



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Efecto de extractos y compuestos comerciales de plantas en la
formación y mantenimiento de biopelículas de cepas de
Acinetobacter baumannii y *Pseudomonas aeruginosa*

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E T A:

ROSA FERNANDA TORRES LOZANO

CODIRECTORES: Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán

Dra. Deyanira Pérez Morales

CUERNAVACA, MORELOS

ABRIL 2021

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado con el donativo CONACYT-Problemas Nacionales no. 2017-01-5182, con los recursos para mi proyecto de investigación y una beca de 6 meses para mí.

En primer lugar quiero expresar mi agradecimiento a mis directores de tesis, el Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán y la Dra. Deyanira Pérez Morales por el apoyo académico, el tiempo que dedicaron en este proyecto y por abrirme las puertas en su grupo de investigación. Les guardo un gran cariño.

Asimismo agradezco el gran apoyo y la asesoría que recibí durante toda mi licenciatura por parte de mi tutora, la Dra. Rosa Cerros Tlatilpa, mi cariño y respeto.

Este trabajo de investigación también es el resultado del apoyo vital que recibí por parte de mi mamá y hermanos, sin el cual no tendría la motivación para seguir creciendo profesionalmente, les agradezco de todo corazón.

Pero sobre todo, gracias a mi compañero Raúl Bello, quien estuvo conmigo desde el día uno de la licenciatura apoyándome en todo momento, una persona incondicional durante mi paso por la universidad.

A todos, muchas gracias.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	4
<i>Importancia clínica de A. baumannii y P. aeruginosa</i>	6
<i>Factores de virulencia de A. baumannii y P. aeruginosa</i>	7
<i>Biopelículas de A. baumannii y P. aeruginosa</i>	8
<i>Etapas de la formación de biopelículas</i>	9
<i>Beneficios de la biopelícula para las bacterias</i>	10
<i>Papel de la biopelícula en la patogenicidad de A. baumannii y P. aeruginosa</i>	11
<i>Compuestos de origen natural como alternativa para combatir las biopelícula</i>	12
<i>Extractos de plantas</i>	12
ANTECEDENTES	18
JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS	22
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
RESULTADOS	30
DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	48
PERSPECTIVAS	49
REFERENCIAS	50

INTRODUCCIÓN

A través del tiempo, los seres humanos nos hemos adaptado a vivir en un ambiente donde predominan microbios, entre ellos las bacterias, las cuales han existido desde mucho tiempo antes de que el hombre apareciera en la tierra. En su mayoría, la relación entre los seres humanos y las bacterias es benéfica. Un claro ejemplo es la microbiota, la cual representa un importante mecanismo de defensa del huésped e incluso contribuye a su funcionamiento fisiológico. Sin embargo, también se puede dar la relación humano-bacteria, en la cual el ser humano resulta perjudicado, sobre todo cuando el ser humano tiene su sistema inmune comprometido, desarrollando enfermedades infecciosas que pueden ser causadas por diferentes microorganismos patógenos.

Los microorganismos patógenos se pueden dividir en dos grupos principales:

1. Patógenos primarios o verdaderos: son las bacterias más virulentas para el hombre, son capaces de producir enfermedades infecciosas en cualquier huésped, incluso en aquéllos previamente sanos.
2. Patógenos oportunistas: son especies bacterianas que únicamente son capaces de provocar enfermedad infecciosa a individuos inmunocomprometidos.

Para causar algún daño, las bacterias patógenas desarrollan mecanismos de virulencia que le van a permitir sobrevivir, multiplicarse y diseminarse dentro de sus hospederos, las cuales pueden ocasionar la muerte del individuo.

Entre las bacterias patógenas oportunistas con mayor importancia desde el punto de vista hospitalario se encuentran *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Las especies del género *Acinetobacter* son cocobacilos Gram negativos, aerobios estrictos, no fermentadores de glucosa, oxidasa negativos, catalasa positiva (Howard *et al.*, 2012). La taxonomía actual del género *Acinetobacter* se muestra en la Tabla 1. Por otro lado las bacterias del género *Pseudomonas* son bacilos Gram negativos, aerobios, móviles, oxidasa y catalasa positivas (Ortiz-Herrera, Gerónimo-Gallegos, Cuevas-Schacht, Pérez-Fernández, & Coria-Jiménez, 2004). En la Tabla 2 se muestra la taxonomía actual del género *Pseudomonas*.

Tabla 1. Taxonomía del género *Acinetobacter*

Dominio	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gamma proteobacteria
Orden	Pseudomonales
Familia	Moraxellaceae
Género	<i>Acinetobacter</i>

Tabla 2. Taxonomía del género *Pseudomonas*

Dominio	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gamma Proteobacteria
Orden	Pseudomonadales
Familia	Pseudomonadaceae
Género	<i>Pseudomonas</i>

Dentro de los géneros *Acinetobacter* y *Pseudomonas* se encuentran dos especies de importancia médica, *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, las cuales se les considera de naturaleza ubicua, ya que pueden ser aisladas de la mayoría de las muestras que se toman del suelo y agua superficial. Estas especies no sólo tienen su hábitat en el ambiente, sino que también se han observado en muestras clínicas humanas (Asif, Alvi, & Rehman, 2018). Ambas bacterias presentan predilección por tejidos vivos húmedos como membranas, mucosas, pulmones o áreas de la piel que se encuentran expuestas, ya sea por heridas quirúrgicas, quemaduras, pie diabético o alguna lesión. A pesar de su asociación con infecciones en la piel, estas bacterias raramente se encuentran formando parte de la microbiota de la piel de gente sana. En este sentido, por medio de un estudio estadístico se ha determinado que sólo el 3% de la población está colonizada por estas bacterias (Howard, *et al.*, 2012).

A. baumannii y *P. aeruginosa* son descritas principalmente como bacterias patógenas oportunistas, causando infecciones en pacientes inmunocomprometidos (por senilidad, quemaduras, diabetes, cáncer, VIH, etc.). Ambas especies han emergido como bacterias de gran importancia clínica, ya que los aislamientos de estas bacterias en los hospitales han aumentado considerablemente en los últimos años a nivel mundial, generando Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS), antes llamadas nosocomiales, con altas tasas de mortalidad (Hernández, 2018; Perez *et al.*, 2007). De manera relevante, muchas cepas de estas bacterias cuentan con mecanismos que les confieren resistencia a una amplia gama de agentes antimicrobianos, lo cual obliga a los médicos a administrar antibióticos de

último recurso para tratar las infecciones que producen, entre ellos los carbapenémicos, la colistina y la tigeciclina (Vázquez-López *et al.*, 2020).

Aunado a estas características, ambas bacterias tienen un factor de virulencia en común, la generación de biopelícula, la cual se describe principalmente como un cúmulo microbiano que crece embebido dentro de una matriz de exopolisacáridos adherida a una superficie inerte o tejido vivo (Elgayyar *et al.*, 2018).

El crecimiento en forma de biopelícula les permite a las bacterias persistir y propagarse en el medio hospitalario, colonizando superficies bióticas y abióticas, resistiendo a la desecación e inanición de las superficies que colonizan durante largos periodos de tiempo (Chapartegui-González *et al.*, 2018). También les brinda una mayor resistencia ante los agentes antimicrobianos y antisépticos a los que pueden estar expuestas, ya que la matriz de exopolisacáridos actúa como una barrera que disminuye la penetración de estos (Vlamakis & Kolter, 2010).

Debido a lo anterior, ambas bacterias han sido catalogadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como patógenos que representan una grave amenaza para la salud humana a nivel mundial. En el 2017, esta Organización publicó un listado de los patógenos prioritarios para los que es urgente generar investigación y el desarrollo de nuevos antimicrobianos, donde *A. baumannii* y *P. aeruginosa* ocupan el primer y segundo lugar, respectivamente (WHO, 2017).

Es por esto que los investigadores se están dando a la tarea de desarrollar nuevas alternativas que puedan combatir o erradicar las biopelículas de estas bacterias.

Importancia clínica de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*

A. baumannii y *P. aeruginosa* han recibido mucha atención en los últimos años, generando una alarma en el gremio médico debido a su creciente asociación con infecciones nosocomiales graves con altas tasas de mortalidad. Las infecciones causadas por *A. baumannii* presentan tasas de mortalidad que van del 26% hasta el 43%, mientras que las de *P. aeruginosa* van de un 30% a un 40%, principalmente en las unidades de cuidados intensivos (UCI) de hospitales en todo el mundo (Borges *et al.*, 2016). Estas tasas de mortalidad están altamente relacionadas con la presencia de cepas multirresistentes a antibióticos (MDR) como ampicilina, ceftazidima, cefepine, ciprofloxacina, doripenem, imipenem y meropenem, entre otros. Las familias de antibióticos que son mayormente susceptibles a generar resistencia en estos generos bacterianos son los siguientes; __ . Algunas de las cepas de estas bacterias que han sido aisladas en diferentes hospitales de nuestro país, muestran altos porcentajes de resistencia a diferentes antibióticos; entre un 52% a un 92% para *A. baumannii* y entre un 20% a 30% para *P. aeruginosa*, frente a los siguientes antibioticos: ampicilina, amikacina, sulbactam,

piperaciclina/tazobactam, cefepime, ceftazidima, meropenem y ciprofloxacina (Asif, Alvi, & Rehman, 2018).

Las infecciones por *A. baumannii* y *P. aeruginosa* están comúnmente asociadas a la inserción de objetos invasivos en los pacientes, como neumonía asociada a ventiladores mecánicos, bacteriemias asociadas a catéteres, infecciones en el tracto urinario asociadas a sondas o infecciones en quemaduras graves y heridas que se encuentren expuestas (Antunes, Visca, & Towner, 2014). Asimismo, la contaminación de los equipos de asistencia respiratoria, los equipos de succión y los dispositivos utilizados para el proceso intravascular, también están relacionados a la infección por estas bacterias (Cuesta, *et al.*, 2012).

Factores de virulencia de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*

Las bacterias expresan diferentes factores de virulencia que les permiten colonizar y replicarse en sus hospederos (René Arredondo, 2018). Para que *A. baumannii* y *P. aeruginosa* puedan causar infecciones necesitan de varios factores de virulencia, dentro de los cuales se encuentran los descritos en la Tabla 3 (Cárdenas, Gándara, & Pérez, 2014).

Tabla 3. Factores de virulencia de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*

Principales determinantes de virulencia	<i>A. baumannii</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Adhesión y colonización	-Lipopolisacáridos	Flagelos
	-Fimbrias	Fimbrias
	-Producción de mucosa	
	-Biopelícula	-Biopelícula
Invasión tisular y destrucción local	Proteína OmpA	Sistema de secreción tipo III
	Vesículas de membrana externa	Proteasas
	Fosfolipasas	Lipasas y fosfolipasas
	Producción de sideróforos	Leucocidinas y hemolisinas
		Sideróforos-pioverdina
		Piocianina
Diseminación y respuesta inflamatoria sistémica		Exotoxina A
		Exoenzima S

Biopelículas de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*

Un importante factor de virulencia que comparten *A. baumannii* y *P. aeruginosa* es la capacidad que tienen para formar biopelículas, gracias a ésta, las bacterias pueden crecer adheridas a casi todas las superficies, formando comunidades arquitectónicamente complejas. Las biopelículas se desarrollan principalmente en ambientes acuosos, sobre un soporte sólido mediante sustancias poliméricas extracelulares (SPE) o en un gran número de superficies hidratadas como metal, plástico, y tejidos tanto vivos como muertos.

Los mecanismos moleculares que regulan la formación de biopelículas varían mucho entre las diferentes especies bacterianas, e incluso varían entre cepas de la misma especie; sin embargo, hay características generales en la formación de biopelículas (Cárdenas *et al.*, 2014). Por ejemplo, todas las biopelículas contienen una matriz extracelular que mantiene unidas a las células. Esta matriz se compone a menudo de un biopolímero de polisacárido junto con otros componentes, en su mayoría agua (97%), proteínas y DNA procedentes de la lisis bacteriana (Koch, 2017).

Los mecanismos que emplean las diferentes bacterias para formar biopelículas varían con frecuencia, dependiendo de las condiciones ambientales y los atributos específicos de las cepas. Un mecanismo muy importante para que las bacterias puedan producir biopelículas es la activación del mecanismo de “Quorum sensing” (QS) que significa detección de quórum. Dicho mecanismo se define como la regulación genética bacteriana en respuesta a la densidad de la población celular (Koch, 2017). El QS está mediado por la producción y secreción de moléculas señales llamadas autoinductores, en el caso de bacterias Gram negativas, las moléculas de señalización que se producen son las AHL (Acil Homoserin Lactonas).

Al estar creciendo en diferentes entornos, las bacterias pueden detectar distintas moléculas de señalización como las AHL mediante receptores específicos, esto sucede cuando las moléculas de señalización son secretadas y alcanzan una alta concentración en el exterior, lo cual está directamente relacionado con altas densidades bacterianas. Posteriormente, los receptores activan a reguladores que a su vez inducen o reprimen la expresión de genes con diferente función celular, incluyendo factores de virulencia, producción de metabolitos secundarios, esporulación, simbiosis y la formación de biopelícula (Vlamakis & Kolter, 2010).

Etapas de la formación de biopelículas

Hasta la década de 1970, las bacterias eran consideradas como microorganismos individuales flotantes. Debido a esto los investigadores han podido estudiar muchas especies bacterianas utilizando el modelo de cultivo bacteriano planctónico y han podido desarrollar biocidas para matarlas, pero la aparición de bacterias resistentes que crecen dentro de matrices autoproducidas, llamadas biopelículas, brinda a las bacterias mecanismos de resistencia a biocidas o antibióticos (Koch, 2017).

El proceso de desarrollo de las biopelículas se ha estudiado ampliamente. La formación de biopelícula se ha dividido en 5 etapas (Lu *et al.*, 2019) (Figura 1).

1. Las bacterias en estado planctónico llegan a una superficie sólida en donde inician una fijación reversible.

2. Inicia una transición de una fijación reversible a una fijación irreversible mediante la producción de polímeros extracelulares y/o por adhesinas específicas localizadas en los pili o fimbrias, las cuales interactúan con la superficie.
3. Inicia el desarrollo de la estructura de la biopelícula.
4. Se desarrollan estructuras maduras y complejas parecidas a pedestales que contienen canales para el paso de agua y con poros para el paso de sustratos, en las cuales las bacterias desarrollan patrones de crecimiento específicos, con una fisiología y un metabolismo distinto al estado planctónico.
5. Las células se liberan de la biopelícula al medio ambiente y regresan al estado planctónico.

