de las membranas bacterianas (Nazzaro *et al.*, 2013). La membrana bacteriana juega un papel importante en la regulación de la presión osmótica celular y en la entrada y salida de biomoléculas (Bassolé y Juliani, 2012). Por lo tanto, una membrana comprometida interrumpirá la presión osmótica, lo que provocará una fuga intracelular y finalmente destruirá la célula. Yap *et al.* (2021) estudiaron la actividad antibacteriana y el modo de acción del AE de lavanda (*Lavandula angustifolia*) contra *Escherichia coli* MDR. Su estudio mostró que este AE afecta la membrana celular después de la exposición. Su estudio fue validado por el análisis microscópico de la membrana celular de *E. coli* tratada con AE de lavanda que mostró la alteración de la estructura de la membrana y la morfología celular.

Por otro lado, estudios recientes han señalado que los metabolitos secundarios presentes en los AEs pueden bloquear receptores QS o degradar señales extracelulares, afectando así directamente la comunicación bacteriana. Estas propiedades han sido confirmadas en modelos experimentales utilizando bacterias como *C. violaceum* y *Pseudomonas aeruginosa*. Olivero *et al.*, (2010) evaluaron la actividad anti-QS de los AEs de *Piper bredemeyeri*, *P. brachypodom* y *P. bogotense*, mostrando valores de concentración inhibitoria del 50% (CI₅₀) para el QS de 45.6, 93.1 y 513.8 µg/mL, respectivamente. Asimismo, otro estudio analizó 12 AEs, identificando que el cis-cis-p-mentenólido, extraído de *Mentha suaveolens*, inhibe la producción de violaceína y la formación de biofilm en *C. violaceum* (Poli *et al.*, 2018).

Otro modo de acción propuesto de los AEs es la capacidad para inhibir las bombas de eflujo. Los estudios han demostrado que algunos compuestos de los AEs pueden inhibir la actividad de las

bombas de eflujo bacterianas. Estos componentes pueden interactuar con las proteínas de la bomba, interferir con su función normal y prevenir la expulsión de las moléculas antimicrobianas de la célula bacteriana (García *et al.*, 2022).

También, diversos estudios han investigado el efecto de los AEs sobre diferentes tipos de bacterias y su capacidad para formar biopelículas (Jannat *et al.*, 2023; Elbestawy *et al.*, 2023; Noumi *et al.*, 2023; Martínez *et al.*, 2023).

1.1.9. Plantas medicinales aromáticas seleccionadas para el análisis químico y evaluación de sus aceites esenciales

En la península de Yucatán (PY), el pueblo maya conserva valiosos conocimientos sobre el uso y manejo de las PMA de la región. Se seleccionaron 10 AEs de plantas de acuerdo con los siguientes criterios:

1. Que sean de plantas nativas de la PY.
2. Que sean empleadas en la medicina tradicional maya para el tratamiento de infecciones o síntomas sugestivos de éstas.
3. Sin o con pocos estudios previos sobre su actividad antiinfecciosa, en especial sobre *A. baumannii*.

Tomando como base este conocimiento y usando como referencia la literatura científica, a continuación, se describen las especies de PMA que fueron objeto de este estudio.

1.1.9.1. *Bursera simaruba* (L.) Sarg.

También conocida como Chaká o palo mulato es un árbol dioico de hasta 30 m de alto, resinoso y aromático, tronco liso (Méndez *et al.*, 2012) (Figura 1.7). Ampliamente distribuida en todo el trópico americano desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Sudamérica. Se ha reportado el uso de la infusión de hojas para alivio del resfriado, heridas, infecciones gastrointestinales y quemaduras. Por ejemplo, para la diarrea se machacan hojas frescas en un litro de agua y se administra oralmente. También se puede hacer uso de las hojas hervidas para aliviar el resfriado. La resina se aplica localmente para las quemaduras provocadas por el chechem (*Metopium brownei*). Se emplea para tratar la fiebre intestinal bebiendo una infusión de la corteza en agua hervida. Las hojas en infusión o en emplasto también se utilizan para el tratamiento de las úlceras (Méndez *et al.*, 2012).

Estudios sobre la composición química de su AE mencionan que se caracteriza por la presencia de los monoterpenos α y β -pineno, β -felandreno y el limoneno entre los más frecuentes, mientras

que el β -cariofileno y el germacreno D son los sesquiterpenos más comunes (Marcotullio *et al.*, 2018). Estudios recientes sobre la composición química del AE de hojas *B. simaruba* colectado en Costa Rica, reveló que los compuestos mayoritarios encontrados fueron α -felandreno (22%), (E)-cariofileno (15%), o-cimeno (9%) y α -tujeno (8%) (Setzer, 2019). También, se ha reportado altos porcentajes de α -pineno (53%) y D-germacreno (20%) (Ferreira *et al.*, 2020).

Recientemente, se ha documentado propiedades antivirulencia de extractos hexánicos de *B. simaruba* sobre cepas de *P. aeruginosa* (Peña, 2020). Además, varios estudios farmacológicos han demostrado la actividad antibacteriana del AE de varias especies del género *Bursera* contra patógenos como *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Vibrio cholerae*, *E. coli* y *S. aureus* (Sánchez-Recillas *et al.*, 2020; Villa-Ruano *et al.*, 2018; Ashok *et al.*, 2015; Moreno *et al.*, 2010). No se ha documentado actividad contra *A. baumannii*.



Figura 1.7. Fotografía de *Bursera simaruba* (Naturalista, 2024).

1.1.9.2. *Croton yucatanensis* Lundell.

Conocida como iikabán en maya. Es un arbusto monoico aromático de 60 a 90 cm de altura con hojas alternas o subopuestas (Figura 1.8). Tiene una distribución restringida a la PY desde el sur de Campeche hasta el Norte de Yucatán. Con frecuencia se encuentra en la selva baja caducifolia. Algunos usos medicinales reportados son el uso de infusiones de las hojas para el alivio de síntomas sugestivos de infecciones gastrointestinales, como fiebre, úlceras y diarrea. También se utilizan gotas a partir de decocciones que son aplicadas sobre la piel para el tratamiento de heridas (Barrera *et al.*, 2016). No existen estudios fitoquímicos reportados para la

especie *C. yucatanensis*, o de su actividad biológica. El estudio de la composición química de los AEs de *Croton* spp. ha revelado la presencia del espatulenol, β -cariofileno, óxido de β -cariofileno, 1,8-cineol, metil-eugenol y α -felandreno como los principales compuestos encontrados (Morais et al., 2019; de Alencar et al., 2017). Se conoce la actividad antibacteriana del género *Croton* spp. sobre bacterias Gram negativas y Gram positivas como *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus* (Cucho-Medrano, et al., 2021; de Alencar et al., 2017). En especies endémicas de Brasil como *C. ceanothifolius* y *C. tetradenius* se ha evaluado el efecto sinérgico de sus AEs y se ha demostrado que potencian selectivamente la acción de antimicrobianos de patente frente a cepas MDR (Siquiera et al., 2021; de Araujo et al., 2020).



Figura 1.8. Fotografía de *Croton yucatanensis* (CICY, 2024).

1.1.9.3. *Turnera diffusa* Willd. ex-Schult.

La damiana, como se conoce comúnmente a esta especie, es una hierba aromática de 30 a 60 cm de altura, de tallo ramificado y pubescente (Figura 1.9). Se distribuye en climas secos desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Sudamérica. En Yucatán, con frecuencia se encuentra en selva baja caducifolia, selva mediana subcaducifolia y en vegetación de duna costera. Es tradicionalmente utilizada para el alivio de padecimientos genitourinarios tales como la debilidad e impotencia sexual, en dolores de postparto, infecciones de la vejiga y nefritis. Las infusiones de las hojas también se usan para aliviar la tos y el catarro (Szewczyk et al., 2014). Algunos compuestos mayoritarios identificados en el AE de *T. diffusa* son α -pineno, la opoplenona, el cadaleno y el epi-cubenol (Urbizu-González et al., 2017; Bueno et al., 2011). En cuanto a la actividad antimicrobiana, su AE ha mostrado potente actividad contra *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en evaluaciones

in vitro (Parra-Naranjo *et al.*, 2023; Ong *et al.*, 2020; Báez, 2019). Los extractos de hexano, cloroformo y etanol de *T. diffusa*, han mostrado actividad contra un amplio espectro de bacterias patógenas destacándose las especies *Shigella boydii* y *S. aureus*



Figura 1.9. Fotografía de *Turnera diffusa* (LM Calvo).

1.1.9.4. *Lantana canescens* Kunth.

Es un arbusto aromático de entre 70 a 150 cm de alto (Figura 1.10). Esta especie tiene una amplia distribución en América, desde Texas y Florida hasta el Norte de Argentina. En la PY se le puede encontrar por todo el territorio, especialmente en selva baja y vegetación secundaria. Las hojas se utilizan en forma de infusión para aliviar la tos, el catarro y la bronquitis. También se ha documentado su uso para aliviar calambres, erupciones de la piel, úlceras, tumores, piquetes de insectos y como diurético. (Filho *et al.*, 2010; Arellano-Rodríguez *et al.*, 2003). Se ha reportado que el AE de *L. canescens* está compuesto principalmente por los sesquiterpenos β -cariofileno, β -cubebeno, elixeno, β -felandreno, aromadendreno y germacreno D (Bhakti *et al.*, 2020; Peralta-Bohórquez *et al.*, 2011; Filho *et al.*, 2010). No existen reportes de actividad antibacteriana para esta especie. Se ha reportado actividad antibacteriana de AEs de *Lantana* spp. contra cepas de *S. aureus* y *E. coli* (Bhakti *et al.*, 2020; de Santana *et al.*, 2009).



Figura 1.10. Fotografía de *Lantana canescens* (LM Calvo).

1.1.9.5. *Ocimum campechianum* Mill.

La albahaca de monte o x kakaltuum, en maya, es como se le conoce a esta especie en la PY. Es una hierba aromática de 49 a 60 cm de alto con tallos tetragonales; de hojas opuestas, ovaladas a elípticas (Figura 1.11). Se puede encontrar desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina y las Antillas, es una especie de amplia distribución en la PY (Méndez *et al.*, 2012). Se emplea para diferentes afecciones como el salpullido, problemas digestivos y heridas. Normalmente se hace el uso de las hojas en forma de infusión o la aplicación directa de las hojas sobre heridas infectadas. También, es conocido su uso para las cataratas, machacando las hojas en agua hervida para aplicar el preparado directamente en los ojos. De igual forma, se emplea para el alivio de infecciones cutáneas o llagas aplicando las hojas directamente en la zona afectada por tiempos prolongados (Méndez *et al.*, 2012). En la caracterización de su AE, se ha identificado una amplia gama de compuestos mayoritarios como los monoterpenos linalol, 1,8-cineol, terpinen-4-ol y metil-eugenol, eugenol, 3-octanol y los sesquiterpenos β -elemeno, β -cariofileno, biciclogermacreno y α -epi-cadinol, (Dharsono *et al.*, 2022; Guardado *et al.*, 2022; Ricarte *et al.*, 2020; Avetisyan, 2017). Se ha reportado actividad biológica para especies del género *Ocimum* spp. contra varios patógenos de importancia clínica como *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *S. aureus* y *A. baumannii* (Ricarte *et al.*, 2020; Avetisya, 2017; Intorasoot *et al.*, 2017)



Figura 1.11. Fotografía de *Ocimum campechianum* (LM Calvo).

1.1.9.6. *Piper auritum* Kunth.

Conocida localmente como hoja santa, es un arbusto o árbol pequeño, 1,5 a 5 m de altura, los tallos con nudos visibles, lisos con hojas simples, alternas con la base en forma de corazón (Figura 1.12). Se distribuye desde el centro y el sur de México, hasta Venezuela y Perú, así como la Amazonia (Lozano-Sangabriel *et al.*, 2022). Las hojas se utilizan para el dolor e inflamación de estómago. Las hojas soasadas y con aceite se colocan sobre el vientre. En problemas de bronquitis y tos se preparan infusiones. Su uso también se indica en enfermedades como asma, laringitis, reumatismo, en llagas, afecciones de los riñones, inflamaciones, dolores musculares, cólicos y quemaduras (Rosas *et al.*, 2013). Un estudio detallado de los usos medicinales de hojas de *P. auritum* en las comunidades mayas de la PY resalta el uso para aliviar la tos, el dolor corporal y la diabetes (Pérez-Hernández *et al.*, 2023). Se conoce que la composición química del AE de *P. auritum* está representada mayoritariamente por safrol (60-90%), aunque también se han identificado otros compuestos mayoritarios como el cinamaldehído, el alcanfor y el γ -terpineno (Wan, 2020; Sánchez *et al.*, 2013). En la PY se ha identificado variación en la concentración de safrol (33.6-53.3%) en AEs de *P. auritum* colectados en huertos familiares y sitios ruderales (Pérez-Hernández *et al.*, 2023). Se ha documentado la actividad antimicrobiana de extractos metanólicos de *P. auritum* sobre *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *E. coli* y *S. aureus* (Salleh, 2021). No se ha reportado la actividad antibacteriana de su AE.



Figura 1.12. Fotografía de *Piper auritum* (LM Calvo).

1.1.9.7. *Piper amalago* L.

Arbusto o árbol pequeño racemoso, nodoso de 4 a 6 m, hojas elíptico-ovadas (Figura 1.13). De amplia distribución en América Tropical, desde México, Centro América, Sudamérica y las Antillas. Las infusiones de sus hojas se utilizan tradicionalmente para curar heridas y quemaduras. También se utiliza para el dolor general, de cabeza e infecciones estomacales (Durand, 2012). Adicionalmente, es utilizada por los curanderos mayas para el tratamiento de afecciones culturales como el “susto”. Esto ha generado recientes investigaciones que demuestran que la especie presenta actividad ansiolítica (Mullally *et al.*, 2016). En los AEs de *P. amalago* se han identificado monoterpenos como α -pineno y *p*-cimeno y sesquiterpenos como el espatulenol, biciclogermacreno, β -felandreno y germacreno D (Bahare *et al.*, 2019). Se ha reportado la actividad antibacteriana del AE de *P. amalago* sobre *E. coli* y *K. pneumoniae* (Araujo-Baptista *et al.*, 2019).



Figura 1.13. Fotografía de *Piper amalago* (Naturalista, 2024).

1.1.9.8. *Hyptis suaveolens* L.

También conocida como planta de chan, es una herbácea con hojas opuestas, simples, con márgenes dentados o aserrados. Tienen una forma lanceolada a elíptica y son de color verde oscuro (Figura 1.14). Se encuentra ampliamente distribuida en América del Sur, asociada a vegetación perturbada y en la PY se puede encontrar principalmente en la porción oeste (Vergara-Santana *et al.*, 2005). Se ha reportado una gran variedad de usos medicinales. Se utiliza para aliviar las infecciones estomacales, respiratorias y de la piel. También se utiliza para la fiebre y tos. Se ha reportado el uso de infusiones de hojas para calmar los nervios, aliviar el estrés, mejorar el sueño, aliviar la diarrea y dolores estomacales (Bonilla-Landa *et al.*, 2022). La variación encontrada en la composición química del AE de *H. suaveolens* ha permitido definir siete quimiotipos representados por la dominancia de los siguientes compuestos: eucaliptol, sabineno, β -cariofileno, aromadendreno, fenchona, eugenol y mentol (Azevedo *et al.*, 2002). Además, se han reportado otros compuestos entre los que destacan el β -elemeno, *trans*- α -bergamoteno, espatulenol y biciclogermacreno (Tonzibo *et al.*, 2009). El AE de *H. suaveolens* ha demostrado tener actividad antibacteriana sobre *S. aureus*, *S. typhi*, *P. aeruginosa*, *E. coli* y *E. faecalis* (Mishra *et al.*, 2021).



Figura 1.14. Fotografía de *Hyptis suaveolens* (LM Calvo).

1.1.9.9. *Ambrosia hispida* Pursh.

También llamada margarita de mar es una herbácea con hojas de tipo alternas y pinnadas, profundamente divididas y dentadas, con una textura peluda. Es una hierba perenne tipo enredadera, trepadora o rastrera que presenta un largo de 80 cm a 6 m (Figura 1.15). Se

distribuye desde Florida, hasta México, Centroamérica y las Antillas. En México, sólo la encontramos en la PY, particularmente asociada a la duna costera. En la medicina tradicional se utilizan las hojas en infusión para el reumatismo y para el alivio de infecciones estomacales y fiebre (Arellano-Rodríguez *et al.*, 2003). La composición química de su AE se encuentra poco estudiada, está representada principalmente por sesquiterpenos. Se han identificado compuestos importantes como el borneol, espatulenol y germacreno D y (Pino *et al.*, 2005). No existen estudios de actividad antibacteriana para esta especie.



Figura 1.15. Fotografía de *Ambrosia hispida* (Naturalista, 2024).

1.1.9.10. *Lippia origanoides* Kunth.

Es una especie arbustiva de entre 1 y 3.5 m de altura, con un crecimiento relativamente rápido y un ciclo de vida corto (5-10 años) (Figura 1.16). Se distribuye ampliamente desde el sur de Norteamérica, hasta México, Centroamérica y el norte de Sudamérica. Las hojas en infusión se utilizan como antiséptico, antipirético, analgésico, abortivo, antiespasmódico, antiinflamatorio y para el tratamiento de problemas menstruales y diabetes (Velázquez *et al.*, 2014). En la PY se ha caracterizado con detalle la presencia de tres quimiotipos en el AE de *L. origanoides*. Estos se encuentran definidos por compuestos mayoritarios como en el caso del quimiotipo timol y carvacrol y por la presencia de compuestos sesquiterpénicos en el quimiotipo no fenólico. Además, destaca la presencia de otros componentes como el *p*-cimeno y derivados del β -cariofileno (Calvo-Irabien *et al.*, 2014). La actividad antimicrobiana del AE de *L. origanoides* se encuentra ampliamente documentada sobre *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* (Uc-Cachón *et al.*, 2024; Martínez *et al.*, 2023; Leal *et al.*, 2019), pero no así sobre otras especies como *A. baumannii*.



Figura 1.16. Fotografía de *Lippia origanoides* (CICY, 2024).

1.2. JUSTIFICACIÓN

Acinetobacter baumannii está ampliamente documentado como un importante patógeno oportunista que causa una variedad de infecciones hospitalarias y comunitarias difíciles de tratar, debido a su resistencia a múltiples fármacos. Esto se traduce en altos costos de atención médica y tasas de mortalidad elevadas. Consistente con esto, en 2024 la OMS publicó una lista de bacterias para las cuales existe una necesidad urgente de desarrollar nuevas alternativas de tratamiento y *A. baumannii* resistente a carbapenémicos se clasificó como una prioridad crítica. Estudios realizados por nuestro grupo de investigación han revelado altas tasas de resistencia a diferentes grupos de fármacos en los aislados clínicos de *A. baumannii* en un hospital de tercer nivel de nuestra región (Uc-Cachón *et al.*, 2023, Garza-González *et al.*, 2019; Uc-Cachón *et al.*, 2019). Estos hallazgos subrayan la urgente necesidad de explorar y desarrollar nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento de infecciones causadas por *A. baumannii* resistente a múltiples fármacos. En la PY podemos encontrar una amplia diversidad de PMA, sobre las cuales existen escasos estudios acerca de las propiedades de sus AEs. Por lo que se evaluó la actividad antiinfecciosa de 10 AEs de PMA nativas de la PY, con un abordaje metodológico novedoso, investigando su actividad sobre el crecimiento y los mecanismos de virulencia y fármacorresistencia de *A. baumannii* con fenotipo MDR y XDR. Los resultados contribuirán al avance en el conocimiento de las propiedades de los AEs de PMA nativas de nuestra región, los mecanismos de acción sobre cepas de *A. baumannii* y su potencial uso como agentes antiinfecciosos. Adicionalmente, explorar el potencial antibacteriano de estas plantas nativas, facilitaría el aprovechamiento de estas especies en la PY impulsando el desarrollo de tecnologías agroecológicas.

1.3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antiinfecciosa de AEs de PMA nativas de la PY sobre cepas de *A. baumannii* resistentes a fármacos y explorar la relación entre la composición química de los AEs y la actividad antiinfecciosa.

1.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Caracterizar la composición química de los AEs.
- 2- Determinar el efecto de los AEs sobre el crecimiento bacteriano.
- 3- Determinar el efecto de los AEs sobre los mecanismos de virulencia QS y actividad anti-catalasa.
- 4- Determinar el efecto de los AEs sobre los mecanismos de resistencia, formación de biopelículas y modulación de bombas de eflujo.
- 5- Determinar la citotoxicidad de los AEs bioactivos.
- 6- Analizar las relaciones entre la actividad biológica y la composición química de los AEs bioactivos.

1.5. HIPÓTESIS

Los AEs con composiciones químicas contrastantes, presentarán diferencias en la actividad sobre el crecimiento, los mecanismos de resistencia y factores virulencia de cepas de *A. baumannii*.

1.6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos planteados y poner a prueba la hipótesis, se realizó la siguiente estrategia experimental (Figura 1.17).

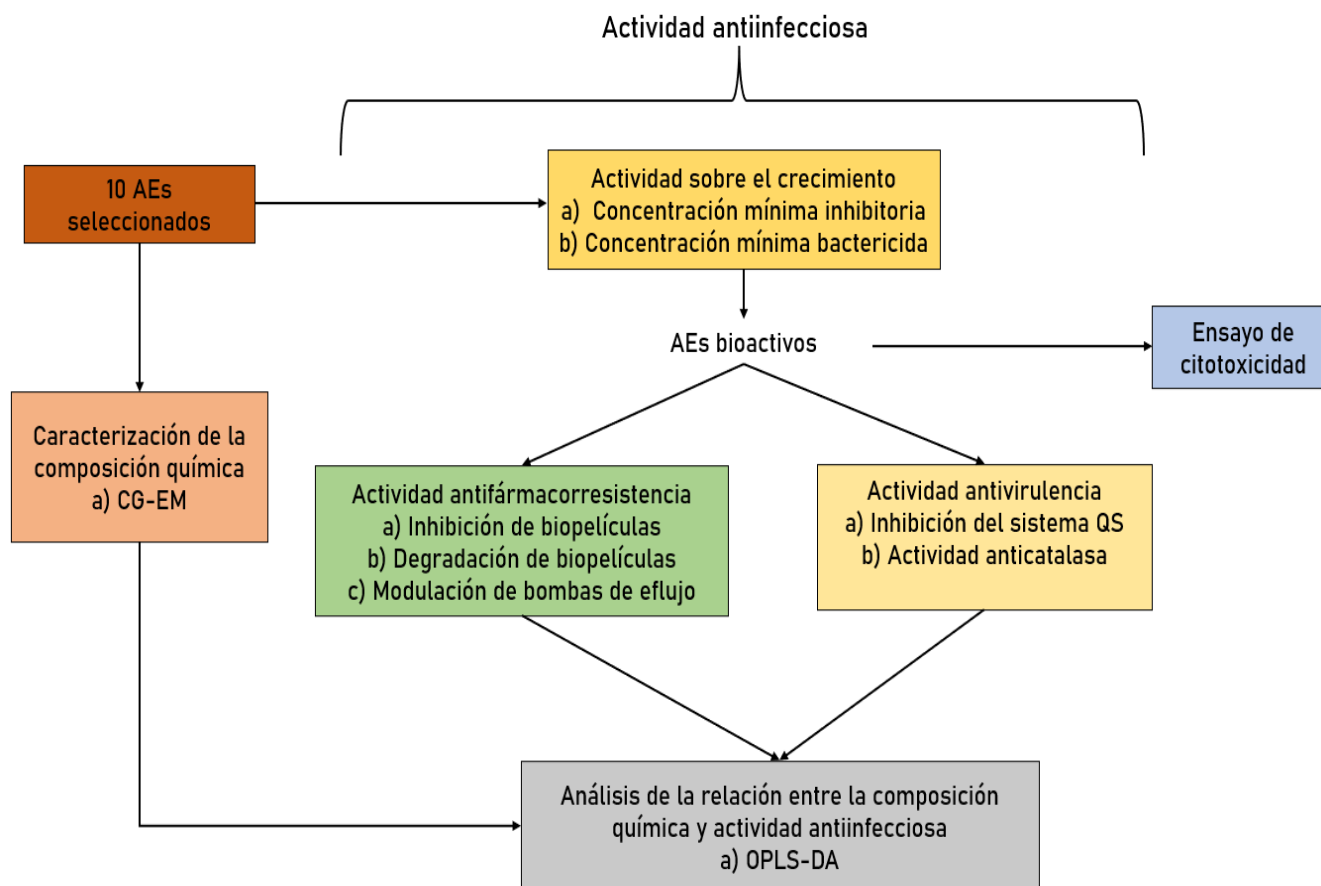


Figura 1.17. Estrategia experimental.

CAPÍTULO II

2.1. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente proyecto atiende objetivos específicos del proyecto macro titulado: POTENCIAL ANTIINFECCIOSO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS NATIVAS SOBRE BACTERIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS: EXPLORACIÓN DE MECANISMOS, aprobado por los comités científico, de ética y de bioseguridad del Instituto Mexicano del Seguro Social con No. de registro R-2022-785-009 y financiamiento del proyecto semilla, convocatoria CICY-2022.

2.1.1. Aceites esenciales

Los AEs para el estudio se obtuvieron de una colección de AEs de la Unidad de Recursos Naturales del CICY que se encuentra bajo resguardo y supervisión de la Dra. Luz María del Carmen Calvo Irabien (Tabla 2.1).

La identificación botánica de las especies fue realizada por personal especializado del Herbario del CICY. Los AEs fueron extraídos individualmente de hojas secas, colectadas en poblaciones naturales de cada una de las especies seleccionadas. La destilación se realizó por el método de hidrodestilación en un aparato tipo Clevenger durante 1.5 h aproximadamente, dependiendo de la especie, usando agua destilada. Los AEs fueron separados de la fase acuosa por diferencia de densidad a través de la decantación, fueron secados con sulfato anhidro de sodio y se mantuvieron en resguardo en viales ámbar a una temperatura de 4 °C hasta su análisis cromatográfico y evaluación de actividad antiinfecciosa.

Tabla 2.1. Especies vegetales seleccionadas para el estudio de sus aceites esenciales.

Nombre científico	Nombre común	Familia botánica	Sitio de colecta	Ejemplar de herbario (LMCalvo)	Usos tradicionales
<i>Ambrosia hispida</i> (AHI)	margarita de mar	Asteraceae	Chuburna Puerto, Sisal y Telchac Puerto	17, 32, 147	Reumatismo, fiebre ²
<i>Bursera simaruba</i> (BSI)	chaká	Burseraceae	Mérida	448	Resfriados, heridas, infecciones gastrointestinales, quemaduras ¹
<i>Croton yucatanensis</i> (CYU)	iikabán	Euphorbiaceae	Nohuayún	355	Cicatrizante, fiebre, diarrea, infecciones de la piel ³
<i>Hyptis suaveolens</i> (HSU)	planta de chan	Lamiaceae	Carretera Mérida a Tetiz, Nohuayún,	36, 386	Infecciones respiratorias, diarrea, infecciones de la piel ⁶
<i>Lantana canescens</i> (LCA)	hierba de javillas	Verbenaceae	J.A CICY y Sierra Papacal	136 y 449	Fiebre, tos ²
<i>Lippia origanoides</i> (LOR)	orégano de monte	Verbenaceae	Nohuayún, Sierra Papacal, Chicxulub Pueblo	257, 260, 452	Dolor, fiebre, infecciones gastrointestinales ⁵
<i>Ocimum campechianum</i> (OCA)	albahaca de monte	Lamiaceae	Opichén	520	Infecciones gastrointestinales, heridas ³
<i>Piper amalago</i> (PAM)	cordoncillo	Piperaceae	Kaúa	370	Heridas, infecciones de la piel, fiebre ⁷
<i>Piper auritum</i> (PAU)	hoja santa	Piperaceae	Uayma, Pixoy, Oxkutzcab,	399-404	Asma, infecciones de la piel, llagas y quemaduras, reumatismo ³
<i>Turnera difussa</i> (TDI)	damiana	Passifloraceae	Tixcalcatuyu b, Nohuayún, Abalá	16, 57, 124	Tos, bronquitis, padecimientos genitourinarios ⁴

¹(Méndez *et al.*, 2012), ²(Calvo-Irabien, 2012), ³(Barrera *et al.*, 2016), ⁴(Gómez *et al.*, 2007), ⁵(Velázquez *et al.*, 2014), ⁶(Tramil, 2023), ⁷(Márquez, 2013).

2.1.2. Caracterización de la composición química de los aceites esenciales

2.1.2.1. Composición química de los aceites esenciales

Los datos cromatográficos se obtuvieron en un cromatógrafo de gases marca Agilent Technologies Modelo 6890N, equipado con un detector selectivo de masas 5875 B (ionización por impacto de electrones 70 eV), inyector split:splitless(1:40 radio split) y un sistema de datos MS-Chemstation G1701- DA. Para la separación se utilizó una columna DB-5 (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano) de 60 m de longitud con un diámetro de 0.25 mm y espesor de 0.25 μm . Se utilizó helio como gas acarreador con un flujo de 1 ml/min. Las condiciones de temperatura del horno fueron las siguientes: temperatura inicial de 45°C, se mantuvo por 5 minutos, un incremento de 4°C/min hasta 150°C, se mantuvo por 2 minutos, un incremento de 5°C/min hasta 250°C que se mantuvo por 5 min y finalmente se incrementó 10°C/min hasta 275°C manteniéndose por 15 min, con un tiempo total de 75.75 minutos. Para aquellos AEs que siguiendo la metodología anterior presentaron un alto número de compuestos sin identificar, se analizaron por CG-EM utilizando una columna de diferente polaridad (DB-WAX; 60 m x 250 μm x 0.25 μm). Las condiciones del análisis por CG por este método fueron las siguientes: temperatura inicial de 50°C, se mantuvo por 5 minutos, un incremento de 4°C/min hasta 150°C, se mantuvo por 7 min, un incremento de 4°C/min hasta 250°C que se mantuvo por 30 min y finalmente se incrementó 2°C/min hasta 250°C con un tiempo total de 87.0 min. En ambas columnas, la temperatura del detector fue de 290° C y la del inyector de 280° C. Las muestras de AE (1 μL) fueron inyectadas disueltas en diclorometano a una concentración entre el 3 y 10% (v/v), dependiendo de la especie. El software utilizado para visualizar y analizar los perfiles cromatográficos fue G1701DA GC-MSD ChemStation vD03.00.552. Para obtener una identificación confirmatoria de los componentes, los patrones de fragmentación de cada uno de los compuestos (picos) presentes en los AEs se compararon con los patrones almacenados en una base de datos de estándares comerciales (inyectados bajo las mismas condiciones cromatográficas descritas con anterioridad). Para esta confirmación sólo se consideró un porcentaje de similitud igual o mayor al 95%. Cuando no se logró tener una identificación confirmatoria, se realizó la identificación tentativa de los compuestos por CG-EM utilizando como base de datos las librerías de NIST11.1 y de Adams (2007). Esta última especializada en terpenos y otros compuestos presentes en los AEs. Para la identificación tentativa sólo se consideraron los resultados con un porcentaje de similitud igual o mayor al 70%. Aquellos compuestos que no cumplieron este criterio se consideraron como no identificados. Para el análisis de datos, se tomaron en cuenta únicamente aquellos compuestos con un porcentaje de área igual o mayor al 1.0%.

Para complementar la identificación de los componentes del AE se calculó el índice de retención lineal (IR) utilizando los tiempos de retención relativos a una serie de alcanos (C7-C40) (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) inyectados directamente en el CG-EM en las condiciones descritas anteriormente. Los IR calculados se compararon con los IR reportados en la literatura (Adams, 2007). El IR se calculó para cada metabolito mediante la siguiente fórmula que corresponde al método cromatográfico con rampa de temperatura.

$$IR = 100xn + 100 \left[\frac{trx - trn}{trN - trn} \right]$$

Dónde: xn= número de carbonos; trx= tiempo de retención del analito; trn= tiempo de retención del alcano de menor número de carbono; trN= el tiempo de retención del alcano de mayor número de carbonos.

2.1.2.2. Análisis de la composición química por métodos estadísticos

Para analizar las diferencias o similitudes en la composición química de los AEs estudiados, se realizaron diagramas de pastel de las proporciones de monoterpenos y sesquiterpenos definidos para cada AEs. Para determinar cuáles metabolitos fueron exclusivos para cada AEs o cuáles estaban presentes en varios, se realizó un análisis de conjuntos de UpSet utilizando R, software. v.4.3.2. Finalmente, se realizó un análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) utilizando MetaboAnalyst V.6.0 (<https://www.metaboanalyst.ca>). Para ello, se construyó una matriz a partir de los porcentajes de área de los compuestos identificados. Para estos análisis se consideraron sólo aquellos compuestos con un porcentaje de área >5%. Esta herramienta estadística es particularmente útil para interpretar datos complejos provenientes de mezclas químicas presentes en los AEs, y para identificar metabolitos clave que contribuyen a las diferencias observadas entre los AEs. Los resultados del PCA fueron evaluados en términos de las varianzas explicadas por los primeros tres componentes principales. También se graficaron las cargas para interpretar la contribución de cada compuesto en los tres componentes principales representados (Karamizadeh *et al.*, 2013).