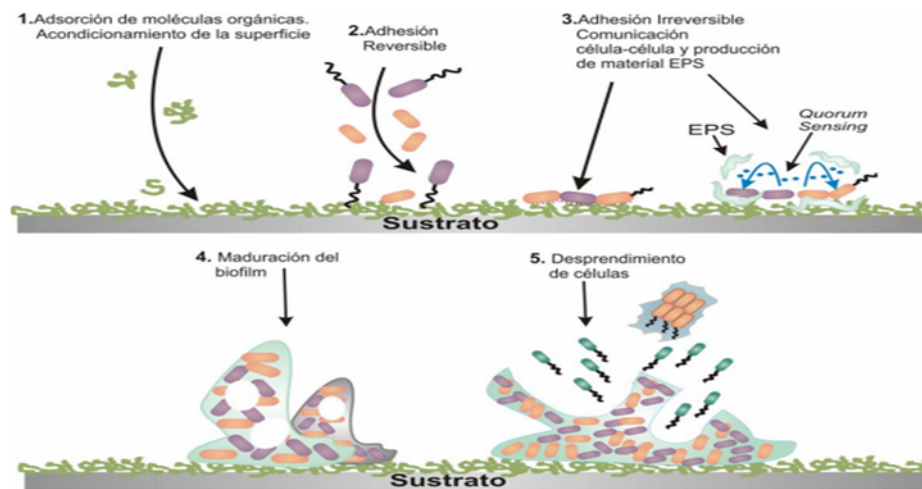


Figura 1.- Etapas de la formación de biopelículas. Tomado de Díaz, 2011.

Beneficios de la biopelícula para las bacterias

Existen numerosos beneficios que una comunidad bacteriana podría obtener de la formación de biopelículas. Estos incluyen resistencia a antimicrobianos, protección contra la depredación de protozoos, protección contra las defensas del huésped y protección contra la deshidratación (Toole, Kaplan, & Kolter, 2000).

El desarrollo de resistencia a antimicrobianos en biopelículas es conocido y estudios recientes han desarrollado una variedad de sistemas modelos para comprender cómo y por qué las biopelículas son más resistentes a agentes antimicrobianos. La matriz de exopolisacáridos actúa como una barrera de difusión que minimiza la concentración intracelular del antibiótico como resultado de una pobre penetración en la biopelícula. Otro factor que explica la alta resistencia de las biopelículas es el microentorno químico alterado que existe en su interior. La disminución del oxígeno y el gradiente de nutrientes que hay dentro de las biopelículas, entre la superficie y las capas más profundas, pueden causar una actividad metabólica alterada y un

crecimiento lento, lo que provoca que algunos antimicrobianos no tengan efecto debido a que su acción citotóxica es dependiente del crecimiento bacteriano (Borges, *et al.*, 2016).

Debido a estas condiciones de estrés, dentro de las biopelículas se presentan un pequeño porcentaje de bacterias llamadas persistentes, las cuales muestran una tasa de crecimiento reducida y una resistencia a agentes antimicrobianos que puedan acumularse dentro de la biopelícula. La persistencia se define como la capacidad que tiene un sub-conjunto de una población bacteriana para sobrevivir estando expuestas a una concentración de fármacos con actividad bactericida (Balaban, 2019), llegando a exhibir tolerancia a múltiples fármacos (Lewis K. *et al.*, 2008). La presencia de estas células contribuye en gran medida a que haya una mayor resistencia a los antibióticos en las biopelículas (Vlamakis & Kolter, 2010).

Papel de la biopelícula en la patogenicidad de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*.

Como ya lo mencionamos anteriormente, las bacterias que crecen dentro de biopelículas tienen una mayor protección frente a los antibióticos, a la defensa inmune del huésped y a las condiciones ambientales adversas que las bacterias de vida libre (planctónico). Debido a esto, se estima que el 65-80% de las enfermedades infecciosas humanas son causadas por bacterias formadoras de biopelículas, como es el caso de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* (Gunn, 2016). Las infecciones asociadas a la biopelícula comúnmente son infecciones crónicas, por lo tanto necesitan de dosis más altas de antibióticos para su tratamiento que una infección aguda de células plantónicas (Ramos-Gallardo, 2016). El uso de dosis altas de antibiótico provoca la resistencia antimicrobiana, aumentos de los casos de muertes, estadías prolongadas en hospitales, pérdidas económicas y pérdida de protección para pacientes.

Los efectos dañinos de la resistencia a los antimicrobianos empiezan a manifestarse en todo el mundo. Infecciones causadas por bacterias resistentes a los antimicrobianos actualmente cobran la vida de al menos 50,000 personas cada año solo en Europa y Estados Unidos, y cientos de miles más muriendo en otras áreas del mundo (O'Neill, 2014). Una investigación inicial revela el impacto que tiene la resistencia a los antimicrobianos, estimando que un aumento continuo en el problema de la resistencia a antibióticos, para el año 2050 conducirá a la muerte de 10 millones de personas cada año (O'Neill, 2014)

En México, se calcula que hasta el 21% de los pacientes hospitalizados presentan infecciones asociadas a los cuidados de la salud; de estas infecciones las más comunes son neumonía, infección de vías urinarias, infección de heridas quirúrgicas y bacteriemia asociada a catéter, con frecuencias de aparición de 33.2%, 24.6%,

15.5% y 5.8%, respectivamente (SALUD, 2011). Las infecciones nosocomiales causadas por *A. baumannii* y *P. aeruginosa* provocan un aumento en los costos de atención en los sistemas de salud pública de México (Gutiérrez-Muñoz J *et al.*, 2017).

Compuestos de origen natural como alternativa para combatir las biopelícula

La inhibición de la formación y/o la erradicación de las biopelículas representa una estrategia anti-virulencia prometedora para el control de la infección por bacterias como *A. baumannii* y *P. aeruginosa*. Para esto se requiere de la identificación de nuevos compuestos que eviten la formación de biopelículas o alteren su estructura. Estos compuestos podrían afectar a diferentes etapas de desarrollo de la biopelícula, como la adhesión, motilidad, producción de sustancias poliméricas extracelulares o mecanismos de QS (moléculas señal), así como inducir la eliminación de la biopelícula mediante su debilitamiento o dispersión.

Extractos de plantas

Un producto natural se define por ser un compuesto químico de bajo peso molecular que es sintetizado por distintos organismos vivos, entre ellos, las plantas.

Debido a que las plantas presentan un estilo de vida sésil, a lo largo de su evolución han desarrollado defensas químicas para defenderse de depredadores, incluyendo la producción de una gran diversidad de metabolitos secundarios, por lo que representan una fuente vasta de compuestos naturales (Lu *et al.*, 2019).

Al conjunto de reacciones químicas que se llevan a cabo en un organismo se le denominada metabolismo. La mayor parte del carbono, del nitrógeno y de la energía termina en moléculas necesarias para las células y para el organismo en general, como lo son los aminoácidos, proteínas, nucleótidos, azúcares y lípidos, a los que se les conoce como metabolitos primarios. Además del metabolismo primario, que es característico de todos los seres vivos, las plantas, que son organismos autótrofos, poseen un metabolismo secundario a través del cual producen numerosos productos con estructuras químicas diversas que no tienen una función directa en procesos fotosintéticos, respiración o asimilación de nutrientes, entre otras funciones. A estos productos se les conoce como metabolitos secundarios, los cuales presentan diferentes propiedades y se les han encontrado diferentes usos, por ejemplo como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros (Balaban *et al.*, 2019).

Los metabolitos secundarios presentan una distribución restringida en las plantas, lo que quiere decir que no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas, ya que se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma

generalizada, esto hace que su producción esté restringida a un determinado género e incluso a una especie de planta (Ávalos, A. y Pérez, 2009).

Los metabolitos secundarios se pueden agrupar en cuatro clases principales (Ávalos, A. y Pérez, 2009):

- Terpenos (hormonas, pigmentos, aceites esenciales)
- Compuestos fenólicos (cumarinas, flavonoides, lignina, taninos)
- Glucósidos (saponinas, glucósidos, glucosinolatos)
- Alcaloides

Diferentes extractos de plantas poseen propiedades antimicrobianas o antibiopelícula, lo cual se atribuye fundamentalmente a la presencia de determinados metabolitos secundarios, entre los que destacan taninos, benzoatos, fenilpropanoides, estilbenos, proantocianidinas flavonoides, terpenos, cumarinas, quinonas y alcaloides (Ta & Arnason, 2016).

Algunos compuestos específicos que se ha reportado que tienen efecto antibiopelículas son el heptilsulfanilacetil del extracto de ajo, fracción de acetato de etilo de *Cocculus trilobus*, que es una especie de arbusto, polifenoles de arándano, ácidos ginkgólidos extraídos del *Ginkgo biloba*, entre otros (Lu *et al.*, 2019) (Tabla 4).

Los efectos de estos productos naturales se basan principalmente en los siguientes aspectos (Lu *et al.*, 2019):

- La inhibición de la formación de la matriz polimérica
- La supresión de la adhesión celular
- La interrupción de la degeneración de la matriz extracelular
- Bloqueo del sistema de QS

Tabla 4. Compuestos naturales y sus mecanismos moleculares en efectos antibiopelícula tomada de Lu *et al.*,2019.

Extractos o compuestos de plantas	Sitios de acción	Bacteria afectada	Efectos anti-biopelículas
N-(Heptilsulfanilacetil)-L-homoserina lactona (extracto de ajo)	Reguladores transcripcionales LuxR y LasR	<i>P. aeruginosa</i>	Disminución en la elaboración de factores de virulencia y producción reducida de señales de QS
Polifenoles (arándano)	Proteínas de unión al glucano, enzimas involucradas en la formación de biopelículas	Bacterias criogénicas y periodonto patógenas	Afectó la destrucción de la matriz extracelular, la producción de carbohidratos, la hidrofobicidad bacteriana, las actividades proteolíticas y la coagregación que participan en la formación de biopelículas
Planta patrinia	Genes asociados a la biopelícula	<i>P. aeruginosa</i>	Inhibió la formación de biopelícula y redujo la producción de

			exopolisacáridos
Ácidos ginkgólicos	Genes curli y genes de profago	<i>E. coli</i> O157:H7	Inhibió la formación de biopelículas en superficies de vidrio, poliestireno y membranas de nylon.
Cinamaldehído	Capacidad de unión al ADN de LuxR	<i>E. coli</i> y <i>Vibrio spp.</i>	Afectó la formación y estructura de la biopelícula, motilidad swimming, respuesta al estrés y virulencia
Floretina	Genes de toxina (<i>hlyE</i> y <i>stx</i>) genes importadores (<i>IsrACDBF</i>) genes curli (<i>csgA csgB</i>)	<i>E. coli</i> O157:H7	Redujo la formación de biopelícula y la producción de fimbrias.
Floretina	Genes de la proteína Efflux	<i>S. aureus</i> RN4220 y SA1199B	Efecto anti-biopelícula a una baja concentración (1-256 µg/ml)
Ácido isolimónico	Vía de señalización célula-célula Luxo y A I3	<i>Vibrio harveyi</i>	Interferencia con la señalización de célula-célula y la formación de biopelícula
Hordenina	Genes relacionados con QS	<i>P. aeruginosa</i>	Inhibe fenotipos controlados por QS, reduciendo la formación de biopelícula y factores de virulencia

Quercetina	SrtA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Bloqueo de SrtA que afecta la producción de ácido siálico y perjudica la formación de biopelículas
Quercetina	LasI, LasR, RhII y RhIR	<i>P. aeruginosa</i>	Inhibió la formación de biopelículas y la producción de factores de virulencia
Quercetina	pH	<i>S. mutans</i>	Modifica el pH en la biopelícula
Quercetina	Elongación de traducción de proteínas y rutas de plegamiento de proteínas	<i>Enterococcus faecalis</i>	Inhibe la traducción, elongación y plegamiento de proteínas
Fracción metanólica de jengibre	Genes de virulencia	<i>S. mutans</i>	Inhibición del antígeno de la proteína de superficie SapP y efecto inhibitorio sobre el índice de hidrofobicidad de la superficie celular de <i>S. mutans</i>
Extracto etanólico de hoja <i>Betle Pipe</i>	Piocianina	<i>P.aeruginosa strain PAO1</i>	Inhibición de producción de piocianina, reducción de swarming, swimming y la capacidad de twitching de la bacteria por el extracto PbLE

Extracto de hoja de <i>Bergenia crassifolia</i>	Gtfs, EPSs	<i>S. mutans</i>	Disminuyó la propiedad de adherencia de <i>S. mutans</i> mediante la inhibición de Gtfs para sintetizar EPS
Extracto etanolico de <i>R. tomentosa</i>	No investigado	<i>S. aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Inhibición y destrucción de la biopelícula madura de <i>Staphylococcus</i>
Extracto de hoja de <i>Hymenocallis littoralis</i>	Proteína de adhesión SrtA y Als3	<i>S. aureus</i> NCIM 2654 y <i>C. alnicans</i> NCIM 3466	Actividad antimicrobiana, anti-biopelícula y actividad antioxidante.
Extracto polifenólico de <i>Camellia sinensis</i>	No investigado	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> aislada de fibrosis quística.	Reducción de la viabilidad de las células bacterianas en biopelículas in vitro y reducción significativa de los recuentos de bacterias en un modelo de infección aguda con ratones de tipo salvaje.
Extracto polifenólico del té <i>Rosa rugosa</i>	Factores de violaceína controlados por QS	<i>Chromobacterium violaceum</i> 026, <i>E. coli</i> K-12 y <i>P. aeruginosa</i> PAO1	Inhibición de la motilidad swarming y de la formación de biopelícula
Erianin	SrtA	<i>S. aureus</i>	Regulación baja de SrtA inhibiendo la adhesión celular
Isovitexina	SpA	USA300	Reducción de SpA

			inhibición de la formación de biopelículas
<i>Partenolida</i>	LasI, RhII, LasR, RhIR y sustancias poliméricas extracelular	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Inhibición de la expresión de genes relacionados con QS LasI/LasR y RhII/RhIR incluida, una sustancia polimérica extracelular regulada negativamente.
Extracto de flores de <i>Chamaemelum nobile</i> (manzanilla común)	No investigado	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 y cepas aisladas de pacientes	Inhibición de bacterias crecidas en enjambre (swarming) y la formación de biopelículas
Salvado de trigo	AHL	<i>S. aureus</i>	Inhibición de QS y de biopelículas a través de la baja producción de AHL
Fracción de acetato <i>Cocculus trilobus</i>	Sortasa	Bacterias Gram positivas	Ejerció efecto anti-adhesivo en la etapa de adhesión en la formación de biopelícula

ANTECEDENTES

En el 2009, M. Shandasi y colaboradores determinaron que distintos extractos obtenidos de diferentes hierbas, especias y plantas medicinales comercialmente importantes, pueden impedir el desarrollo o destruir parcialmente las biopelículas formadas por cepas de *Listeria monocytogenes*.