2.1.3. Actividad antiinfecciosa de los aceites esenciales

La evaluación de la actividad antiinfecciosa de los AEs correspondiente a los objetivos específicos 1-3 se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Unidad de Investigación Médica de Yucatán (UIMY) del IMSS. Las cepas de referencia y los aislados clínicos de *A. baumannii* que se utilizaron en estos ensayos se obtuvieron del biobanco de cepas ESKAPE-E de la UIMY y se describen en la tabla 2.2. Éstas se mantienen criopreservadas en viales que contienen caldo de soya tripticasa y glicerol, a una temperatura de -80°C.

Tabla 2.2. Cepa de referencia y aislados clínicos seleccionados y su perfil de resistencia.

Clave de cepa <i>A. baumannii</i>	Fenotipo de resistencia	Perfil de resistencia	Actividad antiinfecciosa evaluada
ABA-ATCC-1605	XDR, CBRE	AMP, CAZ, CIP, CRO, CFZ, CTX, ETP, FEP, FOS, FOX, GEN, IMP, LVX, MEM, SAM, SXT, TZP	Actividad anti-crecimiento Actividad anti-catalasa Actividad anti-biopelículas
ABA-UIMY-81	MDR, CBRE	AMK, CAZ, CIP, CRO, CTX, FEP, GEN, LVX, MEM, SXT, TOB	Actividad anti-crecimiento Actividad anti-biopelículas
ABA-UIMY-88	CBS	-	Actividad anti-crecimiento
ABA-UIMY-5	XDR, CBR	AMK, CAZ, CIP, CRO, CTX, FEP, GEN, IMP, LVX, MEM, SAM, SXT, TET, TOB	Actividad en la modulación de bombas de eflujo
ABA-UIMY-16	MDR, CBS	AMK, CAZ, CIP, CRO, CTX, FEP, GEN, LVX, SXT, TET, TOB	Actividad en la modulación de bombas de eflujo
<i>C. violaceum</i> ATCC 12472	-	-	Actividad anti-QS

Abreviaturas: AMP: Ampicilina, CRO: Ceftriaxona, FEP: Cefepima, CTX: Cefotaxima, SAM: Ampicilina/Sulbactam, CAZ: Ceftazidima, CFZ: Cefazolina, CIP: Ciprofloxacino, IMP: Imipenem, MEM: Meropenem, SXT: Trimetoprim/Sulfametoxazol, TZP: Piperacilina/Tazobactam, FOS: Fosfomicina, FOX: Cefoxitina, GEN: Gentamicina, TOB: Tobramicina, LVX: Levofloxacina, AMK: Amikacina, CFX: Cefuroxima, ETP: Ertapenem, MDR: multidrogorresistente, XDR: resistencia extendida, CBRE: Resistente a carbapenémicos, CBS: Sensible a carbapenémicos.

2.1.3.1. Actividad de los aceites esenciales sobre el crecimiento de *A. baumannii*

Los AEs fueron evaluados en un primer abordaje sobre el crecimiento bacteriano de las tres cepas de *A. baumannii* descritas (tabla 2.2). Para ello, se realizó un tamizaje a tres concentraciones para posteriormente determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de los AEs activos. Todos los ensayos se realizaron por duplicado con tres réplicas.

Las bacterias fueron reactivadas por resiembra en placas de Petri con agar Mueller Hinton (MH) (Becton Dickinson, Nueva Jersey, EUA) por el método de siembra en estría. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 h. Posteriormente, se realizó una resiembra en caldo MH (Becton Dickinson, Nueva Jersey, EUA). Se obtuvo un cultivo secundario tomando 100 µL de la suspensión y transfiriéndolo a un tubo con 3 mL de caldo MH. El cultivo se incubó a 37 °C hasta alcanzar una turbidez comparable al estándar 0.5 de Mc Farland determinada con un densitómetro (Biosan Den-1, Riga, Letonia). Posteriormente, se realizó una dilución en una

proporción 1:50, que contiene 3×10^6 UFC/mL, que corresponde al inóculo de trabajo para el ensayo (Molina-Salinas *et al.*, 2006). Los AEs se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) con apoyo de un agitador tipo vórtex y baño ultrasonido y se autoesterilizaron por permanencia en el disolvente por 1 h previo a su evaluación (Gahnnadi *et al.*, 2012). Para estos ensayos se utilizó como máxima concentración del disolvente 2.5% v/v. Esta concentración no afecta la viabilidad de las cepas evaluadas, lo que fue determinado con anterioridad por nuestro grupo de trabajo (Dzul-Beh *et al.*, 2023).

Los AEs se evaluaron por el ensayo colorimétrico de resazurina en placa (REMA, por sus siglas en inglés Resazurin Microtiter Assay), descrito por Drummont y Waight (2000) y modificado por Sarke *et al.* (2007) en placas de 96 pozos (Corning-Costar 9535, Massachusetts, EUA). Brevemente, se añadieron 100 μ L del AEs disuelto en DMSO por duplicado a tres concentraciones (1000-250 μ g/mL) utilizando caldo MH. Posteriormente se agregaron 100 μ L del inóculo bacteriano de trabajo (3×10^6 UFC/mL) y las microplacas se incubaron a 37°C por 16 h. En la misma placa se incluyeron los siguientes controles: diluciones seriadas de tetraciclina (Sigma-Aldrich) como control positivo (1-0.25 μ g/mL), medio de cultivo sin inóculo como control de esterilidad y medio de cultivo con inóculo sin AEs como control de crecimiento bacteriano. Además, para descartar que el AE tenga un efecto sobre la reducción de la resazurina, se incluyeron pozos de 200 μ L a las mismas concentraciones evaluadas de los AEs, pero sin inóculo bacteriano (control de capacidad antioxidante).

Transcurrido el tiempo de incubación, las microplacas se revelaron añadiendo 30 μ L del colorante resazurina (Sigma-Aldrich) y se re-incubaron de 2 a 4 h. La adición de resazurina (color azul) funciona como un indicador redox que las células bacterianas metabólicamente activas lo reducen a resofurina (color rosa), lo que permite determinar la viabilidad antimicrobiana. Por lo tanto, si los pocillos de la placa se mantuvieron de color azul se consideró al AEs como positivo a la inhibición. Las evaluaciones se realizaron por duplicado con tres réplicas.

2.1.3.1.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria

Para aquellos AEs que fueron activos en el tamizaje, se realizó la determinación de su CMI por REMA utilizando seis diluciones seriadas (1000 a 31.25 μ g/mL). También se realizó la evaluación de compuestos puros presentes en los AEs bioactivos a las mismas concentraciones. Estos fueron: p -cimeno, α -humuleno, β -cariofileno y óxido de cariofileno (Sigma-Aldrich). El ensayo incluyó los mismos controles descritos con anterioridad y nuevamente las microplacas se incubaron a 37°C por 16 h. Posteriormente, se agregaron 30 μ L de una disolución de resazurina

al 0.015% a todos los pocillos y la placa se dejó por 2 h bajo las mismas condiciones de incubación. El resultado fue interpretado en términos de la CMI, definida como la concentración menor del AE que inhibe el crecimiento bacteriano, que se delimita como aquella que evita el cambio de color de la resazurina del azul a cualquier tonalidad rosa.

2.1.3.1.2. Determinación de la concentración mínima bactericida

En aquellos AEs que se determinó la CMI, se realizó una resiembra del cultivo bacteriano correspondiente a la concentración determinada como CMI, 2X y $\frac{1}{2}$ CMI en placas de agar MH (Becton Dickinson). Se añadieron 10 μ L de cada concentración a placas de agar MH y se incubaron a 37°C durante 16 h. La CMB se definió como la mínima concentración de AE que elimina a más del 99,9% de las bacterias viables después de un tiempo determinado de incubación. Se consideró como efecto bactericida cuando no existió crecimiento y bacteriostático cuando se observó crecimiento bacteriano sobre las placas de MH (Mogana *et al.*, 2020; Djeussj *et al.*, 2013).

2.1.3.2. Actividad de los aceites esenciales sobre factores de virulencia bacterianos

Para los AEs que presentaron actividad sobre el crecimiento de *A. baumannii*, se les realizó la evaluación de la actividad anti-QS utilizando como modelo la cepa *C. violaceum* ATCC 12472. También, se evaluó la actividad anti-catalasa bacteriana de *A. baumannii*, mediante el ensayo de sensibilidad al peróxido de hidrógeno utilizando como modelo la cepa de referencia ABA-ATCC-1605, previamente identificada por nuestro grupo de investigación como modelo de ensayo.

2.1.3.2.1. Determinación de efecto de los aceites esenciales sobre la producción de violaceína

Para determinar la actividad anti-QS se realizó el ensayo cuantitativo de la inhibición de violaceína en microplacas de 96 pozos (Noumi *et al.*, 2018). Primeramente, se prepararon concentraciones subinhibitorias de los AEs y compuestos puros en 100 μ L de caldo Luria Bertani (Becton Dickinson) seguido de la adición de 100 μ L del inóculo bacteriano (1×10^6 UFC/mL). Se incluyeron pocillos sin AEs (control negativo) y pocillos con una solución de cinamaldehído (Sigma-Aldrich) (control positivo). Las placas fueron incubadas a 30°C por 24 h. Posteriormente, el contenido de los pozos fue transferido a tubos tipo Eppendorf y las células bacterianas se lisaron mediante la adición de 200 μ L de una solución de SDS (Sigma-Aldrich) (10%), se agitaron durante 5 seg y se incubó a TA por cinco min. La violaceína total del cultivo bacteriano tratado se extrajo añadiendo 1 mL de una solución de butanol saturado con agua destilada (50 mL + 10 mL), seguido de centrifugación a 12,000 rpm por 10 min. Se transfirieron 200 μ L de la fase superior orgánica del

tubo a una placa de 96 pozos y se determinó la absorbancia a 595 nm. Finalmente, se calculó la concentración del AE que provocó la inhibición del 50% (CI_{50}) de la producción de violaceína mediante R. software. v.4.3.2. (Bali *et al.*, 2019). Con la finalidad de comparar el efecto de los AEs en la inhibición de la producción de la violaceína, se realizó un ANOVA de una vía para la media de los valores de CI_{50} de los tratamientos, además de un análisis a posteriori de comparaciones múltiples de Tukey. Los estadísticos con valores de $P \leq 0.05$ fueron considerados significativos. Los análisis se realizaron en R, software. v.4.3.2.

2.1.3.2.2. Determinación del efecto de los aceites esenciales sobre la actividad de catalasa

Para determinar la actividad anti-catalasa de los AEs sobre la sensibilidad de ABA-ATCC-1605 al H_2O_2 se siguió la metodología propuesta por Uc-Cachon *et al.* (2024). Se realizó un tamizaje a $\frac{1}{2}$ de la CMI para determinar aquellos AEs con actividad.

Primeramente, se realizaron cultivos bacterianos en tubos de vidrio con caldo MH tratados con $\frac{1}{2}$ CMI de los AEs. Se incluyeron cultivos con azitromicina (Sigma-Aldrich) como control positivo y se incubaron a $37^\circ C$ por 24 h. Posteriormente, el cultivo bacteriano y tratado se ajustó al 0.5 de Mc Farland, se transfirieron 150 μL a tubos tipo Eppendorf, se añadieron 150 μL de una disolución de H_2O_2 () al 0.125 mM y se incubaron a $37^\circ C$ por 1 h. Para cada tratamiento se incluyeron controles sin H_2O_2 (Crisol) agregando 150 μL de caldo MH. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas en caldo MH, agregando 50 μL en una placa de agar MH. Las placas fueron incubadas por 24 h y se determinó el porcentaje de mortalidad en función del número de colonias supervivientes al tratamiento con H_2O_2 . Para aquellos AEs que provocaron la sensibilidad de la cepa al H_2O_2 , se les realizó la evaluación de $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{64}$ de la CMI, siguiendo el procedimiento descrito con anterioridad.

2.1.3.3. Actividad de los aceites esenciales sobre los mecanismos de fármacorresistencia de *A. baumannii*

Para los AEs que presentaron actividad sobre el crecimiento de *A. baumannii*, se les realizó la evaluación de la actividad antifármacorresistencia desde dos abordajes antibiopelículas: inhibición y degradación de la biopelícula formada por una cepa de referencia ABA-ATCC-1605 y el aislado clínico ABA-UIMY-81, previamente caracterizados como formadores de biopelículas mediante el método colorimétrico de microdilución con cristal violeta (Uc-Cachón *et al.*, 2024).

2.1.3.3.1. Determinación de la actividad anti-formación de biopelículas

Primeramente, se reactivaron las cepas en caldo tripticasa soya (CTS) (Becton Dickinson) una noche previa y se realizó un cultivo secundario que se ajustó a una turbidez equiparable al estándar 0.5 de McFarland. La suspensión bacteriana fue diluida en una proporción 1:50 en caldo TS enriquecido con 1% (v/v) de glucosa (Sigma-Aldrich). Posteriormente, 100 μ L de la suspensión fueron agregados a una microplaca de 96 pozos donde previamente los AEs de interés se prepararon en una serie de 6 concentraciones subinhibitorias de 1/2 a 1/64 valor de su CMI. Se incluyó como control positivo el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA; Sigma-Aldrich) y como control negativo cultivos sin AEs. Las microplacas se incubaron a 37 °C por 24 h. Posteriormente los cultivos fueron decantados y se realizaron tres lavados con agua destilada estéril para eliminar el resto de las bacterias plantónicas. Las biopelículas se fijaron con calor por 45 min a 60 °C. Luego, las biopelículas bacterianas fueron teñidas con 200 μ L de una disolución de cristal violeta (Sigma-Aldrich) al 0.1% por 30 min a TA. El exceso del colorante se retiró con lavados con agua destilada estéril, seguido de la adición de 200 μ L de ácido acético al 40% (v/v) para liberar el color y medir la absorbancia del cristal violeta a 490 nm mediante un lector de microplacas. Los ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron en % de inhibición y se calculó la CI_{50} de cada AE con apoyo del programa R. software. v.4.3.2. (Abd El-Rahman *et al.*, 2023; Uc-Cachón *et al.*, 2021). Con la finalidad de comparar el efecto de los AEs en la inhibición de biopelículas, se realizó un ANOVA de dos vías para la media de los valores de CI_{50} de los tratamientos sobre ambas cepas, además de un análisis *a posteriori* de comparaciones múltiples de Tukey. Los factores considerados fueron tratamiento (AEs o compuestos puros) y cepa (aislado clínico o cepa de referencia). Los estadísticos con valores de $P < 0.05$ fueron considerados significativos. Los análisis se realizaron en R. software. v.4.3.2.

2.1.3.3.2. Análisis por microscopía electrónica de barrido del efecto anti-formación de biopelículas

Los AEs que resultaron activos en la inhibición de la formación de biopelículas en términos de CI_{50} se evaluaron morfométricamente. Para observar los cambios en la estructura de las biopelículas se utilizó la técnica de microscopía electrónica de barrido (MEB) siguiendo la metodología propuesta por Gómez-Sequeda *et al.* (2020), con ligeras modificaciones. Para ello, se emplearon secciones de cubreobjetos de vidrio estériles que fueron depositados en el fondo de microplacas de 96 pozos. Posteriormente, se agregó 100 μ L del inóculo bacteriano en caldo CTS (Becton Dickinson) enriquecido con glucosa (1%) (Sigma-Aldrich) y se incubaron a 37 °C durante 24 h, en presencia y ausencia de 100 μ L de disoluciones de CTS conteniendo 1/2, 1/4 y

1/8 de la CMI de los AEs. Como control negativo se incluyeron biopelículas sin agregar AE. Después de 24 h, estas secciones de vidrio fueron recuperados de los pozos y se realizaron lavados con agua destilada estéril para eliminar las células planctónicas. Luego, fueron fijadas con glutaraldehído (Sigma-Aldrich) al 2.5% durante 2 h. Posteriormente se retiró el glutaraldehído y se realizaron lavados con agua destilada. Las muestras fueron deshidratadas en un gradiente de etanol (Sigma-Aldrich) del 30, 50 y 70%, dejando cada disolución por 30 min a TA. Para su observación por microscopía electrónica de barrido (MEB), los cultivos tratados y no tratados con AEs se dejaron secar por 1 h a TA. Las secciones de cubreobjetos de vidrio fueron recubiertas con una capa de oro y montadas en tubos de aluminio. Las muestras fueron observadas usando el MEB (JEOL, JSM-6360 LV) bajo las siguientes condiciones: alto vacío, voltaje de aceleración de 15 kV y un aumento de 1500x, 10,000x y 20,000x.

2.1.3.3.3. Determinación de la actividad degradativa de biopelículas

El ensayo se realizó en microplacas de poliestireno de 96 pozos. Brevemente, se realizó un cultivo en caldo MH de una noche previa que fue ajustado a una turbidez equiparable al estándar 0.5 de McFarland. La suspensión bacteriana fue diluida 1:100 en CTS (Becton Dickinson) que estaba enriquecido con 1% de glucosa (Sigma-Aldrich). Se adicionaron 200 µL de la suspensión en cada pocillo y se incubaron por 24 h a 37°C para permitir la formación de la biopelícula.

Posteriormente el contenido de los pozos fue decantado y se hicieron lavados con solución salina con fosfato (Sigma-Aldrich) Se adicionaron 200 µL de disoluciones de CTS (Becton Dickinson) a cada pozo que contenían una serie de 6 concentraciones subinhibitorias de los AEs de 1/2 a 1/64 de valor de su CMI, y se incubaron durante a 37°C por 24 h. Se incluyeron pocillos sin AEs (control negativo) y pocillos con una disolución de EDTA (Sigma-Aldrich) (control positivo) (500, 400, 300, 200, 100, 50 µg/mL). La placa de ensayo se incubó de nuevo durante 24 h a 37 °C; posteriormente el contenido de la placa fue decantado y lavado tres veces con agua destilada estéril para posteriormente fijar y teñir las biopelículas con cristal violeta como previamente se describió en el método anterior. Se determinó la DO a 490 nm y se calculó la concentración del AE que provoca la degradación del 50% (CD₅₀) de la biopelícula mediante R. software. v.4.3.2. (Dzib-Baak *et al.*, 2022; Stepanović *et al.*, 2007).

2.1.3.3.4. Determinación del efecto modulador de la resistencia a antibióticos de los AEs

Para determinar la actividad de los AEs en la resistencia a los antibióticos vía bombas de eflujo se realizó el ensayo de reversión de la resistencia utilizando como modelos los aislados clínicos MDR UIMY-ABA-16 y UIMY-ABA-5, que se caracterizaron fenotípicamente por poseer bombas

de eflujo como mecanismo de resistencia a los antibióticos amikacina (AMK) e imipenem (IMP), respectivamente (Uc-Cachón *et al.*, 2024). Para este ensayo, previamente se determinó la CMI de los AEs sobre los aislados clínicos por el método de REMA.

El ensayo se realizó en microplacas de poliestireno de 96 pozos. Se adicionaron 50 µL de disoluciones en caldo MH (Becton Dickinson) que contenían concentraciones de IMP (Sigma-Aldrich) (256 a 2 µg/mL) y AMK (Sigma-Aldrich) (256 a 1 µg/mL). Luego, se agregaron a los pozos 50 µL de los AEs en concentraciones equivalentes a ½ CMI, seguido de 100 µL de inóculo bacteriano (1×10^6 UFC/mL). Todos los ensayos incluyeron un control positivo (cultivos con el inhibidor de bomba de eflujo: fenilalanina-arginina-β-naftilamida [Sigma-Aldrich] a 50 µg/mL), un control negativo (caldo de cultivo con los antibióticos sin AEs) y un control de esterilidad (caldo de cultivo sin inóculo). Las placas fueron incubadas a 37°C por 16 h, posteriormente las CMI se determinaron por REMA, como se describió anteriormente. El factor de modulación de antibióticos (FMA), calculado como CMI (antibiótico sólo) / CMI (antibiótico + AEs), se utilizó para expresar los efectos moduladores de los AEs. (Uc-Cachón *et al.*, 2024).

2.1.4. Actividad citotóxica de los aceites esenciales bioactivos

La actividad citotóxica de los AEs bioactivos se evaluó sobre líneas celulares de primate (ATCC CCL-8). Las líneas celulares fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB; Sigma-Aldrich), 10,000 U de penicilina, 10 mg/mL de estreptomicina (Biowest). Los cultivos celulares se mantuvieron en una atmósfera con 95% de humedad y 5% de CO₂ a 37 °C.

El ensayo se realizó por el método de tinción con sulforodamina B en placas de cultivo celular de 96 pozos. Primeramente, a cada pozo se le adicionó 100 µL de medio con 10% de SFB con una densidad celular de 50,000 células/mL y se incubó por 24 h. Al término de este tiempo, el medio fue retirado y se añadió 100 µL de medio nuevo sin SFB (Sigma-Aldrich). Posteriormente, se adicionaron 100 µL de medio donde previamente se disolvieron los AEs y finalmente se realizan las diluciones seriadas evaluándose los AEs en un rango de 1000-62.5 µg/mL. Las placas se incubaron por 48 h y al término de este tiempo se decantó el medio y las células fueron fijadas con 50 µL de una disolución de ácido tricloroacético (Sigma-Aldrich) al 10%, incubándose las placas a 4°C durante 30 min. Seguidamente se retiró el sobrenadante y se adicionaron 50 µL de una disolución de sulforodamina B (0.1% sulforadamina B en ácido acético al 1%) y se dejó reaccionar durante 15 min. Finalmente se decantó el sobrenadante y se realizaron cuatro lavados con una disolución de ácido acético (Sigma-Aldrich) al 1%. La tinción se solubilizó con 100 µL de

una disolución de tris-base (Sigma-Aldrich) (10 mM) y se determinó DO a 540 nm. La actividad citotóxica se determinó empleando la siguiente fórmula $(DO_{\text{control}} - DO_{\text{extracto}} / DO_{\text{control}}) \times 100$. Las evaluaciones sobre cada línea celular se realizaron por triplicado. La actividad se expresó como concentración citotóxica 50 (CC_{50}) que se determinó mediante R. software. v.4.3.2. Se calculó el índice de selectividad (IS) para los AEs bioactivos en cada uno de los modelos *in vitro* dividiendo la CC_{50} entre la CI_{50} o la CMI para cada AEs, según sea el caso (Dzul-Beh *et al.*, 2019).

2.1.5. Análisis de la relación entre la actividad antiinfecciosa con la composición química de los aceites esenciales

Con la finalidad de analizar la relación entre la actividad biológica y la composición química de los AEs estudiados, e identificar metabolitos asociados con la actividad antiinfecciosa, se empleó un análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA, por sus siglas en inglés) utilizando MetaboAnalyst V.6.0. Se construyó una matriz de Excel que consistía en dos partes; 1) el porcentaje de área para cada uno de los compuestos detectados en los AEs, 2) una clasificación categórica de la actividad. Para esta matriz se consideraron sólo aquellos compuestos con un porcentaje de área >5% y la clasificación categórica se determinó como “activo” y “no activo” considerando los resultados experimentales obtenidos en cada modelo evaluado. El modelo de OPLS-DA fue evaluado mediante los coeficientes R^2 (capacidad explicativa) y Q^2 (capacidad predictiva), calculados a través de un procedimiento de validación cruzada de 5 pliegues. Estos parámetros aseguraron la robustez y validez estadística del modelo. Para identificar los metabolitos que contribuyen significativamente a la separación y discriminación de los grupos se calcularon los valores de importancia de las variables (VIP, por sus siglas en inglés) y se construyó un gráfico S-plot. Este último permitió visualizar la carga y correlación de cada metabolito en la discriminación de los grupos, destacando aquellos más asociados con la actividad antiinfecciosa. Sólo se consideraron aquellos metabolitos con un alto valor de carga predictiva (valor de p) y un VIP mayor a 1. Se realizaron cuatro modelos OPLS-DA con base en los resultados obtenidos en: 1) la evaluación sobre el crecimiento, 2) la actividad anti-biopelículas y anti-catalasa, 3) la actividad en la modulación de la resistencia vía bombas de eflujo, 4) la actividad anti-QS. Para el primer modelo se consideró la actividad mostrada por los 10 AEs estudiados, para los demás modelos sólo se consideraron los resultados presentados por LOR, PAU, PAM y AHI, ya que el resto de los AEs no fueron evaluados bajo estos modelos (Pineda-Alegría *et al.*, 2024; Mohanty *et al.*, 2023).

CAPÍTULO III

3.1. RESULTADOS

3.1.1. Composición química de los aceites esenciales

En la tabla 3.1 se muestran los compuestos identificados por CG-EM en el AE de LOR. Se destaca el timol (48.9%) como compuesto mayoritario, seguido del *p*-cimeno (16.2%) y β -cariofileno (9.4%), que juntos representaron el 74.6% del total de la composición del AE. Un gran porcentaje de los compuestos identificados son monoterpenos (76.9%), particularmente monoterpenos oxigenados (57.0%).

Tabla 3.1. Composición química del aceite esencial de *Lippia origanoides*

Pico	Compuesto	Clase	IR ^a	IR ADAMS ^b	% área	Método de identificación ^c
1	Mirceno	M	992	988	3.6	IR, MS
2	<i>p</i> -Cimeno	M	1030	1020	16.2	IR, MS, IE
3	Eucaliptol	MO	1037	1026	4.0	IR, MS, IE
4	Timol, metil-éter	MO	1239	1232	4.1	IR, MS
5	Timol	MO	1302	1289	48.9	IR, MS, IE
6	β -Cariofileno	S	1439	1417	9.4	IR, MS, IE
7	α -Humuleno	S	1475	1452	4.9	IR, MS, IE
8	Óxido de cariofileno	SO	1607	1582	3.0	IR, MS, IE
% total de clase de compuestos						
Monoterpenos					19.8	
Monoterpenos oxigenados					57.0	
Sesquiterpenos					14.3	
Sesquiterpenos oxigenados					3.0	
% total identificado					94.1	

a) Índices de retención calculado experimentalmente relativo a una serie de n-alcanos (C8-C40). b) Índices de retención bibliográficos (Adams, 2007). c) método de identificación: IR = identificación tentativa basada en el índice de retención, MS= identificación tentativa basada en espectrometría de masas con cromatografía en columna DB-5, IE= identificación confirmatoria con estándares comerciales. M= Monoterpeno, MO= Monoterpeno oxigenado, S= Sesquiterpeno, SO= Sesquiterpeno oxigenado. Los tres compuestos más abundantes se resaltan en gris.

En la tabla 3.2. se muestran los compuestos identificados en el AE de BSI. Se identificó la presencia del α -pineno (65.2%) como compuesto claramente mayoritario. Además, se detectaron otros monoterpenos como β -pineno (11.8%) y limoneno (4.4%). Fue el único AEs en el que no se identificaron sesquiterpenos.

Tabla 3.2. Composición química del aceite esencial de *Bursera simaruba*.

Pico	Compuesto	Clase	IR ^a	IR ADAMS ^b	% área	Método de identificación ^c
1	α -Pino	M	944	932	65.2	IR, MS, IE
2	Canfeno	M	955	946	1.3	IR, MS, IE
3	β -Pino	M	984	974	11.8	IR, MS
4	Mirceno	M	992	988	1.0	IR, MS, IE
5	Limoneno	M	1034	1024	4.4	IR, MS, IE
6	<i>trans</i> -Pinocarveol	MO	1148	1135	1.0	IR, MS
7	<i>trans</i> -Verbenol	MO	1153	1140	1.3	IR, MS
8	NI		1309		3.2	
9	NI		1318		1.4	
10	NI		1321		1.4	
% total de clase de compuestos						
Monoterpenos					83.7	
Monoterpenos oxigenados					2.3	
% total identificado					86.0	

Letras y abreviaturas iguales a las de la Tabla 3.1. NI = no identificado. Los tres compuestos más abundantes se resaltan en gris.

La composición química del AE de PAU se encuentra mayoritariamente representada por safrol (70.2%), seguido en menor proporción por sesquiterpenos como β -cariofileno (4.6%) y germacreno D (4.3%) (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Composición química del aceite esencial de *Piper auritum*.

Pico	Compuesto	Clase	IR ^a	IR ADAMS ^b	% área	Método de identificación ^c
1	Safrol	MO	1308	1285	70.2	IR, MS, IE
2	α -Copaeno	S	1391	1374	1.0	MS, IE
3	β -Cariofileno	S	1441	1417	4.6	IR, MS, IE
4	Germacreno D	S	1501	1480	4.3	IR, MS
5	Biciclogermacreno	S	1516	1500	2.7	IR, MS
6	Miristicina	S	1533	1517	2.4	IR, MS, IE
7	Espatuleno	SO	1600	1577	3.4	IR, MS, IE
8	Óxido de cariofileno	SO	1610	1582	1.2	IR, MS, IE
9	Fitol	DO	2118	1942	1.0	IR, MS, IE
% total de clase de compuestos						
Monoterpenos oxigenados					70.2	
Sesquiterpenos					15.0	
Sesquiterpenos oxigenados					4.6	
Diterpenos oxigenados					1.0	
% total identificado					90.8	

Letras y abreviaturas iguales a las de la Tabla 3.1. DO= Diterpeno oxigenado. Los tres compuestos más abundantes se resaltan en gris.

En la tabla 3.4 se describe la composición química del AE de PAM, que contrasta con la composición del AE del mismo género PAU, ya que se encuentra representada totalmente por

sesquiterpenos (84.4%). Los compuestos mayoritarios identificados fueron β -bisaboleno (33.8%), β -cariofileno (12.9%) y α -curcumeno (12.7%).

Tabla 3.4. Composición química del aceite esencial de *Piper amalago*.

Pico	Compuesto	Clase	IR ^a	IR ADAMS ^b	% área	Método de identificación ^c
1	δ -Elemeno	S	1352	1335	2.4	IR, MS
2	β -Elemeno	S	1407	1389	1.0	IR, MS
3	β -Cariofileno	S	1443	1417	12.9	IR, MS, IE
4	FaRneseno	S	1465	1440	4.2	IR, MS
5	α -Curcumeno	S	1496	1479	12.7	IR, MS
6	Germacreno D	S	1502	1480	1.4	IR, MS
7	α -Zingibereno	S	1507	1493	2.8	IR, MS
8	β -Bisaboleno	S	1525	1505	33.8	IR, MS
9	NI		1651		1.0	
10	β -Sesquifelandreno	S	1540	1521	7.6	IR, MS
11	Óxido de cariofileno	SO	1610	1582	2.9	IR, MS, IE
12	2-Pendadecanona	SO	1703	1682	1.0	IR, MS
13	4-(1,5-dimetilhex-4-il) ciclohex-2-en-1-ona	SO	1708	1677	1.3	IR, MS
14	NI		1713		1.0	
15	NI		1801		2.3	
16	NI		1826		2.5	
17	NI		1888		3.1	
18	NI		1910		1.3	
19	NI		1927		1.2	
% total de clase de compuestos						
Sesquiterpenos					79.2	
Sesquiterpenos oxigenados					5.2	
% total identificado					84.4	

Letras y abreviaturas iguales a las de la Tabla 3.1. NI = no identificado. Los tres compuestos más abundantes se resaltan en gris.

En la tabla 3.5 se puede observar que los tres compuestos más abundantes del AE de AHI son espatulenol (15.8%), óxido de cariofileno (8.1%) y α -pineno (7.7%). En contraste con el AE de LOR, el AE de AHI se encuentra representado en su mayoría por sesquiterpenos (57.9%). Fue el único AE donde se identificaron diterpenos como el kaureno y su derivado oxigenado kauran-16-ol.

Tabla 3.5. Composición química del aceite esencial de *Ambrosia hispida*.

Pico	Compuesto	Clase	IR ^a	IR ADAMS ^b	% área	Método de identificación ^c
1	α -Pineno	M	938	932	7.7	IR, MS, IE
2	Limoneno	M	1033	1024	1.3	IR, MS, IE
3	Silfiferol-5-ene	S	1340	1326	1.5	IR, MS
4	Silfineno	S	1363	1345	2.3	IR, MS
5	α -Copaeno	S	1391	1374	1.0	IR, MS
6	Modheph-2-ene	S	1399	1382	2.4	IR, MS
7	β -Elemeno	S	1405	1389	2.0	IR, MS
8	α -Isocomeno	S	1407	1387	2.4	IR, MS
9	β -Isocomeno	S	1430	1408	1.5	IR, MS
10	Aromadendreno	S	1459	1439	1.3	IR, MS, IE
11	α -Curcumeno	S	1493	1479	6.8	IR, MS
12	α -Muroleno	S	1515	1500	1.6	IR, MS
13	γ -Cadineno	S	1532	1513	2.0	IR, MS
14	Nerolidol E	SO	1572	1561	2.9	IR, MS, MSW
15	Espatulenol	SO	1604	1577	15.8	IR, MS, IE
16	Óxido de cariofileno	SO	1610	1582	8.1	IR, MS, IE
17	Veltonal	SO	1618	1599	2.5	IR, MS
18	NI		1623		1.5	
19	Epóxido II de humuleno	SO	1634	1608	1.8	IR, MS
20	NI		1661		5.4	
21	NI		1688	1660	1.1	IR, MS
22	Amorfa-4,7(11)-dieno	SO	1795	1775	1.3	IR, MS, MSW
23	Ácido hexadecanoico	AG	1950	1910	1.3	IR, MS
24	Kaureno	D	2093	2042	3.2	IR, MS,
25	NI		2194		1.0	
26	NI		2234		1.8	
27	Kauran-16-ol	DO	2295	2252	3.0	IR, MS
% total de clase de compuestos						
Monoterpeno					9.0	
Sesquiterpeno					24.8	
Sesquiterpeno oxigenado					32.4	
Diterpeno					3.2	
Diterpeno oxigenado					3.0	
Ácido graso					1.3	
% total identificado					73.7	
% total					84.5	

Letras y abreviaturas iguales a las de la Tabla 3.1. NI= no identificado, AG= Ácido graso, D= Diterpeno, DO= Diterpeno oxigenado. Los tres compuestos más abundantes se resaltan en gris.