En el 2012, Mitchell y colaboradores estudiaron las propiedades del alcaloide tomatidina extraída del tomate, mostraron que éste bloquea la expresión de varios genes del sistema “quorum sensing”, alterando así la virulencia de *S. aureus* como la hemólisis. En este mismo año, Truchado y sus colaboradores determinaron que el cinamaldehído es capaz de inhibir la producción violaceína y reducir la concentración de AHL producidas por dos bacterias patógenas: *Yersinia enterocolitica* y *Erwinia carotovora*.

En 2013, Martos J y colaboradores investigaron la actividad antimicrobiana y anti-biopelícula del aceite de eucalipto y del aceite de naranja en *Enterococcus faecalis*. Reportaron que el aceite de naranja presentó una mayor actividad anti-biopelícula que el aceite de eucalipto. Al combinar los aceites con cetrimina a diferentes concentraciones, lograron una inhibición total de la biopelícula, la asociación de cetrimina (CTR) logra la máxima actividad contra las biopelículas de *E. faecalis*.

En el 2014, Gonzales Ortiz y colaboradores observaron que el extracto soluble del salvado de trigo al 0.5% es capaz de inhibir la formación y destruir las biopelículas de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de vacas.

En el 2018, Abderrahmen y colaboradores evaluaron el efecto anti-biopelícula del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* y de su componente principal 1,8-cineol, frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). Ambos compuestos mostraron eficacia frente al crecimiento de biopelículas generadas por las cepas resistentes a meticilina. Y demuestran que el aceite esencial de *E. globulus* tiene una actividad anti-QS más fuerte estando a baja concentración comparándolo con el componente 1,8-cineol.

En el 2018, Eveline Kelle y colaboradores evaluaron la actividad antimicrobiana y anti-biopelícula del aceite esencial de *Citronela nardus* y del compuesto principal de este aceite, el geraniol, en bacterias Gram negativas. Sus resultados mostraron una actividad antimicrobiana del aceite esencial de *C. nardus* y del geraniol frente a *S. aureus*. Por otro lado, también mostrarón que el aceite esencial de *C. nardus* y el geraniol tienen una actividad anti-biopelícula, ya que redujeron la biomasa de la biopelícula de *S. aureus* hasta en un 100%. Demostrando que el aceite esencial de *C. nardus* y el geraniol son compuestos antimicrobianos prometedores contra *S. aureus*.

En el 2019, Song YJ y colaboradores realizaron un estudio donde evaluaron el efecto anti-biopelícula del extracto de semilla de toronjo (EST), frente a cepas de *S. aureus* y *E. coli* formadoras de biopelícula. El efecto de degradación de biopelículas se observó cuando fueron expuestas a concentraciones superiores a la concentración mínima inhibitoria (MIC) para todas las cepas probadas. Observaron

cambios significativos en la tasa de producción de EPS tanto en *S. aureus* como en *E. coli*. Estos resultados sugieren que el extracto de semilla del árbol de toronjo podría usarse como un agente anti-biopelícula efectivo contra *S. aureus* y *E. coli*.

En algunos estudios se han identificado extractos o compuestos de plantas que afectan las biopelículas de *A. baumannii* y/o *P. aeruginosa*. A continuación se mencionan algunos ejemplos de estos estudios.

En el 2013, Norizan y sus colaboradores mostraron que la cafeína presentaba una propiedad anti-quorum sensing en la cepa P01 de *P. aeruginosa*, lo que inhibía la producción de moléculas de señalización AHL.

En el 2014, Chang y colaboradores señalaron al cinamaldeído como un agente inhibidor de quorum sensing (QS) en *P. aeruginosa*, los investigadores realizaron acoplamiento celular donde demostraron que el cinamaldeído se une a LasI y a Esal, ocupando el sitio de unión del sustrato para la producción de AHL.

En el 2015, Kim YG y colaboradores estudiaron 83 aceites esenciales para evaluar su actividad frente a la inhibición de biopelículas de *P. aeruginosa*, sus resultados demostraron que el aceite de corteza de canela y su componente principal, cinamaldeído, inhiben notablemente la formación de biopelículas de *P. aeruginosa*.

En el 2016, Banu Kaskatepe y colaboradores estudiaron el efecto antibacteriano de los aceites de canela contra aislamientos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, y reportaron un efecto antibacteriano por parte del aceite de canela frente a estas cepas resistentes.

En el 2017, Vishvanath Tiwari y colaboradores mostraron que el extracto polar del kiwi (*Actinidia deliciosa*) y del clavo (*Syzygium aromaticum*), inhiben la formación de biopelícula de *A. baumannii* resistente a carbapenémicos.

En el 2018, Fahad y colaboradores evaluaron el efecto antimicrobiano de diferentes especies de eucalipto de Australia Occidental, frente a las cepas *A. baumannii* NCTC 7844 y *P. aeruginosa* ATCC 27853; los aceites de eucalipto exhibieron actividad antimicrobiana, *A. baumannii* fue la bacteria más sensible a los diferentes aceites de eucalipto.

En el 2018, Leonardo Caputo y colaboradores evaluaron la actividad antimicrobiana y anti-biopelícula de extractos en agua de tres cáscaras de cítricos naranja, limón y citron frente a diez cepas de *P. aeruginosa*. Aunque ningún extracto logró inhibir completamente el crecimiento de las bacterias estudiadas, sí mostraron una reducción significativa sobre la biomasa de la biopelícula formada por estas bacterias. Estos resultados muestran que las infusiones de agua de cáscara de cítricos pueden reducir la formación de biopelículas.

En el 2018, Topa SH y colaboradores estudiaron el efecto del componente principal de canela, el cinamaldehído (CAD) frente a *P. aeruginosa*, el cinamaldehído destruyó las biopelículas preformadas en un 75.6%. También nos muestran como CAD reduce a bis-(3'-5')-monofosfato de guanosina dimérico cíclico (c-di-GMP) que controla la formación de biopelículas de *P. aeruginosa*. Sus estudios reportaron que este componente de la canela tiene el potencial de alterar biopelículas y otros fenotipos de colonización de la superficie a través de la modulación de los procesos de señalización intracelular.

En el 2018, Diego F. y colaboradores evaluaron la actividad anti-biopelícula de cinamaldehído frente a *P. aeruginosa*. Sus resultados reportaron que las biomasa de biopelícula lograron reducirse un 99.9% en presencia del compuesto; asimismo, con 0.2 mg/ml de cinamaldehído se logró reducir el número de células viables.

En el 2019, Ahmed Saks y colaboradores investigaron el efecto de los compuestos de plantas sobre la represión del sistema de QS en una cepa de *P. aeruginosa*. Sus resultados mostraron que el Trans-cinamaldehído (CA) a concentraciones sub-inhedoras logra inhibir notablemente la expresión de genes que intervienen en la expresión del QS y virulencia en *P. aeruginosa* PAO1. También se observó una disminución en la formación de biopelículas.

En el 2020, Sana Alibi y colaboradores evaluaron el efecto anti-biopelícula, anti-quórum y antioxidante del aceite esencial de *Cinnamomum verum* (árbol de canela o canelo) frente a bacterias MDR Gram negativas. El aceite esencial de *Cinnamomum verum* mostró tener una importante actividad antibacteriana. También mostró tener una actividad notable anti-biopelícula y anti-quórum contra casi todas las especies estudiadas. Los resultados de este trabajo respaldan el uso de este aceite esencial como agente alternativo para tratar infecciones causadas por bacterias resistentes a múltiples fármacos (MDR) y para evitar la formación de biopelículas.

En el 2020, Topa SH y colaboradores realizaron estudios donde combinaron cinamaldehído (CAD) y colistina (COL), CAD mostró tener la capacidad de inhibir el QS mediante la inhibición de expresión de los siguientes genes *lasB*, *rhlA* y *pqsA* en cepas de *P. aeruginosa* PAO1. También probaron cinamaldehído (CAD) con tobramicina (TOB), esta combinación también mostró ser un fuerte inhibidor de QS. Los resultados revelan una inhibición y una erradicación de biopelícula con ambas combinaciones. Con estos resultados los autores reportan dos métodos eficaces para combatir infecciones por *P. aeruginosa*.

JUSTIFICACIÓN

Con el fin de contribuir a la solución de la problemática que representan *A. baumannii* y *P. aeruginosa* a nivel clínico, en este trabajo se evaluará el efecto de diferentes extractos de plantas, sobre la formación y mantenimiento de las biopelículas generadas por distintas cepas multirresistentes a antibióticos de estas dos bacterias patógenas.

HIPÓTESIS

A partir de los extractos de origen vegetal que se evaluarán en este estudio, se pueden obtener compuestos que inhiban la formación y/o que erradiquen la biopelícula de cepas multirresistentes a antibióticos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*.

OBJETIVO GENERAL

Obtener nuevos compuestos derivados de plantas que inhiban la formación y/o el mantenimiento de la biopelícula de las cepas de referencia ATCC 17978 y ATCC 27853 de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* respectivamente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar si las diferentes cepas de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* con las que se cuenta en nuestro grupo de trabajo desarrollan biopelícula
- ✓ Evaluar el efecto de los extractos naturales en estudio sobre el crecimiento de diferentes cepas de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*.
- ✓ Determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración máxima subinhibitoria (CMS) para cada uno de los extractos.
- ✓ Determinar el efecto de diferentes extractos de plantas en la formación de biopelículas de las cepas de *A. baumannii* ATCC 17978 y *P. aeruginosa* ATCC 27853
- ✓ Determinar el efecto de diferentes extractos de plantas sobre el mantenimiento de las biopelículas generadas por las cepas *A. baumannii* ATCC 17978 y *P. aeruginosa* ATCC 27853

MATERIALES Y MÉTODOS

- LUGAR Y ÁREA DE TRABAJO

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán, en el departamento de Microbiología Molecular, en el Instituto de Biotecnología (IBt) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) en Cuernavaca, Morelos.

- MEDIOS

Para preparar 250 ml de caldo Luria-Bertani (LB) se agregaron 2.5 g de triptona, 1.25 g de extracto de levadura, 2.5 g de cloruro de sodio y 250 ml de agua destilada, se disolvieron los componentes y el medio se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Para preparar 250 ml de medio LB al 50% se ocupó la mitad de todos los componentes que se necesitan para LB.

Para preparar 500 ml de medio Mueller Hinton (MH) se agregaron 10.5 g del medio Difco Mueller Hinton Broth, se hidrató con 500 ml de agua destilada, se disolvió el medio y esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

- COMPUESTOS DE PLANTAS

En este trabajo evaluamos el efecto de diferentes extractos comerciales y del compuesto cinamaldehído, sobre la formación y mantenimiento de la biopelícula de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*.

Los extractos comerciales CinnAcar, citrobio y mega se obtuvieron mediante una colaboración con el Dr. Odon Vite de la empresa Ultraquimia. Los extractos de Eucalipto y citronela fueron donados por un grupo de personas de la región de Cuautla Morelos, el compuesto cinamaldehído fue adquirido de la marca Sigma Aldrich.

La colección de estos extractos se enlistan en la Tabla 5.

Tabla 5. Extractos comerciales de plantas que se usaron en este proyecto

✓ CinnAcar	Extracto de canela
✓ Mega	Extracto de planta gobernadora
✓ Eucalipto	Extracto de hojas de árbol de eucalipto
✓ Citronela	Extracto de la planta citronella
✓ Citrobio	Extracto de la semilla de toronja
✓ Cinamaldehído	Componente principal de la canela

- El cinnAcar es un extracto de canela (*Cinnamomun zeylanicum*). Comercialmente se usa en la agricultura orgánica convencional como acaricida e insecticida. En estudios previos se ha visto que extractos de canela tienen efecto antimicrobiano e inhiben la formación y mantenimiento de biopelículas de bacterias como *A. baumannii* y *P. aeruginosa*. (Ver antecedentes)
- El cinamaldehído es el compuesto principal del extracto de canela (*Cinnamomun zeylanicum*). Comercialmente se usa como saborizante, aromatizante y fungicida. En estudios previos se ha visto que el cinamaldehído presenta actividad antimicrobiana y antibiopelícula frente a cepas de *P. aeruginosa*. (Ver antecedentes)
- El mega es un extracto de la planta gobernadora (*Larrea tridentata*). Comercialmente se usa como insecticida y fungicida botánico. Hasta el momento no se tiene algún reporte científico que demuestre que el extracto de gobernadora tenga efecto antibacteriano y/o antibiopelícula. (Ver antecedentes)
- El Citrobio es un extracto de la semilla de toronja (*Citrus paradisi*). Comercialmente se usa como plaguicida en la agricultura convencional. En estudios previos se ha visto que extractos de cítricos tienen efecto inhibitorio de biopelículas de *P. aeruginosa*. (Ver antecedentes)
- El eucalipto es un extracto de la hoja de Eucalipo (*Eucalyptus globulus*). Comercialmente se usa como descongestionante nasal, antiinflamatorio y desinfectante. Estudios previos se ha visto que extractos de eucalipto tienen actividad antibacteriana frente a cepas de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*. También se ha reportado que algunas especies de eucalipto tienen un efecto inhibitorio frente a las biopelículas de diferentes especies bacterianas. (Ver antecedentes)
- La citronela es un extracto de la planta de citronela (*Cymbopogon nardus*). Comercialmente se utiliza como repelente de moscos. Un estudio previo reporta que el extracto de citronela tiene actividad antimicrobiana y antibiopelícula frente a *S. aureus*. (Ver antecedentes)

En nuestro laboratorio se determinó previamente que los extractos de plantas enlistados en la Tabla 4 tienen actividad antibacteriana (Téllez Galván., 2018)

- CEPAS BACTERIANAS

Las cepas bacterianas que se utilizaron en este proyecto (Tablas 5 y 6) fueron proporcionadas por el Dr. Rafael Franco Cendejas, las cuales fueron aisladas de pacientes con quemaduras admitidos en el Centro Nacional de Investigación y Atención de Quemados (CENIAQ) del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”, localizado en la Ciudad de México.

Tabla 6. Listado de cepas de *Acinetobacter baumannii*

Cepas de <i>A. baumannii</i>	Fuente de aislamiento	Resistencia a antibióticos.
ATCC 17978	Paciente de 4 meses con meningitis fatal	AMP
A687 MDR	Sonda de urocultivo	CAZ/FEP/CIP/DOR/IPM/MEM
A770 MDR	Catéter central	CIP
A797 MDR	Catéter central	AMK/GEN/CAZ/FEP/CIP/DOR/IPM/MEM/COL/AMP
A801 MDR	Punta de catéter intravascular	CAZ/FEP/CIP/DOR/IPM/MEM
A805 MDR	Catéter central	GEN/CAZ/FEP/CIP
A808 MDR	Punta de catéter intravascular	CAZ/FEP/CIP/DOR/IPM/MEM
A811 MDR	Catéter central	CAZ/CIP/DOR/IPM/MEM
A820 MDR	Biopsia cuantitativa de brazo derecho	CAZ/CIP/DOR/IPM/MEM
A822 MDR	Catéter central	CAZ/FEP/IPM/MEM/AMP
A829 MDR	Lavado bronquioalveolar	CAZ/FEP/IPM/MEM/AMP

AMP: ampicilina CAZ: ceftazidima FEP: cefepime CIP: ciprofloxacino DOR: doripenem
 IPM: imipenem MEM: meropenem AMK: amikacina GEN: gentamicina COL: colistina
 MDR: multirresistencia, resistente a 3 familias de antibióticos.

Tabla 7. Listado de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*

Cepas de <i>P. aeruginosa</i>	Fuente de aislamiento	Resistencia a antibióticos
ATCC 27853	Cultivo sanguíneo	
P1473 MDR	Urocultivo sonda	AK, GEN, AZR, CAZ, FEP, CIP, LVX, DORY, IMP, MRP.
P1483 MDR	AET	AK, CAZ, CIP, DORY, FEP, GEN, IMP, LVX, MRP, TZP.
P1503 MDR	Biopsia tendón muñeca	AK, GEN, CAZ, FEP, CIP, LVX, DORY, IMP, MRP, TZP.
P1546 MDR	Urocultivo sonda	AK, GEN, DORY, IMP, MRP, TZP.
P1547 MDR	Herida de muñón izquierdo	AK, CAZ, CIP, DORY, FEP, GEN, IMP, LVX, MRP, TZP.

AK: amikacina, GEN: gentamicina, AZT: aztreonam, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepime, CIP: ciprofloxacina, LVX: levofloxacina, DORY: doripenem IMP: imipenem, MRP: meropenem COL: colistina, TZP: tazobactam+piperaciclina MDR: multirresistencia, (Resistencia a 3 familias de antibióticos).

- **PRESERVACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS**

Las bacterias se inocularon en 3 ml de medio LB y se incubaron durante toda la noche a 37°C, con agitación a 250 RPM (revoluciones por minuto). Al día siguiente, de este cultivo se tomaron 750 µl y se agregaron a un microtubo de 1.5 ml, y posteriormente se le agregaron 250 µl de glicerol estéril al 100%, se agitaron y se guardaron en el ultracongelador a una temperatura de -70°C.

- **CUANTIFICACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS**

La cuantificación de biopelícula se realizó con el método descrito por Stepanovic, *et al.* (2000) con algunas modificaciones. De un cultivo de toda la noche en LB, se hizo una dilución 1:100 de cada una de las cepas; la dilución se realizó con 990 µl de medio Mueller Hinton (MH) fresco y 10 µl del preinóculo. Se agregaron 200 µl de esta dilución, por cuadruplicado, en una placa de ELISA. Esta placa se incubó a 30°C durante 24 horas. Pasado este tiempo, se determinó la densidad óptica (D.O.) a 620 nm de los cultivos en un lector de micro placas EPOCH 2 de la marca BIOTEK. Después, los pozos de las placas se lavaron tres veces con 200 µl de PBS 1X, para retirar el cultivo planctónico, se dejó secar y se fijó con metanol durante 15 minutos. Posteriormente se retiró el metanol, se dejó secar y se agregó cristal violeta (0.2%)

durante 10 minutos. En seguida se retiró el cristal violeta, se enjuagó la placa con agua destilada, se dejó secar y se resolubiliza el cristal violeta absorbido por las bacterias adheridas en cada pozo de la placa con 200 µl de ácido acético al 33% durante 15 minutos. Pasado este tiempo se determinó la densidad óptica de los pozos de la placa a una longitud de onda de 562 nm.

Para expresar la cantidad de biopelícula formada se dividió el valor obtenido de la D.O. a 562 nm sobre el valor obtenido de la D.O. a 620 nm, esto se realizó por triplicado y después se sacó el promedio de las tres repeticiones y ese promedio es proporcional a la cantidad de biopelícula que generó cada cepa.

- ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS

Se siguió el protocolo descrito anteriormente para la cuantificación de la formación de la biopelícula. Para determinar si los extractos o compuestos inhiben la formación de la biopelícula, se probaron concentraciones sub-inhedorias (concentraciones que no inhiben el crecimiento de las bacterias), desde el inicio de la incubación de los cultivos en la microplaca. Como control negativo se analizó la formación de la biopelícula en ausencia de los extractos o compuestos.

- ENSAYO DE ERRADICACIÓN DE BIOPELÍCULAS

Se siguió el protocolo descrito anteriormente para la cuantificación de la formación de la biopelícula. Después de la incubación de los cultivos en la microplaca a 30°C durante 24 horas para la formación de biopelícula, los pozos de las placas se lavaron 3 veces con medio Mueller Hinton (MH) fresco, posteriormente se agregaron en los pozos MH que contenían la concentración mínima inhibitoria de cada uno de los compuestos a evaluados. La microplaca se incubó a 30°C durante 16 horas. Al término de este tiempo se realizó el protocolo de tinción para cuantificar la biopelícula.

- DETERMINACION DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y SUBINHIBITORIA DE LOS EXTRACTOS Y COMPUESTOS A EVALUAR

Para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias y máximas sub-inhedorias de crecimiento de los extractos y compuestos, se realizaron diluciones de cada uno de ellos en medio Mueller Hinton (MH) con un factor de dilución de 10. Se obtuvieron diluciones mínimas inhibitorias y máximas sub-inhedorias de cada uno de los extractos y compuestos que se evaluaron.

Partimos de diluciones 1:10, 1:100, 1:1,000 y 1:10,000 y se fueron acortando o agrandando los rangos para llegar a la dilución exacta a la cual los extractos y componentes llevaron a cabo su actividad antimicrobiana, tomando esta dilución

como la concentración mínima inhibitoria de crecimiento. Tomamos la dilución más cercana a la mínima inhibitoria que no afecte el crecimiento bacteriano como la concentración máxima sub-inhibitoria, para probarla frente a la inhibición de la formación de biopelículas. La concentración mínima inhibitoria de crecimiento se utilizó para evaluar si los extractos o compuestos tienen la capacidad de erradicar la biopelícula ya formada.

Los cultivos bacterianos, se dejaron crecer hasta obtener una densidad óptica de 0.3 nm tomando la lectura a 620 nm. Posteriormente se realizó una dilución 1:20 con medio MH para tener un aproximado de 50,000 bacterias. En una placa de 96 pocillos se agregaron 10µl de la dilución de bacterias y 100µl de la dilución a la que se probarán los extractos o compuestos.

Esto se realizó por duplicado con cada una de las diluciones que se probaron de los extractos o compuestos. Ya inoculada la placa se incubó a 30°C durante 16 horas. Pasadas las 16 horas de incubación, se mide la densidad óptica a 630 nm.

NOTA: Los extractos de eucalipto, cinamaldehído y citronela fueron diluidos inicialmente con etanol puro al 60 y 70%, respectivamente. Para tener una mezcla homogénea del extracto y el medio MH. De estas diluciones al 60 y 70% partimos para realizar las diferentes diluciones que evaluamos tomando en cuenta que están a dichos porcentajes de etanol.

RESULTADOS

Para empezar a cumplir los objetivos de este proyecto, primeramente se evaluó si las diferentes cepas de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* en estudio tenían la capacidad de formar biopelícula.

Formación de biopelículas de las cepas de *A. baumannii*

Las condiciones a evaluar fueron aquéllas previamente reportadas para la formación de biopelícula de *A. baumannii* (incubación en medio LB a 37°C durante 24 horas) (R. Chen et al., 2017). En nuestro trabajo se consideró que había formación de biopelícula cuando los valores eran mayores a los del control negativo.

Como se observa en la Figura 2A, para la cepa ATCC 17978 y los aislados clínicos A801 y A829 se obtuvieron valores de formación de biopelícula de 1 o cercanos a 1, mientras que para el resto de las cepas los valores obtenidos fueron menores de 0.3. Estos resultados indican que en LB a 37°C existe variabilidad en la capacidad de formar biopelícula entre las cepas de *A. baumannii* evaluadas.

Con base en estos resultados, decidimos analizar la formación de biopelícula en diferentes medios de cultivo y temperaturas, con el fin de poder encontrar alguna condición que favorece mejor la formación de biopelícula de todas las cepas de *A. baumannii*. Las condiciones a probar fueron: medio LB a 30°C, medio LB-50% a 37°C, medio LB-50% a 30°C, medio Mueller Hinton (MH) a 37°C y medio MH a 30°C. El medio LB-50% es un medio modificado al que se le agrega la mitad de cada uno de los componentes del medio LB. Se ha reportado que la formación de biopelículas puede variar según las condiciones de crecimiento que se usen; por ejemplo, las condiciones de estrés o de limitación de nutrientes favorecen la formación de biopelículas (Baughn & Rhee, 2014) (Hoffman *et al.*, 2005). También evaluamos la formación de biopelícula en medio MH, ya que este medio presenta una buena reproducibilidad de los resultados repetición a repetición.

El medio LB a 30°C fue favorable para la formación de biopelícula de las cepas A801, A822 y A823 (Figura 2B).

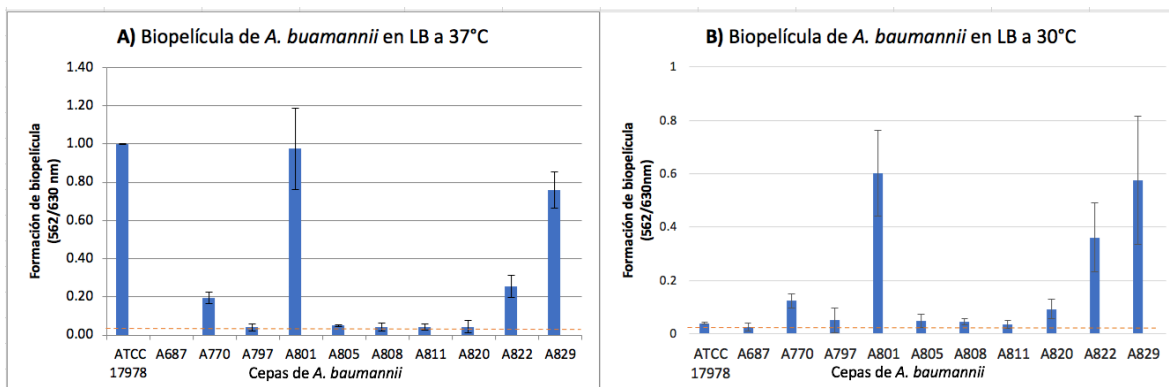


Figura 2. Evaluación de formación de biopelículas de las cepas de *A. baumannii* crecidas en LB a 37°C (panel A) y LB a 30°C (panel B). Las cepas se crecieron a las temperaturas indicadas durante 24 horas. Se probó la cepa de referencia ATCC 17978 y los aislados clínicos A687, A770, A801, A805, A808, A811, A820, A822 y A829. El eje Y indica el valor de formación de biopelícula y en el eje X están indicadas las cepas de *A. baumannii*. Los datos mostrados representan el promedio y la desviación estándar obtenidos de 3 experimentos independientes hechos por cuadruplicado. La línea punteada color naranja indica el valor que se obtuvo para el control negativo, el cual fue de 0.04 y 0.02 respectivamente.

El medio LB-50% a 37°C favoreció la formación de biopelícula únicamente de las cepas A770, A801, A822 y A829, con valores de 1.21, 4.18, 1.18 y 1.26, respectivamente (Figura 3A). En esta condición no se favoreció la formación de biopelícula de la cepa ATCC 17978, ya que presentó un valor de 0.39 (Figura 3A).

La condición de LB-50% a 30°C fue favorable para la formación de biopelícula de las cepas ATCC 17978, A801, A822 y A829, las cuales presentaron valores de 3.43, 6.64, 2.34 y 1.3, respectivamente (Figura 3B).

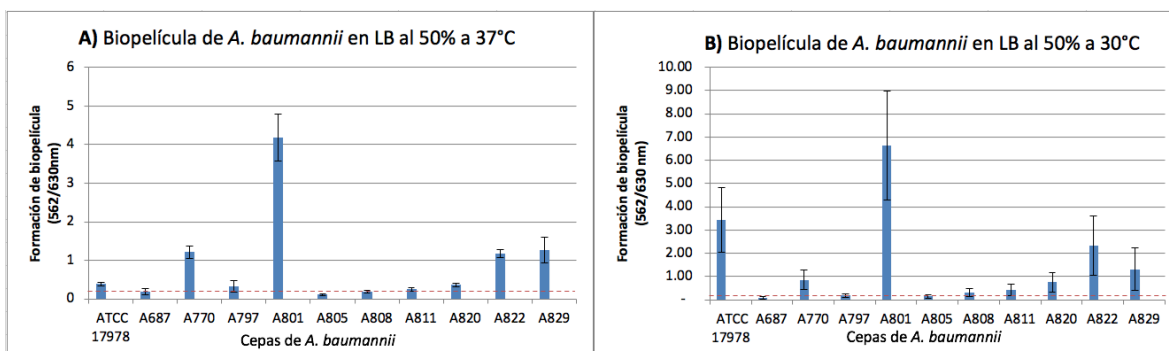


Figura 3. Evaluación de la formación de biopelículas de cepas de *A. baumannii* crecidas en LB-50% a 37°C (panel A) y 30°C (panel B) durante 24 horas. Se probó la cepa de referencia ATCC 17978 y los aislados clínicos A687, A770, A797, A801, A805, A808, A811, A820, A822 y A829. El eje Y indica el valor de la formación de biopelícula y en el eje X están indicadas las cepas de *A. baumannii* que se evaluaron. Los datos mostrados representan el promedio y la desviación estándar obtenidos de 3 experimentos independientes hechos por cuadruplicado. La línea punteada color naranja indica el valor que se obtuvo para el control negativo, el cual fue de 0.04 y 0.08 respectivamente.