La composición química del AE de HSU está dominada por una variedad de sesquiterpenos, siendo los más abundantes β -cariofileno (16.2%), espatulenol (12.4%) y α -bergamoteno (7.5%) (Tabla 3.6.).

Tabla 3.6. Composición química del aceite esencial de *Hyptis suaveolens*.

Pico	Compuesto	Clase	IR ^a	IR ADAMS ^b	% área	Método de identificación ^c
1	Sabineno	M	977	969	3.8	IR, MS
2	β -Pineno	M	981	974	1.0	IR, MS, IE
3	<i>p</i> -Cimeno	M	1028	1020	2.7	IR, MS, IE
4	Limoneno	M	1033	1024	2.0	IR, MS, IE
5	Eucaliptol	MO	1036	1026	1.1	IR, MS, IE
6	Terpinoleno	MO	1093	1086	1.6	IR, MS
7	α -Cubebeno	S	1362	1345	1.1	IR, MS
8	α -Copaeno	S	1393	1374	6.6	IR, MS
9	β -Bourboneno	S	1403	1387	3.0	IR, MS
10	β -Elemeno	S	1405	1389	1.7	IR, MS
11	β -Cariofileno	S	1444	1417	16.2	IR, MS, IE
12	α -Bergamoteno	S	1451	1411	7.5	IR, MS
13	α -Humuleno	S	1475	1452	2.1	IR, MS, IE
14	Germacreno D	S	1502	1480	5.1	IR, MS
15	β -Selineno	S	1507	1489	1.0	IR, MS
16	Elixeno	S	1518	1492	4.0	IR, MS
17	Cubebol	SO	1544	1533	1.1	IR, MS
18	Espatuleno	SO	1606	1577	11.4	IR, MS, IE
19	Óxido de cariofileno	SO	1611	1582	4.4	IR, MS, IE
20	Pogostol	SO	1678	1651	1.8	IR, MS
21	Bergamotol	SO	1711	1690	5.5	IR, MS
22	Abietatrieno	D	2094	2055	1.2	IR, MS
% total de clase de compuestos						
Monoterpenos					9.5	
Monoterpenos oxigenados					2.7	
Sesquiterpenos					44.3	
Sesquiterpenos oxigenados					24.2	
% total identificado					86.0	

Letras y abreviaturas iguales a las de la Tabla 3.1. D= Diterpeno. Los tres compuestos más abundantes se resaltan en gris.

En la tabla 3.7. se muestran los compuestos identificados en el AE de CYU. La composición química estuvo totalmente representada por sesquiterpenos siendo el α -bisabolol (16.2%), óxido de cariofileno (14.4%) y β -cariofileno (13.0%) los más abundantes.

Tabla 3.7. Composición química del aceite esencial de *Croton yucatanensis*

Pico	Compuesto	Clase	IR ^a	IR ADAMS ^b	% área	Método de identificación ^c
1	α -Copaeno	S	1392	1374	2.6	IR, MS
2	β -Bourboneno	S	1405	1387	9.9	IR, MS
3	β -Cariofileno	S	1443	1417	13.0	IR, MS, IE
4	β -Copaeno	S	1449	1430	1.5	IR, MS
5	α -Humuleno	S	1475	1452	1.9	IR, MS, IE
6	Aromadendreno	S	1482	1458	1.1	IR, MS, MSW
7	γ -Muroloeno	S	1493	1478	1.4	IR, MS
8	Germacreno D	S	1500	1484	1.2	IR, MS
9	β -bisaboleno	S	1520	1505	2.2	IR, MS
10	Espatulenol	SO	1598	1577	4.2	IR, MS
11	Óxido de cariofileno	SO	1613	1582	14.4	IR, MS, IE
12	NI		1634		1.0	
13	Epóxido II de humuleno	SO	1636	1608	1.3	IR, MS
14	Cubenol-1, 10-di-epi	SO	1638	1618	1.3	IR, MS
15	γ -Eudesmol	SO	1647	1622	1.5	IR, MS
16	α -Cadinol	SO	1676	1652	1.0	IR, MS
17	NI		1679		1.0	
18	α -Bisabolol	SO	1706	1685	16.2	IR, MS
% total de clase de compuestos						
Sesquiterpenos					35.1	
Sesquiterpenos oxigenados					40.2	
% total identificado					75.3	

Letras y abreviaturas iguales a las de la Tabla 3.1. NI= no identificado. Los tres compuestos más abundantes se resaltan en gris.

En la tabla 3.8 se puede observar que los tres compuestos más abundantes del AE de TDI fueron α -humuleno (11.3%), β -cariofileno (9.3%) y óxido de cariofileno (8.5). Los sesquiterpenos fueron la clase química más dominante.

Tabla 3.8. Composición química del aceite esencial de *Turnera diffusa*.

Pico	Compuesto	Clase	IR ^a	IR ADAMS ^b	% área	Método de identificación ^c
1	α -Pino	M	938	932	2.4	IR, MS, IE
2	β -Pino	M	981	974	2.9	IR, MS, IE
3	Eucaliptol	MO	1037	1026	3.0	IR, MS, IE
4	α -Cubebeno	S	1362	1345	1.3	IR, MS
5	α -Copaeno	S	1393	1374	5.0	IR, MS
6	β -Bourboneno	S	1403	1387	4.3	IR, MS
7	β -Cariofileno	S	1443	1417	9.3	IR, MS, IE
8	Guaiadieno	S	1461	1442	2.0	IR, MS
9	α -Humuleno	S	1478	1452	11.3	IR, MS, IE
10	Aromadendreno	S	1405	1458	3.7	IR, MS, MSW
11	γ -Murolo	S	1495	1478	4.6	IR, MS
12	Germacreno D	S	1502	1480	1.7	IR, MS
13	Guaieno	S	1516	1492	1.5	IR, MS
14	Calameneno	S	1541	1521	4.2	IR, MS
15	Espatuleno	SO	1599	1577	5.9	IR, MS
16	Óxido de cariofileno	SO	1613	1582	8.5	IR, MS, IE
17	Epóxido II de humuleno	SO	1636	1608	7.5	IR, MS
18	NI		1658		1.4	
19	NI		1662		1.4	
20	β -Eudesmol	SO	1677	1649	1.1	IR, MS
21	NI		1679		1.2	IR, MS
% total de clase de compuestos						
Monoterpenos					4.3	
Monoterpenos oxigenados					3.0	
Sesquiterpenos					48.9	
Sesquiterpenos oxigenados					23.0	
% total identificado					80.2	

Letras y abreviaturas iguales a las de la Tabla 3.1. NI= no identificado. Los tres compuestos más abundantes se resaltan en gris.

La mayor parte del AE de LCA está representada por sesquiterpenos. Los compuestos más abundantes fueron óxido de cariofileno (37.8%), β -cariofileno (25.8%) y sabineno (6.1%) (Tabla 3.9).

Tabla 3.9. Composición química del aceite esencial de *Lantana canescens*.

Pico	Compuesto	Clase	IR ^a	IR ADAMS ^b	% área	Método de identificación ^c
1	Sabineno	M	977	969	6.1	IR, MS
2	α -Copaeno	S	1391	1374	3.6	IR, MS
3	β -Elemeno	S	1405	1389	3.9	IR, MS
4	β -Cariofileno	S	1445	1417	25.8	IR, MS, IE
5	α -Humuleno	S	1475	1452	3.7	IR, MS, IE
6	Aromadendreno	S	1482	1458	1.6	IR, MS, MSW
7	γ -Muroleno	S	1492	1478	1.2	IR, MS
8	Óxido de cariofileno	SO	1615	1582	37.8	IR, MS, IE
9	Epóxido II de humuleno	SO	1636	1608	2.5	IR, MS
% total de clase de compuestos						
Monoterpenos					6.1	
Sesquiterpenos					38.2	
Sesquiterpenos oxigenados					40.3	
% total identificado					86.2	

Letras y abreviaturas iguales a las de la Tabla 3.1. Los tres compuestos más abundantes se resaltan en gris.

Los sesquiterpenos predominaron en el AEs de OCA, siendo el compuesto más abundante β -cariofileno (24.7%). También se identificaron monoterpenos importantes como el metil eugenol (21.8%), eugenol (7.5%) y eucaliptol (5.5%) (Tabla 3.10).

Tabla 3.10. Composición química del aceite esencial de *Ocimum campechianum*.

Pico	Compuesto	Clase	IR ^a	IR	% área	Método de identificación ^c
1	Limoneno	M	1035	1022	3.7	IR, MS, IE
2	Eucaliptol	MO	1038	1026	5.5	IR, MS, IE
3	Canfor	MO	1154	1141	1.4	IR, MS, IE
4	Eugenol	MO	1369	1356	7.5	IR, MS, IE
5	β -Elemeno	S	1405	1389	1.0	IR, MS, IE
6	Metil eugenol	MO	1418	1403	21.8	IR, MS
7	β -Cariofileno	S	1447	1417	24.7	IR, MS, IE
8	α -Humuleno	S	1476	1452	3.7	IR, MS, IE
9	Germacreno D	S	1501	1480	3.4	IR, MS
10	Biciclogermacreno	S	1520	1500	11.7	IR, MS
11	β -Bisaboleno	S	1523	1505	6.0	IR, MS
% total de clase de compuestos						
Monoterpenos					3.7	
Monoterpenos oxigenados					36.2	
Sesquiterpenos					50.5	
% total identificado					90.4	

Letras y abreviaturas iguales a las de la Tabla 3.1. Los tres compuestos más abundantes se resaltan en gris.

En la Tabla 3.11 se resume el porcentaje de área para los metabolitos identificados en los 10 AEs. Se observa que el β -cariofileno y óxido de cariofileno fueron los compuestos más ampliamente distribuidos, ya que se encontraron en 8 de los 10 AEs estudiados. Otros compuestos presentes en varios AEs fueron el α -humuleno, germacreno D, espatulenol y α -copaeno.

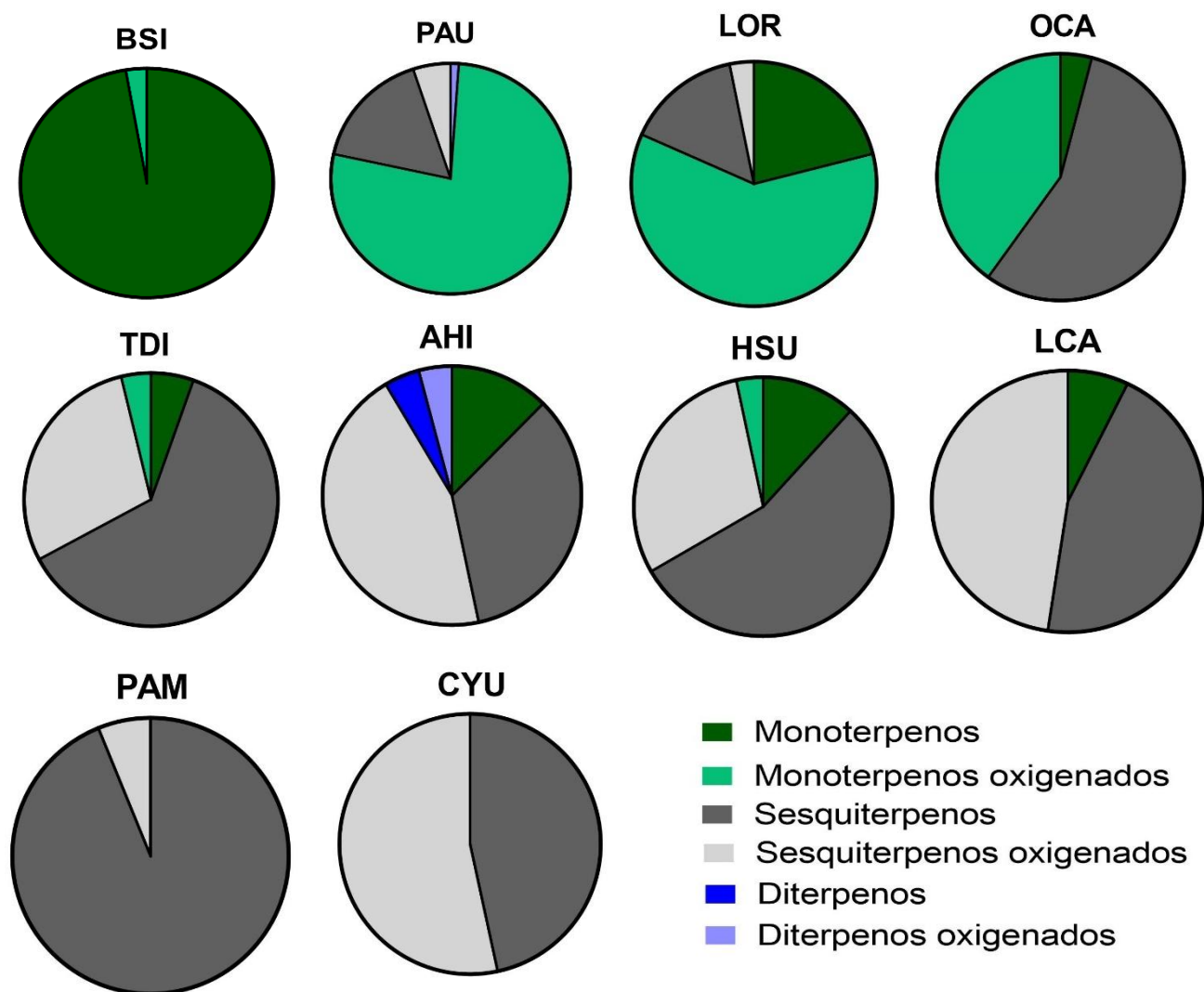
Tabla 3.11. Composición química de los diez aceites esenciales analizados.

Compuestos	AEs									
	LOR	BSI	PAU	PAM	AHI	HSU	CYU	TDI	LCA	OCA
α -Pino	-	65.2	-	-	7.7	-	-	2.5	-	-
Sabineno	-	-	-	-	-	3.9	-	-	6.2	-
β -Pino	-	11.8	-	-	-	1.1	-	1.9	-	-
Mirceno	3.6	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>p</i> -Cimeno	16.2	-	-	-	-	2.8	-	-	-	-
Limoneno	-	4.4	-	-	1.3	2.1	-	-	-	3.7
Eucaliptol	4.0	-	-	-	-	1.1	-	3.0	-	5.5
Timol, metil-eter	4.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Timol	48.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Safrol	-	-	70.2	-	-	-	-	-	-	-
Eugenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.5
α -Copaeno	-	-	1.0	-	1.0	6.7	2.6	5.0	-	-
Modif-2-eno	-	-	-	-	2.4	-	-	-	-	-
Silfineno	-	-	-	-	2.3	-	-	-	-	-
β -Bourboneno	-	-	-	-	-	3.1	10.0	4.3	-	-
NI_BSI	-	3.2	-	-	-	-	-	-	-	-
NI_PAM	-	-	-	2.3	-	-	-	-	-	-
β -Elemeno	-	-	-	1.0	2.0	1.8	-	-	-	1.0
α -Isocomeno	-	-	-	-	2.4	-	-	-	-	-
Metil eugenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21.8
Farneseno	-	-	-	4.2	-	-	-	-	-	-
α -Curcumeno	-	-	-	12.7	6.8	-	-	-	-	-
β -Cariofileno	9.4	-	4.6	12.9	-	16.2	13.1	9.4	25.9	24.7
α -Bergamoteno	-	-	-	-	-	7.5	-	-	-	-
Guaiadieno<6,9->	-	-	-	-	-	-	-	2.0	-	-
α -Humuleno	4.9	-	-	-	-	2.2	2.0	11.4	3.8	3.7
Aromadendreno	-	-	-	-	1.3	-	1.1	3.7	1.7	-
δ -Elemeno	-	-	-	2.4	-	-	-	-	-	-
γ -Muroleno	-	-	-	-	-	-	1.4	4.7	1.3	-
Germacreno D	-	-	4.3	1.4	-	5.1	1.2	1.8	-	3.4
Biciclogermacreno	-	-	2.7	-	-	-	-	-	-	11.7
Elixeno	-	-	-	-	-	4.0	-	-	-	-
α -Zingibereno	-	-	-	2.8	-	-	-	-	-	-
β -Bisaboleno	-	-	-	33.8	-	-	2.2	-	-	6.0

α -Bisabolol	-	-	-	-	-	-	16.3	-	-	-
γ -Cadineno	-	-	-	-	2.0	-	-	-	-	-
Nerolidol E	-	-	-	-	2.9	-	-	-	-	-
Miristicina	-	-	2.4	-	-	-	-	-	-	-
Calameneno	-	-	-	-	-	-	-	4.2	-	-
NI_PAM	-	-	-	2.5	-	-	-	-	-	-
Espatulenol	-	-	3.4	-	15.8	11.4	4.2	5.9	-	-
β -Sesquifelandreno	-	-	-	7.6	-	-	-	-	-	-
NI_PAM	-	-	-	3.1	-	-	-	-	-	-
Óxido de cariofileno	3.0	-	1.2	2.9	8.1	4.4	14.5	8.5	37.8	-
Veltonal	-	-	-	-	2.5	-	-	-	-	-
Epóxido II de humuleno	-	-	-	-	1.8	-	1.3	7.6	2.5	-
NI_AHI	-	-	-	-	5.4	-	-	-	-	-
z - α -Bergamotol	-	-	-	-	-	5.5	-	-	-	-
Kaureno	-	-	-	-	3.2	-	-	-	-	-
Kauran-16-ol	-	-	-	-	3.0	-	-	-	-	-

Sólo se presentan los metabolitos con un porcentaje de área $\geq 1\%$. Se resaltan en gris los metabolitos que estuvieron presentes en cuatro o más aceites esenciales. Se resaltan en negritas los tres metabolitos más abundantes para cada aceite esencial. NI: no identificado. PAU: *P. auritum*; LOR: *L. origanoides*; PAM: *P. amalago*; AHI: *A. hispida*; BSI: *B. simaruba*; HSU: *H. suaveolens*; OCA: *O. campechianum*; CYU: *C. yucatanensis*; LCA: *L. canescens*; TDI: *T. diffusa*

En la Figura 3.1 se compara la composición química de los AEs agrupando los metabolitos en clases de terpenos. Se observa que los AEs de BSI, LOR y PAU fueron claramente dominados por monoterpenos, particularmente por monoterpenos oxigenados en LOR y PAU. En el resto de los AEs los sesquiterpenos fueron los metabolitos más representativos. Se distingue el AEs de PAM como el que mostró mayor proporción de sesquiterpenos (79.2%), donde el metabolito más abundante fue el β -bisaboleno, mientras que los AEs de CYU y LCA mostraron la mayor dominancia de sesquiterpenos oxigenados (40%). El AE de AHI fue el único donde se identificó la presencia de diterpenos y diterpenos oxigenados.



El diagrama de UpSet de la composición química de los AEs permitió determinar que la mayoría de los metabolitos se compartían al menos entre dos AEs, destacándose el β -cariofileno y el óxido de cariofileno, los cuales fueron identificados en ocho de los 10 AEs analizados. Se detectaron pocos compuestos exclusivos en los AEs. Por ejemplo, los compuestos exclusivos del AEs de LOR fueron el timol (48.9%) y timol metil-éter (4.1%), y para el AEs de PAU fueron safrol (70.2%) y miristicina (2.4%). El AE de OCA se caracterizó por la presencia de eugenol (7.5%) y metil eugenol (21.8%), HSU fue la única especie con α -bergamoteno (7.5%), z - α bergamotol (5.5%) y elixeno (4%), mientras que los metabolitos guaiadeno 6-9 (2%) y calameneno (4.2%) sólo estuvieron presentes en TDI. El α -bisabolol (16.3%) fue característico del AE de CYU. Es relevante señalar que los AEs que presentaron la mayor cantidad de compuestos exclusivos en su composición química fueron AHI y PAM, con 9 y 7 metabolitos, respectivamente (Figura 3.2).

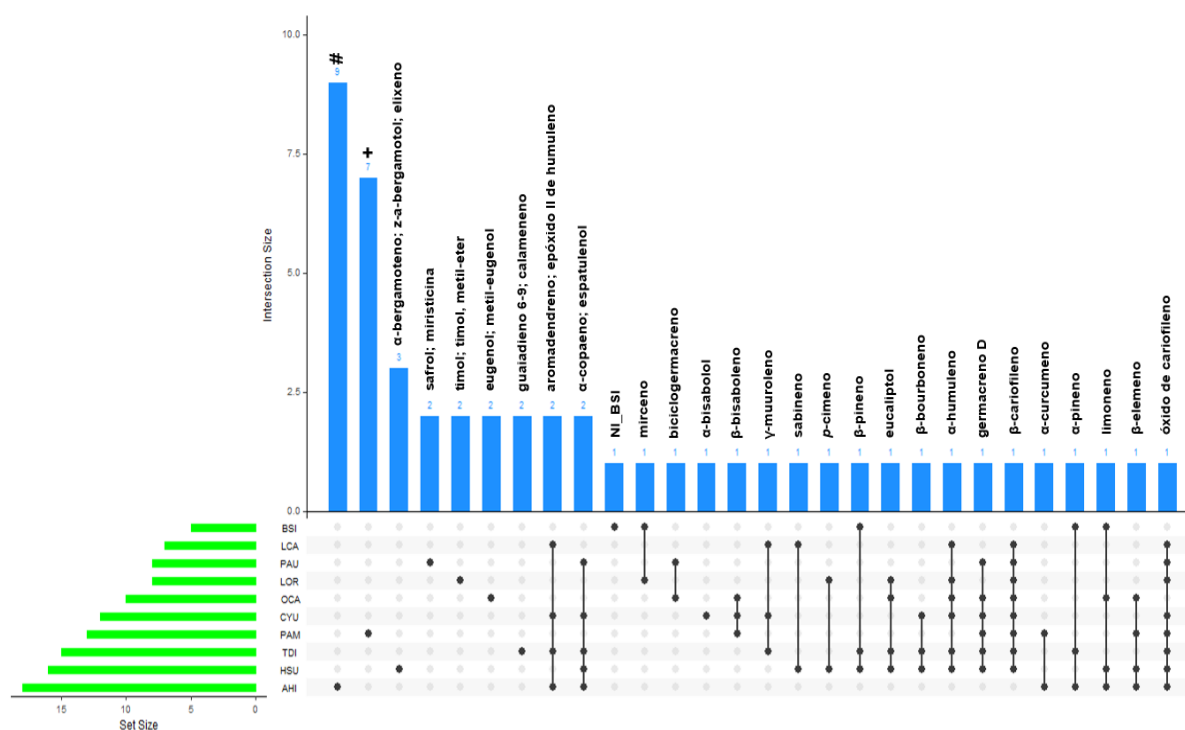


Figura 3.2. Gráfico de UpSet de los metabolitos presentes en los diez aceites esenciales. Sólo se analizaron los metabolitos con un porcentaje de área $\geq 1\%$. Los puntos negros conectados por líneas negras reflejan la presencia de los metabolitos en cada aceite esencial, mientras que el tamaño del conjunto (set size, barras verdes) refleja la cantidad total de metabolitos presentes en cada aceite esencial individual. Las barras verticales azules indican la cantidad de metabolitos exclusivos o compartidos entre los conjuntos, permitiendo identificar los compuestos comunes y distintivos en los aceites esenciales estudiados. #: representa los compuestos exclusivos del aceite esencial de *A. hispida*, modef-2-eno, silfineno, α -isocomeno, γ -cadineno, nerolidol E, veltonal, kaureno, kauran-16-ol y un compuesto no identificado. +: representa los compuestos exclusivos del aceite esencial de *P. amalago*, farneseno, δ -elemeno, α -zingibereno, β -sesquifelandreno, tres compuestos no identificados. PAU: *P. auritum*; LOR: *L. origanoides*; PAM: *P. amalago*; AHI: *A. hispida*; BSI: *B. simaruba*; HSU: *H. suaveolens*; OCA: *O. campechianum*; CYU: *C. yucatanensis*; LCA: *L. canescens*; TDI: *T. diffusa*.

Los resultados del análisis de componentes principales (PCA) mostraron una varianza acumulada de 75% en los primeros tres componentes (Figura 3.3), lo que sugiere que el modelo está capturando una proporción significativa de la varianza. En la proyección de los componentes 1-2 (Figura 3.3a) se observa que los AEs de BSI y PAU forman dos grupos claramente diferenciados, explicados por la alta carga del α -pineno y el safrol, como se observa en el diagrama de cargas (Figura 3.3b). Por otro lado, el resto de los AEs formaron un sólo grupo, destacando que en estos AEs la composición química se caracterizó principalmente por la presencia de sesquiterpenos y por no presentar un compuesto claramente mayoritario, con excepción del AE de LOR. En la proyección de los componentes 1-3 (Figura 3.3c) se muestra la formación de un cuarto grupo, donde se distingue el AEs de LOR, determinado por el alto valor de correlación del timol al componente principal 3, como se observa en el gráfico de cargas (Figura 3.3d).

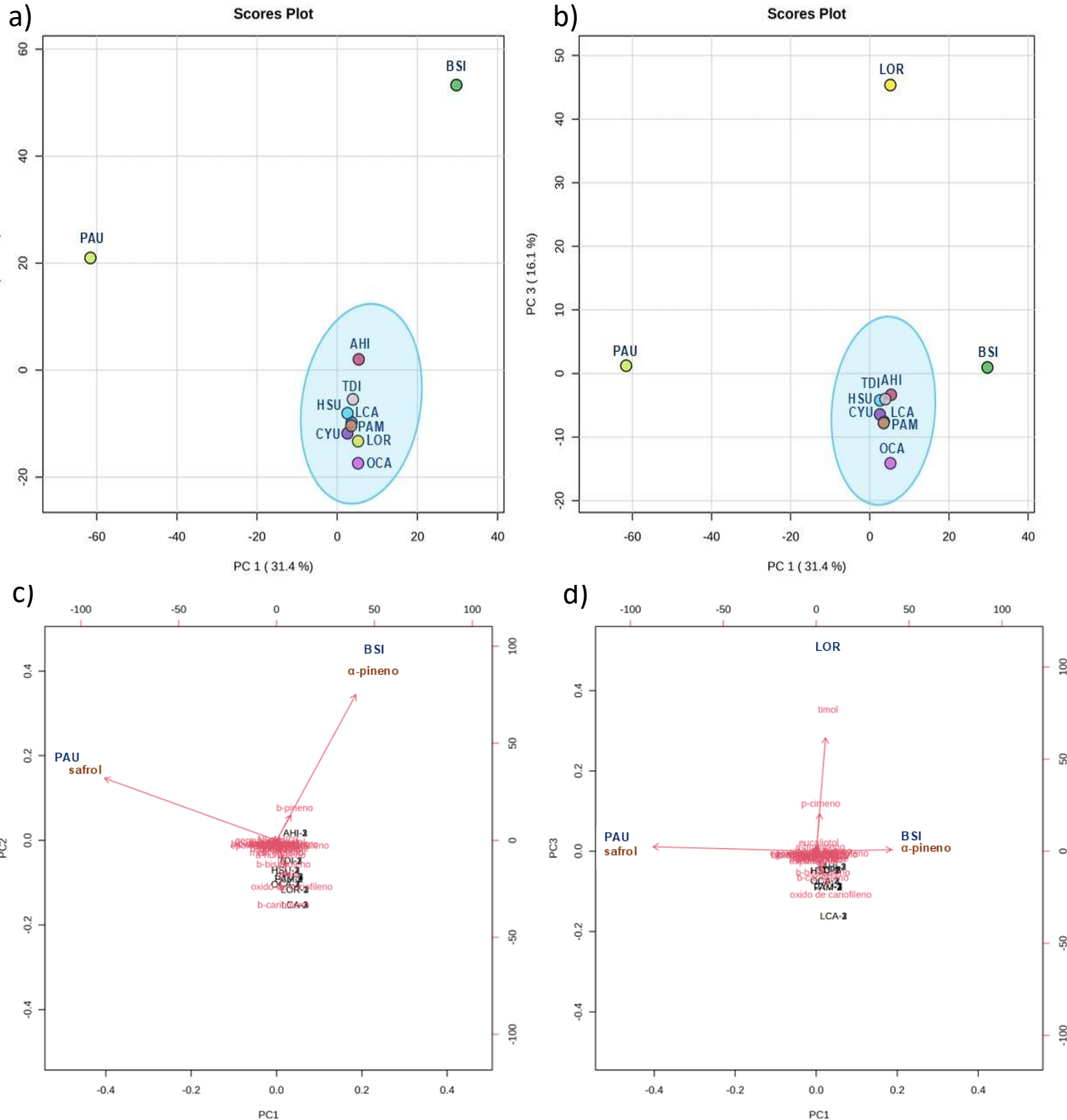


Figura 3.3. Score plot y gráfico de cargas del análisis de componentes principales (PC1-PC2; PC1-PC3) generado a partir del % de área ($\geq 5\%$) de los metabolitos presentes en los aceites esenciales. PAU: *P. auritum*; LOR: *L. origanoides*; PAM: *P. amalago*; AHI: *A. hispida*; BSI: *B. simaruba*; HSU: *H. suaveolens*; OCA: *O. campechianum*; CYU: *C. yucatanensis*; LCA: *L. canescens*; TDI: *T. diffusa*.

3.1.2. Actividad de los aceites esenciales sobre el crecimiento de *A. baumannii*

3.1.2.1. Tamizaje de actividad anti- *A. baumannii* de los diez aceites esenciales

Los resultados del tamizaje se presentan en la Tabla 3.12. De un total de 10 AEs evaluados a tres concentraciones (1000, 500 y 250 µg/mL), cuatro mostraron actividad anti-*A. baumannii* contra al menos una cepa (CMI ≤ 1000 µg/mL). Los AEs de LOR y AHI mostraron actividad contra las tres cepas evaluadas, distinguiéndose LOR como el que mejor actividad presentó (CMI <250 µg/mL). Los AEs de PAM y PAU sólo mostraron actividad contra la cepa ABA-UIMY-81.

Tabla 3.12. Concentración mínima inhibitoria resultante del tamizaje de la actividad anti-*Acinetobacter baumannii* de los diez aceites esenciales.

AE/antibiótico	Cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i>		
	ABA-ATCC-1605	ABA-UIMY-81	ABA-UIMY-88
LOR	<250	<250	<250
AHI	1000	1000	1000
PAU	NA	1000	NA
PAM	NA	1000	NA
LCA	NA	NA	NA
HSU	NA	NA	NA
BSI	NA	NA	NA
CYU	NA	NA	NA
TDI	NA	NA	NA
OCA	NA	NA	NA
TET	0.5	1	0.5

NA: No activo (CMI >1000 µg/mL). TET: Tetraciclina (control positivo).

3.1.2.2. Concentraciones mínima inhibitoria y mínima bactericida de los aceites esenciales bioactivos y compuestos puros

Los AEs de AHI, PAU y PAM no presentaron un efecto bactericida a 1000 µg/mL. La CMI del AE de LOR para las cepas ABA-ATCC-1605 y ABA-UIMY-88 fue de 250 µg/mL, mientras que en el aislado clínico ABA-UIMY-81 fue más activo, con una CMI de 125 µg/mL (Tabla 3.13).

Tabla 3.13. Concentraciones mínima inhibitoria y mínima bactericida de los aceites esenciales activos sobre *Acinetobacter baumannii*.

AE/antibiótico	ABA-ATCC-1605		ABA-UIMY-81		ABA-UIMY-88	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
LOR	250	250	125	125	250	250
AHI	1000	NB	1000	NB	1000	NB
PAU	NA	-	1000	NB	NA	-
PAM	NA	-	1000	NB	NA	-
TET	0.5	-	1	-	0.5	-

CMI: Concentración mínima inhibitoria (µg/mL); CMB: Concentración mínima bactericida (µg/mL); NA: No activo (CMI > 1000 µg/mL); NB: No bactericida (CMB > 1000 µg/mL); TET: Tetraciclina (control positivo).

La CMI y CMB del timol y otros compuestos puros presentes en el AE de LOR se presentan en la tabla 3.14.

Tabla 3.14. Concentraciones mínima inhibitoria y mínima bactericida del aceite esencial de *Lippia origanoides* y compuestos puros presentes en su aceite esencial sobre *Acinetobacter baumannii*.

AE/compuestos puros	ABA-ATCC-1605		ABA-UIMY-81		ABA-UIMY-88	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
LOR	250	250	125	125	250	250
timol	250	250	500	500	250	250
<i>p</i> -cimeno	1000	1000	1000	1000	1000	1000
α -humuleno	NA	-	NA	-	NA	-
β -cariofileno	NA	-	NA	-	NA	-
óxido de cariofileno	NA	-	NA	-	NA	-
TET	0.5	-	1	-	0.5	-

CMI: Concentración mínima inhibitoria (µg/mL); CMB: Concentración mínima bactericida (µg/mL); NA: No activo (CMI > 1000 µg/mL). TET: Tetraciclina (control positivo).

Para el timol se determinó una CMI de 250 µg/mL sobre el aislado clínico ABA-UIMY-88 y la cepa ABA-ATCC-1605, y de 500 µg/mL sobre el aislado clínico ABA-UIMY-81. La CMI y CMB del timol fue similar a la presentada por el AE de LOR, excepto en el aislado clínico ABA-UIMY-81. El *p*-cimeno presentó una CMI y CMB de 1000 µg/mL sobre todas las cepas. Adicionalmente, el AE de LOR, y los metabolitos timol y *p*-cimeno fueron los únicos que presentaron un efecto bactericida sobre las tres cepas evaluadas. Los sesquiterpenos α -humuleno, β -cariofileno y óxido de cariofileno no exhibieron actividad sobre las cepas evaluadas.

A partir de los resultados de CMI y CMB se seleccionaron los AEs activos: LOR, AHI, PAU, PAM y el timol para continuar con su evaluación en los modelos antivirulencia y antifármacorresistencia.

3.1.3. Actividad antivirulencia de los aceites esenciales sobre *A. baumannii*

3.1.3.1. Efecto de los aceites esenciales sobre la inhibición de la producción de violaceína en *C. violaceum*

Los valores de CI_{50} en la inhibición de la producción de violaceína para cada AEs se muestran en la Tabla 3.15. El ANOVA mostró diferencias significativas entre los dos aceites activos, el compuesto puro y el control positivo ($F_{(3, 11)} = 387.10$, $P < 0.0001$). El timol presentó mayor actividad que el AE de LOR, mientras que el AE de AHI exhibió la menor actividad. Los AEs de PAU y PAM no presentaron actividad.

Tabla 3.15. Actividad inhibitoria de la producción de violaceína en *Chromobacterium violaceum* por efecto de los aceites esenciales.

AE/ compuesto puro	<i>C. violaceum</i> ATCC 12472
	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
PAU	NA
PAM	NA
AHI	126.4 ± 4.9^d
LOR	43.9 ± 5.9^c
timol	26.3 ± 5.7^b
Cinamaldehído*	15.0 ± 2.5^a

Se presentan los valores promedio $\pm$ la desviación estándar para tres replicas. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los valores de CI_{50} (Tukey, $P < 0.05$). *control positivo. NA: No activo (inhibición menor al 50% a $\frac{1}{2}$ CMI).

3.1.3.2. Actividad de los aceites esenciales sobre la actividad anti-catalasa de *A. baumannii*

El tamizaje de los AEs y el timol a una concentración de la mitad de sus respectivas CMI mostró que el AE de AHI redujo significativamente la supervivencia de las células bacterianas en respuesta al H_2O_2 , resultando en una mortalidad de 56.7%, valor cercano al 68.7% de la azitromicina (control positivo). Por el contrario, los AEs de LOR, PAU y PAM y el timol indujeron una mortalidad menor al 20%, por lo que presentaron baja actividad (Figura 3.4).

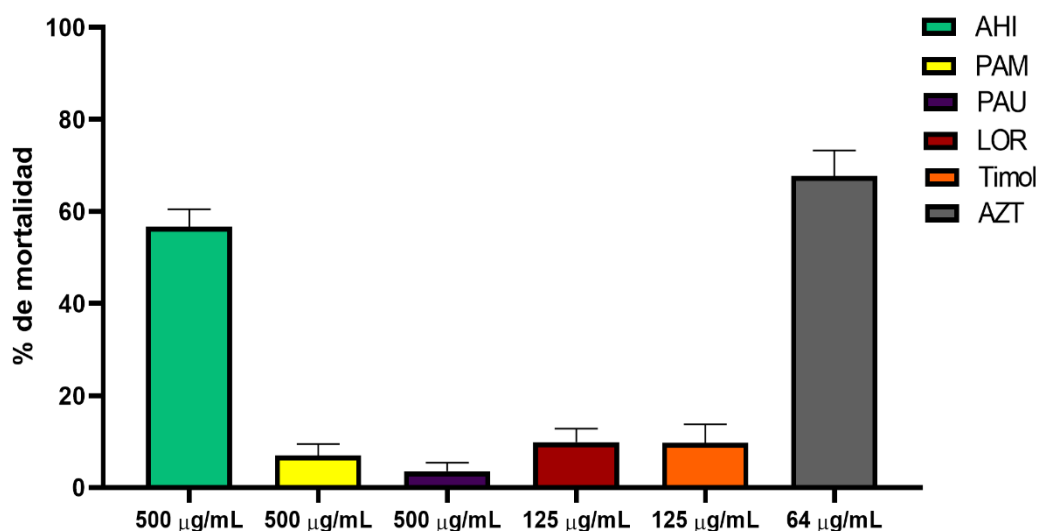


Figura 3.4. Efecto de la $\frac{1}{2}$ concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales y compuestos sobre *Acinetobacter baumannii* ATCC-1605 después del tratamiento con peróxido de hidrogeno. Las barras representan los valores promedio $\pm$ la desviación estándar para tres réplicas.

Debido a que el AE de AHI fue el que mostró mayor actividad, se evaluó a menores concentraciones para determinar la CI_{50} . La CI_{50} del AE de AHI, el único AE que presentó actividad anti-catalasa, fue de $292.5 \pm 5.2 \mu\text{g/mL}$ valor considerablemente mayor al de la azitromicina $40.2 \pm 2.6 \mu\text{g/mL}$.

3.1.4. Actividad antifármacorresistencia de los aceites esenciales sobre *A. baumannii*

3.1.4.1. Efecto de los aceites esenciales en la inhibición de la formación de biopelículas en *A. baumannii*

Los resultados del efecto sobre la formación de biopelículas (CI_{50}) se muestran en la Tabla 3.16. El ANOVA de dos vías mostró que la interacción tratamiento-cepa fue estadísticamente significativa ($F_{(3, 11)} = 67.29$, $P = <0.0001$), indicando que el efecto presentado en la inhibición fue dependiente tanto del tratamiento como de la cepa. El AHI mostró un efecto en la inhibición de la formación de biopelículas en ambas cepas. El efecto del AE de AHI fue significativamente diferente entre ambas cepas siendo más activo sobre ABA-UIMY-81 ($166.38 \pm 4.65 \mu\text{g/mL}$). Aunque los valores de CI_{50} del AE de AHI fueron cercanos al control positivo, presentaron diferencias significativas. Para el AE de LOR, PAU, PAM y el timol no fue posible determinar la CI_{50} , ya que la máxima inhibición a $\frac{1}{2}$ CMI fue menor al 20%, por lo que se consideraron con baja actividad anti-biopelículas.

Tabla 3.16. Efecto del aceite esencial de *Ambrosia hispida* en la inhibición de la formación de biopelículas por cepas de *Acinetobacter baumannii*

AE/Control	ABA-ATCC-1605	ABA-UIMY-81
	$CI_{50} (\mu\text{g/mL})$	$CI_{50} (\mu\text{g/mL})$
AHI	166.3 ± 4.65^c	188.2 ± 3.8^d
EDTA*	109.7 ± 4.7^b	92.6 ± 2.2^a

Se presentan los valores promedio $\pm$ la desviación estándar para tres replicas. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los valores de CI_{50} (Tukey, $P < 0.05$). EDTA: ácido etilendiaminotetraacético; *control positivo.

3.1.4.2. Análisis morfométrico por microscopia electrónica de barrido del efecto en la inhibición de la formación de biopelículas de cepas de *A. baumannii* por el aceite esencial de *A. hispida*

Las microfotografías obtenidas por MEB de la actividad de inhibición de la formación de biopelículas del AEs de AHI y el EDTA sobre el aislado clínico ABA-UIMY-81 y la cepa ABA-ATCC-1605 se presentan en las figuras 3.5. y 3.6, respectivamente. En los controles negativos (sin tratamiento) se observa la agrupación de bacterias formando biopelículas que cubren casi la totalidad del área de observación. Para los cultivos bacterianos tratados con 500, 250 y 125 $\mu\text{g/mL}$ del AE de AHI, se observa una disminución significativa en las biopelículas adheridas en comparación con el control negativo. Este mismo efecto se presentó con el control positivo de inhibición (EDTA).

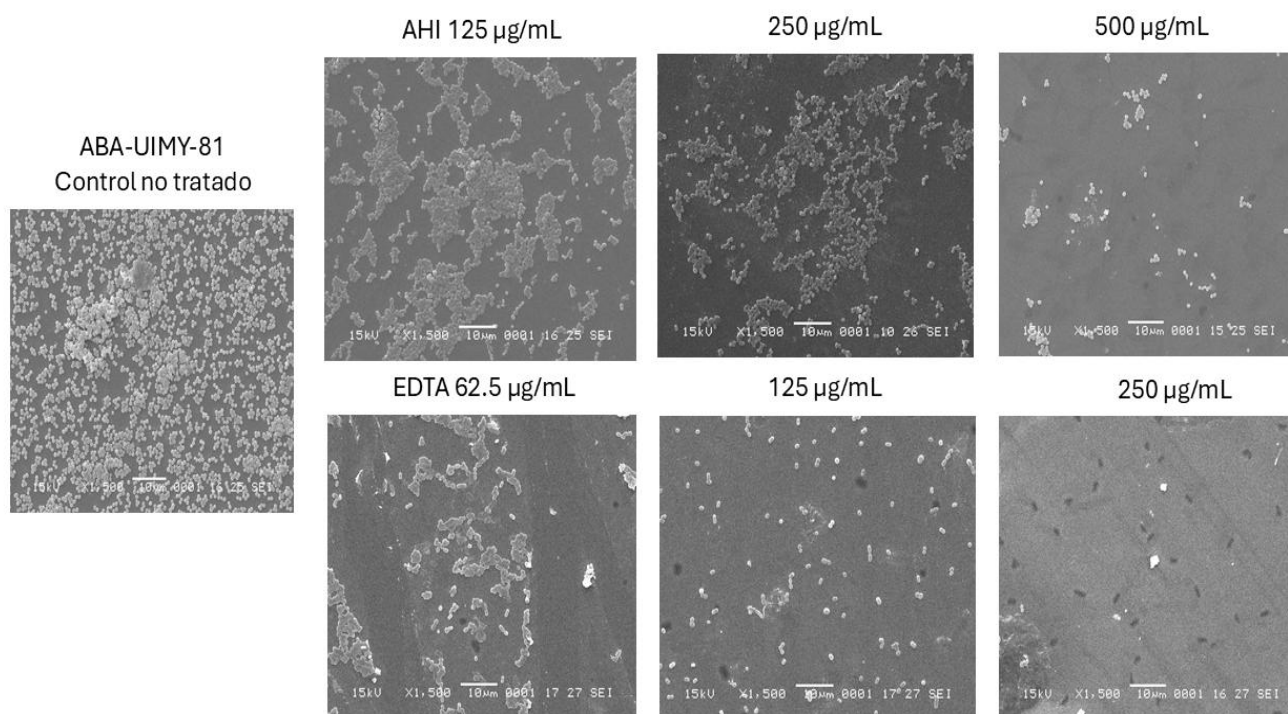


Figura 3.5. Efecto en la inhibición de formación de biopelículas del aceite esencial de *Ambrosia hispida* y el EDTA sobre *Acinetobacter baumannii* UIMY-81 visualizado por microscopio electrónico de barrido. Microfotografías con un aumento de 1500 $\times$.

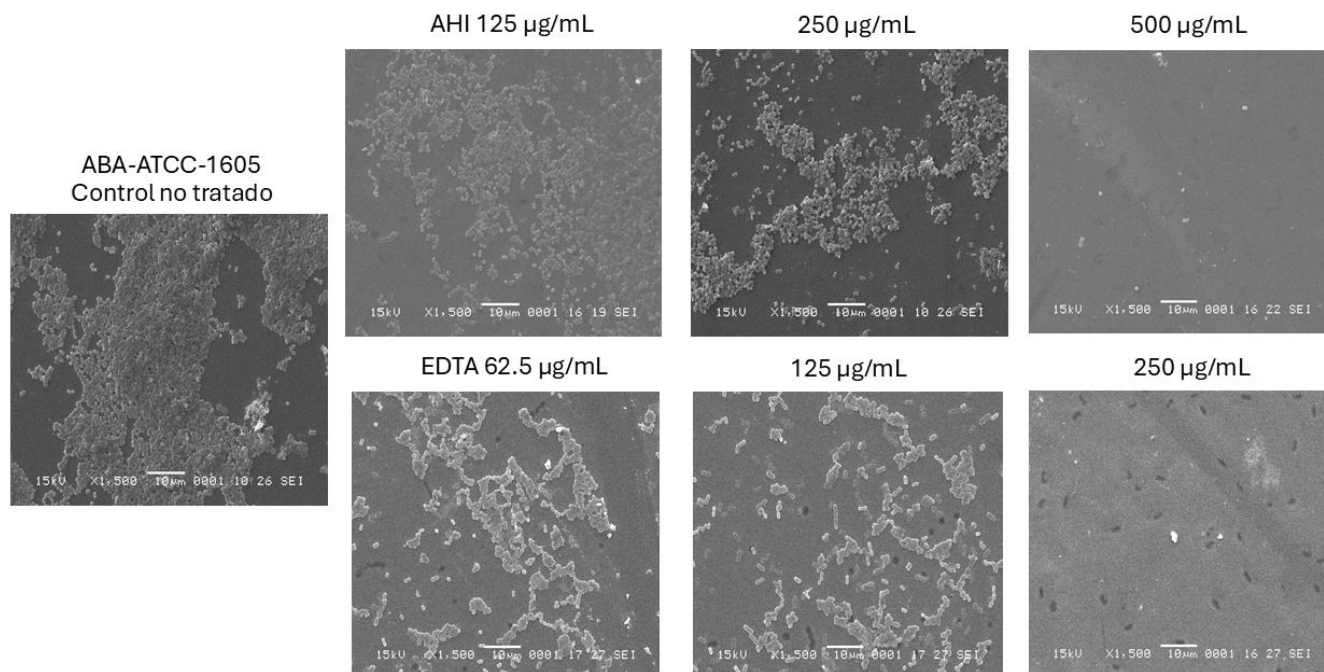


Figura 3.6. Efecto en la inhibición de formación de biopelículas del aceite esencial de *Ambrosia hispida* y el EDTA sobre *Acinetobacter baumannii* ATCC-1605 visualizado por microscopio electrónico de barrido. Microfotografías con un aumento de 1500 $\times$.

La Figura 3.7a muestra una amplificación (10,000 $\times$) del control negativo (no tratado con AE de AHI) donde se observa la matriz extracelular de polisacáridos y la morfología cocoide sin alteraciones visibles en la estructura bacteriana. En la Figura 3.7b se pueden observar bacterias tratadas con el AE de AHI, en una concentración de 125 $\mu\text{g/mL}$, donde se observa una morfología irregular de las células bacterianas (señaladas con flechas amarillas).

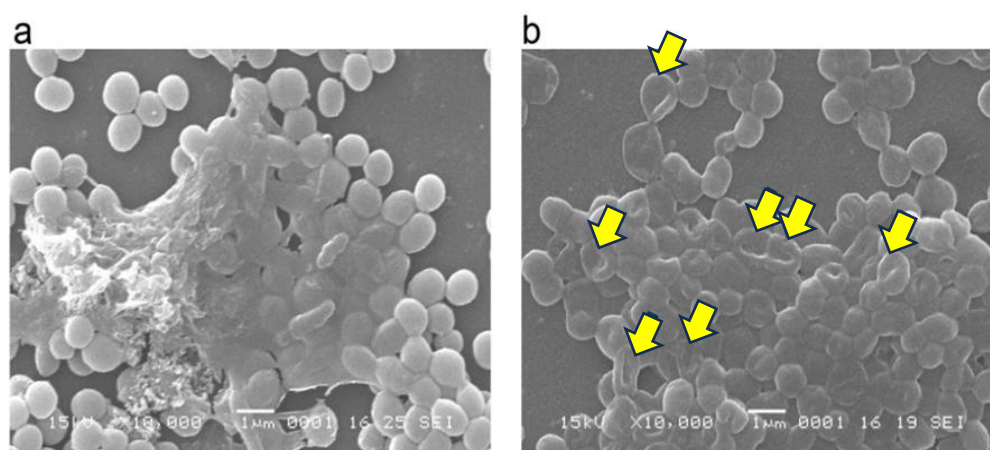


Figura 3.7. Efecto del aceite esencial de *Ambrosia hispida* en la morfología de las células bacterianas de *Acinetobacter baumannii*. a: biopelícula de *A. baumannii* sin tratamiento; b: AE de AHI sobre las células bacterianas (125 $\mu\text{g/mL}$). Microfotografías a un aumento de 10,000. Las flechas amarillas indican daños morfológicos en las células tratadas.

3.1.4.3. Efecto de los aceites esenciales sobre la degradación de biopelículas en *A. baumannii*

El AE de AHI sólo presentó un bajo efecto degradativo sobre las biopelículas de ambas cepas a una concentración de 250 o 500 µg/mL correspondiente a ½ CMI, comparado con el EDTA (Figura 3.8). Los AEs de LOR, PAU, PAM y el timol no presentaron efecto degradativo a ½ CMI.

EL ANOVA de dos vías mostró que la interacción tratamiento-cepa fue estadísticamente significativa ($F_{(3, 11)} = 20.30$, $P = 0.002$), indicando que el efecto presentado en la degradación fue dependiente tanto de la cepa como del tratamiento. El AHI mostró un efecto superior degradativo sobre la biopelícula de ABA-ATCC-1605 (37.6%), que sobre ABA-UIFY-81 (22.4%). No hubo diferencias significativas entre el efecto del EDTA en ambas cepas.

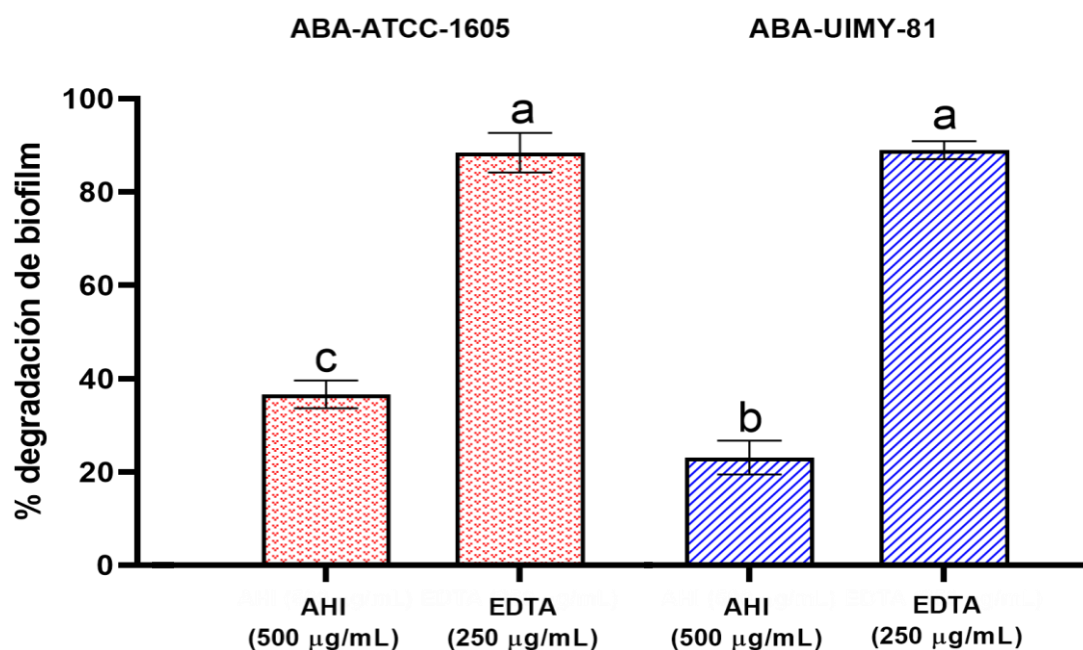


Figura 3.8. Efecto degradativo del aceite esencial de *Ambrosia hispida* sobre las biopelículas de *Acinetobacter baumannii*. Se presentan los valores promedio ± la desviación estándar para tres replicas. Las letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey, $P < 0.05$).

3.1.4.4. Efecto de los aceites esenciales sobre la modulación de la resistencia a antibióticos

El AE de LOR y timol redujeron la CMI de AMK (FMA=16), e IMP (FMA=8) como se presenta en la Tabla 3.17. El AE de AHI no tuvo un efecto modulador en combinación con IMP (FMA=1), pero sí combinado con AMK (FMA=2). El AE de PAU presentó potente actividad exclusivamente en la modulación de la resistencia a AMK (FMA=16). Los resultados demuestran que los AEs de LOR, y timol, con altos valores de FMA, e inclusive iguales o mayores que el control positivo, modulan la resistencia a antibióticos vía bombas de eflujo en los dos aislados clínicos de *A. baumannii*.

Table 3.17. Concentración mínima inhibitoria (µg/mL) de imipenem y amikacina en combinación con ½ concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales sobre dos aislados clínicos de *Acinetobacter baumannii*.

AE/compuesto	ABA-UIMY-5		ABA-UIMY-16	
	CMI de IMP + AE	FMA	CMI de AMK + AE	FMA
Ninguno	128	--	64	--
PAU (500 µg/mL)	128	1	8	8
PAM (500 µg/mL)	128	1	64	1
AHI (500 µg/mL)	128	1	32	2
LOR (62.5 µg/mL)	16	8	4	16
Timol (62.5 µg/mL)	16	8	4	16
PABN (50 µg/mL) *	16	8	16	4

IMP: Imipenem; AMK: amikacina; CMI: concentración mínima inhibitoria; PABN: Fenil-arginina-beta-naftilamida
*control positivo; FMA: Factor de modulación de antibióticos

3.1.5. Efecto citotóxico de los aceites esenciales sobre células Vero

La citotoxicidad fue mayor en el AE de PAU, LOR y el timol puro, con valores de CC_{50} de 92.1 $\mu\text{g/mL}$, 99.8 $\mu\text{g/mL}$ y 139.5 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Mientras que los AEs de AHI y PAM presentaron menor citotoxicidad (Tabla 3.18). Los valores de IS del AE de AHI sobre la actividad anti-QS (2) y actividad anti-biopelículas (1-3-1.5) indican una selectividad baja. El AE de LOR y

Tabla 3.18. Citotoxicidad de los aceites esenciales y el timol sobre células Vero.

AE o fármaco	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
AHI	259.8 ± 3.1^e
PAU	92.1 ± 1.8^b
PAM	317.4 ± 5.4^f
LOR	139.5 ± 3.8^d
timol	99.8 ± 3.2^c
Doxetacel*	3.8 ± 0.7^a

Se presentan los valores promedio de $CC_{50} \pm$ la desviación estándar para tres replicas. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los valores de CC_{50} (Tukey, $P < 0.05$). *control positivo. CC_{50} : concentración citotóxica del 50%.

el timol presentaron un IS de 3.1 y 3.7 respectivamente, sobre la actividad anti-QS.

3.1.6. Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales ortogonales de la actividad antiinfecciosa.

El modelo OPLS-DA de la actividad de los 10 AEs en el crecimiento bacteriano mostró una clara separación entre los AEs activos de PAM, AHI, PAU y LOR y el resto de los AEs, no activos (Figura 3.9). Los valores de R^2 y Q^2 , del modelo, fueron de 0.88 y 0.80, respectivamente, lo que sugiere un modelo robusto y confiable. Los compuestos más influyentes en la proyección del grupo de AEs con actividad antibacteriana, determinados por el análisis del S-plot (con mayor carga al extremo superior derecho), fueron timol (VIP= 1.1, $p= 10.5$), *p*-cimeno (VIP= 1.1, $p= 3.43$), compuesto mayoritarios del AE de LOR, α -curcumeno (VIP= 1.7, $p= 4.6$), mayoritario en el AE de AHI, β -bisaboleno (VIP= 1.0, $p= 6.7$), mayoritario en el AE de PAM y safrol (VIP=1.8, $p= 13.8$), metabolito mayoritario en el AE de PAU. La asociación de estos compuestos con la proyección del grupo activo resalta su posible papel como biomarcadores, sugiriendo que podrían ser los responsables de la actividad anti-crecimiento sobre *A. baumannii*.

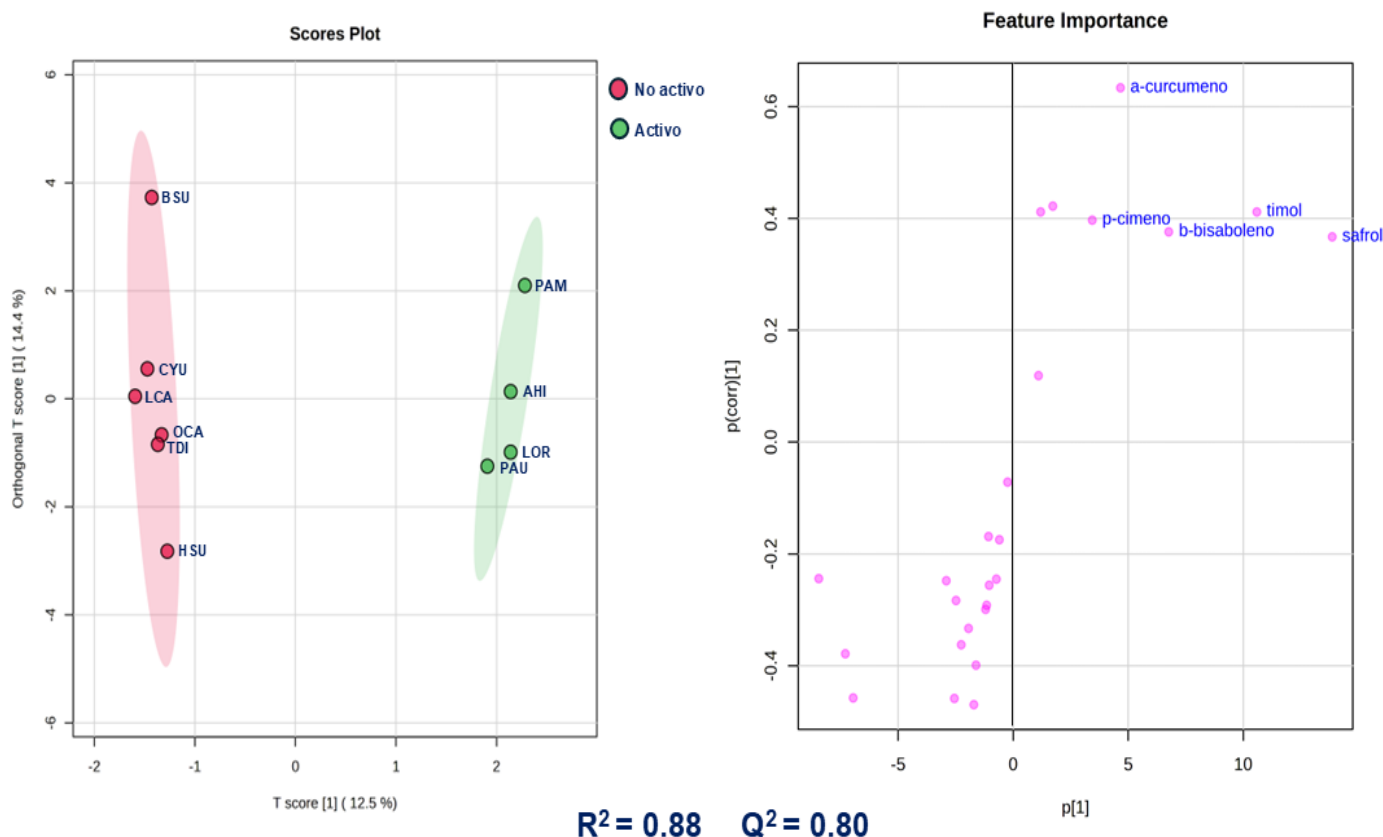


Figura 3.9. Score plot (izquierda) y S-plot (derecha) para el modelo OPLS-DA de la actividad de los aceites esenciales estudiados sobre el crecimiento de *Acinetobacter baumannii*. Se consideraron como activos aquellos aceites esenciales que mostraron una concentración mínima inhibitoria ≤ 1000 $\mu\text{g/mL}$. En el S-plot sólo se muestra el nombre de los metabolitos con un VIP mayor a 1 asociados con el grupo activo. PAU: *P. auritum*; LOR: *L. organoides*; PAM: *P. amalago*; AHI: *A. hispida*; BSI: *B. simaruba*; HSU: *H. suaveolens*; OCA: *O. campechianum*; CYU: *C. yucatanensis*; LCA: *L. canescens*; TDI: *T. diffusa*.

En el score plot y S-plot del modelo OPLS-DA para la actividad anti-QS se observó la separación de los AEs de AHI y PAU que representaron el grupo de activos (Figura 3.10). Los valores de R^2 (0.91) y Q^2 (0.93) mostraron que el modelo es adecuado. Los metabolitos responsables de la discriminación del grupo activo fueron espatulenol (VIP= 1.0, p = 7.5), metabolito mayoritario en el AE de AHI, y los metabolitos mayoritarios del AE de LOR, *p*-cimeno (VIP= 1.2, p = 9.7) y timol (VIP= 1.3, p = 29.2).

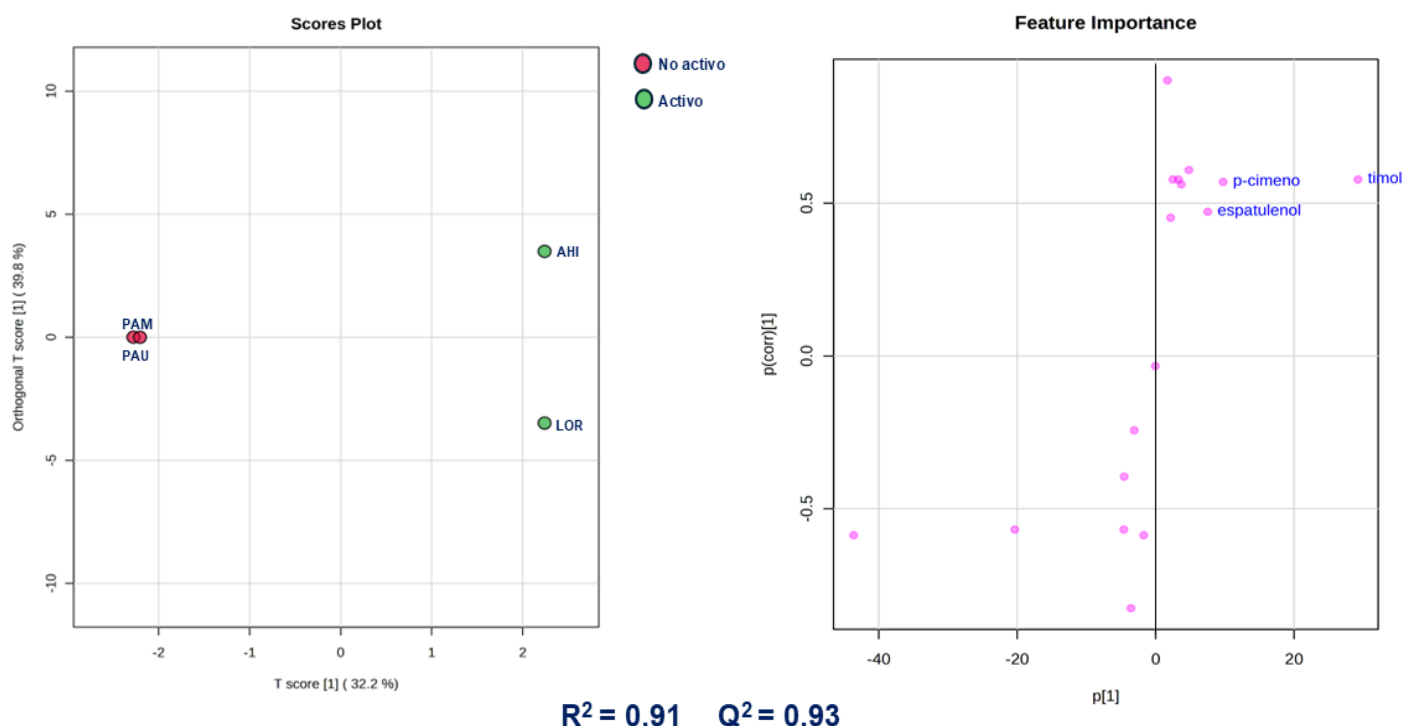


Figura 3.10. Score plot y S-plot para el modelo OPLS-DA de la actividad anti-quorum sensing de los aceites esenciales estudiados sobre *Chromobacterium violaceum*. Se consideraron como activos aquellos aceites esenciales que mostraron una inhibición de la producción de violaceína mayor al 50% a una concentración de $\frac{1}{2}$ concentración mínima inhibitoria. En el S-plot sólo se muestra el nombre de los metabolitos con un VIP mayor a 1 asociados con el grupo activo. PAU: *P. auritum*; LOR: *L. origanoides*; PAM: *P. amalago*; AHI: *A. hispida*.