El medio MH es donde comúnmente se evalúa la actividad antibacteriana de compuestos; con base en esto, nosotros decidimos analizar en este medio el efecto de los extractos y el cinamaldehído sobre las biopelículas de las cepas seleccionadas. Así, primeramente determinamos en este medio la formación de biopelícula de las cepas ATCC 17978, A801 y A829.

En la Figura 4 se muestran los resultados de la formación de biopelícula en medio MH a 37°C y 30°C de las cepas ATCC 17978, A801 y A829 de *A. baumannii*. La cantidad de biopelícula formada por las tres cepas evaluadas fue mayor a 30°C (Figura 4A) que a 37°C (Figura 4B). Por lo tanto, seleccionamos la condición del medio MH a 30°C para más adelante analizar el efecto de los extractos y el cinamaldehído sobre la formación y mantenimiento de la biopelícula de la cepa de referencia ATCC 17978 de *A. baumannii*.

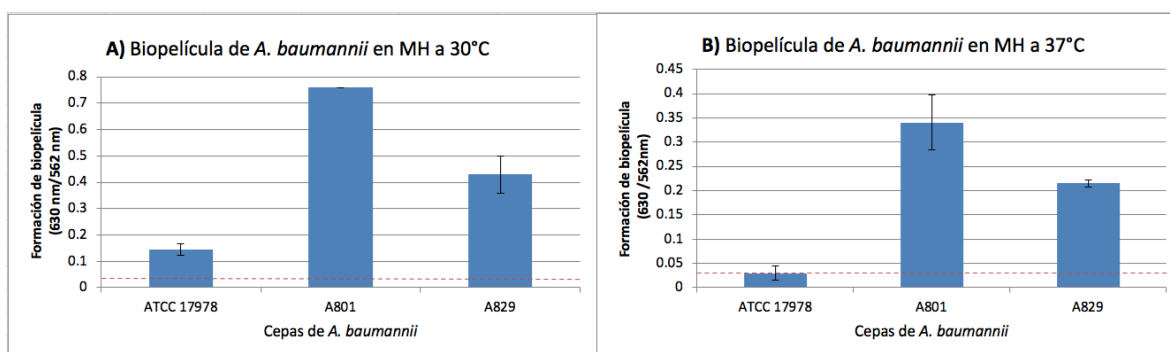


Figura 4. Evaluación de formación de biopelículas de cepas de *A. baumannii* crecidas en medio Mueller Hinton (MH) a 37°C (panel A) y 30°C (panel B) durante 24 horas. Se probó la cepa de referencia ATCC 17978 y los aislados clínicos A801 y A829. El eje Y indica el valor de formación de biopelícula y en el eje X están indicadas las cepas de *A. baumannii*. Los datos mostrados representan el promedio y la desviación estándar obtenidos de 3 experimentos independientes hechos por cuadruplicado. La línea punteada color naranja representa el control negativo, el cual fue de 0.04 para ambas condiciones.

En la Tabla 8 se resumen los resultados de la formación de biopelícula de las cepas de *A. baumannii* en las diferentes condiciones evaluadas, observándose que de la colección de aislados clínicos, las cepas A801 y A829 son las que en general tuvieron valores más altos de formación de biopelícula en las diferentes condiciones.

Tabla 8. Resumen de la formación de biopelículas en cepas de *A. baumannii* en las diferentes condiciones evaluadas

Cepa	LB 37°C	LB 30°C	LB 50% 30°C	LB 50% 37°C	MH 37°C	MH 30°C
ATCC 17978	1±0	0.08±0.07	3.42±1.39	0.39±0.05	0.03±0.01	0.14±0.02
A 687	0±0	0.02±0.02	0.09±0.05	0.19±0.07		
A 770	0.20±0.03	0.19±0.13	1.07±0.19	1.21±0.16		
A 797	0.04±0.02	0.04±0.04	0.18±0.08	0.33±0.14		
A 801	0.98±0.21	0.76±0.30	3.72±0.71	4.18±0.61	0.34±0.06	0.76±0
A 805	0.05±0.01	0.03±0.03	0.16±0.07	0.11±0.03		
A 808	0.04±0.02	0.07±0.04	0.32±0.17	0.19±0.04		
A 811	0.04±0.02	0.07±0.06	0.43±0.24	0.25±0.05		
A 820	0.04±0.03	0.09±0.04	0.76±0.91	0.37±0.04		
A 822	0.26±0.06	0.36±0.13	1.86±0.45	1.18±0.10		
A 829	0.76±0.09	0.58±0.24	1.94±0.48	1.24±0.33	0.21±0.01	0.43±0.07

En verde se marcan las cepas que se seleccionaron para evaluar el efecto de los extractos y el cinamaldehído en estudio sobre las biopelículas.

Formación de biopelículas de cepas de *P. aeruginosa*

Para evaluar la formación de biopelícula de las cepas de *P. aeruginosa* se usaron las mismas condiciones probadas para las cepas de *A. baumannii*.

La condición de LB a 37°C favoreció la formación de biopelícula, en las cepas ATCC 27853 y la P1503, ya que presentaron valores de 1.38 y 1 respectivamente, mientras que para el resto de las cepas los valores obtenidos fueron menores a 0.5 (Figura 5A).

Cuando se evaluó la formación de biopelículas en medio LB a 30°C, se observaron valores mayores a los obtenidos en LB a 37°C; las cepas ATCC 27853, P1473, P1483, P1503 y P1547, presentaron valores de 3.28, 4.63, 0.93, 0.73 y 1.15, respectivamente (Figura 5B).

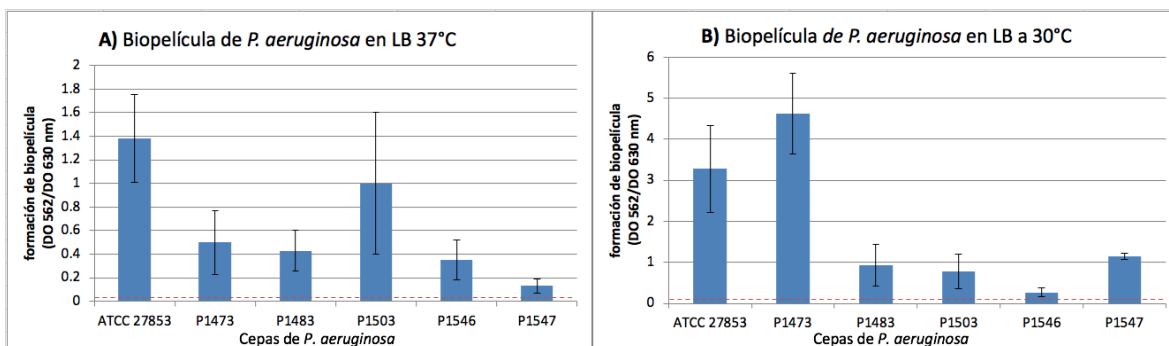


Figura 5. Evaluación de formación de biopelículas de cepas *P. aeruginosa* crecidas en medio LB a 37°C (panel A) y 30°C (panel B) durante 24 horas. Se probó la cepa de referencia ATCC 27853 y los aislados clínicos P1473, P1483, P1503, P1546 y P1547. El eje Y indica el valor de formación de biopelícula y en el eje X están indicadas las cepas de *P. aeruginosa*. Los datos mostrados representan el promedio y la desviación estándar obtenidos de 3 experimentos independientes hechos por cuadruplicado. La línea punteada color naranja representa el control negativo, el cual fue de 0.08 y 0.09 respectivamente.

En LB al 50% a 37°C, las cepas ATCC 27853 y P1547 fueron las que generaron mayor formación de biopelícula, con valores de 1.89 y 1.38, respectivamente, mientras que las cepas P1473, P1483, y P1546, formaron biopelícula con valores menores de 0.67 (Figura 6A).

En medio LB al 50% a 30°C se incrementó considerablemente la formación de biopelícula de la mayoría de las cepas, con respecto a LB-50% a 37°C; las cepas ATCC 27853, P1473, P1503, P1547, P1483 y P1546, mostraron valores de 5.66, 2.93, 1.63, 1.07, 0.97 y 0.78, respectivamente (Figura 6B).

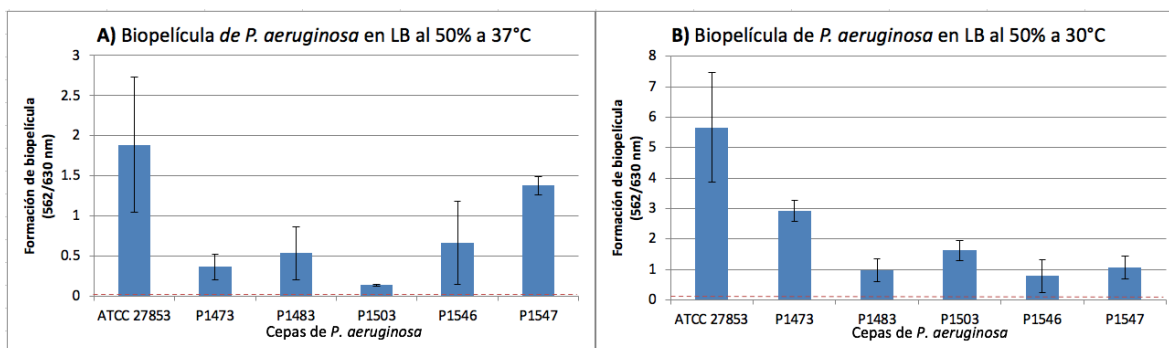


Figura 6. Evaluación de formación de biopelículas de cepas de *P. aeruginosa* crecidas en LB al 50% a 37°C (panel A) y 30°C (panel B) durante 24 horas. Se probó la cepa de referencia ATCC 27853 y los aislados clínicos P1473, P1483, P1503, P1546 y P1547. El eje de las Y indica el valor de la formación de biopelícula y en el eje de las X están indicadas las cepas de *P. aeruginosa*. Los datos mostrados representan el promedio y la desviación estándar obtenidos de 3 experimentos independientes hechos por cuadruplicado. La línea punteada color naranja representa el control negativo, el cual fue de 0.05 y 0.08 respectivamente.

Al igual que para las cepas de *A. baumannii*, para las cepas de *P. aeruginosa* también se evaluó la formación de biopelícula en medio Mueller Hinton (MH). De igual manera, esta condición sólo se evaluó con las cepas que en general formaron mayor cantidad de biopelícula en las condiciones evaluadas anteriormente.

En la condición de MH a 37°C se obtuvieron valores en la formación de biopelícula de 0.14, 0.16 y 0.22, para las cepas ATCC 27853, P1503 y P1547 de *P. aeruginosa* respectivamente. Cuando se evaluó la condición de MH a 30°C, la capacidad de formación de biopelícula aumentó. Se obtuvieron valores de 0.37, 1.27 y 0.84 para las cepas ATCC 27853, P1503 y P1547, respectivamente (Figura 7A). Por lo tanto, se seleccionó el medio MH a 30°C como la condición para evaluar la actividad de los diferentes extractos y el cinamaldehído en la formación y mantenimiento de la biopelícula de la cepa ATCC 27853 de *P. aeruginosa*.

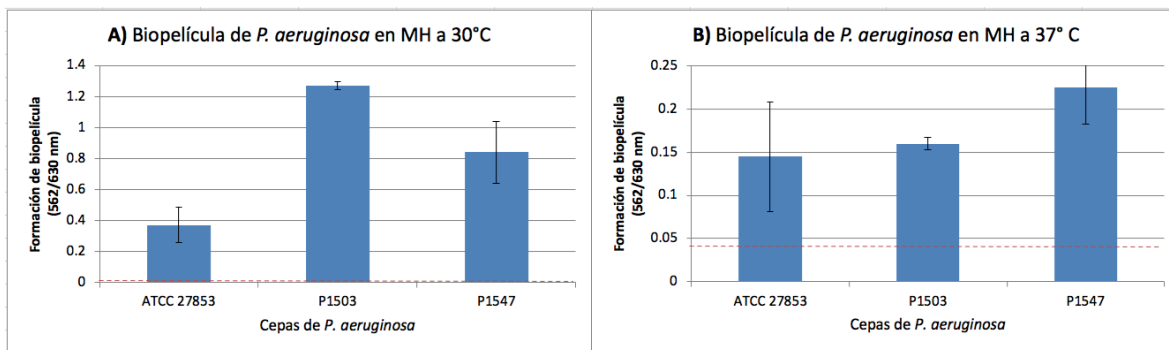


Figura 7. Evaluación de formación de biopelícula de cepas de *P. aeruginosa* crecidas en medio MH a 37°C (panel A) y 30°C (panel B) durante 24 horas. Se probó la cepa de referencia ATCC 27853, y los aislados clínicos P1473, P1503 y P1547. El eje Y indica el valor de formación de biopelícula y en el eje X están indicadas las cepas de *P. aeruginosa*. Los datos mostrados representan el promedio y la desviación estándar obtenidos de 3 experimentos independientes hechos por cuadruplicado. La línea punteada color naranja representa el control negativo, el cual fue de 0.04 para ambas condiciones.

En la Tabla 9 se resumen los resultados de la formación de biopelícula de las cepas de *P. aeruginosa* en las diferentes condiciones evaluadas, observándose que de la colección de aislados clínicos, las cepas P1473, P1503 y P1547 son las que en general tuvieron valores más altos de biopelícula en las diferentes condiciones.

Tabla 9. Resumen de la formación de biopelículas en cepas de *P. aeruginosa* en las diferentes condiciones evaluadas.

Cepa	LB 37°C	LB 30°C	LB 50% 37°C	LB 50% 30°C	MH 37°C	MH 30°C
ATCC 27853	1.38 ± 0.37	3.28±1.06	1.89±0.84	5.6 ±1.8	0.14±0.06	0.37±0.11
P1473	0.5 ± 0.27	4.63±0.99	0.37±0.16	2.93±0.35	0.07±0.01	0.73±0.11
P1483	0.43 ± 0.17	0.93 ± 0.5	0.54±0.33	0.97±0.38		
P1503	1 ± 0.06	0.77±0.42	0.14±0.01	1.63±0.33	0.16±0.04	1.27±0.03
P1546	0.35 ± 0.17	0.27 ± 0.1	0.67±0.52	0.78±0.53		
P1547	0.13 ± 0.06	1.15±0.08	1.38±0.11	1.07±0.38	0.22±0.09	0.84±0.20

En verde se marcan las cepas que se seleccionaron para evaluar el efecto de los extractos y el cinamaldehído en estudio sobre las biopelículas.