En el modelo OPLS-DA de la actividad en la inhibición de la formación de biopelículas y la actividad anti-catalasa únicamente el AE de AHI se consideró como activo (Figura 3.11). El valor de R^2 y Q^2 del modelo fueron de 0.92 y 0.98, respectivamente. Los compuestos asociados con la actividad anti-catalasa y antibiopelículas identificados por el modelo fueron los cuatro compuestos más abundantes presentes en el AEs de AHI. Estos son: α -pineno (VIP= 1.5, p = 8.7), óxido de cariofileno (VIP= 1.5, p = 7.1), espatulenol (VIP= 1.5, p = 17.3) y un compuesto no identificado (5.4%) (VIP= 1.5, p = 6.3).

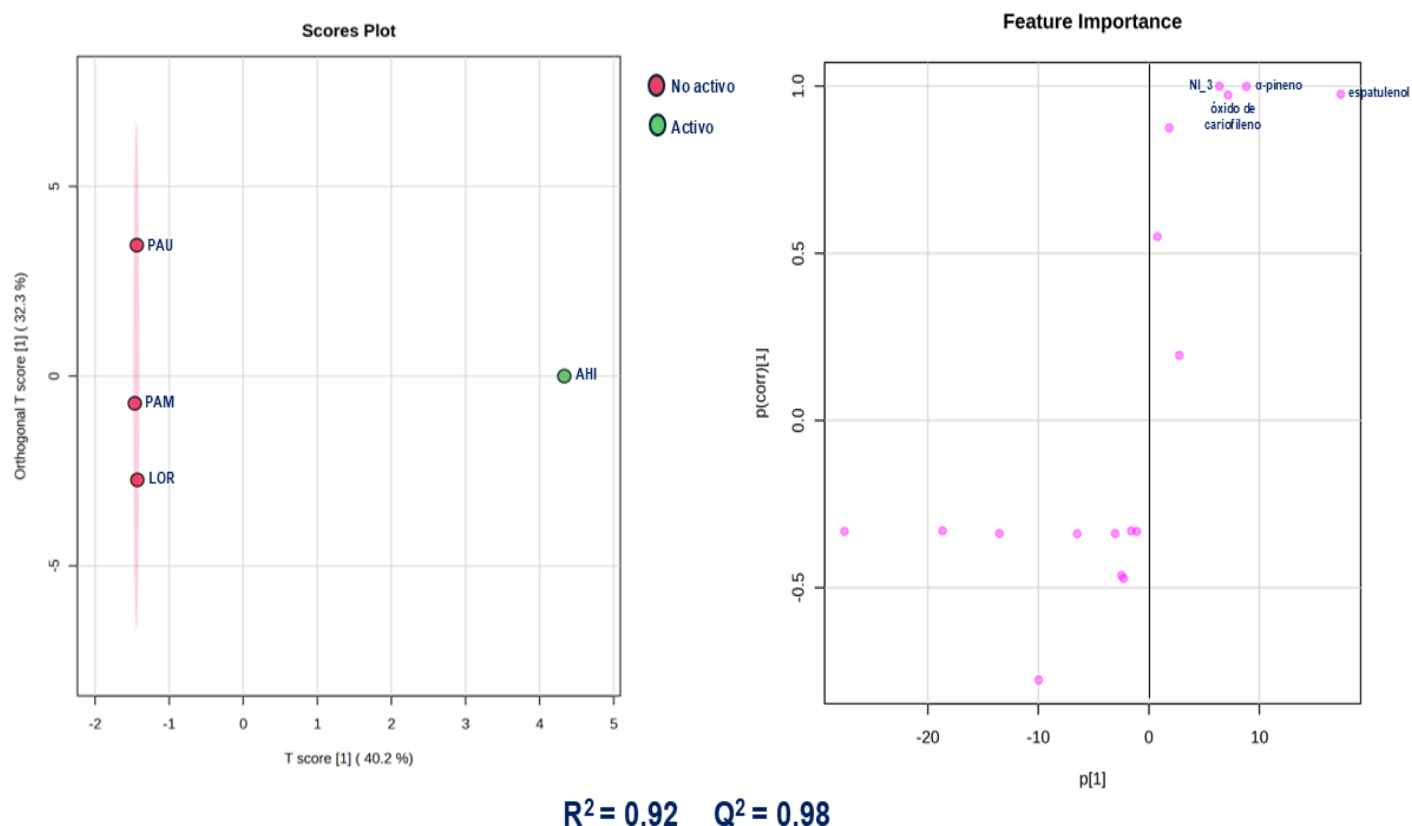


Figura 3.11. Score plot y S-plot para el modelo OPLS-DA de la actividad anti-biopelículas y anti-catalasa de los aceites esenciales estudiados sobre *Acinetobacter baumannii*. Se consideraron como activos aquellos aceites esenciales que mostraron una inhibición de la formación de biopelículas y una mortalidad inducida mayor 50% a $\frac{1}{2}$ concentración mínima inhibitoria. En el S-plot sólo se muestra el nombre de los metabolitos con un VIP mayor a 1 asociados con el grupo activo. PAU: *P. auritum*; LOR: *L. origanoides*; PAM: *P. amalago*; AHI: *A. hispida*.

Finalmente, el modelo OPLS-DA para la actividad en la modulación de la resistencia vía bombas de eflujo ($R^2 = 0.95$, $Q^2 = 0.85$) identificó tres compuestos como probables responsables de la actividad presentada por los AEs de LOR y PAU (Figura 3.12). Los metabolitos asociados fueron *p*-cimeno (VIP= 1.0, $p = 9.8$) y timol (VIP= 1.6, $p = 28.3$), abundantes en el AE de LOR y safrol (VIP= 2.1, $p = 41.9$) compuesto mayoritario del AE de PAU.

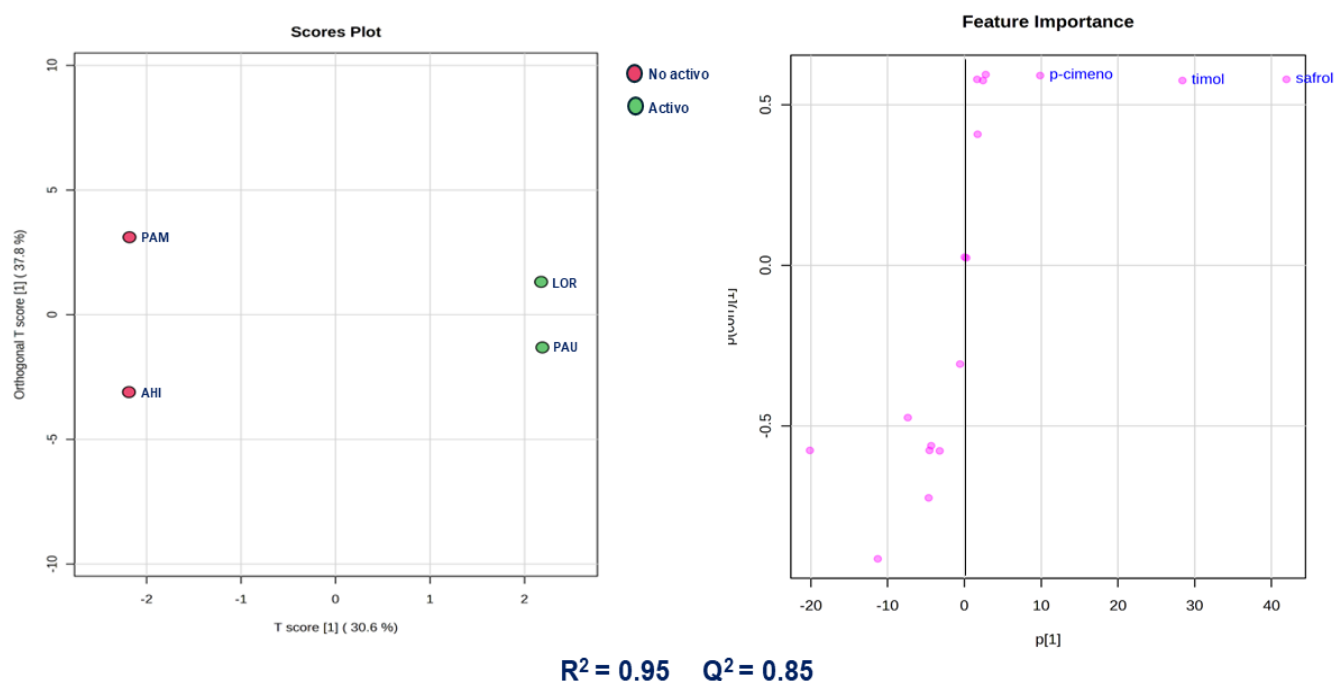


Figura 3.12. Score plot y S-plot para el modelo OPLS-DA para la actividad en la modulación de la resistencia vía bombas de eflujo de los aceites esenciales estudiados sobre *Acinetobacter baumannii*. Se consideraron como activos aquellos aceites esenciales que mostraron un factor de modulación de antibióticos mayor a cuatro a $\frac{1}{2}$ concentración mínima inhibitoria. En el S-plot sólo se muestra el nombre de los metabolitos con un VIP mayor a 1 asociados con el grupo activo. PAU: *P. auritum*; LOR: *L. origanoides*; PAM: *P. amalago*; AHI: *A. hispida*.

En la Tabla 3.20 se resumen los biomarcadores identificados por el análisis de OPLS-DA en cada modelo de actividad antiinfecciosa. Varios de los metabolitos identificados se asociaron con más de un mecanismo de actividad antiinfecciosa. Se distingue el timol y *p*-cimeno, asociados con una reducción en el crecimiento bacteriano, un efecto anti-QS y con la modulación de bombas de eflujo. La presencia del espatulenol se asoció con la actividad anti-catalasa, anti-QS y antibiopelículas. Otros metabolitos como el β -bisaboleno y α -curcumeno sólo se asociaron con la reducción en el crecimiento bacteriano.

Tabla 3.20. Biomarcadores identificados por OPLS-DA en los aceites esenciales antiinfecciosos.

Actividad asociada	Metabolito	Clase	VIP	Carga predictiva (p)	Presente en el AE
Anti-crecimiento	Safrol	MO	1.8	13.8	PAU
	Timol	MO	1.1	10.5	LOR
	β -Bisaboleno	M	1.0	6.7	PAM
	α -Curcumeno	S	1.7	4.6	AHI
	<i>p</i> -Cimeno	S	1.1	3.4	LOR
Anti-QS	Timol	MO	1.3	29.2	LOR
	<i>p</i> -Cimeno	M	1.2	9.7	LOR
	Espatuleno	SO	1.0	7.5	AHI
Anti-biopelículas y Anti-catalasa	Espatuleno	SO	1.5	17.3	AHI
	α -Pino	M	1.5	8.7	AHI
	Óxido de cariofileno	SO	1.5	7.1	AHI
Modulación de la resistencia vía bombas de eflujo	Safrol	MO	2.1	41.9	PAU
	Timol	MO	1.6	28.3	LOR
	<i>p</i> -Cimeno	M	1.0	9.8	LOR

M = Monoterpeno, MO = Monoterpeno oxigenado, S = Sesquiterpeno, SO = Sesquiterpeno oxigenado.

CAPÍTULO IV

4.1. DISCUSIÓN

4.1.1. Caracterización de la composición química de los aceites esenciales

La caracterización de la composición química de los AEs es un paso fundamental para comprender los mecanismos detrás de su actividad biológica. La diversidad de compuestos presentes en los AEs desempeña un papel crucial en la modulación de sus efectos antibacterianos, ya sea de forma individual o en sinergia. Esto no sólo permite identificar los metabolitos responsables de la actividad biológica, sino que también proporciona información valiosa para diseñar estrategias terapéuticas más eficientes (Dhifi *et al.*, 2016). En el presente trabajo se caracterizó la composición química de 10 AEs de PMAs nativas de la PY.

Al comparar los resultados de la caracterización química de los AEs del presente estudio, con lo reportado en la literatura, encontramos que, los compuestos mayoritarios identificados en el AE de LOR fueron timol (48.9%), *p*-cimeno (16.2%) y β -cariofileno (9.4%). Los dos primeros compuestos fueron únicos de este AE. El AE de LOR puede presentar varios quimiotipos y en la PY se han identificado hasta tres, definidos por la predominancia de compuestos fenólicos como carvacrol, timol y un tercero en el cual predominan sesquiterpenos. Utilizando la clasificación propuesta por (Calvo-Irabien *et al.*, 2014) el AE utilizado en este trabajo se clasifica como quimiotipo timol, dada la alta concentración de este metabolito, con un 48.9% del total del área del cromatograma. Varios estudios han descrito la composición química del AE de LOR quimiotipo timol, principalmente en Brasil, donde la abundancia de este metabolito puede variar desde un 44 hasta un 83%, dependiente del sitio de colecta y las condiciones ambientales (da Silva *et al.*, 2022; Rodríguez *et al.*, 2017). El *p*-cimeno se identificó como el segundo compuesto mayoritario en el AE de LOR, lo cual coincide con lo reportado en la literatura (Santos-Filho *et al.*, 2023; Lisboa *et al.*, 2020; Damasceno *et al.*, 2018). La presencia simultánea de *p*-cimeno en AEs ricos en timol puede explicarse por su relación biosintética dentro de la vía metabólica de los terpenoides. En las plantas, el *p*-cimeno actúa como un precursor en la biosíntesis del timol (Krause *et al.*, 2021).

En el caso del AE de BSI presentó un alto contenido de α -pineno (65.2%) y β -pineno (11.8%). Ambos son isómeros que pertenecen al grupo de los monoterpenos y es común encontrarlos en una gran variedad de AEs (da Silva-Rivas *et al.*, 2012). BSI fue el único AE en el que no se encontraron sesquiterpenos como parte de la composición química del aceite. Estos resultados coinciden con lo reportado por Setzer *et al.* (2014) que reportan abundancia similar de α -pineno

(69%) en poblaciones silvestres de Costa Rica. También Porter *et al.* (2008) en Ecuador, informan una menor proporción de α -pineno (39%). Recientemente, Ravelo-Martínez *et al.* (2024) identificaron el α -terpineno (27.7%), *p*-cimeno (22.8%) y el γ -terpineno (16.7%) como metabolitos predominantes en el AE de poblaciones de esta especie en Colombia.

En el AE de PAU el compuesto claramente mayoritario fue el safrol (70%), metabolito que sólo se presentó en esta especie. En la literatura se ha reportado como el compuesto mayoritario en el AE de PAU de poblaciones colectadas en México (Puebla) (51%), Colombia (69%), España (71%), Cuba (89%), Chile (93%), y Costa Rica (93%) (Lam-Gutiérrez *et al.*, 2024; Caballero-Gallardo *et al.*, 2014; Rodríguez *et al.*, 2013; Pineda *et al.*, 2012; Monzote *et al.*, 2010; Vloger *et al.*, 2006). Pocos estudios han identificado poblaciones de PAU con el safrol como no mayoritario, como el realizado por Noriega-Rivera *et al.* (2018) en Ecuador, que identificaron como los compuestos más abundantes al γ -terpineno (31.9%) y terpinoleno (25%). En un estudio realizado en China identificaron al cinamaldehído como compuesto mayoritario en PAU (Hao *et al.*, 2018).

En el AE de PAM los compuestos más abundantes fueron los sesquiterpenos β -bisaboleno (33.8%), β -cariofileno (12.9%), α -curcumeno (12.7%) y β -sesquifelandreno (7.6%). Aunque PMA y PAU son especies que pertenecen al mismo género, la composición química de ambos fue muy contrastante. La variabilidad en la composición química de los AEs dentro de una misma especie suele ser considerable, influenciada por factores como el ambiente, las condiciones edáficas y las etapas de desarrollo. Por ello, es frecuente encontrar la presencia de varios quimiotipos dentro de una misma especie. En este contexto, es razonable esperar que dicha variabilidad sea aún mayor cuando se comparan especies diferentes, aun cuando pertenezcan al mismo género (Dosoky y Setzer, 2018). Diversos estudios de composición química del AE de PAM en Brasil identifican al β -elemeno como el compuesto más abundante (Vasconcelos *et al.*, 2024; Carrara *et al.*, 2010; Mesquita *et al.*, 2005). En otro estudio realizado en Ecuador, identificaron al β -felandreno (20.4%), espatulenol (10.0%) y biciclogermacreno (8.5%) como los principales metabolitos (Baptista *et al.*, 2019). El estudio de Setzer *et al.* (2018) analizaron la composición química de poblaciones en Costa Rica encontrando como mayoritarios el germacreno D (28.9%) β -elemeno (24.6%) y β -cariofileno (20.8%). En contraste, también se ha reportado el limoneno (30%) como el compuesto más abundante en PAM colectada en Brasil (Ferraz *et al.*, 2010).

El análisis por CG-EM del AE de AHL mostró que su composición química está definida por una gran variedad de sesquiterpenos, principalmente espatulenol (15.8%) y óxido de cariofileno (8.1%). También se identificaron monoterpenos como el α -pineno (7.9%) y fue el único AE donde se identificó la presencia de diterpenos como el kaureno (3.2%) y su derivado oxigenado kauran-

16-ol (3.0%). Pino *et al.* (2005) analizaron la composición química del AE de AHI colectado en Cuba y encontraron que los compuestos más abundantes fueron espatulenol (11.8%), borneol (9.4%) y germacreno D (7.9%). En nuestros AEs de AHI no se detectó la presencia del borneol y germacreno D, aunque sí fue consistente en el espatulenol como el metabolito más abundante. Este es el primer reporte de la composición química de los AEs de AHI para poblaciones presentes en México.

En el AE de HSU se identificó una predominancia de sesquiterpenos siendo el β -cariofileno (16.2%), espatulenol (11.4%) y α -bergamoteno (7.6%) los principales metabolitos. Otros estudios de poblaciones de HSU en China han identificado una alta proporción de sesquiterpenos como β -cariofileno (31.1%), óxido de cariofileno (17.6%) y espatulenol (12.4%) coincidiendo con lo reportado en nuestro trabajo (Chung *et al.*, 2020; Xu *et al.*, (2013). Para esta especie se ha descrito los quimiotipos eucaliptol en Brasil (>60%) (Joseph *et al.*, 2020; Moreira *et al.*, 2010), y sabineno en poblaciones colectadas en Italia (46%) (Canale *et al.*, 2013).

En el AE de CYU se identificaron sesquiterpenos en mayor proporción, principalmente α -bisabolol (16.2%), óxido de cariofileno (14.4%), β -cariofileno (13.0%) y β -bourboneno (9.9%). No existen antecedentes de la química del AE de CYU.

El AE de TDI estuvo representado únicamente por sesquiterpenos como α -humuleno (11.3%), β -cariofileno (9.3%) y óxido de cariofileno (8.5%). El AE extraído de TDI presenta una notable variabilidad química, ya que se han identificado más de 10 quimiotipos (Joshi *et al.*, 2009). Los resultados de este trabajo coinciden con lo reportado en un estudio en Nigeria; con β -cariofileno (43.3%) como metabolito mayoritario. Otros estudios mencionan una composición química diferente a la encontrada, mencionando la deshidrofuquinona (53.7%) como metabolito mayoritario en estudios realizados en varias poblaciones de Colombia; así como drima-7,9-dieno (33.2%) en Brasil (Carreño *et al.*, 2023; Silva-Trujillo *et al.*, 2022; Lawal *et al.*, 2020; Río *et al.*, 2017; Stashenko *et al.*, 2015; Bueno *et al.*, 2012).

En el AE de LCA los compuestos predominantes fueron el óxido de cariofileno (37.8%) y el β -cariofileno (25.8%), conjuntamente ambos metabolitos representaron más del 50% del perfil cromatográfico. El óxido de cariofileno y el β -cariofileno están estrechamente relacionados, siendo el óxido de cariofileno un derivado oxigenado del β -cariofileno. Aunque el óxido de cariofileno puede estar presente de forma natural en las estructuras vegetales, las altas temperaturas y la exposición al oxígeno en el proceso de obtención del AE puede inducir la oxidación del β -cariofileno, dando lugar a la formación abundante de óxido de cariofileno

(Francomano *et al.*, 2019; Fidy *et al.*, 2018). Peralta-Bohórquez *et al.* (2011) reportaron β cariofileno (13.5%) germacreno D (10.0%) y 1-octen-3-ol (8.4%) como los principales fitoconstituyentes del AE de LCA colectado en Colombia. En otro estudio realizado en Brasil, se identificó β -cariofileno (43.9%) y otros compuestos como cubebeno (10.1%) y elixeno (8.6%) en el AE de LCA (Filho *et al.*, 2010).

El AE de OCA presentó un alto contenido de β -cariofileno (24.7%), metil-eugenol (21.8%) y biciclogermacreno (11.7%). Para esta especie los principales quimiotipos documentados son metil-eugenol, eucaliptol, β -cariofileno y linalol (Wilson *et al.*, 2022). En poblaciones de Perú y Brasil se ha reportado un contenido de metil-eugenol >65% en OCA, con la presencia de β -cariofileno como segundo compuesto mayoritario (Wilson *et al.*, 2022; Figueiredo *et al.*, 2018). En Ecuador, Brasil y Croacia se ha reportado la presencia del quimiotipo eugenol (Silva-Souza *et al.*, 2022; Tacchini *et al.*, 2021; Ricarte *et al.*, 2020).

De manera general, se encontró que, se presentan dos grupos, los AEs de PAU, LOR y BSI en los que los fitoconstituyentes más abundante fueron los monoterpenos, mientras que, en los AEs de PAM, AHI, HSU, LCA, OCA, CYU y TDI predominaron los sesquiterpenos. Además, los AEs de PAU, LOR y BSI fueron los únicos que presentaron un sólo compuesto claramente mayoritario (con un porcentaje de área mayor al 40%). En el resto de los AEs no se identificó un compuesto mayoritario, sino que su composición mostró la presencia de múltiples compuestos en proporciones relativamente bajas. La similitud en la proporción de varios compuestos de baja abundancia fue el factor que permitió agrupar estos AEs, según los resultados del PCA, mientras que los AEs de PAU, LOR y BSI se clasificaron en grupos diferentes.

Generalmente, se considera que los compuestos mayoritarios en los AEs son los responsables de la actividad antibacteriana identificada (Santana *et al.*, 2023; Micić *et al.*, 2021; Chua *et al.*, 2019). Sin embargo, los metabolitos presentes en menores o bajas concentraciones, en la mayoría de los casos influyen en dicha actividad biológica y son importantes en otras características como la penetración celular, la atracción lipofílica o hidrofílica, la fijación en la pared o membrana celular. (Chouhan *et al.*, 2017). Por ejemplo, el *p*-cimeno, al ser altamente hidrofóbico, puede facilitar la incorporación de compuestos más polares, como el timol o carvacrol, en la bicapa lipídica de la membrana celular. Esta interacción no sólo permite un mejor acceso de los compuestos activos al interior celular, sino que también aumenta la disrupción de la membrana (Bassolé y Juliani, 2012). También se ha documentado que la combinación de linalol y eucaliptol presentes en AEs como el de lavanda o eucalipto, interactúan para dañar la membrana celular y, simultáneamente, unirse al ADN bacteriano, inhibiendo la replicación y la

transcripción (Chouhan *et al.*, 2017). En este contexto, los AEs de AHI y PAM, a pesar de no presentar un metabolito dominante en su composición química, exhibieron actividad en el crecimiento de *A. baumannii* (CMI=1000 µg/mL), y particularmente AHI mostró actividad anti-QS (CI₅₀= 126.4 µg/mL), anti-biopelículas (CI₅₀= 166.3-188.2 µg/mL), y anti-catalasa (CI₅₀= 292.5 µg/mL). La combinación de múltiples compuestos en bajas concentraciones puede generar un efecto sinérgico, esto podría potenciar la actividad global del AE, aumentando su eficacia (Miladinović *et al.*, 2021).

Es importante destacar que el análisis de UpSet permitió identificar que ambos AEs fueron los que presentaron un mayor número de compuestos exclusivos en su composición química, lo que sugiere que estos compuestos conferirían propiedades antibacterianas únicas a estos dos AEs. Para AHI estos fueron: modheph-2-ene (2.4%), silfineno (2.3%), α-isocomeno (2.4%), γ-cadineno (2.0%), nerolidol E (2.9%), veltonal (2.5%), kaureno (3.2%), kauran-16-ol (3.0%) y un compuesto no identificado (5.4%). Otra posible explicación para la actividad antiinfecciosa del AE de AHI podría estar relacionada con la presencia de compuestos exclusivos de reconocida bioactividad, como los diterpenos kaureno y kauran-16-ol. Los diterpenos son metabolitos secundarios ampliamente reportados por su potente acción antimicrobiana, atribuida a su capacidad para alterar la integridad de las membranas celulares, interferir con la síntesis de proteínas y generar estrés oxidativo en células bacterianas. Diversos estudios han demostrado que estos compuestos pueden ejercer efectos antibacterianos importantes sobre bacterias (Zhou *et al.*, 2024; Kubo *et al.*, 2004),

4.1.2. Actividad de los aceites esenciales sobre el crecimiento de *A. baumannii*

Para considerar los AEs como bioactivos se han descrito criterios específicos en relación con el valor de CMI. Cuando el valor de CMI es <125 µg/ml, la actividad se describe como alta; valores obtenidos están entre 125 y 500 µg/mL se considera como moderada; 1000 µg/ml, como baja; y con MIC > 1000 µg/mL como inactivos. El valor de CMI para considerar a un AEs activo en este trabajo fue de ≤ 1000 µg/mL (Puvaca *et al.*, 2021).

Los AEs de PAU, PAM, AHI y LOR mostraron actividad sobre el crecimiento de al menos una cepa *A. baumannii* determinada mediante el ensayo REMA, lo que representó el 40% (4/10) de los AEs evaluados. Los AEs de PAU y PAM presentaron baja actividad sobre el aislado clínico resistente ABA-UIFY-81 (CMI = 1000 µg/mL). Para ambas especies no existen reportes de la actividad antibacteriana de sus AEs sobre *A. baumannii*. El AE de PAM ha demostrado tener actividad moderada y baja sobre *E. coli* (CMI = 125 µg/mL), *K. pneumoniae* (CMI = 1000 µg/mL) y *P. aeruginosa* (CMI = 1000 µg/mL) (Araujo *et al.*, 2019). En otro estudio de Santos *et al.* (2016), se

documentaron CMI similares a los de este estudio sobre *E. coli* (CMI = 1000 µg/mL) y *P. aeruginosa* (CMI = 1000 µg/mL).

El AE de AHI resultó activo sobre todas las cepas de *A. baumannii* (CMI=1000 µg/mL). Es importante resaltar que, aunque presentó una baja actividad, según los valores de CMI, este es el primer reporte de la propiedad antibacteriana del AE de AHI.

El AE de LOR mostró la mayor actividad sobre todas las cepas de *A. baumannii* con una CMI y CMB en un rango de 250-125 µg/mL. La potente actividad del AE de LOR sobre el crecimiento bacteriano se encuentra reportada para un amplio espectro de bacterias Gram negativas (Martínez *et al.*, 2023; Pinheiro *et al.*, 2022; Ribeiro *et al.*, 2021; Leal *et al.*, 2019; Sarrazin *et al.*, 2015; Betancourt *et al.*, 2012). Sin embargo, particularmente sobre *A. baumannii* los estudios son limitados. da Silva *et al.* (2024) evaluaron la actividad del AE de LOR sobre nueve aislados clínicos MDR de *A. baumannii* reportando una CMI y CMB de 256 a 128 µg/mL, lo que es similar a lo reportado en este trabajo. También se han obtenido CMI de 500 y 625 µg/mL sobre cepas de *A. baumannii* ATCC-19606 (Fimbres-García, *et al.*, 2024; Tapia-Rodríguez *et al.*, 2023). Estos resultados sugieren que el AE de LOR podría ser una fuente prometedora de nuevos agentes que inhiban el crecimiento en *A. baumannii*, especialmente relevante frente a la creciente ineffectividad de los antibióticos disponibles. Sin embargo, es importante considerar su citotoxicidad.

4.1.3. Actividad de los aceites esenciales sobre los factores de virulencia bacterianos

La actividad antivirulencia engloba la inhibición de la producción de los factores responsables del establecimiento de la infección, el daño al huésped y la propagación bacteriana. Los agentes antivirulencia deben tener la capacidad de actuar sobre productos génicos denominados factores de virulencia, los cuales son expresados por las bacterias específicamente durante procesos infecciosos y no son esenciales para la viabilidad bacteriana. Se ha propuesto que el desarrollo de terapias antivirulencia es una estrategia viable para el control de infecciones bacterianas, con la posibilidad de evitar o reducir la aparición de resistencia (Filipic *et al.*, 2024; Tang y Zhan., 2014). La búsqueda y desarrollo de fármacos con abordaje antivirulencia se ha enfocado principalmente sobre la inhibición del sistema de QS (Dickey *et al.*, 2017).

La actividad anti-QS de los AEs de PAU, PAM, AHI y LOR evaluada mediante el ensayo de inhibición de la producción de violaceína en *C. violaceum* mostró que los AEs de AHI y LOR inhibieron significativamente la producción de violaceína con una CI₅₀ de 126.40 µg/mL y 43.90 µg/mL, respectivamente, lo que implica un efecto sobre la expresión del QS bacteriano. La potente actividad anti-QS sobre *C. violaceum* del AE de LOR coincide con lo documentado

previamente por Cáceres *et al.* (2023) en Costa Rica ($CI_{50} = 112.3 \mu\text{g/mL}$). En otro estudio, se observó que el AE de LOR logró inhibir un 50% la producción de violaceína cuando se evaluó a una concentración de $100 \mu\text{g/mL}$ (Ortiz *et al.*, 2020). Esta es la primera vez que se reporta la actividad anti-QS del AE de AHL sobre bacterias. Los AEs son ampliamente reconocidos por su capacidad para interferir con el sistema de QS en *C. violaceum*, como se ha demostrado en varios estudios (Cáceres *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2019; Myszkka *et al.*, 2016). A pesar de ello, en este trabajo los AEs de PAU y PAM, que sí presentaron inhibición del crecimiento bacteriano, no presentaron actividad anti-QS.

La bacteria *A. baumannii* sintetiza compuestos antioxidantes y enzimas, como la catalasa y el superóxido dismutasa, para protegerse de las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por su propio metabolismo y por los neutrófilos durante la fagocitosis. Las catalasas descomponen el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), una especie reactiva de oxígeno producida por las células del sistema inmune para eliminar las bacterias (Selvaraj *et al.*, 2022; Eason y Fan, 2014). Esto permite a la bacteria evadir la acción de las células fagocíticas y otros mecanismos de defensa del huésped. Al inhibir las catalasas, las bacterias serían más susceptibles al daño oxidativo inducido por el sistema inmunológico, lo que facilitaría su eliminación por parte de las células del sistema inmune (Uc-Cachón *et al.*, 2024).

El AE de AHL mostro actividad en el ensayo de sensibilidad al peróxido de hidrógeno sobre la cepa *A. baumannii* ATCC-1605. En particular, se observó una mortalidad del 56,7 % tras la exposición al peróxido de hidrógeno cuando las bacterias habían sido pretratadas con el AE de AHL a una concentración de $500 \mu\text{g/mL}$ ($\frac{1}{2}$ CMI). En contraste, los AEs de LOR, PAU y PAM mostraron un efecto sensibilizante considerablemente menor, registrando tasas de mortalidad inferiores al 20 % en las mismas condiciones. Selvaraj *et al.* (2022) demostraron que el mirtenol ($200 \mu\text{g/mL}$) compuesto predominante en el AE de *Myrtus communis* induce una mortalidad del 50-77% en aislados clínicos de *A. baumannii*. Estudios previos de nuestro grupo revelaron que el extracto metanólico de la corteza ($250 \mu\text{g/mL}$) de la planta medicinal maya *Schoefia schreberi* mostró una mortalidad del 47.5% sobre un aislado clínico de *A. baumannii* (Uc-Cachón *et al.*, 2024).

4.1.4. Actividad de los aceites esenciales sobre los mecanismos de resistencia en *A. baumannii*

El aumento de bacterias patógenas resistentes a múltiples fármacos a nivel mundial representa un desafío enorme debido al notable aumento de la morbilidad y mortalidad en infecciones causadas por

estos patógenos. Para ello es necesario desarrollar nuevos agentes para evitar/revertir la resistencia bacteriana que además pueden ayudar a restaurar la eficacia de antibióticos actuales al inhibir los mecanismos de resistencia bacterianos, como, por ejemplo, la formación de biopelículas y la modulación de bombas de eflujo.

Las biopelículas bacterianas, compuestas por una matriz de sustancias poliméricas extracelulares, permiten que *A. baumannii* persista en entornos médicos, resista el efecto de los antibióticos convencionales y cause recurrencia de infecciones. Por ello, la búsqueda de agentes que inhiban la formación de biopelículas en *A. baumannii* es de importancia crítica, ya que los estudios son escasos (Zeng *et al.*, 2021).

En este trabajo se demostró que el AE de AHI inhibió significativamente la producción de biopelículas con una CI_{50} de 166.38 $\mu\text{g/mL}$ y 188.27 $\mu\text{g/mL}$, sobre las cepas ABA-ATCC-1605 y ABA-UIMY-81, respectivamente. No existen reportes en la literatura del efecto anti-biopelículas del AE de AHI. Sin embargo, existen reportes de AEs evaluados sobre la biopelícula de *A. baumannii*. Ganíc *et al.* (2022) reportaron que el AE de canela a 500 $\mu\text{g/mL}$ (*Cinnamomum verum*) exhibió la inhibición del 50% sobre de la formación de biopelículas de aislados clínicos resistentes de *A. baumannii*. En otro estudio, se documentó que se requieren concentraciones superiores a 1000 $\mu\text{g/mL}$ del AE de varias especies para inhibir el 50% de la formación de biopelículas de *A. baumannii* (Ouslimani *et al.*, 2023). En nuestro estudio, las concentraciones del AE de AHI necesarias para inhibir la formación de biopelículas fueron significativamente menores a lo reportado para otros AEs sobre *A. baumannii*, lo que remarca su potencial como agente anti-biopelículas. Aunado a lo anterior, las microfotografías del MEB mostraron una reducción significativa de la biopelícula bacteriana tratada con el AE de AHI en comparación con el control no tratado. Efectos similares sobre biopelículas han sido reportados en otros estudios con MEB que involucran AEs (Martinez *et al.*, 2021; Mohamed *et al.*, 2018; Khan *et al.*, 2012). Las alteraciones observadas incluyeron una disminución drástica en el número de células y densidad de la matriz de la biopelícula, así como daños evidentes en la superficie celular, lo cual es consistente con las perturbaciones inducidas por los AEs descrito en la literatura. Por ejemplo, Al-Shabib *et al.* (2017) demostraron que el AE de *Nigella sativa* provocó la desagregación de biopelículas de *P. aeruginosa*, acompañada de deformación celular y reducción de las sustancias poliméricas extracelulares según lo revelado por MEB. De manera similar, Sharma *et al.* (2020) reportaron que el AE de *Ocimum sanctum* afectó significativamente la integridad del biofilm en *K. pneumoniae*, observándose mediante MEB células colapsadas y lisadas, incrustadas en una matriz polimérica reducida. Estos cambios ultraestructurales sugieren que los AE pueden

comprometer la adhesión bacteriana inhibiendo el desarrollo y mantenimiento de las biopelículas, como lo mostrado por el AE de AHI en este estudio (Nazzaro *et al.*, 2013).

Contrario a lo encontrado para el AE de AHI, los AEs de PAU, PAM y LOR no presentaron actividad en la inhibición de la formación de biopelículas de *A. baumannii* a concentraciones subinhibitorias de su crecimiento. Tapa-Rodríguez *et al.* (2023) demostraron baja actividad anti-biopelículas del AE de LOR (Timol 65%) sobre *A. baumannii* ATCC-19606 (28% de inhibición a 250 µg/mL), efecto similar a nuestros resultados sobre ABA-ATCC-1605 (18.5% de inhibición a 125 µg/mL). Esto resulta discordante, particularmente para el AEs de LOR para el cual se ha documentado su potente actividad anti-biopelículas sobre otras bacterias Gram negativas como *E. coli* y *P. aeruginosa* (Martínez *et al.* 2023; Gómez-Sequeda *et al.*, 2020). Diversos autores mencionan que las características bioquímicas como la composición y estructura altamente robusta de la matriz extracelular de la biopelícula en *A. baumannii* les confiere mayor protección y resistencia en comparación con la biopelícula de otras especies como *E. coli* y *S. aureus* (Gedefie *et al.*, 2021). Ésta es una de las razones por las que *A. baumannii* presenta una notable capacidad de resistencia y persistencia en entornos hospitalarios (Pakharukova *et al.*, 2018).

Otro mecanismo importante de resistencia bacteriana es la expulsión de los antibióticos desde las células bacterianas por acción de proteínas de membrana externa. En particular la resistencia a múltiples fármacos observada en *A. baumannii* se ha atribuido a la sobreexpresión de las bombas de eflujo, reduciendo las dosis terapéuticas efectivas, por lo que para responder a este desafío se están orientando las investigaciones a descubrir inhibidores o moduladores de bombas de eflujo (AlMatar *et al.*, 2021)

A partir los resultados obtenidos del ensayo de modulación de la resistencia a antibióticos por efecto de los AEs en aislados clínicos de *A. baumannii* con sobreexpresión bombas de eflujo, los AEs de LOR y PAU modularon la resistencia de *A. baumannii* a AMK con una actividad mayor que la presentada por el control positivo PAβN. El PAβN actúa bloqueando competitivamente la acción de las bombas, lo que permite incrementar la acumulación intracelular de agentes antimicrobianos y, por lo tanto, restaurar su eficacia. Debido a su actividad como inhibidor estandarizado, el PAβN se emplea principalmente como herramienta experimental para identificar cepas que expresen bombas de eflujo (Gbian y Omri, 2021)

Diversos autores han demostrado la eficacia del AEs de LOR para modular la resistencia a AMK (FMA = 16), AMP (FMA = 32) y CIP (FMA = 32) en *S. aureus* y *E. coli* (Alcántara-Oliveira *et al.*, 2024; Dos Santos *et al.*, 2023; Barreto *et al.*, 2014), sin embargo, no existen estudios que evalúen

su efecto sobre *A. baumannii*. Para el AEs de PAU no existen estudios previos sobre su actividad en modulación de la resistencia vía bombas de eflujo, pero sí para el safrol, compuesto mayoritario presente en este AE, con un FMA = 16 con AMK (Almeida *et al.*, 2020). Se ha reportado el efecto de otros AEs sobre la modulación de la resistencia vía bombas de eflujo en *A. baumannii*, el AE de *Rosmarinus officinalis* (250 µg/mL) exhibió un valor de FMA = 16 en combinación con ciprofloxacina en *A. baumannii* (Saviuc *et al.*, 2016). En un reciente estudio Saleh *et al.* (2024), reportaron que los AEs de canela (*Cinnamomum verum*, 128 µg/mL), clavo (*Syzygium aromaticum*, 256 µg/mL) y tomillo (*Thymus vulgaris*, 128 µg/mL), en combinación con IMP disminuyeron la CMI (FMA de 8-16). En nuestros resultados, el AEs de LOR fue el único que redujo la CMI del IMP (FMA = 8).

4.1.5. Efecto citotóxico de los aceites esenciales sobre células Vero

La evaluación del efecto citotóxico de los AEs sobre células normales es esencial para determinar su viabilidad como agentes terapéuticos. Las células Vero, ampliamente utilizadas en estudios de citotoxicidad de agentes con potencial farmacéutico, permiten identificar posibles efectos adversos, lo que resulta crucial para garantizar la seguridad de los compuestos en aplicaciones clínicas (Burtscher *et al.*, 2021). El análisis citotóxico proporciona una medida preliminar del margen terapéutico, diferenciando entre concentraciones efectivas y niveles tóxicos que podrían generar daño celular en tejidos no diana (Kovacik *et al.*, 2017). En este sentido, la evaluación de la citotoxicidad en los AEs que mostraron inhibición del crecimiento en *A. baumannii* como el AE de PAU con un valor de CMI=1000 µg/mL presentó una CC₅₀ de 92.1 µg/mL, lo que resultó en un IS de 0.09, lo que denota baja selectividad hacia las células objetivo. También presentó efecto en la modulación de la resistencia a AMK a una concentración de 500 µg/mL (IS= 0.1) (Bouyahya *et al.*, 2018).

El AE de LOR mostró una CC₅₀ de 139.5 µg/mL, lo que demuestra un importante efecto citotóxico. Sin embargo, presentó actividad en la modulación de la resistencia en AMK e IMP a una concentración de 62.5 µg/mL (IS = 2.2), y un notable efecto anti-QS con una CI₅₀ de 43.90 µg/mL (IS = 3.1), ambas concentraciones por debajo de la CC₅₀. Por otro lado, cabe resaltar que el AE de AHI presentó actividad anti-biopelículas (CI₅₀ = 166.38-188.27 µg/mL; IS= 1.5-1.3) y anti-QS (CI₅₀ = 126.40 µg/mL; IS= 2.0) a concentraciones no citotóxicas para células Vero (CC₅₀ = 259.8 µg/mL). Aunque los valores de IS obtenidos para el AE de AHI sugieren un bajo potencial terapéutico, se podría obtener una mayor optimización para mejorar el perfil de seguridad de los AEs. Una de las estrategias más prometedoras para reducir la citotoxicidad consiste en la encapsulación del AE en sistemas de liberación controlada, como liposomas, nanopartículas

poliméricas o nanopartículas lipídicas sólidas, los cuales han demostrado mejorar la estabilidad, la biocompatibilidad y la liberación dirigida del compuesto, disminuyendo su citotoxicidad (da Silva *et al.*, 2020; Rai *et al.*, 2019).

4.1.6. Análisis de la relación entre la actividad biológica y la composición química

El uso de análisis multivariados, como el OPLS-DA se ha convertido en una herramienta poderosa para identificar biomarcadores, metabolitos asociados con la actividad biológica. Estas técnicas estadísticas avanzadas permiten extraer patrones significativos de conjuntos de datos complejos, permitiendo analizar la correlación entre la composición química de los AEs y los resultados específicos de actividad biológica. Los modelos OPLS-DA permitieron identificar varios metabolitos como posibles responsables de la actividad sobre *A. baumannii*. Estos fueron timol, *p*-cimeno, metabolitos específicos y mayoritarios en el AE de LOR, α -curcumeno y β -bisaboleno, moléculas presentes en el AE de PAM, safrol, metabolito mayoritario y específico del AE de PAU, y espatulenol, α -pineno y óxido de cariofileno metabolitos mayoritarios del AE de AHI.

El timol ha sido ampliamente estudiado por su actividad antibacteriana, incluyendo su eficacia contra bacterias resistente a múltiples fármacos como *E. coli*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* (Hajibonabi *et al.*, 2023; Souza *et al.*, 2022; Sahoo *et al.*, 2021; Marchese *et al.*, 2016; Santurio *et al.*, 2014). Particularmente, se han reportado CMI y CMB de 64 a 500 $\mu\text{g/mL}$ sobre diferentes cepas de *A. baumannii* en diferentes estudios (Tapia-Rodríguez *et al.*, 2023; Da silva *et al.*, 2023; Gan *et al.*, 2023; Hassannejad *et al.*, 2019). Investigaciones han demostrado que el timol interactúa con la membrana bacteriana debido a su naturaleza lipofílica y la capacidad de su grupo hidroxilo (-OH) para formar enlaces de hidrógeno. Este compuesto se inserta en la bicapa lipídica, desorganizando las interacciones entre los fosfolípidos y aumentando la fluidez de la membrana. Como consecuencia, se altera la permeabilidad, provocando la fuga de iones (K^+ , H^+) y moléculas esenciales. Estas alteraciones comprometen la homeostasis celular y conducen a la muerte bacteriana (Farhadi *et al.*, 2024; Souza *et al.*, 2022).

La actividad antibacteriana del *p*-cimeno ha sido descrito sobre bacterias Gram negativas como *E. coli* ATCC 43895 (CMI = 12,000 $\mu\text{g/mL}$) y *S. enterica* ATCC 6539 (CMI = 3,000 $\mu\text{g/mL}$) aunque con una baja actividad (Marchese *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2014). En este trabajo se exploró por primera vez la actividad del *p*-cimeno sobre cepas de *A. baumannii* que presentó valores de CMI y CMB de 1000 $\mu\text{g/mL}$ menores a lo reportado para otras bacterias en la literatura. Además, se ha explorado la sinergia entre el *p*-cimeno y otros compuestos presentes en el AE de LOR como el timol. La combinación de timol con *p*-cimeno ha mostrado efectos sinérgicos en la inhibición

del crecimiento bacteriano, lo que sugiere que la interacción entre estos compuestos puede potenciar la actividad antibacteriana (Martínez *et al.*, 2021; Ahmad *et al.*, 2014). Un estudio sobre el AEs de LOR que contiene abundante proporción de timol y *p*-cimeno, demostró que la mezcla de estos compuestos exhibe una actividad antimicrobiana más fuerte que la de cada componente individual (Oliveira-Ribeiro *et al.*, 2021). En nuestros resultados, para el aislado clínico ABA-UIMY-81 el AEs de LOR (CMI = 125 µg/mL) mostró mejor actividad que los compuestos puros, timol (CMI = 500 µg/mL) y *p*-cimeno (CMI = 1000 µg/mL), lo que evidencia una posible sinergia de estos metabolitos.

Se ha documentado actividad sobre el crecimiento bacteriano del safrol, compuesto mayoritario del AE de PAU, sobre *E. coli* y *S. aureus* (Khairan *et al.*, 2023; Almeida *et al.*, 2020) pero no existen estudios reportados sobre *A. baumannii*. Al igual que el timol, el safrol puede interactuar con la membrana celular, interrumpiendo las interacciones entre los fosfolípidos y alterando la permeabilidad. También se ha propuesto que el safrol puede interferir con sistemas enzimáticos esenciales para el metabolismo bacteriano, como enzimas involucradas en la síntesis de la pared celular y el metabolismo energético de la cadena respiratoria (Eid *et al.*, 2021).

Los sesquiterpenos de tipo bisaboleno (que incluyen tres isómeros; α -bisaboleno, β -bisaboleno y γ -bisaboleno) han sido ampliamente estudiados por su actividad antibacteriana sobre varias especies (Li *et al.*, 2023). Específicamente para el β -bisaboleno se ha reportado potente actividad sobre *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* (Shu *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2015; Nascimento *et al.*, 2007). Aunque el β -bisaboleno ha mostrado actividad antibacteriana en diversos estudios, su mecanismo de acción antibacteriano no está completamente dilucidado (Shu *et al.*, 2021). Para el sesquiterpeno α -curcumeno no existen reportes de su actividad antibacteriana, pero se ha documentado la actividad del AEs de *Copaifera langsdorffii* que contiene una abundante proporción de α -curcumeno (33%) sobre *S. aureus* (Alencar *et al.*, 2015).

El análisis por OPLS-DA identificó tres metabolitos como posibles biomarcadores de la actividad anti-QS, estos fueron timol, *p*-cimeno y espatulenol. En este trabajo el timol mostró una potente actividad en la inhibición de la producción de violaceína (CI₅₀ de 26.3 µg/mL) sobre *C. violaceum* ATCC 12472, mayor que la presentada por el AE de LOR (CI₅₀ de 112.3 µg/mL). Esto coincide con lo documentado por Saptami *et al.*, (2022) donde el timol presentó una CI₅₀ de 28 µg/mL en la inhibición de la violaceína en *C. violaceum*. En este mismo estudio, mediante análisis de acoplamiento molecular se demostró que el timol puede interactuar directamente con el sitio de unión de la proteína CviR, donde normalmente se acoplan las moléculas de señalización de QS. Esto evita que el receptor CviR se active, bloqueando la regulación de genes que inducen la

producción de violaceína, lo que sugiere que el timol también actúa como un inhibidor del QS bacteriano. No se encontraron estudios específicos que investiguen el efecto del *p*-cimeno y el espatulenol sobre el QS bacteriano. Sin embargo, varios terpenos han sido ampliamente reconocidos por sus propiedades anti-QS en diversos estudios (Dimitrova *et al.*, 2023; Bouyahya *et al.*, 2022).

El espatulenol, α -pineno y óxido de cariofileno, los tres compuestos más abundantes en el AE de AHI, se correlacionaron con la actividad anti-catalasa y anti-biopelículas. Para el espatulenol y α -pineno no se ha descrito propiedades sobre la enzima catalasa. No obstante, se ha demostrado en modelos *in vivo* que el óxido de cariofileno puede inhibir la actividad de la catalasa provocando un efecto antiinflamatorio (Ames-Sibin *et al.*, 2018; Nguyen *et al.*, 2017). También se ha descrito el efecto anti-catalasa de otros terpenos como β -cariofileno y mirtenol sobre *A. baumannii* lo que resalta el potencial, aún poco explorado, de los terpenos para inhibir factores de virulencia bacterianos mediante la modulación de la actividad de la catalasa, lo cual podría contribuir al desarrollo de estrategias antimicrobianas novedosas (Gyrdymova y Rubtsova, 2022; Selvaraj *et al.*, 2020).

Con relación a la actividad en la inhibición de biopelículas, el α -pineno ha demostrado poseer potente actividad anti-biopelículas según la literatura. da Silva *et al.* (2012) evaluaron el efecto del α -pineno sobre las biopelículas de *Candida albicans* encontrando que concentraciones subinhibitorias de 1500 y 750 $\mu\text{g/mL}$ inhibían más del 90% de la formación de biopelículas, lo que también coincide con lo reportado por Barros *et al.* (2023). También se ha documentado su actividad sobre bacterias, encontrando que el α -pineno (1250 $\mu\text{g/mL}$) inhibió completamente la formación de biopelículas en *S. epidermidis* (Sieniawska *et al.*, 2013). Cabe destacar que de los cuatro AEs evaluados sobre la actividad antibiopelículas, el AE de AHI fue el que presentó α -pineno en su composición química.

Se ha reportado que el espatulenol ejerce actividad sobre la formación de biopelículas en *P. aeruginosa*. En estudios previos, se observó que este metabolito es capaz de inhibir hasta un 50% la formación de biopelículas a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$, destacando además su capacidad para inhibir las moléculas de señalización del QS bacteriano (Gilabert *et al.*, 2011). Además, numerosos estudios han reportado actividad anti-biopelículas de AEs con abundantes concentraciones de espatulenol, como en *Myriactis nepalensis* (33% de espatulenol), *Croton conduplicatus* (22.1%), *Murraya koenigii* (15%) y *Ruellia paniculata* (13%) (Bains *et al.*, 2023; Fu *et al.*, 2022; Oliveira *et al.*, 2022; Sankar *et al.*, 2015). Para el óxido de cariofileno no se ha documentado su actividad anti-biopelículas, pero sí de AEs donde este metabolito es el

compuesto mayoritario como en *Ruellia asperula* (29%) y *Rhanterium suaveolens* (24.82%) (Vasconcelos *et al.*, 2023; Chemsá *et al.*, 2016).

El análisis mediante OPLS-DA permitió identificar tres metabolitos, a saber: timol, *p*-cimeno y safrol, como posibles biomarcadores asociados con la actividad en la modulación de la resistencia vía bombas de eflujo. Esto es concordante con nuestros resultados, donde el timol mostró modulación en combinación con IMP y AMK.

Diversos estudios han demostrado que el timol, *p*-cimeno y safrol tienen la capacidad de actuar como inhibidores competitivos de las bombas de eflujo en bacterias (Días *et al.*, 2022). No existen estudios de estos tres metabolitos sobre la modulación de bombas de eflujo en *A. baumannii*. No obstante, varios estudios mostraron que el timol puede restaurar la eficacia del norfloxacinó, amikacina y tetraciclina en *S. aureus* que expresa bombas de eflujo de tipo TetK, NorA y MsrA (Dos Santos *et al.*, 2022; Sousa Silveira *et al.*, 2020; Cirino *et al.*, 2015). También se ha estudiado la capacidad del timol (64 µg/mL) de inhibir la expresión de genes que regulan las bombas de eflujo en *E. coli*, demostrando que puede inhibir la expresión de los genes MarA y AcrB, que codifican componentes clave de las bombas de eflujo en esta bacteria (Yuan *et al.*, 2019). Estudios similares se han realizado con safrol, encontrando que concentraciones subinhibitorias de este metabolito redujeron significativamente la CMI del norfloxacinó y ciprofloxacino en *S. aureus*. Esto sugiere que el safrol inhibió las bombas de eflujo NorA y MepA lo cual fue corroborado mediante un análisis *in silico* (Almeida *et al.*, 2020). Mouwakeh *et al.* (2019) documentaron que el *p*-cimeno disminuye la expresión de los genes que codifican para la bomba de eflujo MepA en *S. aureus* (MRSA).

El uso AEs como estrategia antiinfecciosa contra *A. baumannii* representa una alternativa prometedora frente a la creciente problemática de la resistencia bacteriana. Los AEs constituyen mezclas complejas de metabolitos secundarios que pueden actuar sinérgicamente, afectando múltiples dianas celulares de manera simultánea. En este trabajo, los AEs de LOR, AHI, PAM y PAU demostraron tener un efecto *in vitro* sobre el crecimiento bacteriano y sobre los mecanismos de fármacorresistencia y virulencia de *A. baumannii*. Además, el análisis multivariado sugiere que los metabolitos responsables de la actividad en los AEs podrían estar implicados en más de un mecanismo bacteriano. Esta diversidad de modos de acción no sólo dificulta la adaptación y la generación de resistencia bacteriana, sino que también puede potenciar la eficacia del tratamiento al lograr un efecto coordinado.

El aprovechamiento de AEs derivados de PMA con actividad antiinfecciosa no sólo ofrece una estrategia eficaz desde un enfoque farmacológico, sino que también abre oportunidades para el desarrollo de sistemas agroecológicos sostenibles, basados en plantas nativas de nuestra región. La extracción de AEs a partir de especies nativas adaptadas a las condiciones locales podría incentivar la generación de cadenas de valor, promoviendo la diversificación productiva y beneficiando a las comunidades. De esta forma, la valorización de las PMA no sólo responde a la necesidad de nuevas alternativas terapéuticas frente a la resistencia bacteriana, sino que también podría impulsar el desarrollo económico local a través de la bioprospección y el aprovechamiento sostenible de la biodiversidad vegetal por parte de las comunidades que utilizan de manera tradicional estos valiosos recursos

CAPÍTULO V

5.1. CONCLUSIONES

La composición química de los diez aceites esenciales fue contrastante. Los aceites esenciales de *Lippia organoides*, *Piper auritum* y *Bursera simaruba* mostraron un compuesto monoterpénico claramente mayoritario, mientras que el resto de los aceites esenciales estuvieron representados por una variedad de sesquiterpenos en menores proporciones.

Los aceites esenciales de *L. organoides*, *P. auritum*, *P. amalago* y *Ambrosia hispida* inhibieron el crecimiento de *Acinetobacter baumannii*, siendo *L. organoides* el que mostró mayor actividad y el único con actividad bactericida. Esto se asoció con la abundante proporción de timol y *p*-cimeno presente en el aceite esencial de esta especie.

El aceite esencial de *A. hispida* mostró una potente capacidad de inhibir la formación de biopelículas, lo cual fue sustentado por fotografías del microscopio electrónico de barrido en las que se observan cambios importantes en la formación de biopelícula de cepas tratadas con este aceite esencial. También presentó notable actividad antivirulencia sobre el quorum sensing y actividad de catalasa. Esto se asoció con la abundancia de espatulenol, α -pineno y óxido de cariofileno presente en el aceite esencial. Este es el primer reporte de las propiedades antibacterianas, antivirulencia y anti-biopelículas del aceite esencial de *A. hispida*.

Los aceites esenciales de *L. organoides* y *P. auritum* mostraron actividad en la modulación de la resistencia a antibióticos en aislados clínicos de *A. baumannii*, reduciendo la concentración mínima inhibitoria de amikacina e imipenem combinación con ambos aceites. Timol y safrol, compuestos mayoritarios presentes en *L. organoides* y *P. auritum*, han sido descritos como inhibidores naturales de bombas de eflujo en células bacterianas.

El uso de herramientas quimiométricas como el análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales ortogonales permitió identificar los metabolitos que podrían estar relacionados con la actividad antiinfecciosa de los aceites esenciales bioactivos, permitiendo discriminar aquellos compuestos con mayor contribución a la actividad biológica observada.

Los aceites esenciales representan una alternativa para combatir la resistencia bacteriana, ya que su composición compleja permite actuar sobre varios mecanismos de acción, dificultando la aparición de resistencia. Además de su potencial terapéutico, su obtención podría fomentar el desarrollo agroecológico, promoviendo la sostenibilidad y beneficiando a las comunidades a

través del aprovechamiento de la biodiversidad y la generación de oportunidades económicas locales.

Finalmente, es fundamental continuar investigando la actividad antiinfecciosa de los aceites esenciales de las plantas medicinales aromáticas de nuestra región. Este enfoque contribuirá al conocimiento sobre el potencial terapéutico de la biodiversidad regional, así como a la revalorización de estas especies en el contexto de la medicina tradicional. También, permitirá la identificación de aceites esenciales prometedores como estrategia para el desarrollo de fitofármacos que podrían actuar como alternativas en la lucha contra la resistencia antimicrobiana.

5.2. PERSPECTIVAS

Como perspectivas, se plantea la necesidad de evaluar individualmente y en combinación los metabolitos identificados por OPLS-DA sobre los modelos *in vitro* realizados en este trabajo. También resulta importante realizar estudios *in silico* para complementar la identificación de biomarcadores con mayor precisión. Esto permitirá determinar con mayor exactitud los mecanismos subyacentes y las interacciones entre los compuestos activos presentes en los aceites esenciales.

Una perspectiva relevante sería evaluar la citotoxicidad de los aceites esenciales bioactivos sobre otras líneas celulares, como células mononucleares y epiteliales humanas, con el objetivo de garantizar su seguridad y ampliar el conocimiento sobre su citotoxicidad. También es necesario la exploración de estrategias para la incorporación de los aceites esenciales en sistemas de administración innovadores, como nanopartículas o emulsiones, con el fin de potenciar su eficacia antimicrobiana y facilitar su incorporación en la terapia.

La integración de análisis ómicos, como transcriptómica o proteómica, podría proporcionar una visión más detallada del impacto de estos compuestos sobre los mecanismos de acción bacterianos y las redes moleculares implicadas en la inhibición que presentan los aceites esenciales sobre los mecanismos de resistencia y virulencia. Estas líneas de investigación abrirían nuevas oportunidades para el desarrollo de agentes terapéuticos basados en productos naturales, que puedan ser utilizados en el control de bacterias resistentes a múltiples fármacos, con especial énfasis en *A. baumannii*.

BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Rahman, O. A., Rasslan, F., Hassan, S. S., Ashour, H. M., y Wasfi, R. (2023). The RND Efflux Pump Gene Expression in the Biofilm Formation of *Acinetobacter baumannii*. *Antibiotics*, 12(2), 419.
- Abdi, S. N., Ghotaslou, R., Ganbarov, K., Mobed, A., Tanomand, A., Yousefi, M., ... y Kafil, H. S. (2020). *Acinetobacter baumannii* efflux pumps and antibiotic resistance. *Infection and Drug Resistance*, 423-434.
- Adams, R. P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Quinta edición. *Texensis Publishing*, Texas pp. 456.
- Ahmad, A., Van Vuuren, S., y Viljoen, A. (2014). Unravelling the complex antimicrobial interactions of essential oils—the case of *Thymus vulgaris* (Thyme). *Molecules*, 19(3), 2896-2910.
- Alavez, D. y Cruz, S. (2022). Enervantes aromas que matan o ahuyentan. *Elementos (BUAP)*, 127, 23-26.
- Alcantara Oliveira, F. A., Lemos, G. M. D., de Sousa, J. N., de Figueirêdo, G. S., de Freitas, D. R. J., Ferreira, J. H. L y Barreto, H. M. (2024). Modulation of fluoroquinolone resistance by *Lippia origanoides* Kunth in *Staphylococcus aureus*. *Vegetos*, 1-9.
- Alcántar-Curiel, M. D., García-Torres, L. F., González-Chávez, M. I., Morfín-Otero, R., Gayosso-Vázquez, C., Jarillo-Quijada, M. D. y Santos-Preciado, J. I. (2014). Molecular mechanisms associated with nosocomial carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Mexico. *Archives Of Medical Research*, 45(7), 553-560.
- Alcaraz-Meléndez, L., Delgado-Rodríguez, J., y Real-Cosío, S. (2004). Analysis of essential oils from wild and micropropagated plants of damiana (*Turnera diffusa*). *Fitoterapia*, 75(7-8), 696-701.
- Almatar, M., Albarri, O., Makky, E. A., y Köksal, F. (2021). Efflux pump inhibitors: new updates. *Pharmacological Reports*, 73, 1-16.
- Almeida, R. S., Freitas, P. R., Araújo, A. C. J., Alencar Menezes, I. R., Santos, E. L., Tintino, S. R. y Melo Coutinho, H. D. (2020). GC-MS profile and enhancement of antibiotic activity by the essential oil of *Ocotea odorífera* and safrole: Inhibition of *Staphylococcus aureus* efflux pumps. *Antibiotics*, 9(5), 247.

-
- Ames-Sibin, A. P., Barizão, C. L., Castro-Ghizoni, C. V., Silva, F. M., Sá-Nakanishi, A. B., Bracht, L. y Comar, J. F. (2018). β -Caryophyllene, the major constituent of copaiba oil, reduces systemic inflammation and oxidative stress in arthritic rats. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(12), 10262-10277.
- Antunes, L. C., Visca, P., y Towner, K. J. (2014). *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathogens and Disease*, 71(3), 292-301.
- Araujo Baptista, L. M., Rondón Rivas, M. E., y Cruz Tenempaguay. (2019). Antimicrobial activity of the essential oil of *Piper amalago* L. (Piperaceae) collected in coastal Ecuador. *Pharmacology Online*, 3, 15-27.
- Ardehali, S. H., Azimi, T., Fallah, F., Owrang, M., Aghamohammadi, N., y Azimi, L. (2019). Role of efflux pumps in reduced susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbes and New Infections*, 30, 100547.
- Arellando Rodriguez J.A. Flores Guido J. S., Tun-Garrido, J. y Cruz Bojorquez, M. (2003) Nomenclatura y forma de vida, uso manejo y distribución de las especies vegetales de la península de Yucatán. Universidad autónoma de Yucatán, México, pp. 235.
- Ashok, T., Madhuri, N., Raju, G. L. N., y Rani, M. (2015). Antimicrobial activity of *Bursera penicillata* leaf extracts on human infectious pathogens. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(2), 841.
- Ashour, M., Wink, M., y Gershenzon, J. (2010). Biochemistry of terpenoids: monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 303.
- Avetisyan, A., Markosian, A., Petrosyan, M., Sahakyan, N., Babayan, A., Aloyan, S. y Trchounian, A. (2017). Chemical composition and some biological activities of the essential oils from basil *Ocimum* different cultivars. *BMC complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 1-8.
- Azevedo, N. R., Campos, I. F. P., Ferreira, H. D., Portes, T. A., Seraphin, J. C., De Paula, J. R. y Ferri, P. H. (2002). Essential oil chemotypes in *Hyptis suaveolens* from Brazilian Cerrado. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30(3), 205-216.
- Badave, G. K., y Kulkarni, D. (2015). Biofilm producing multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: an emerging challenge. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 9(1), DC08.
-

-
- Baez, K. (2019). Análisis farmacognóstico y molecular de *Turnera diffusa* var. *aphrodisiaca* y *Turnera diffusa* var. *diffusa* Willd. Ex. Schult. Tesis de doctorado. Centro de investigación en Alimentación y Desarrollo, Sinaloa, México, pp. 125.
- Bains, A., Sridhar, K., Kaushik, R., Chawla, P., y Sharma, M. (2023). Enzyme-assisted polysaccharides extraction from *Calocybe indica*: Synergistic antibiofilm and oxidative stability of essential oil nanoemulsion. *International Journal of Biological Macromolecules*, 242, 124843.
- Barbosa, L. C. A., Filomeno, C. A., y Teixeira, R. R. (2016). Chemical variability and biological activities of *Eucalyptus* spp. essential oils. *Molecules*, 21(12), 1671.
- Barrera, C. A. C., Gómez, D. C., y Castiblanco, F. A. (2016). Importancia medicinal del género *Croton* (Euphorbiaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(2), 234-247.
- Barreto, H. M., Fontinele, F. C., De Oliveira, A. P., Arcanjo, D. D. R., Dos Santos, B. H. C., De Abreu, A. P. L., ... y Lopes, J. A. D. (2014). Phytochemical prospection and modulation of antibiotic activity in vitro by *Lippia organoides* HBK in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *BioMed Research International*, 2014.
- Barros, D. B., e Lima, L. D. O., da Silva, L. A., Fonseca, M. C., Ferreira, R. C., Neto, H. D. y da Silva, M. V. (2023). α -Pinene: docking study, cytotoxicity, mechanism of action, and anti-biofilm effect against *Candida albicans*. *Antibiotics*, 12(3).
- Baser, K. H. C. y Buchbauer, G. (2009). Handbook of essential oils: science, technology, and applications. *CRC Press*, pp. 654.
- Bassolé, I. H. N., y Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17(4), 3989-4006.
- Betancourt, L., Phandanauvong, V., Patiño, R., Ariza-Nieto, C., y Afanador-Téllez, G. (2012). Composition and bactericidal activity against beneficial and pathogenic bacteria of oregano essential oils from four chemotypes of *Origanum* and *Lippia* genus. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 59(1), 21-31.
- Bhakti, M, Kahane, M. B. C. y Kakade, M. (2020). A Review on Genus *Lantana*. *International Journal of Pharmaceutical Research and Applications*, 7(2), 342-347.