Determinación de las Concentración Mínima Inhibitoria y Máxima Sub-inhibitoria de los extractos y el cinamaldehído sobre el crecimiento de cepas de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*

Para evaluar el efecto de compuestos sobre la formación de biopelículas se requiere que se usen cantidades de estos compuestos que no inhiban el crecimiento de las bacterias en estudio. Por otro lado, para evaluar el efecto sobre el mantenimiento de biopelículas se parte por probar la concentración mínima inhibitoria del crecimiento bacteriano de los compuestos. Así, el siguiente paso de nuestro estudio fue determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Máxima Sub-inhibitoria (CMS) de los extractos de plantas y el cinamaldehído sobre el crecimiento de las cepas *A. baumannii* ATCC 17978 y *P. aeruginosa* ATCC 27853, ambas cepas de referencia. La CMI es la concentración mínima del extracto que inhibe el crecimiento de las bacterias, mientras que la CMS es la máxima concentración del extracto que permite el crecimiento bacteriano. La CMI se usó para evaluar el efecto de los extractos sobre la erradicación de la biopelícula, mientras que con la CMS se evaluó el efecto sobre la inhibición de la formación de la biopelícula de las bacterias en estudio.

Para esto, primeramente se determinó el efecto de diferentes diluciones (V/V) de los extractos y el compuesto cinamaldehído sobre la cepa *A. baumannii* ATCC 17978. Es importante señalar que ya que no teníamos la concentración de los extractos a probar, en nuestro estudio definimos la CMI y la CMS con base a las diluciones de los extractos.

Con el extracto de eucalipto, observamos que con las diluciones 1:10 y 1:50 el crecimiento de *A. baumannii* ATCC 17978 fue inhibido por completo, mientras que con la dilución 1:100 observamos un efecto parcial y con las diluciones 1:300, 1:600, 1:900 y 1:1,000 ya no hubo inhibición del crecimiento; con estas últimas diluciones se obtuvo un crecimiento similar a cuando no se agregó extracto al medio (Figura 8A). Así, para el extracto de eucalipto, se determinó que la dilución 1:50 es la CMI y la dilución 1:300 es la CMS.

Siguiendo un análisis similar que para el eucalipto, determinamos la CMI y CMS para los extractos de citronela, gobernadora, cítricos, canela y el compuesto cinamaldehído, con los resultados siguientes:

-Para el extracto de citronela, la dilución 1:200 es la CMI y la dilución 1:400 es la CMS. (Figura 8B)

-Para el extracto gobernadora, la dilución 1:100 es la CMI y la dilución 1:1,000 es la CMS.(Figura 8C)

-Para el extracto de cítricos, la dilución 1:50,000 es la CMI y la dilución 1:80,000 es la CMS.(Figura 8D)

-Para el extracto de canela, la dilución 1:50 es la CMI y la dilución 1:500 es la CMS. (Figura 8E)

-Para el compuesto cinamaldehído, la dilución 1:3,000 es la CMI y la dilución 1:12,000 es la CMS. (Figura 8F)

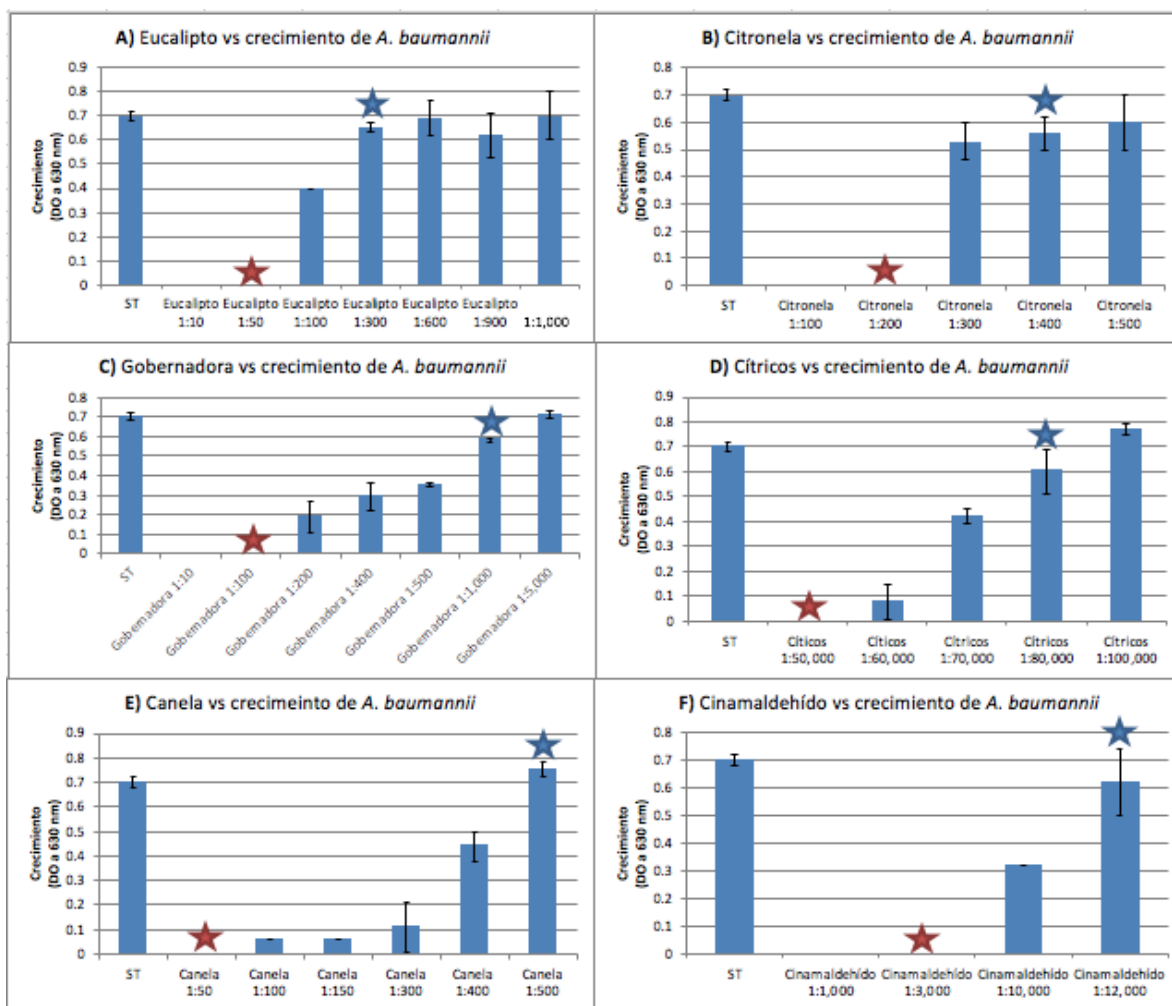


Figura 8. Determinación de la concentración mínima inhibitoria y máxima sub-inhibitoria del extracto de eucalipto (Panel A), citronela (Panel B), gobernadora (Panel C), cítricos (Panel D), canela (Panel E) y cinamaldehído (Panel F) sobre el crecimiento de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978. El eje Y indica el crecimiento bacteriano y en el eje X se indican los tratamientos, sin extracto (ST) o con diferentes diluciones de los extractos evaluados (V/V) en medio MH a 30°C durante 16 horas. Los datos mostrados representan el promedio y la desviación estándar obtenidos de 3 experimentos independientes hechos por duplicado. La estrella de color rojo indica la concentración mínima inhibitoria y la estrella de color azul indica la concentración máxima sub-inhibitoria.

De la misma forma se determinó el efecto de los extractos y el compuesto cinamaldehído sobre la cepa de referencia *P. aeruginosa* ATCC 27853, obteniéndose los resultados que se describen a continuación.

-Para el extracto de eucalipto, la dilución 1:30 es la CMI y la dilución 1:150 es la CMS. (Figura 9A)

-Para el extracto de citronela, la dilución 1:100 es la CMI y la dilución 1:400 es la CMS. Figura 9B

-Para el extracto de gobernadora, la dilución 1:70 es la CMI y la dilución 1:500 es la CMS. Figura 9C

-Para el extracto de cítricos, la dilución 1:2,500 es la CMI y la dilución 1:14,000 es la CMS. Figura 9D

-Para el extracto de canela, la dilución 1:100 es la CMI y la dilución 1:200 es la CMS. (Figura 9E)

-Para el compuesto cinamaldehído, la dilución 1:1,000 es la CMI y la dilución 1:3,000 es la CMS. (Figura 9F)

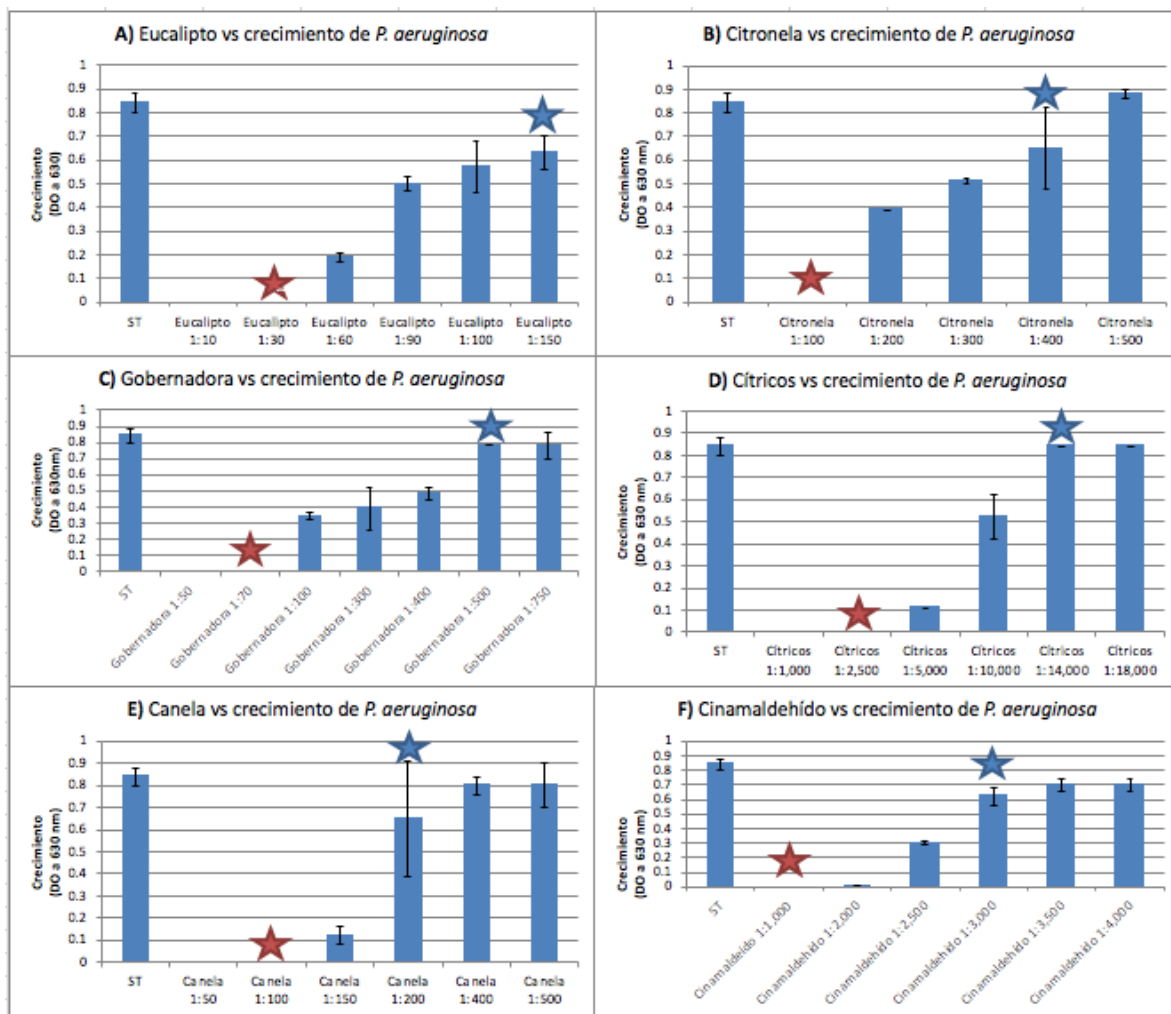


Figura 9. Determinación de la concentración mínima inhibitoria y máxima sub-inhibitoria del extracto de eucalipto (panel A), citronela (panel B), gobernadora (Panel C), cítricos (Panel D), canela (Panel E) y cinamaldehído (Panel F) sobre el crecimiento de la cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853. El eje Y indica el crecimiento bacteriano y en el eje X se indican los tratamientos, sin extracto (ST) o con diferentes diluciones de los extractos evaluados (V/V), en medio MH a 30°C durante 16 horas. Los datos mostrados representan el promedio y la desviación estándar obtenidos de 3 experimentos independientes hechos por duplicado. La estrella roja indica la concentración mínima inhibitoria y la estrella azul indica la concentración máxima sub-inhibitoria.

En la Tabla 10 se resumen las CMI y CMSs de los extractos y el cinamaldehído en las cepas de referencia ATCC 17978 de *A. baumannii* y ATCC 27853 de *P. aeruginosa* y los aislados clínicos. Estos resultados muestran que todos los extractos y el compuesto cinamaldehído analizados tienen actividad inhibitoria del crecimiento. Con base en las diluciones, podríamos sugerir que el extracto que tiene mayor actividad inhibitoria del crecimiento es el de cítricos, ya que mostró efecto a diluciones mayores; sin embargo, se requiere de estudios adicionales para confirmar esto.

Tabla 10. CMI y CMS de los extractos evaluados en las cepas de referencia y aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*.

Cepa	Eucalipto	Citronela	Gobernadora	Cítricos	Canela	Cinamaldehído
<i>A. baumannii</i> ATCC 17978	CMI: 1:50 CMS:1:300	CMI: 1:200 CMS:1:400	CMI: 1:100 CMS: 1:1,000	CMI:1:50,000 CMS: 1:80,000	CMI: 1:50 CMS: 1:500	CMI: 1:3,000 CMS: 1:12,000
A801	CMI:1:50 CMS:300	CMI:1:200 CMS:1:400	CMI:1:100 CMS:1:2,500	CMI:1:50,000 CMS:1:80,000	CMI:1:30 CMS:1:500	CMI:1:3,000 CMS:1:12,000
A829	CMI:1:50 CMS:300	CMI:1:200 CMS:1:800	CMI:1:50 CMS:1:5,000	CMI:1:50,000 CMS: 80,000	CMI:1:25 CMS:1:500	CMI:1:3,000 CMS:1:12,000
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	CMI: 1:30 CSI: 1:150	CMI: 1:100 CMS:1:400	CMI:1:70 CMS:1:500	CMI:1:2,500 CMS:1:14,000	CMI:1:100 CMS:1:200	CMI:1:1,000 CMS:1:3,000
P1503	CMI:1:30 CMS:1:200	CMI:1:100 CMS:1:400	CMI:1:70 CMS:1:1,000	CMI:1:2,500 CMS:1:15,000	CMI:1:80 CMS:1:500	CMI:1:1,000 CMS:1:5,000
P1547	CMI:1:30 CMS:1:300	CMI:1:100 CMS:1:800	CMI:1:70 CMS:1:600	CMI:1:2,500 CMS: 15,000	CMI:1:80 CMS:1:600	CMI:1:1,000 CMS:1:6,000

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria. CMS: Concentración Máxima Sub-inhibitoria.

Efecto de los extractos de plantas y el cinamaldehído sobre la formación de biopelículas de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*

Para determinar si los extractos de plantas o el compuesto cinamaldehído tenían la capacidad de inhibir la formación de biopelícula, se probaron sus CMSs en las cepas *A. baumannii* ATCC 17978 y *P. aeruginosa* ATCC 27853.

De manera interesante, como se puede observar en la Figura 18A, el extracto de eucalipto inhibió la formación de biopelícula de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978, en aproximadamente un 87%, mientras que los demás extractos y el cinamaldehído no afectaron notoriamente la formación de biopelícula en esta cepa bacteriana.

Sorprendentemente, cuando se evaluó la cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853, se observó que todos los extractos y el cinamaldehído tuvieron un efecto contrario al buscado, ya que aumentaron la formación de biopelícula, en comparación con la

condición control no expuesta a ningún extracto (Figura 18B). Los extractos de gobernadora y de cítricos incrementaron la formación de biopelícula de *P. aeruginosa* ATCC 27853 3 y 6 veces, respectivamente, con respecto a la cepa sin tratar; los demás extractos aumentaron la cantidad de biopelícula formada aproximadamente 2 veces (Figura 18B).

Estos resultados muestran que el extracto de eucalipto inhibe la formación de biopelícula de *A. baumannii*, lo cual representa una base para más estudios encaminados a la identificación de los compuestos específicos que tienen dicho efecto.

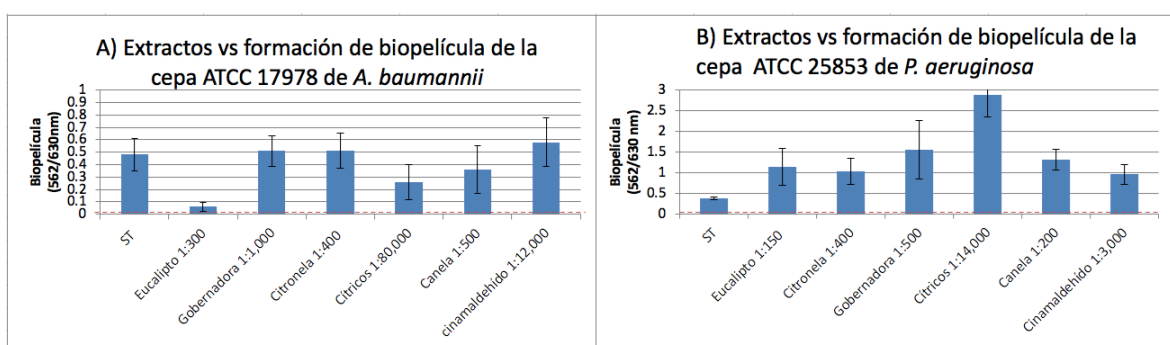


Figura 10. Efecto de los extractos de eucalipto, gobernadora, citronela, cítricos, canela y del compuesto cinamaldehído sobre la formación de biopelícula de las cepas de *A. baumannii* ATCC 17978 (panel A) y *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Panel B). En el eje Y se indica el valor de formación de biopelícula. En el eje X se indican los diferentes tratamientos, sin extracto (ST) o las CMS de cada extracto (V/V). La formación de biopelícula se evaluó en medio MH a 30°C durante 24 horas. La línea punteada color naranja representa los valores obtenidos para el control negativo, el cual fue de 0.04 en ambas bacterias. Los datos mostrados representan el promedio y la desviación estándar obtenidos de 3 experimentos independientes hechos por cuadruplicado.

Efecto de los extractos de plantas y el cinamaldehído sobre el mantenimiento de biopelículas de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*

Para determinar si los extractos de plantas o el cinamaldehído pueden afectar el mantenimiento de la biopelícula, se probaron sus CMI en las cepas de *A. baumannii* ATCC 17978 y *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Como se muestra en la Figura 19A, hubo 4 extractos que fueron capaces de erradicar la biopelícula ya formada por la cepa de referencia *A. baumannii* ATCC 17978. Los extractos de citronela, cítricos, canela y el compuesto cinamaldehído erradicaron en un 100% la biopelícula formada, con respecto a la condición control

sin extracto; asimismo, el extracto de eucalipto erradicó la biopelícula en un 85% (Figura 19A). En contraste, el extracto de gobernadora tuvo un efecto contrario, ya que aumentó la formación de biopelícula en un 23% (Figura 19A).

En el caso de la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853, 2 extractos fueron capaces de erradicar al 100% la biopelícula ya formada, la canela y el cinamaldehído, con respecto a la condición control sin tratar (Figura 19B). Los extractos de eucalipto, de citronela y de cítricos, disminuyeron el mantenimiento de la biopelícula de *P. aeruginosa* ATCC 27853, en un 41%, 32% y 34%, respectivamente (Figura 19B). Similar a lo que se observó para *A. baumannii* ATCC 17978, el extracto de gobernadora generó un aumento de 70% en la cantidad de biopelícula preformada, con respecto a la condición control sin extracto (Figura 19B).

Estos resultados muestran que el cinamaldehído tiene la capacidad de erradicar las biopelículas formadas por *A. baumannii* y *P. aeruginosa*. Asimismo, nuestros resultados indican que es posible la identificación de otros compuestos específicos que permitan la erradicación de las biopelículas formadas por *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, a partir de los extractos de canela, cítricos y citronela.

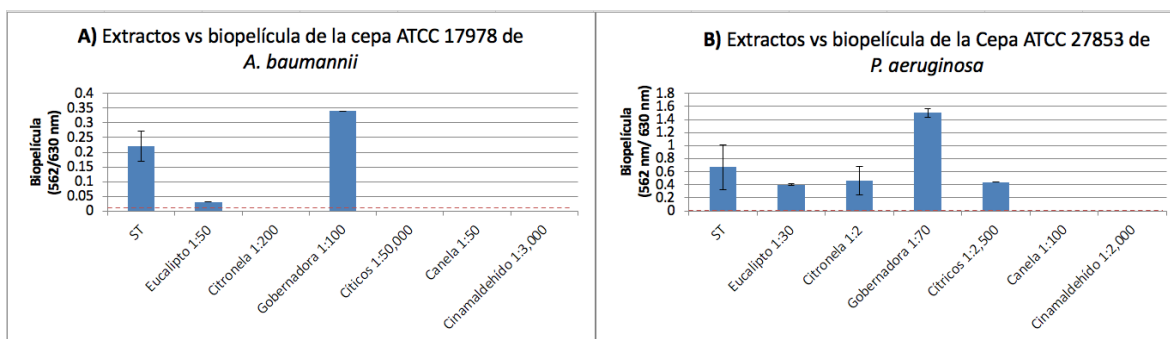


Figura 11. Evaluación del efecto de los extractos de eucalipto, citronela, gobernadora, cítricos, canela y del compuesto cinamaldehído sobre la biopelícula ya desarrollada de las cepas de referencia de *A. baumannii* ATCC 17978 (panel A) y *P. aeruginosa* ATCC 27853 (panel B). El eje Y indica el mantenimiento de la biopelícula. En el eje X se indican los diferentes tratamientos, sin extracto (ST) o las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de crecimiento de cada extracto (V/V) en medio MH a 30°C durante 16 horas. La línea punteada color naranja representa el valor que se obtuvo para el control negativo, el cual fue de 0.03 y 0.04 respectivamente. Los datos mostrados representan el promedio y la desviación estándar obtenidos de 3 experimentos independientes hechos por cuadruplicado.

DISCUSIÓN

Las especies bacterianas *A. baumannii* y *P. aeruginosa* son patógenos oportunistas en humanos, las infecciones nosocomiales causadas por estas bacterias presentan altas tasas de mortalidad en todo el mundo (Hernández, 2018; Perez et al., 2007). Estas bacterias tiene la capacidad de crecer en forma de biopelícula, lo que les permite persistir durante largos periodos de tiempo en superficies inanimadas y propagarse, además de que les confiere la capacidad de protegerse de factores externos como desinfectantes o antibióticos (Vázquez-López et al., 2020). Aunado a esto, la mayoría de los aislados clínicos que se tienen reportados en la actualidad de estas especies bacterias presentan resistencia a los antibióticos, debido al uso inapropiado de antibióticos durante los últimos años (Asif, Alvi, & Rehman, 2018). Es por esto que hay una urgente necesidad de buscar nuevas alternativas eficaces para combatir las infecciones causadas por estas especies bacterianas.

A lo largo del tiempo, extractos de plantas, semillas y sus derivados se han utilizado en la medicina tradicional. El uso de plantas para tratar infecciones bacterianas es una estrategia viable, ya que las plantas producen naturalmente una gran cantidad de metabolitos secundarios que le permiten defenderse de las infecciones causadas por hongos, plagas o depredadores. Estos metabolitos secundarios son muy variados en composición, con estructuras químicas complejas (Lu et al., 2019).

En este trabajo, se evaluó la actividad inhibitoria del crecimiento y la actividad anti-biopelícula de diferentes extractos comerciales y del compuesto cinamaldehído, contra cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. Específicamente, se evaluaron extractos de eucalipto, citronela, gobernadora, cítricos y canela. De manera interesante, encontramos que varios de los extractos analizados y/o el compuesto cinamaldehído presentan una o ambas actividades mencionadas. Algunos de estos extractos fueron preparados artesanalmente para su aplicación como desinfectantes en granjas locales, por lo tanto, desafortunadamente no pudimos obtener la información de su concentración. Únicamente contamos con la información de la concentración del extracto de canela (151.8 mg/ml) y del cinamaldehído (1.048 mg/ml).

Para el extracto de canela, se encontró actividad inhibitoria del crecimiento en la cepa ATCC 17978 de *A. baumannii*, a una dilución 1:50 que equivale a 3.03 mg/ml, así como en la cepa ATCC 27853 de *P. aeruginosa*, a una dilución 1:100 que equivale a 1.51 mg/ml. Además, a las mismas concentraciones el extracto de canela erradicó totalmente la biopelícula preformada por estas dos bacterias. En 2006, Ooi y cols. reportaron que el aceite esencial de canela (*Cinnamomun cassia*) inhibe el crecimiento de un aislamiento de *P. aeruginosa* a una CMI de 0.3 mg/ml. Asimismo, en 2018, Firmino y cols reportaron que el aceite esencial de canela presentó actividad inhibitoria del crecimiento y de la formación de biopelícula en la cepa

ATCC 15442 de *P. aeruginosa*, a concentraciones de 0.50 mg/ml y de 1.92 mg/ml, respectivamente.

De acuerdo a la literatura, las propiedades antibacterianas del extracto de canela se atribuyen a la presencia principalmente de cinamaldehído y eugenol, los cuales componen en un 72% y 13.3% a la canela, respectivamente (Sikkema y cols., 1995). Para el cinamaldehído encontramos actividad inhibitoria de crecimiento y de erradicación de biopelícula en las cepas ATCC 17978 de *A. baumannii* y ATCC 27853 de *P. aeruginosa*, a concentraciones de 0.34 mg/ml y 1.048 mg/ml, respectivamente. En 2006, Ooi y cols. mostraron que el cinamaldehído a una concentración de 0.3 mg/ml presenta un efecto antimicrobiano, ya que inhibe el crecimiento de un aislado de *P. aeruginosa*. Asimismo, en 2015, Shen y cols. dieron a conocer que el compuesto cinamaldehído inhibe el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* a una concentración de 0.31 mg/ml. Además, en 2018, Firmino y cols. reportaron una CMI de 0.50 mg/ml del cinamaldehído en la cepa ATCC 15442 de *P. aeruginosa*.

En cuanto al mecanismo de acción del efecto antibacteriano de la canela o sus componentes, se ha reportado que el aceite esencial de canela inhibe la expresión genética de porinas de membrana, la actividad de ATPasas, así como la división celular y el transporte activo (Vasconcelos y Croda. 2018). Por otro lado, un estudio reportó que el aceite de corteza de canela, así como los compuestos cinamaldehído y eugenol, reducen notablemente la producción de fimbrias, las cuales son importantes para la formación de biopelículas en *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) (Yong y cols., 2014). Además, en 2015, Shen y cols. mencionaron que el cinamaldehído es capaz de generar alteraciones en la membrana celular de las bacterias, lo que se puede atribuir a que tenga un fuerte efecto antibacteriano. Por otro lado, se ha reportado que el trans-cinamaldehído y algunos de sus derivados inhiben el proceso de división celular al unirse a la proteína FtsZ, la cual es clave en el proceso de división celular y está presente en prácticamente todas las bacterias (Doyle y Stephens. 2019).

El cinamaldehído tiene limitantes para su uso comercial, ya que el compuesto es sensible cuando se expone a la luz y al aire durante periodos prolongados de tiempo, lo que hace que se pierda su efecto antimicrobiano. In vivo es probable que el cinamaldehído se descompone en ácido cinámico mediante una catálisis enzimática antes de que lleve a cabo su actividad antimicrobiana, es por eso que podría considerarse inestable en la sangre (Doyle y Stephens., 2019). Por otra parte, el grupo de investigación de América del Norte ha informado que el cinamaldehído es una causa frecuente de reacciones alérgicas, por esta razón se ha limitado su uso (Doyle y Stephens., 2019). Por lo tanto, es necesario que se

obtengan derivados del cinamaldehído que sean más estables y que presenten menores efectos alérgicos y tóxicos, pero que conserven la actividad antimicrobiana

El extracto comercial de eucalipto que se evaluó en nuestro estudio presentó actividad antibacteriana inhibiendo el crecimiento en las cepas de referencia ATCC 17978 y ATCC 27853 a las diluciones 1:50 y 1:30 respectivamente. Además, inhibió la formación de biopelícula en un 87%, a la dilución 1:300, y erradicó la biopelícula formada en un 85%, a la dilución 1:50, en la cepa ATCC 17978 de *A. baumannii*. En 2015, Knezevic y cols. reportaron que el aceite de *Eucalyptus camaldulensis* presenta un efecto antibacteriano inhibiendo el crecimiento en cepas multirresistentes de *A. baumannii*, a concentraciones que variaron de 0.5 µl/mL a 2 µl/mL. Por otro lado, en 2018, Aldoghaim y cols. reportaron que diversos aceites esenciales de *Eucalyptus mallee* presentaron actividad antimicrobiana inhibiendo el crecimiento de las cepas *A. baumannii* NCTC 7844 y *P. aeruginosa* ATCC 27853, a concentraciones de 2% v/v y 8% v/v respectivamente. El componente principal del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* es el aceite 1,8 cineol. Este compuesto inhibe la biopelícula de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina, lo cual se ha atribuido a su actividad anti-QS (Angelo L. y cols., 2016).