-
- Bonilla-Landa, I., Callejas-Linares, J. M., Murillo, E. M. C., Farías, F. R., Guevara-Valencia, M., Monribot-Villanueva, J. L., y Guerrero-Analco, J. A. (2022). Actividad antibacteriana y perfil fenólico del extracto metanólico de las partes aéreas de *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae). *Acta Botanica Mexicana*, 13, 129.
- Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Assemian, I. C. C., Abrini, J., y Dakka, N. (2018). In vitro antiproliferative activity of selected medicinal plants from the North-West of Morocco on several cancer cell lines. *European Journal of Integrative Medicine*, 18, 23-29.
- Bouyahya, A., Chamkhi, I., Balahbib, A., Rebezov, M., Shariati, M. A., Wilairatana, P. y El Omari, N. (2022). Mechanisms, anti-quorum-sensing actions, and clinical trials of medicinal plant bioactive compounds against bacteria: a comprehensive review. *Molecules*, 27(5), 1484.
- Bueno, J., Escobar, P., Martínez, J. R., Leal, S. M., y Stashenko, E. E. (2011). Composition of three essential oils, and their mammalian cell toxicity and antimycobacterial activity against drug resistant-tuberculosis and non-tuberculous mycobacteria strains. *Natural Product Communications*, 6(11), 1934578X1100601143.
- Burtscher, J., Etter, D., Biggel, M., Schlaepfer, J., y Johler, S. (2021). Further insights into the toxicity of bacillus cytotoxicus based on toxin gene profiling and Vero cell cytotoxicity assays. *Toxins*, 13(4), 234.
- Cáceres, M., Hidalgo, W., Stashenko, E. E., Torres, R. y Ortiz, C. (2023). Metabolomic analysis of the effect of *Lippia origanoides* essential oil on the inhibition of quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*. *Antibiotics*, 12(5), 814.
- Cáceres, M., Hidalgo, W., Stashenko, E., Torres, R., y Ortiz, C. (2020). Essential oils of aromatic plants with antibacterial, anti-biofilm and anti-quorum sensing activities against pathogenic bacteria. *Antibiotics*, 9(4), 147.
- Calvo-Irabién, L. (2012). Plantas aromáticas de Yucatán. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán, México, pp. 63.
- Calvo-Irabién, L. M., Grijalva-Arango, R., Ix-Magaña, M. y Uh-Góngora, W. (2022). Flora aromática de la Península de Yucatán: importancia del olor para entender los patrones de uso. *Desde el Herbario CICY*, 14: 256-260.

-
- Calvo-Irabién, L. M., Parra-Tabla, V., Acosta-Arriola, V., Escalante-Erosa, F., Díaz-Vera, L., Dzib, G. R., y Peña-Rodríguez, L. M. (2014). Phytochemical Diversity of the Essential Oils of Mexican Oregano (*Lippia graveolens* Kunth) Populations along an Edapho-Climatic Gradient. *Chemistry and Biodiversity*, 11(7), 1010-1021.
- Canale, A., Benelli, G., Conti, B., Lenzi, G., Flamini, G., Francini, A., y Cioni, P. L. (2013). Ingestion toxicity of three Lamiaceae essential oils incorporated in protein baits against the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera Tephritidae). *Natural Product Research*, 27(22), 2091-2099.
- Cardiel, L. J. C., Contreras, V. V., Jamett, F. H. T., y Quintana, K. P. (2021). Identificación de un brote de *Acinetobacter baumannii* y su persistencia hospitalaria. *Expresiones Médicas*, 9(2), 14-23.
- Carev, I., Gelemanović, A., Glumac, M., Tutek, K., Dželalija, M., Paiardini, A., y Prosseda, G. (2023). *Centaurea triumfetii* essential oil chemical composition, comparative analysis, and antimicrobial activity of selected compounds. *Scientific Reports*, 13(1), 7475.
- Carrara, V. D. S., Souza, A. D., Dias Filho, B. P., Nakamura, C. V., Paulo, L. F. D., Young, M. y García Cortez, D. A. (2010). Chemical composition and antifungal activity of the essential oil from *Piper amalago* L. *Latin American Journal of Pharmacy*, 34, 29-35.
- Carreño, H., Stashenko, E. E., y Escobar, P. (2023). Essential Oils Distilled from Colombian Aromatic Plants and Their Constituents as Penetration Enhancers for Transdermal Drug Delivery. *Molecules*, 28(6), 2872.
- Carrillo-Galván, G., Bye, R., Eguiarte, L. E., Cristians, S., Pérez-López, P., Vergara-Silva, F., y Luna-Cavazos, M. (2020). Domestication of aromatic medicinal plants in Mexico: Agastache (Lamiaceae)—an ethnobotanical, morpho-physiological, and phytochemical analysis. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 16(1), 1-16.
- Chamorro, E. R., Zambón, S. N., Morales, W. G., Sequeira, A. F., y Velasco, G. A. (2012). Study of the chemical composition of essential oils by gas chromatography. *Gas chromatography in plant science, wine technology, toxicology and some specific applications*, 1, 307-324.
- Chemsa, A. E., Erol, E., Öztürk, M., Zellagui, A., Özgür, C., Gherraf, N., y Duru, M. E. (2016). Chemical constituents of essential oil of endemic *Rhanterium suaveolens* Desf.

-
- growing in Algerian Sahara with antibiofilm, antioxidant and anticholinesterase activities. *Natural Product Research*, 30(18), 2120-2124.
- Chokshi, A., Sifri, Z., Cennimo, D., y Horng, H. (2019). Global contributors to antibiotic resistance. *Journal of Global Infectious Diseases*, 11(1), 36.
- Chouhan, S., Sharma, K., y Guleria, S. (2017). Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. *Medicines*, 4(3), 58.
- Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., y Florou-Paneri, P. (2012). Aromatic plants as a source of bioactive compounds. *Agriculture*, 2(3), 228-243.
- Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., y Florou-Paneri, P. (2012). Aromatic plants as a source of bioactive compounds. *Agriculture*, 2(3), 228-243.
- Chua, L. Y., Chong, C. H., Chua, B. L., y Figiel, A. (2019). Influence of drying methods on the antibacterial, antioxidant and essential oil volatile composition of herbs: A review. *Food and Bioprocess Technology*, 12, 450-476.
- Chung, N. T., Huong, L. T., Dai, D. N., y Ogunwande, I. A. (2020). Chemical compositions of essential oils and antimicrobial activity of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit.(Lamiaceae) from Vietnam. *European Journal of Medicinal Plants*, 31(8), 114-123.
- Cirino, I. C. S., Menezes-Silva, S. M. P., Silva, H. T. D., de Souza, E. L., y Siqueira-Júnior, J. P. (2015). The essential oil from *Origanum vulgare* L. and its individual constituents carvacrol and thymol enhance the effect of tetracycline against *Staphylococcus aureus*. *Chemotherapy*, 60(5-6), 290-293.
- Cucho-Medrano, J. L. L., Mendoza-Beingolea, S. W., Fuertes-Ruitón, C. M., Salazar-Salvatierra, M. E. y Herrera-Calderon, O. (2021). Chemical Profile of the Volatile Constituents and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from *Croton adipatus*, *Croton thurifer*, and *Croton collinus*. *Antibiotics*, 10(11), 1387.
- da Silva Cirino, I. C., de Santana, C. F., Bezerra, M. J. R., Rocha, I. V., de Oliveira Luz, A. C., Coutinho, H. D. M. y Leal-Balbino, T. C. (2023). Comparative transcriptomics analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in response to treatment with the terpenic compounds thymol and carvacrol. *Biomedicine y Pharmacotherapy*, 165, 115189.

-
- da Silva Mota, J., de Souza, D. S., Boone, C. V., Lima Cardoso, C. A., y Bastos Caramão, E. (2013). Identification of the volatile compounds of leaf, flower, root and stem oils of *Piper amalago* (Piperaceae). *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 16(1), 11-16.
- da Silva Rivas, A. C., Lopes, P. M., de Azevedo Barros, M. M., Costa Machado, D. C., Alviano, C. S., y Alviano, D. S. (2012). Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. *Molecules*, 17(6), 6305-6316.
- da Silva, A. T., Cândido, A. E. C., Júnior, E. D. C., do É, G. N., Moura, M. P., Souza, R. D. y da Costa, M. M. (2024). Bactericidal and Synergistic Effects of *Lippia origanoides* Essential Oil and Its Main Constituents against Multidrug-Resistant Strains of *Acinetobacter baumannii*. *ACS Omega*, 9 (43).
- Da Silva, A., Lopes, P. M., Costa, D. C. M., Alviano, C. S., y Alviano, D. S. (2012). Biological Activities of α -Pinene and $[\beta]$ -Pinene Enantiomers. *Molecules*, 17(6), 6305.
- Dadgostar, P. (2019). Antimicrobial resistance: implications and costs. *Infection and Drug Resistance*, 3903-3910.
- Damasceno, E. T. S., Almeida, R. R., de Carvalho, S. Y. B., de Carvalho, G. S. G., Mano, V., Pereira, A. C., y de Lima Guimaraes, L. G. (2018). *Lippia origanoides* Kunth. essential oil loaded in nanogel based on the chitosan and p-coumaric acid: Encapsulation efficiency and antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, 125, 85-94.
- de Alencar, J. M., Araújo, L. D. C., Oliveira, A. P., Guimarães, A. L., Pacheco, A. G., Silva, F. S. y Araújo, E. C. D. C. (2017). Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from leaves of *Croton heliotropiifolius* in different seasons of the year. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27, 440-444.
- de Araújo, A. C., R. Freitas, P., Rodrigues dos Santos Barbosa, C., Muniz, D. F., Esmeraldo Rocha, J., Neto, J. B. D. A. y Melo Coutinho, H. D. (2020). Essential oil of *Croton ceanothifolius* Baill. potentiates the effect of antibiotics against multiresistant bacteria. *Antibiotics*, 9(1), 27.
- de Santana, L., Bizzo, H. R., Souza, A. M., Lourenço, M. C. S., Silva, P. E. A., Tavares, E. S. y Leitão, S. G. (2009). Essential oils from two *Lantana* species with antimycobacterial activity. *Natural Product Communications*, 4(12), 1934578X0900401224.

-
- Dehsheikh, A. B., Sourestani, M. M., Dehsheikh, P. B., Mottaghipisheh, J., Vitalini, S., y Iriti, M. (2020). Monoterpenes: Essential oil components with valuable features. *Mini Reviews In Medicinal Chemistry*, 20(11), 958-974.
- Dewick, P. M. (2009). The mevalonate and methylerythritol phosphate pathways: Terpenoids and steroids. *Medicinal Natural Products*, 187-310.
- Dharsono, H. D. A., Putri, S. A., Kurnia, D., Dudi, D. y Satari, M. H. (2022). *Ocimum* species: A review on chemical constituents and antibacterial activity. *Molecules*, 27(19), 6350.
- Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., y Mnif, W. (2016). Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. *Medicines*, 3(4), 25.
- Dias, K. J. S. D. O., Miranda, G. M., Bessa, J. R., Araújo, A. C. J. D., Freitas, P. R., Almeida, R. S. D. y Ribeiro-Filho, J. (2022). Terpenes as bacterial efflux pump inhibitors: A systematic review. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 953982.
- Díaz-Núñez, J. L., García-Contreras, R., y Castillo-Juárez, I. (2021). The new antibacterial properties of the plants: Quo vadis studies of anti-virulence phytochemicals? *Frontiers in Microbiology*, 12, 667126.
- Dickey, S. W., Cheung, G. Y., y Otto, M. (2017). Different drugs for bad bugs: antivirulence strategies in the age of antibiotic resistance. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(7), 457-471.
- Kubo, I., Xu, Y., & Shimizu, K. (2004). Antibacterial activity of ent-kaurene diterpenoids from *Rabdosia rosthornii*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 18(2), 180-183.
- Dimitrova, P. D., Damyanova, T., y Paunova-Krasteva, T. (2023). *Chromobacterium violaceum*: Model for Evaluating Anti-Quorum Sensing Activity of Plant Substances. *Scientia Pharmaceutica*, 91(3), 33.
- Djeussi DE, Noumedem JA, Seukep JA, y Fankam L. (2013). Antibacterial activities of selected edible plants extract against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13, 1-8.
- Doron, S. y Gorbach, S. L. (2008). Bacterial Infections: Overview. *International Encyclopedia of Public Health*, 273–282.
-

-
- Dos Santos Barbosa, C. R., Scherf, J. R., de Freitas, T. S., de Menezes, I. R. A., Pereira, R. L. S., Dos Santos, J. F. S. y da Cunha, F. A. B. (2021). Effect of carvacrol and thymol on NorA efflux pump inhibition in multidrug-resistant (MDR) *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 53(4), 489-498.
- Dos Santos, B. N. G., Furtado, M. M., de Freitas, E. E., Lima, L. R., Leão, P. V. S., de Alcântara Oliveira, F. A. y Barreto, H. M. (2023). Chemical profile of the essential oil of *Lippia organoides* Kunth and antibiotic resistance-modifying activity by gaseous contact method. *Journal of Herbal Medicine*, 41, 100703.
- Dosoky, N. S., y Setzer, W. N. (2018). Chemical composition and biological activities of essential oils of Curcuma species. *Nutrients*, 10(9), 1196.
- Drummond AJ, Waigh RD. Waigh y Pandalai SG. (2000). Recent research developments in phytochemistry. *International Journal of Chemistry*, 4, 143–152.
- Dzib-Baak, H. E., Uc-Cachón, A. H., Dzúl-Beh, A. D. J., Rosado-Manzano, R. F., Gracida-Osorno, C., y Molina-Salinas, G. M. (2022). Efficacy of Fosfomycin against Planktonic and Biofilm-Associated MDR Uropathogenic *Escherichia coli* Clinical Isolates. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 7(9), 235.
- Dzul-Beh, A. D. J., García-Sosa, K., Uc-Cachón, A. H., Bórquez, J., Loyola, L. A., Barrios-García, H. B. y Molina-Salinas, G. M. (2020). In vitro growth inhibition and bactericidal activity of spathulenol against drug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29, 798-800.
- Dzul-Beh, A., Uc-Cachón, A. H., González-Sánchez, A. A., Dzib-Baak, H. E., Ortiz-Andrade, R., Barrios-García, H. B. y Molina-Salinas, G. M. (2023). Antimicrobial potential of the Mayan medicine plant *Matayba oppositifolia* (A. Rich.) Britton against antibiotic-resistant priority pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*, 300, 115738.
- Eason, M. M., y Fan, X. (2014). The role and regulation of catalase in respiratory tract opportunistic bacterial pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 74, 50-58.
- Eid, A. M., y Hawash, M. (2021). Biological evaluation of Safrole oil and Safrole oil Nanoemulgel as antioxidant, antidiabetic, antibacterial, antifungal and anticancer. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21(1), 159.

-
- El Atki, Y., Aouam, I., El Kamari, F., Taroq, A., Nayme, K., Timinouni, M. y Abdellaoui, A. (2019). Antibacterial activity of cinnamon essential oils and their synergistic potential with antibiotics. *Journal of advanced pharmaceutical technology y research*, 10(2), 63.
- Elbestawy, M. K., El-Sherbiny, G. M. y Moghannem, S. A. (2023). Antibacterial, antibiofilm and anti-inflammatory activities of eugenol clove essential oil against resistant *Helicobacter pylori*. *Molecules*, 28(6), 2448.
- Farhadi, K., Rajabi, E., Varpaei, H. A., Iranzadasl, M., Khodaparast, S., y Salehi, M. (2024). Thymol and carvacrol against *Klebsiella*: anti-bacterial, anti-biofilm, and synergistic activities—a systematic review. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1487083.
- Feizi, N., Hashemi-Nasab, F. S., Golpelichi, F., Saburouh, N., y Parastar, H. (2021). Recent trends in application of chemometric methods for GC-MS and GC-MS-based metabolomic studies. *Trends in Analytical Chemistry*, 138, 116239.
- Feng, Y. X., Lu, X. X., Du, Y. S., Zheng, Y., Zeng, D., y Du, S. S. (2022). Sesquiterpenoid-rich essential oils from two *Magnolia* plants: Contact and repellent activity to three stored-product insects. *Journal of Oleo Science*, 71(3), 435-443.
- Ferraz, A., Balbino, J. M., Zini, C. A., Ribeiro, V. L. S., Bordinon, S. A., y von Poser, G. (2010). Acaricidal activity and chemical composition of the essential oil from three *Piper* species. *Parasitology Research*, 107, 243-248.
- Ferreira, W. C., Carrillo, M. R., Rojas, L., y Porcar, C. R. (2019). Chemical composition of essential oils from *B. simaruba* (L.) Sarg. fruits and the resins from three *Bursera* species: *B. simaruba* (L.) Sarg, *B. glabra* Jack and *B. inversa* Daly. *Avances en Química*, 14(1), 25-29.
- Fidy, K., Fiedorowicz, A., Strzdała, L., y Szumny, A. (2016). β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide—natural compounds of anticancer and analgesic properties. *Cancer Medicine*, 5(10), 3007-3017.
- Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G., y Scheffer, J. J. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance journal*, 23(4), 213-226.

-
- Figueiredo, P. L. B., Silva, S. G., Nascimento, L. D., Ramos, A. R., Setzer, W. N., da Silva, J. K. R., y Andrade, E. H. A. (2018). Seasonal study of methyleugenol chemotype of *Ocimum campechianum* essential oil and its fungicidal and antioxidant activities. *Natural Product Communications*, 13(8), 1934578X1801300833.
- Filho, J. G. S., Xavier, H. S., Filho, J. M. B. y Duringer, J. M. (2010). A chemical marker proposal for the Lantana genus: composition of the essential oils from the leaves of *Lantana radula* and *L. canescens*. *Natural Product Communications*, 5(4), 1934578X1000500429.
- Filho, J. G. S., Xavier, H. S., Filho, J. M. B., y Duringer, J. M. (2010). A chemical marker proposal for the *Lantana* genus: composition of the essential oils from the leaves of *Lantana radula* and *L. canescens*. *Natural Product Communications*, 5(4), 1934578X1000500429.
- Filipić, B., Ušjak, D., Rambaher, M. H., Oljatic, S., y Milenković, M. T. (2024). Evaluation of novel compounds as anti-bacterial or anti-virulence agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14, 1370062.
- Fimbres-García, J. O., Flores-Sauceda, M., Othón-Díaz, E. D., García-Galaz, A., Tapiá-Rodriguez, M. R., Silva-Espinoza, B. A. y Ayala-Zavala, J. F. (2024). *Lippia graveolens* Essential Oil to Enhance the Effect of Imipenem against Axenic and Co-Cultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Antibiotics*, 13(5), 444.
- Francomano, F., Caruso, A., Barbarossa, A., Fazio, A., La Torre, C., Ceramella, J. y Sinicropi, M. S. (2019). β -Caryophyllene: a sesquiterpene with countless biological properties. *Applied sciences*, 9(24), 5420.
- Freires, I. A., Denny, C., Benso, B., Alencar, S. M. D., y Rosalen, P. L. (2015). Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: a systematic review. *Molecules*, 20(4), 7329-7358.
- Fu, J., Gao, Y., y Xing, X. (2022). Preliminary Study on Phytochemical Constituents and Biological Activities of Essential Oil from *Myriactis nepalensis* Less. *Molecules*, 27(14), 4631.

-
- Gan, C., Langa, E., Valenzuela, A., Ballesteros, D., y Pino-Otín, M. R. (2023). Synergistic activity of thymol with commercial antibiotics against critical and high WHO priority pathogenic bacteria. *Plants*, 12(9), 1868.
- Ganić, T., Vuletić, S., Nikolić, B., Stevanović, M., Kuzmanović, M., Kekić, D. y Mitić-Ćulafić, D. (2022). Cinnamon essential oil and its emulsion as efficient antibiofilm agents to combat *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 989667.
- García, Í. R., de Oliveira Garcia, F. A., Pereira, P. S., Coutinho, H. D. M., Siyadatpanah, A., Norouzi, R. y Rodrigues, F. F. G. (2022). Microbial resistance: The role of efflux pump superfamilies and their respective substrates. *Life Sciences*, 120391.
- Garza-González, E., Morfín-Otero, R., Mendoza-Olazarán, S., Bocanegra-Ibarias, P., Flores-Treviño, S., Rodríguez-Noriega, E. y Camacho-Ortiz, A. (2019). A snapshot of antimicrobial resistance in Mexico. Results from 47 centers from 20 states during a six-month period. *PLoS One*, 14(3), e0209865.
- Gayer, M., Legros, D., Formenty, P., y Connolly, M. A. (2007). Conflict and emerging infectious diseases. *Emerging infectious diseases*, 13(11), 1625.
- Gbian, D. L., y Omri, A. (2021). The impact of an efflux pump inhibitor on the activity of free and liposomal antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*. *Pharmaceutics*, 13(4), 577.
- Gedefie, A., Demsis, W., Ashagrie, M., Kassa, Y., Tesfaye, M., Tilahun, M. y Sahle, Z. (2021). *Acinetobacter baumannii* biofilm formation and its role in disease pathogenesis: a review. *Infection And Drug Resistance*, 3711-3719.
- Gershenzon, J., y Dudareva, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology*, 3(7), 408-414.
- Ghannadi, A., Bagherinejad, M. R., Abedi, D., Jalali, M., Absalan, B., y Sadeghi, N. (2012). Antibacterial activity and composition of essential oils from *Pelargonium graveolens* L'Her and *Vitex agnus-castus* L. *Iranian Journal of Microbiology*, 4(4), 171.
- Ghavam, M., Bacchetta, G., Castangia, I., y Manca, M. L. (2022). Evaluation of the composition and antimicrobial activities of essential oils from four species of Lamiaceae Martinov native to Iran. *Scientific Reports*, 12(1), 17044.

-
- Gilabert, M., Ramos, A. N., Schiavone, M. M., Arena, M. E., y Bardón, A. (2011). Bioactive sesqui-and diterpenoids from the Argentine liverwort *Porella chilensis*. *Journal of Natural Products*, 74(4), 574-579.
- Głowacka, P., Żakowska, D., Naylor, K., Niemcewicz, M., y Bielawska-Drozd, A. (2018). Virulence Factors, Pathogenesis and Treatment. *Polish Journal of Microbiology*, 67(2), 151-161.
- Gnimatin, J. P., Weyori, E. W., Agossou, S. M., y Adokiya, M. N. (2022). Bacterial infections epidemiology and factors associated with multidrug resistance in the northern region of Ghana. *Scientific Reports*, 12(1), 22069.
- Gómez-Sequeda, N., Cáceres, M., Stashenko, E. E., Hidalgo, W., y Ortiz, C. (2020). Antimicrobial and antibiofilm activities of essential oils against *Escherichia coli* O157: H7 and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Antibiotics*, 9(11), 730.
- González-Mas, M. C., Rambla, J. L. y López-Gresa, M. P., Blázquez, M. A., y Granell, A. (2019). Volatile compounds in citrus essential oils: A comprehensive review. *Frontiers in Plant Science*, 10, 12.
- González-Stuart A, Rivera J. (2009). Comparison of herbal products use in twolargest border communities between the US and Mexico. *Herbalgram*. 2009;81:58–66
- Grigore-Gurgu, L., Dumitraşcu, L., y Aprodu, I. (2025). Aromatic herbs as a source of bioactive compounds: An overview of their antioxidant capacity, antimicrobial activity, and major applications. *Molecules*, 30(6), 1304.
- Guardado, E., Matos, M. J., Buso, P., Martínez, A. P., Asanza, M., Scalvenzi, L. y Sacchetti, G. (2022). A comprehensive ethnobotanical profile of *Ocimum campechianum* (Lamiaceae): From traditional medicine to phytochemical and pharmacological evidence. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 156(6), 1388-1404.
- Gyrdymova, Y. V. y Rubtsova, S. A. (2022). Caryophyllene and caryophyllene oxide: A variety of chemical transformations and biological activities. *Chemical Papers*, 1-39.
- Hajibonabi, A., Yekani, M., Sharifi, S., Nahad, J. S., Dizaj, S. M., y Memar, M. Y. (2023). Antimicrobial activity of nanoformulations of carvacrol and thymol: New trend and applications. *Open Nano*, 100170.

-
- Hassannejad, N., Bahador, A., Rudbari, N. H., Modarressi, M. H., y Parivar, K. (2019). In vivo antibacterial activity of *Zataria multiflora* Boiss extract and its components, carvacrol, and thymol, against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* in a pneumonic BALB/c mouse model. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(11), 18640-18649.
- Hussain, A. I., Anwar, F., Nigam, P. S., Sarker, S. D., Moore, J. E., Rao, J. R., y Mazumdar, A. (2011). Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. *LWT-Food Science and Technology*, 44(4), 1199-1206.
- Intorasoot, A., Chornchoem, P., Sookkhee, S., y Intorasoot, S. (2017). Bactericidal activity of herbal volatile oil extracts against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of intercultural ethnopharmacology*, 6(2), 218.
- Islam, M. T., da Mata, A. M. O. F., de Aguiar, R. P. S., Paz, M. F. C. J., de Alencar, M. V. O. B., Ferreira, P. M. P., y de Carvalho Melo-Cavalcante, A. A. (2016). Therapeutic potential of essential oils focusing on diterpenes. *Phytotherapy Research*, 30(9), 1420-1444.
- Iwalokun, B. A., Gbenle, G. O., Adewole, T. A., Smith, S. I., Akinsinde, K. A., y Omonigbehin, E. O. (2023). Effects of *Ocimum gratissimum* L. essential oil at subinhibitory concentrations on virulent and multidrug-resistant *Shigella* strains from Lagos, Nigeria. *Apmis*, 111(4), 477-482.
- Jannat, B., Alizadeh, A. M., Farshi, P., Dadgarnejad, M., Hosseini, H., Hashempour-Baltork, F., y Jafari, S. M. (2023). Anti-biofilm activity of essential oils in fruit and vegetable: A systematic review. *Food Control*, 152, 109875.
- Jiang, Q., Chen, J., Yang, C., Yin, Y., y Yao, K. (2019). Quorum sensing: a prospective therapeutic target for bacterial diseases. *BioMed Research International*, 2019.
- Joseph, B. C., Duniya, S. V., y Sokoato, M. I. (2020). Characterization of essential oils from *Hyptis suaveolens* leaves by gas chromatography-mass spectroscopy and fourier transform infra-red spectroscopy. *International Journal of Molecular Biology*, 5(3), 125-133.
- Joshi, V. C., Rao, A. S., Wang, Y. H., Avula, B., y Khan, I. A. (2009). Taxonomic Clarification on *Turnera diffusa* Ward and its Demarcation from "False Damiana" using

-
- Fluorescence, Scanning Electron Microscopy, HPTLC and UPLC. *Planta Medica*, 75(04), P-16.
- Karamizadeh, S., Abdullah, S. M., Manaf, A. A., Zamani, M., y Hooman, A. (2013). An overview of principal component analysis. *Journal of signal and information processing*, 4(3), 173-175.
- Katekar, V. P., Rao, A. B., y Sardeshpande, V. R. (2022). Review of the rose essential oil extraction by hydrodistillation: An investigation for the optimum operating condition for maximum yield. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 29, 100783.
- Khairan, K., Ginting, B., Sufriadi, E., Amalia, A., Sofyan, H., Muhammad, S., ... y Ernawati, E. (2023, May). Studies on the antioxidant activity of safrole, myristicin and terpeniol from myristica fragrans houtt: a review. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 1183, No. 1, p. 012062). IOP Publishing.
- Khoury, M., Stien, D., Eparvier, V., Ouaini, N., y El Beyrouthy, M. (2016). Report on the medicinal use of eleven Lamiaceae species in Lebanon and rationalization of their antimicrobial potential by examination of the chemical composition and antimicrobial activity of their essential oils. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016(1), 2547169.
- Kovacik, A., Tvrda, E., Fulopova, D., Cupka, P., Kovacikova, E., Zbynovska, K., y Massanyi, P. (2017). In vitro assessment of gentamicin cytotoxicity on the selected mammalian cell line (Vero cells). *Advanced Research in Life Sciences*, 1(1), 111-116.
- Krause, S. T., Liao, P., Crocoll, C., Boachon, B., Förster, C., Leidecker, F. y Degenhardt, J. (2021). The biosynthesis of thymol, carvacrol, and thymohydroquinone in Lamiaceae proceeds via cytochrome P450s and a short-chain dehydrogenase. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 118(52), e2110092118.
- Lawal, O. A., Avoseh, O. N., Tinubu, O. J., Ogunwande, I. A., Ascrizzi, R., Flamini, G., y Mtunzi, F. M. (2020). Anti-nociceptive Property, Anti-inflammatory Activity and Constituents of Essential Oils from the Leaves and Stem Bark of *Turnera diffusa* Wild (Passifloraceae) Growing in Nigeria. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 10(6), 473-483.
- Leal, A. L. A. B., Braga, A. L., de Araújo Barbosa, B., Rodrigues, A. M. X., de Carvalho Teixeira, F. A. F., da Silva, K. M. y de Medeiros, M. D. G. F. (2019). Antimicrobial

-
- action of essential oil of *Lippia organoides* HBK. *Journal of Clinical Microbiology and Biochemical Technology*, 5(1), 007-012.
- Lee, V. J., Aguilera, X., Heymann, D., Wilder-Smith, A., Lee, V. J., Heymann, D. L. y Yeo, W. Q. (2020). Preparedness for emerging epidemic threats: a Lancet Infectious Diseases Commission. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(1), 17-19.
- Leitão, J. H. (2020). Microbial virulence factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5320.
- Li, D. S., Shi, L. L., Guo, K., Luo, S. H., Liu, Y. C., Chen, Y. G. y Li, S. H. (2023). A new sesquiterpene synthase catalyzing the formation of (R)- β -bisabolene from medicinal plant *Colquhounia coccinea* var. *mollis* and its anti-adipogenic and antibacterial activities. *Phytochemistry*, 211, 113681.
- Li, X. D., Li, X. M., Xu, G. M., Zhang, P., y Wang, B. G. (2015). Antimicrobial phenolic bisabolanes and related derivatives from *Penicillium aculeatum* SD-321, a deep-sea sediment-derived fungus. *Journal of Natural Products*, 78(4), 844-849.
- Lisboa, C. F., Melo, E. C., Demuner, A. J., da Silva, L. C., Carneiro, A. P., y Coelho, A. P. F. (2020). Chemical composition of *Lippia organoides* Kunt. and *Ocimum gratissimum* L. essential oils stored at- 20° C. *Industrial Crops and Products*, 151, 112485.
- Lozano-Sangabriel, E., Aquino-Bolaños, N. E., Tovar-Miranda, R., Ledea-Rodríguez, J. L., Hernández-Montiel, L. G., Lara-Capistrán, L., y Zulueta-Rodríguez, R. (2022). Producción de Aceite Esencial en plantas de *Piper auritum* Kunth Abonadas Orgánicamente e Inoculadas con Hongos Micorrízicos Arbusculares. *RINDERESU*, 6(1-2).
- Mabou, F. D., y Yossa, I. B. N. (2021). TERPENES: Structural classification and biological activities. *IOSR Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences*, 16, 2319-7676.
- Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G. y Olsson-Liljequist, B. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*.18:268–281.
-

-
- Majdura, J., Jankiewicz, U., Gałazka, A., y Orzechowski, S. (2023). The role of quorum sensing molecules in bacterial–plant interactions. *Metabolites*, 13(1), 114.
- Marchese, A., Arciola, C. R., Barbieri, R., Silva, A. S., Nabavi, S. F., Tsetegho Sokeng, A. J. y Nabavi, S. M. (2017). Update on monoterpenes as antimicrobial agents: A particular focus on p-cymene. *Materials*, 10(8), 947.
- Marchese, A., Orhan, I. E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, S. F. y Nabavi, S. M. (2016). Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food chemistry*, 210, 402-414.
- Marcotullio, M. C., Curini, M., y Becerra, J. X. (2018). An ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological review on lignans from Mexican *Bursera* spp. *Molecules*, 23(8), 1976.
- Martínez, A., Stashenko, E. E., Sáez, R. T., Zafra, G., y Ortiz, C. (2023). Effect of essential oil from *Lippia origanoides* on the transcriptional expression of genes related to quorum sensing, biofilm formation, and virulence of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*, 12(5), 845.
- Martínez-Trejo, A., Ruiz-Ruiz, J. M., Gonzalez-Avila, L. U., Saldaña-Padilla, A., Hernández-Cortez, C., Loyola-Cruz, M. A. y Castro-Escarpulli, G. (2022). Evasion of Antimicrobial Activity in *Acinetobacter baumannii* by Target Site Modifications: An Effective Resistance Mechanism. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), 6582.
- Méndez, M., Argáez, B., Euan, D., Muñoz, T., y Luiscoaut, J. (2012). Flora medicinal de los mayas peninsulares. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán, México, pp. 450.
- Mesquita, J. M. O., Cavaleiro, C., Cunha, A. P., Lombardi, J. A., y Oliveira, A. B. (2005). Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15, 6-12.
- Micić, D., Đurović, S., Riabov, P., Tomić, A., Šovljanski, O., Filip, S. y Blagojević, S. (2021). Rosemary essential oils as a promising source of bioactive compounds: Chemical composition, thermal properties, biological activity, and gastronomical perspectives. *Foods*, 10(11), 2734.

-
- Miladinović, D. L., Dimitrijević, M. V., Mihajlov-Krstev, T. M., Marković, M. S., y Ćirić, V. M. (2021). The significance of minor components on the antibacterial activity of essential oil via chemometrics. *LWT - Food Science and Technology*, 136, 110305.
- Mion, S., Carriot, N., Lopez, J., Plener, L., Ortalo-Magné, A., Chabrière, E., ... y Daudé, D. (2021). Disrupting quorum sensing alters social interactions in *Chromobacterium violaceum*. *Biofilms and Microbiomes*, 7(1), 40.
- Mishra, P., Sohrab, S., y Mishra, S. K. (2021). A review on the phytochemical and pharmacological properties of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. *Future journal of pharmaceutical sciences*, 7, 1-11.
- Mogana R, Adhikari A, Tzar MN y Cassian L. (2020). Antibacterial activities of the extracts, fractions, and isolated compounds from *Canarium patentinervium* Miq. against bacterial clinical isolates. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20: 1-11.
- Moghaddam, M., y Mehdizadeh, L. (2017). Chemistry of essential oils and factors influencing their constituents. In *Soft chemistry and food fermentation*, pp. 419.
- Mohanty, S., Ray, A., Sahoo, C., Sahoo, A., Jena, S., Panda, P. C., y Nayak, S. (2023). Volatile profiling coupled with multivariate analysis, antiproliferative and anti-inflammatory activities of rhizome essential oil of four *Hedychium* species from India. *Journal of Ethnopharmacology*, 317, 116835.
- Molina-Salinas, G. M., Ramos-Guerra, M. C., Vargas-Villarreal, J., Mata-Cárdenas, B. D., Becerril-Montes, P., y Said-Fernández, S. (2006). Bactericidal activity of organic extracts from *Flourensia cernua* dc against strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Archives of Medical Research*, 37(1):45-49.
- Morais, S. M., Cossólosso, D. S., Silva, A. A., Moraes, M. O. D., Teixeira, M. J., Campello, C. C. y Vila-Nova, N. S. (2019). Essential oils from *Croton* species: Chemical composition, in vitro and in silico antileishmanial evaluation, antioxidant, and cytotoxicity activities. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 30, 2404-2412.
- Morandim-Giannetti, A. D. A., Pin, A. R., Santo Pietro, N. A., de Oliveira, H. C., Mendes-Giannini, M. J. S., Alecio, A. C. y Furlan, M. (2010). Composition and antifungal activity against *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* and *Cryptococcus neoformans* of essential oils from leaves of Piper and Peperomia species. *Journal of Medicinal Plants Research*, 1810-1814.
-

-
- Moreira, A. C. P., Lima, E. D. O., Wanderley, P. A., Carmo, E. S., y Souza, E. L. D. (2010). Chemical composition and antifungal activity of *Hyptis suaveolens* (L.) poit leaves essential oil against *Aspergillus* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 28-33.
- Moreno, J., Aparicio, R., Velasco, J., Rojas, L. B., Usubillaga, A., y Lue-Merú, M. (2010). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from fruits of *Bursera tomentosa*. *Natural Product Communications*, 5(2), 1934578X1000500229.
- Morfín-Otero R, Alcántar-Curiel MD, Rocha MJ, Alpuche-Aranda CM, Santos-Preciado JI y Gayosso-Vázquez C. (2018). *Acinetobacter baumannii* infections in a tertiary care hospital in Mexico over the past 13 years. *Chemotherapy*. 59(1):57–65.
- Morfin-Otero, R., Tinoco-Favila, J. C., Sader, H. S., Salcido-Gutierrez, L., Perez-Gomez, H. R., Gonzalez-Diaz, E. y Rodriguez-Noriega, E. (2012). Resistance trends in gram-negative bacteria: surveillance results from two Mexican hospitals, 2005–2010. *BMC Research Notes*, 5(1), 1-5.
- Mouwakeh, A., Kincses, A., Nové, M., Mosolygó, T., Mohácsi-Farkas, C., Kiskó, G., y Spengler, G. (2019). *Nigella sativa* essential oil and its bioactive compounds as resistance modifiers against *Staphylococcus aureus*. *Phytotherapy Research*, 33(4), 1010-1018.
- Mukherjee, S., y Bassler, B. L. (2019). Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nature Reviews Microbiology*, 17(6), 371-382.
- Mullally, M., Cayer, C., Muhammad, A., Walshe-Roussel, B., Ahmed, F., Sanchez-Vindas, P. E. y Arnason, J. T. (2016). Anxiolytic activity and active principles of *Piper amalago* (Piperaceae), a medicinal plant used by the Q'eqchi'Maya to treat susto, a culture-bound illness. *Journal of Ethnopharmacology*, 185, 147-154.
- Munda, S., Dutta, S., Pandey, S. K., Sarma, N., y Lal, M. (2019). Antimicrobial activity of essential oils of medicinal and aromatic plants of the Northeast India: A biodiversity hot spot. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 22(1), 105-119.
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R., Gray, A. y Tasak, N. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629-655.

-
- Myszka, K., Schmidt, M. T., Majcher, M., Juzwa, W., Olkowicz, M., y Czaczyk, K. (2016). Inhibition of quorum sensing-related biofilm of *Pseudomonas fluorescens* KM121 by *Thymus vulgare* essential oil and its major bioactive compounds. *International Biodeterioration y Biodegradation*, 114, 252-259.
- Namyslowska, A., Laudy, A. E., y Tyski, S. (2015). *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of resistance to antibacterial agents. *Postepy Mikrobiologii*, 54(4), 392-406.
- Nanmeni, G., Tedonkeu, A. T., Fankam, A. G., Mbaveng, A. T., Wamba, B. E., Nayim, P., ... y Kuete, V. (2021). An efflux pumps inhibitor significantly improved the antibacterial activity of botanicals from *Plectranthus glandulosus* towards MDR phenotypes. *The Scientific World Journal*, 2021, 1-8.
- Nascimento, A. M., Brandao, M. G., Oliveira, G. B., Fortes, I. C., y Chartone-Souza, E. (2007). Synergistic bactericidal activity of *Eremanthus erythropappus* oil or β -bisabolene with ampicillin against *Staphylococcus aureus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 92, 95-100.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., y De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451-1474.
- Nguyen, L. T., Myslivečková, Z., Szotáková, B., Špičáková, A., Lněničková, K., Ambrož, M. y Skálová, L. (2017). The inhibitory effects of β -caryophyllene, β -caryophyllene oxide and α -humulene on the activities of the main drug-metabolizing enzymes in rat and human liver in vitro. *Chemico-Biological Interactions*, 278, 123-128.
- Noumi, E., Ahmad, I., Adnan, M., Merghni, A., Patel, H., Haddaji, N. y De Feo, V. (2023). GC/MS Profiling, antibacterial, anti-quorum sensing, and antibiofilm properties of *Anethum graveolens* L. essential oil: Molecular docking study and In-silico ADME profiling. *Plants*, 12(10), 1997.
- Noumi, E., Merghni, A., M. Alreshidi, M., Haddad, O., Akmadar, G., De Martino, L., ... y De Feo, V. (2018). *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: Models for evaluating anti-quorum sensing activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its main component terpinen-4-ol. *Molecules*, 23(10), 2672.
- Oliveira, G. D. D., Rocha, W. R. V. D., Rodrigues, J. F. B., y Alves, H. D. S. (2022). Synergistic and antibiofilm effects of the essential oil from *Croton conduplicatus*
-

-
- (Euphorbiaceae) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pharmaceuticals*, 16(1), 55.
- Oliveira-Ribeiro, S., Fontaine, V., Mathieu, V., Abdesselam, Z., Dominique, B., Caroline, S., y Florence, S. (2021). Antibacterial activities of homemade matrices miming essential oils compared to commercial ones. *Antibiotics*, 10(5), 584.
- Olivero V, J. T., Pajaro, C, N. P., y Stashenko, E. (2011). Antiquorum sensing activity of essential oils isolated from different species of the genus *Piper*. *Vitae*, 18(1), 77-82.
- O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. *Review of antimicrobial resistance*, 236, 43-60.
- Ong, C. W., CHAN, Y., CHAN, S., Chan, M. W., LOON, E., TEH, C. L. D. S. y Sit, N. W. (2020). Antifungal, antibacterial, and cytotoxic activities of non-indigenous medicinal plants naturalised in Malaysia. *Farmacia*, 7, 35.
- Organización Mundial de la Salud. (2024). Lista de prioridades mundiales de la OMS de bacterias resistentes a los antibióticos para guiar la investigación, el descubrimiento y el desarrollo de nuevos antibióticos; OMS: Ginebra, Suiza.
- Organización Mundial de la Salud. 2022. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/67314> [Acceso 10 de mayo de 2023].
- Osaka, I. y Hefty, P. S. (2013). Simple resazurin-based microplate assay for measuring Chlamydia infections. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(6), 2838-2840.
- Ouslimani, S., Bendahou, M., Abedelmounaim, K., Benbelaid, F., Mahdi, F., Yassine Benziane, M., y Costa, J. (2023). Antibacterial and anti-biofilm efficiency of twenty algerian plants essential oils against resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 26(1), 206-231.
- Owuama, C. I. (2017). Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) using a novel dilution tube method. *African journal of microbiology research*, 11(23), 977-980.
- Pakharukova, N., Tuittila, M., Paavilainen, S., Malmi, H., Parilova, O., Teneberg, S. y Zavialov, A. V. (2018). Structural basis for *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(21), 5558-5563.

-
- Palomo, J. G., Balbín, J. A., Blanco, J. P., y Benito, M. S. (2010). Enfermedades infecciosas. concepto, clasificación, aspectos generales y específicos de las infecciones. *Medicine*, 10(49), 3251.
- Parra-Naranjo, A., Delgado-Montemayor, C., Salazar-Aranda, R., y Waksman-Minsky, N. (2023). Bioactivity of the Genus *Turnera*: A Review of the Last 10 Years. *Pharmaceuticals*, 16(11), 1573.
- 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*. *Biomaterial investigations in dentistry*, 7(1), 105-109.
- Peña, M. (2020). Evaluación de agentes naturales como inhibidores de factores relacionados con la patogenicidad bacteriana. Tesis de Maestría. Centro de investigación Científica de Yucatán. Yucatán, México, pp. 89.
- Peralta-Bohórquez, A. F., Quijano-Célis, C., Gaviria, M., Vanegas-López, C., y Pino, J. A. (2011). Essential oil from leaves of *Lantana canescens* and *L. lopez-palacii* grown in Colombia. *Natural Product Communications*, 6(2), 1934578X1100600223.
- Perveen, S. y Al-Taweel, A. (2018). Terpenes and terpenoides. Editorial IntechOpen. Tercera edición. Reino Unido, pp. 650.
- Pineda-Alegría, J. A., Peña-Rodríguez, L. M., Cardoso-Taketa, A., Sánchez, J. E., Torres-Acosta, J. F. D. J., Hernández-Bolio, G. I. y Aguilar-Marcelino, L. (2024). 1H-NMR Metabolomic Study of the Mushroom *Pleurotus djamor* for the Identification of Nematocidal Compounds. *Pharmaceuticals*, 17(5), 580.
- Pinheiro, L. G., dos Santos Fontenelle, R. O., Rodrigues, T. H. S., Pinto, V. D. y Barbosa, F. C. B. (2022). Inhibitory and bactericidal activities of *Lippia organoides* essential oil against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* multidrug resistant. *Research, Society and Development*, 11(9), e6811931478-e6811931478.
- Pino, J. A., Marbot, R., Payo, A., Chao, D., Herrera, P., y Martí, M. P. (2005). Leaf oils of two Cuban Asteraceae species: *Pluchea carolinensis* Jacq. and *Ambrosia hispida* Pursh. *Journal of Essential Oil Research*, 17(3), 318-320.

-
- Poli, J. P., Guinoiseau, E., de Rocca Serra, D., Sutour, S., Paoli, M., Tomi, F. y Lorenzi, V. (2018). Anti-Quorum Sensing Activity of 12 Essential Oils on *Chromobacterium violaceum* and Specific Action of cis-cis-p-Menthenolide from Corsican *Mentha suaveolens ssp. insularis*. *Molecules*, 23(9), 2125.
- Pontes, J. G. D. M., Fernandes, L. S., dos Santos, R. V., Tasic, L., y Fill, T. P. (2020). Virulence factors in the phytopathogen–host interactions: an overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(29), 7555-7570.
- Portillo-Gallo, J. H., Sánchez-González, J. M., Velo-Méndez, G., Rivera-Cisneros, A. E., Ishida-Gutiérrez, C., y Franco-Santillán, R. (2022). *Acinetobacter baumannii* panresistente en paciente post-COVID-19 y comorbilidades. *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 68(3), 137-139.
- Puvača, N., Milenković, J., Galonja Coghill, T., Bursić, V., Petrović, A., Tanasković, S. y Miljković, T. (2021). Antimicrobial activity of selected essential oils against selected pathogenic bacteria: In vitro study. *Antibiotics*, 10(5), 546.
- Rasko, D. A., y Sperandio, V. (2010). Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nature Reviews and Drug discovery*, 9(2), 117-128.
- Ribeiro, F. P., Santana de Oliveira, M., de Oliveira Feitosa, A., Santana Barbosa Marinho, P., Moacir do Rosario Marinho, A., de Aguiar Andrade, E. H., y Favacho Ribeiro, A. (2021). Chemical composition and antibacterial activity of the *Lippia origanoides* Kunth essential oil from the Carajás National Forest, Brazil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021(1), 9930336.
- Ricarte, L. P., Bezerra, G. P., Romero, N. R., Silva, H. C., Lemos, T. L., Arriaga, A. y Santiago, G. M. (2020). Chemical composition and biological activities of the essential oils from *Vitex-agnus castus*, *Ocimum campechianum* and *Ocimum carnosum*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 92, 135.
- Ríos, N., Stashenko, E. E., y Duque, J. E. (2017). Evaluation of the insecticidal activity of essential oils and their mixtures against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 61, 307-311.
- Rojas, M. M. (2011). Quorum sensing en la asociación beneficiosa de las bacterias con las plantas. *Revista colombiana de biotecnología*, 13(2), 135-143.

-
- Sacchetti, G., Medici, A., Maietti, S., Radice, M., Muzzoli, M., Manfredini, S. y Bruni, R. (2004). Composition and functional properties of the essential oil of Amazonian basil, *Ocimum micranthum* Willd., Labiatae in comparison with commercial essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), 3486-3491.
- Sadgrove, N. J., Padilla-González, G. F., y Phumthum, M. (2022). Fundamental chemistry of essential oils and volatile organic compounds, methods of analysis and authentication. *Plants*, 11(6), 789.
- Sahoo, C. R., Paidisetty, S. K., y Padhy, R. N. (2021). The recent development of thymol derivative as a promising pharmacological scaffold. *Drug Development Research*, 82(8), 1079-1095.
- Salehi, B., Zakaria, Z. A., Gyawali, R., Ibrahim, S. A., Rajkovic, J., Shinwari, Z. K. y Setzer, W. N. (2019). Piper species: A comprehensive review on their phytochemistry, biological activities and applications. *Molecules*, 24(7), 1364.
- Salleh, W. M. N. H. W. (2021). A systematic review of botany, phytochemicals and pharmacological properties of "Hoja santa" (*Piper auritum* Kunth). *Zeitschrift für Naturforschung C*, 76(3-4), 93-102.
- Sánchez, Y., Correa, T. M., Abreu, Y., y Pino, O. (2013). Efecto del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth y sus componentes sobre *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson y *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson. *Revista de Protección Vegetal*, 28(3), 204-210.
- Sánchez-Recillas, A., Aragón-Castillo, S. L., Arroyo-Herrera, A. L., Araujo-León, J. A., y Ortiz-Andrade, R. R. (2020). Efecto espasmolítico y antibacteriano de la especie *Bursera graveolens* (Kunth). *Polibotánica*, (49), 135-147.
- Sankar Ganesh, P., y Rai Vittal, R. (2015). In vitro antibiofilm activity of *Murraya koenigii* essential oil extracted using supercritical fluid CO₂ method against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Natural Product Research*, 29(24), 2295-2298.
- Santana de Oliveira, M., Vostinaru, O., Rigano, D., y de Aguiar Andrade, E. H. (2023). Bioactive compounds present in essential oils: Advances and pharmacological applications. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1130097.

-
- Santos, E. L., Freitas, P. R., Araujo, A. C. J., Almeida, R. S., Tintino, S. R., Paulo, C. L. R. y Coutinho, H. D. (2021). Phytochemical characterization and antibiotic potentiating effects of the essential oil of *Aloysia gratissima* (Gillies y Hook.) and beta-caryophyllene. *South African Journal of Botany*, 143, 1
- Santos, V. L., Lima, C. P., Campos, R., Ribeiro, C. S., Marques, F. A., Budel, J. M., y Messias-Reason, I. J. (2016). Chemical composition and antimicrobial activity of volatile oils of *Piper amalago*. *Latin American Journal of Pharmacy*, 35(8), 1883-9.
- Santos-Filho, I. G. D., reis, R. B., Souza, A. S. Q., Canuto, K. M., Brito, E. S., Castro, K. N. y Diniz, F. M. (2023). Chemical composition and biological activities of the essential oils from *Lippia alba* and *Lippia origanoides*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 95, e20220359.
- Santurio, D. F., de Jesus, F. P. K., Zanette, R. A., Schlemmer, K. B., Fraton, A., y Fries, L. L. M. (2014). Antimicrobial activity of the essential oil of thyme and of thymol against *Escherichia coli* strains. *Acta Scientiae Veterinariae*, 42(1), 1-4.
- Saptami, K., Arokia Balaya Rex, D., Chandrasekaran, J., y Rekha, P. D. (2022). Competitive interaction of thymol with *cviR* inhibits quorum sensing and associated biofilm formation in *Chromobacterium violaceum*. *International Microbiology*, 25(3), 629-638.
- Saranathan, R., Vasanth, V., Vasanth, T., Shabareesh, P. R. V., Shashikala, P., Devi, C. S. y Prashanth, K. (2015). Emergence of carbapenem non-susceptible multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* strains of clonal complexes 103B and 92B harboring OXA-type carbapenemases and metallo- β -lactamases in Southern India. *Microbiology and immunology*, 59(5), 277-284.
- Sarker SD, Nahar L y Kumarasamy Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*. 42:321–324.
- Sarrazin, S. L. F., Da Silva, L. A., De Assunção, A. P. F., Oliveira, R. B., Calao, V. Y., Da Silva, R. y Mourão, R. H. V. (2015). Antimicrobial and seasonal evaluation of the carvacrol-chemotype oil from *Lippia origanoides* kunth. *Molecules*, 20(2), 1860-1871.

-
- Sarshar, M., Behzadi, P., Scribano, D., Palamara, A. T., y Ambrosi, C. (2021). *Acinetobacter baumannii*: an ancient commensal with weapons of a pathogen. *Pathogens*, 10(4), 387.
- Saviuc, C., Gheorghe, I., Coban, S., Drumea, V., Chifiriuc, M. C., Banu, O. y Lazăr, V. E. R. O. N. I. C. A. (2016). *Rosmarinus officinalis* essential oil and eucalyptol act as efflux pumps inhibitors and increase ciprofloxacin efficiency against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* MDR strains. *Romanian Biotechnological Letters*, 21(4), 11783.
- Selvaraj, A., Valliammai, A., Sivasankar, C., Suba, M., Sakthivel, G., y Pandian, S. K. (2020). Antibiofilm and antivirulence efficacy of myrtenol enhances the antibiotic susceptibility of *Acinetobacter baumannii*. *Scientific reports*, 10(1), 1-14.
- Setzer, W. N. (2014). Leaf and bark essential oil compositions of *Bursera simaruba* from Monteverde, Costa Rica. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 1(3), 34-36.
- Sharma, A. K., Dhasmana, N., Dubey, N., Kumar, N., Gangwal, A., Gupta, M., y Singh, Y. (2017). Bacterial virulence factors: secreted for survival. *Indian Journal of Microbiology*, 57, 1-10.
- Shehabeldine, A. M., Doghish, A. S., El-Dakrouy, W. A., Hassanin, M. M., Al-Askar, A. A., AbdElgawad, H., y Hashem, A. H. (2023). Antimicrobial, antibiofilm, and anticancer activities of *Syzygium aromaticum* essential oil nanoemulsion. *Molecules*, 28(15), 5812.
- Shu, H. Z., Peng, C., Bu, L., Guo, L., Liu, F., y Xiong, L. (2021). Bisabolane-type sesquiterpenoids: Structural diversity and biological activity. *Phytochemistry*, 192, 112927.
- Sieniawska, E., Los, R., Baj, T., Malm, A., y Glowniak, K. (2013). Antimicrobial efficacy of *Mutellina purpurea* essential oil and α -pinene against *Staphylococcus epidermidis* grown in planktonic and biofilm cultures. *Industrial Crops and Products*, 51, 152-157.
- Silva-Trujillo, L., Quintero-Rueda, E., Stashenko, E. E., Conde-Ocazonez, S., Rondón-Villarreal, P., y Ocazonez, R. E. (2022). Essential oils from Colombian plants: Antiviral potential against dengue virus based on chemical composition, in vitro and in silico analyses. *Molecules*, 27(20), 6844.
-

-
- Singh, S., Singh, S. K., Chowdhury, I., y Singh, R. (2017). Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. *The open microbiology journal*, 11, 53.
- Sionov, R. V., Steinberg, D. (2022). Targeting the holy triangle of quorum sensing, biofilm formation, and antibiotic resistance in pathogenic bacteria. *Microorganisms*, 10(6), 1239.
- Siqueira, I. B., Teixeira Barbosa, A. A., Jain, S., Miranda Fernandes, R. P., Tavares Silva, A. R. S., Ferreira Barbosa, F. H. y Dolabella, S. S. (2021). In vitro antibacterial activity of essential oils of *Croton tetradenius* Baill. From the Brazilian Caatinga biome and its synergistic effect with ciprofloxacin and meropenem. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 24(1), 12-21.
- Sousa Silveira, Z. D., Macêdo, N. S., Sampaio dos Santos, J. F., Sampaio de Freitas, T., Rodrigues dos Santos Barbosa, C., Júnior, D. L. D. S. y Martins, N. (2020). Evaluation of the antibacterial activity and efflux pump reversal of thymol and carvacrol against *Staphylococcus aureus* and their toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Molecules*, 25(9), 2103.
- Souza, V. V. M. A., Almeida, J. M., Barbosa, L. N., y Silva, N. C. C. (2022). Citral, carvacrol, eugenol and thymol: antimicrobial activity and its application in food. *Journal of Essential Oil Research*, 34(3), 181-194.
- Stashenko, E., Córdoba, Y., y Martínez, J. R. (2015). Oxygen radical absorption capacity of *Lippia origanoides* (thymol and phellandrene chemotypes) and *Turnera diffusa* essential oils and extracts. *Planta Medica*, 81(16), PW_199.
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G. D., Djukić, S., Ćirković, I., y Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, 115(8), 891-899.
- Stojanović-Radić, Z., Stojanović, N., Sharifi-Rad, J., y Stanković, N. (2016). Potential of *Ocimum basilicum* L. and *Salvia officinalis* L. essential oils against biofilms of *P. aeruginosa* clinical isolates. *Cellular and Molecular Biology*, 62(9), 27-33.

-
- Szewczyk, K., y Zidorn, C. (2014). Ethnobotany, phytochemistry, and bioactivity of the genus *Turnera* (Passifloraceae) with a focus on damiana—*Turnera diffusa*. *Journal of ethnopharmacology*, 152(3), 424-443.
- Tacchini, M., Echeverria Guevara, M. P., Grandini, A., Maresca, I., Radice, M., Angiolella, L., y Guerrini, A. (2020). *Ocimum campechianum* mill. from Amazonian Ecuador: Chemical Composition and biological activities of extracts and their main constituents (eugenol and rosmarinic acid). *Molecules*, 26(1), 84.
- Tang, K., y Zhang, X. H. (2014). Quorum quenching agents: resources for antivirulence therapy. *Marine drugs*, 12(6), 3245-3282.
- Tapia-Rodriguez, M. R., Cantu-Soto, E. U., Vazquez-Armenta, F. J., Bernal-Mercado, A. T., y Ayala-Zavala, J. F. (2023). Inhibition of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation by terpenes from Oregano (*Lippia graveolens*) essential oil. *Antibiotics*, 12(10), 1539.
- Tonzibo, Z. F., Florence, A. B., Bédi, G., & Chalchat, J. C. (2009). Chemical composition of essential oil of *Hyptis Suaveolensis* (L) Poit. from Côte d'Ivoire. *European Journal of Scientific Research*, 38(4), 565-571.
- Tsusaka, T., Makino, B., Ohsawa, R., y Ezura, H. (2019). Genetic and environmental factors influencing the contents of essential oil compounds in *Atractylodes lancea*. *PLoS One*, 14(5), e0217522.
- Uc-Cachón, A. H., Calvo-Irabien, L. M., Dzul-Beh, A. D. J., Dzib-Baak, H. E., Grijalva-Arango, R., y Molina-Salinas, G. M. (2024). Potential anti-Infectious activity of essential oil chemotypes of *Lippia origanoides* Kunth on antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Plants*, 13(9), 1172.
- Uc-Cachón, A. H., de Jesús Dzul-Beh, A., González-Cortázar, M., Zamilpa-Álvarez, A. y Molina-Salinas, G. M. (2024). Investigating the anti-growth, anti-resistance, and anti-virulence activities of *Schoepfia schreberi* JF Gmel. against the superbug *Acinetobacter baumannii*. *Heliyon*, e31420.
- Uc-Cachón, A. H., de Jesús Dzul-Beh, A., Palma-Pech, G. A., Jiménez-Delgadillo, B., Flores-Guido, J. S., Gracida-Orsno, C., y Molina-Salinas, G. M. (2021). Antibacterial and antibiofilm activities of Mayan medicinal plants against Methicillin-susceptible and-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 279, 114369.
-

-
- Uc-Cachón, A. H., Gracida-Osorno, C., Luna-Chi, I. G., Jiménez-Guillermo, J. G., y Molina-Salinas, G. M. (2019). High prevalence of antimicrobial resistance among gram-negative isolated bacilli in intensive care units at a tertiary-care hospital in Yucatán Mexico. *Medicina*, 55(9), 588.
- Uc-Cachón, A. H., Molina-Salinas, G. M., de Jesús Dzul-Beh, A., Rosado-Manzano, R. F., y Dzib-Baak, H. E. (2023). Bacterias Gram-negativas de prioridad crítica en pacientes de las UCI de un hospital de tercer nivel. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 61(5), 552.
- Ugboko, H. U., Nwinyi, O. C., Oranusi, S. U., Fatoki, T. H., y Omonhinmin, C. A. (2020). Antimicrobial importance of medicinal plants in Nigeria. *The Scientific World Journal*, 32, 56-90.
- Urbizu-González, A. L., Castillo-Ruiz, O., Martínez-Ávila, G. C. G. y Torres-Castillo, J. A. (2017). Natural variability of essential oil and antioxidants in the medicinal plant *Turnera diffusa*. *Asian pacific journal of tropical medicine*, 10(2), 121-125.
- Valdivieso-Ugarte, M., Gomez-Llorente, C., Plaza-Díaz, J., y Gil, Á. (2019). Antimicrobial, antioxidant, and immunomodulatory properties of essential oils: A systematic review. *Nutrients*, 11(11), 2786.
- Vanegas-Múnera, Johana, H., Roncancio-Villamil, G., y Jiménez-Quiceno, J. N. (2014). *Acinetobacter baumannii*: importancia clínica, mecanismos de resistencia y diagnóstico. *CES Medicina*, 28(2), 233-246.
- Vasconcelos, A. A., Veras, I. N. D. S., Vasconcelos, M. A. D., Andrade, A. L., Dos Santos, H. S., Bandeira, P. N. y Teixeira, E. H. (2023). Chemical composition determination and evaluation of the antibacterial activity of essential oils from *Ruellia asperula* (Mart. Ex Ness) Lindau and *Ruellia paniculata* L. against oral Streptococci. *Natural Product Research*, 37(2), 333-337.
- Vasconcelos, L. C., Bergamim, A. D. S., Martins, G. S., Mariano, G. F., Mendes, L. A., Carrijo, T. T., y Praça-Fontes, M. M. (2024). Influence of seasonal variation on the chemical composition of *Piper amalago* essential oils and their phytocytogenotoxic activity in model plants and weeds. *Bragantia*, 83, e20240090.
- Vaz-Perigo, C. V., Torres, R. B., Bernacci, L. C., Guimaraes, E. F., Haber, L. L., Facanali, R., y Marques, M. O. M. (2016). The chemical composition and antibacterial activity of

-
- eleven Piper species from distinct rainforest areas in Southeastern Brazil. *Industrial Crops and Products*, 94, 528-539.
- Vergara-Santana, M. I., Lemus-Juárez, S., y Bayardo-Parra, R. (2005). Efecto de la selección artificial en el "Chan" (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Labiatae) sobre su morfología floral y la floración. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 9(3), 19-31.
- Vichai, V., y Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature protocols*, 1(3), 1112-1116.
- Villa-Ruano, N., Becerra-Martínez, E., Cruz-Durán, R., Zarate-Reyes, J. A., Landeta-Cortés, G., y Romero-Arenas, O. (2018). Volatile profiling, insecticidal, antibacterial and antiproliferative properties of the essential oils of *Bursera glabrifolia* leaves. *Chemistry y Biodiversity*, 15(11), e1800354.
- Wang, W., Li, D., Huang, X., Yang, H., Qiu, Z., Zou, L. y Li, Y. (2019). Study on antibacterial and quorum-sensing inhibition activities of *Cinnamomum camphora* leaf essential oil. *Molecules*, 24(20), 3792.
- Whiteway, C., Breine, A., Philippe, C., y Van der Henst, C. (2022). *Acinetobacter baumannii*. *Trends in microbiology*, 30(2), 199-200.
- Wilson, T. M., Murphy, B. J., Abad, A., Packer, C., Poulson, y Carlson, R. E. (2022). Essential oil composition and stable isotope profile of cultivated *Ocimum campechianum* Mill. (Lamiaceae) from Peru. *Molecules*, 27(9), 2777.
- Xu, D. H., Huang, Y. S., Jiang, D. Q., y Yuan, K. (2013). The essential oils chemical compositions and antimicrobial, antioxidant activities and toxicity of three Hyptis species. *Pharmaceutical Biology*, 51(9), 1125-1130.
- Yang, T. S., Chao, L. K. P., y Liu, T. T. (2014). Antimicrobial activity of the essential oil of *Glossogyne tenuifolia* against selected pathogens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(14), 2965-2971.
- Yap, P. S. X., Yiap, B. C., Ping, H. C. y Lim, S. H. E. (2014). Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *The open microbiology journal*, 8, 6.
- Yap, P. S. X., Yusoff, K., Lim, S. H. E., Chong, C. M., y Lai, K. S. (2021). Membrane disruption properties of essential oils—A double-edged sword? *Processes*, 9(4), 595.

-
- Yuan, W., y Yuk, H. G. (2019). Effects of sublethal thymol, carvacrol, and trans-cinnamaldehyde adaptation on virulence properties of *Escherichia coli* O157: H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(14), e00271-19.
- Zeng, P., Yi, L., Xu, J., Gao, W., Xu, C., Chen, S., ... y Wong, K. Y. (2021). Investigation of antibiofilm activity, antibacterial activity, and mechanistic studies of an amphiphilic peptide against *Acinetobacter baumannii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1863(6)8, 183600.
- Zhou, Z. S., Wang, Z. J., Tian, B., Zhu, Y. Y., Wei, M. Z., Zhao, Y. L., y Luo, X. D. (2024). Three new ent-kaurane diterpenes with antibacterial activity from *Sigesbeckia orientalis*. *Molecules*, 29(19), 4631.
- Karakonstantis, S., Gikas, A., Astrinaki, E., y Kritsotakis, E. I. (2020). Excess mortality due to pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in hospitalized patients. *Journal of Hospital Infection*, 106(3), 447-453.
- Göttig, S., Gruber, T. M., Higgins, P. G., Wachsmuth, M., Seifert, H., y Kempf, V. A. (2014). Detection of pan drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Germany. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(9), 2578-2579.