Aunque no se ha estudiado ampliamente el mecanismo por el cual el aceite de eucalipto inhibe el crecimiento bacteriano, se ha propuesto que algunos de sus componentes, como terpinoleno, 1,8-cineol y cis-geraniol, dañan los lipopolisacáridos de la membrana externa, lo que lleva al aumento en la permeabilidad de la membrana citoplasmática (Aldoghaim y cols., 2018)..

El extracto comercial de citronela que se evaluó en este estudio, mostró tener un efecto antibacteriano inhibiendo el crecimiento de la cepa de referencia ATCC 17978 de *A. baumannii* y ATCC 27853 de *P. aeruginosa*, a las diluciones 1:200 y 1:100 respectivamente. Además, a la dilución 1:400, este extracto erradicó en un 100% la biopelícula formada por la cepa ATCC 17978 de *A. baumannii* y en un 32% la biopelícula formada por la cepa ATCC 27853 de *P. aeruginosa*. En 2018, Pontes y cols. reportaron que el aceite esencial de *Cymbopogon nardus* (citronela) y su componente principal, el geraniol, tienen actividad inhibitoria del crecimiento y antibiopelícula en *Staphylococcus aureus*. El geraniol es un monoterpeno que tiene la capacidad de permeabilizar y despolarizar las membranas plasmáticas de las bacterias (Khan y Ahmad., 2012).

El extracto comercial de cítricos evaluado en nuestro estudio presentó un efecto antibacteriano, inhibiendo el crecimiento de las cepas ATCC 17978 de *A. baumannii* y ATCC 27853 de *P. aeruginosa*, a las diluciones 1:50,000 y 1:2,500 respectivamente. También tuvo un efecto antibiopelícula, ya que destruye en un 100% la biopelícula previamente formada por la cepa ATCC 17978 de *A. baumannii*.

En 2018, Caputo y cols. reportaron que extractos de cáscara naranja a base de agua, presentan actividad antimicrobiana reduciendo la biopelícula de las cepas *P. putida* ITEM 17297, *P. flourences* NCPPB 1964 y *P. flourencens* ITEM 17298, y por otro lado el extracto de cáscara de naranja mantuvo baja la tasa de crecimiento de la cepa de *P. fluorescens* ITEM 17298. Por otro lado, en 2017, Lin y cols. mostraron que el aceite esencial de cáscara de toronja obtenido por destilación al vapor mezclada con quitosano, tiene un efecto antibacteriano significativo, inhibiendo el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, y reportan que el limoneno es el componente principal de este aceite. En nuestro caso, el extracto de cítricos evaluado a una dilución que no afecta el crecimiento indujo 6 veces la formación de biopelícula de la cepa ATCC 27853 de *P. aeruginosa*. Este aumento podría deberse al estrés inducido por el extracto evaluado, ya que la formación de las biopelículas se promueve precisamente por el estrés que detectan las bacterias en el ambiente (Eze y cols., 2018).

El extracto de gobernadora mostró tener un efecto antibacteriano inhibiendo el crecimiento de las cepas de referencia ATCC 17978 de *A. baumannii* y ATCC 27853 de *P. aeruginosa*, a las diluciones 1:100 y 1:70, respectivamente. Hasta nuestro conocimiento, nuestro estudio es el único que ha reportado la actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano de este extracto. Una dilución que no inhibe el crecimiento favoreció la formación de biopelículas de las cepas ATCC 17978 de *A. baumannii* y ATCC 27853 de *P. aeruginosa*, lo cual podría explicarse por el posible estrés inducido por el extracto en las bacterias probadas, un fenómeno que mencionamos antes en esta sección (Eze y cols., 2018).

CONCLUSIONES

- Hay variación en el nivel de la formación de biopelículas entre las diferentes cepas evaluadas de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*.
- Todos los extractos de plantas evaluados y el cinamaldehído mostraron un efecto inhibitorio del crecimiento en las cepas de referencias ATCC 17978 y 27853 de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*.
- La planta gobernadora tiene actividad antibacteriana, inhibiendo el crecimiento de las cepas de referencia de *A. baumannii* ATCC 17978 y *P. aeruginosa* ATCC 27853.
- Los extractos de eucalipto, cítricos y canela inhibieron en un 87%, 54% y 25% la formación de biopelícula de la cepa de referencia ATCC 17978 de *A. baumannii*.
- Ningún de los extractos evaluados, así como el cinamaldehído, mostraron tener actividad inhibitoria en la formación de biopelícula de la cepa ATCC 27853 de *P. aeruginosa*, al contrario, aumentaron de 2 a 6 veces la cantidad de biopelícula formada por esta cepa.
- Los extractos de citronela, cítricos, canela y el cinamaldehído lograron erradicar al 100% la biopelícula generada por la cepa de referencia ATCC 17978 de *A. baumannii* y el extracto de eucalipto la erradicó en un 87%.
- El extracto de canela y el cinamaldehído erradicaron al 100% la formación de biopelícula de la cepa de referencia de *P. aeruginosa* ATCC 27853.

PERSPECTIVAS

Nuestros resultados junto con los resultados reportados en otros estudios, indican que es posible obtener compuestos naturales para el tratamiento de las infecciones causadas por cepas de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, a partir de extractos de plantas similares a los que nosotros evaluamos. Dichos compuestos pueden tener actividad inhibitoria de crecimiento o efecto antibiopelícula. Sin embargo, se requieren de más análisis para llegar a la identificación de los compuestos específicos que presentan dichas actividades biológicas. Entre varios análisis que quedan por hacer, proponemos las siguientes perspectivas para la continuación de nuestro estudio:

- Obtener extractos similares a los probados, para conocer la concentración de cada extracto que presenta la actividad antibacteriana.
- Separar los componentes de los extractos e identificar aquéllos que presentan la actividad antibacteriana.
- Identificar la estructura química de los compuestos con actividad antibacteriana.
- Sintetizar las compuestos con actividad antibacteriana.
- Determinar la concentración mínima de los compuestos para la actividad de inhibición del crecimiento o formación/mantenimiento de biopelículas de diferentes bacterias.
- Analizar la toxicidad de los compuestos con actividad antibacteriana.
- Analizar la sinergia de los compuestos con actividad antibacteriana y antibióticos.
- Determinar el efecto de las compuestos con actividad antibacteriana en la erradicación de infecciones por *A. baumannii* y *P. aeruginosa* en modelos animales.
- Determinar el efecto de los compuestos con actividad antibacteriana en la erradicación de biopelículas de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* en tejidos de animales o en superficies inertes (material médico).
- Evaluar el uso como desinfectantes de los compuestos con actividad antibacteriana; por ejemplo, en granjas de animales o en hospitales.
- Determinar si las bacterias pueden generar resistencia contra los compuestos seleccionados y en el caso, si se genera resistencia cruzada con antibióticos.

REFERENCIAS

- Aldoghaim, F., Flematti, G., & Hammer, K. (2018). Antimicrobial Activity of Several Cineole-Rich Western Australian Eucalyptus Essential Oils. *Microorganisms*, 6(4), 122. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6040122>
- Angelo, L., Duarte, A., Gominho, J., Domingues, F., Duarte, A. (2016). Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils. *Industrial crops and products* 274-282. 10.1016/j.indcrop.2015.10.055
- Antunes, L. C. S., Visca, P., & Towner, K. J. (2014). *A. baumannii* Evolution of a global pathogen. *Pathogens and Disease*, 71(3), 292–301. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12125>
- Asif, M., Alvi, I. A., & Rehman, S. U. (2018). *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. *Infection and Drug Resistance*, Volume 11, 1249–1260. <https://doi.org/10.2147/IDR.S166750>
- Ávalos, A. y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. REDUCA (Biología). REDUCA (*Biología*), 2(3), 119–145. Retrieved from <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/798>
- Balaban, N. Q., Helaine, S., Lewis, K., Ackermann, M., Aldridge, B. Aldridge, Andersson, D. I., Brynildsen, M., Bumann, D., Camilli, A., Collins, J.J., Dehio, C., Fortune, S., Chigo, JM., Hardt, W.D., Harms, A., Heinemann, M., Hung, DT., Jenal, U., Levin, R.B., Michiels, J., Storz, G., Tan, W.M., Tenson, T., Melderen, V.L., Zinkernagel, A. (2019). Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nature Reviews Microbiology*, 17(July), 441–448. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0196-3>
- Barreca, D., Gattuso, G., Bellocco, E., Calderaro, A., Trombetta, D., Smeriglio, A., ... Nabavi, S. M. (2017). Flavanones: Citrus phytochemical with health-promoting properties. *BioFactors*, 43(4), 495–506. <https://doi.org/10.1002/biof.1363>
- Baughn, A. D., & Rhee, K. Y. (2014). Biofilm Matix Proteins. *Microbiology Spectrum*, 2(3), 1–16. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec>
- Borges, A., Abreu, A. C., Dias, C., Saavedra, M. J., Borges, F., & Simões, M. (2016). New perspectives on the use of phytochemicals as an emergent strategy to control bacterial infections including biofilms. *Molecules*, 21(7). <https://doi.org/10.3390/molecules21070877>
- Caputo, L., Quintieri, L., Cavalluzzi, M. M., Lentini, G., & Habtemariam, S. (2018). Antimicrobial and antibiofilm activities of citrus water-extracts obtained by microwave-assisted and conventional methods. *Biomedicines*, 6(2), 1–14. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6020070>

- Cárdenas, M., Gándara, J., & Pérez, M. (2014). Factores de virulencia bacteriana: la “inteligencia” de las bacterias. *Elementos*, 94, 35–43.
- Chaieb, K., Kouidhi, B., Jrah, H., Mahdouani, K., & Bakhrouf, A. (2011). Antibacterial activity of Thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa* and its potency to prevent bacterial biofilm formation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11(1), 29. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-29>
- Chapartegui-González, I., Lázaro-Díez, M., Bravo, Z., Navas, J., Icardo, J. M., & Ramos-Vivas, J. (2018). *Acinetobacter baumannii* maintains its virulence after long-time starvation. *PLoS ONE*, 13(8), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201961>
- Chen, G. W., Lin, Y. H., Lin, C. H., & Jen, H. C. (2018). Antibacterial activity of emulsified pomelo (*Citrus grandis osbeck*) peel oil and water-soluble chitosan on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Molecules*, 23(4). <https://doi.org/10.3390/molecules23040840>
- Chen, R., Lv, R., Xiao, L., Wang, M., Du, Z., Tan, Y., Song, Y. (2017). hybrid two-component regulator from *Acinetobacter baumannii* ATCC17978, is involved in surface motility and biofilm formation in this bacterium. *MicrobiologyOpen*, 6(5), 1–13. <https://doi.org/10.1002/mbo3.510>
- CONAMED. (2017). Boletín conamed OPS, 400.
- Cuesta, D., Vallejo, M., Guerra, K., Hoyos, C., & Loaiza, E. (2012). Infección intrahospitalaria por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: estudio de casos y controles. *Medicina U.P.B.*, 31(2), 135–142.
- Doyle, A. A., & Stephens, J. C. (2019). A review of cinnamaldehyde and its derivatives as antibacterial agents. *Fitoterapia*, 139, 104405. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104405>
- Elgayyar, M., Draughon, F. A., Golden, D. A., Mount, J. R., Pontes, E. K. U., Melo, H. M., & Hammer, K. (2018). Antibacterial activity of Thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa* and its potency to prevent bacterial biofilm formation. *Journal of Ethnopharmacology*, 6(2), 29. <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.15998.1>
- Eze, E. C., Chenia, H. Y., & El Zowalaty, M. E. (2018). *Acinetobacter baumannii* biofilms: Effects of physicochemical factors, virulence, antibiotic resistance determinants, gene regulation, and future antimicrobial treatments. *Infection and Drug Resistance*, 11, 2277–2299. <https://doi.org/10.2147/IDR.S169894>
- Firmino, D. F., Cavalcante, T. T. A., Gomes, G. A., Firmino, N. C. S., Rosa, L. D., De Carvalho, M. G., & Catunda, F. E. A. (2018). Antibacterial and Antibiofilm Activities of *Cinnamomum* Sp. Essential Oil and Cinnamaldehyde: Antimicrobial Activities. *Scientific World Journal*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7405736>

- Gutiérrez-Muñoz J, Ramírez-Corona A, Martínez-Bustamante ME, Coria-Lorenzo JJ, Armenta-Gallegos L, & Ayala-Franco JR,. (2017). Estudio multicéntrico de resistencias bacterianas nosocomiales en México. *Rev Latin Infect Pediatr*, 30, 68–75. Retrieved from www.medigraphic.org.mxhttp://www.medigraphic.com/rlip
- Gunn, J. S., Bakaletz, O. L. & Wozniak, J. D. (2016). What's on the Outside Matters: The Role of the Extracellular Polymeric Substance of Gram-negative Biofilms in Evading Host Immunity and as a target for therapeutic intervención. *journal of biological chemistry*.
- Hernández, A., Yagüe G., Garcia Vazquez E., Simón M., Moreno Prado L., Canteras M., & Gomez J. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente incluido carbapenémicos : factores predictivos y pronósticos . Estudio prospectivo 2016-2017, 31(2), 123–130.
- Hoffman, L. R., D'Argenio, D. A., MacCoss, M. J., Zhang, Z., Jones, R. A., & Miller, S. I. (2005). Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature*, 436(7054), 1171–1175. <https://doi.org/10.1038/nature03912>
- Kaskatepe, B., Kiymaci, M. E., Suzuk, S., Erdem, S. A., Cesur, S., & Yildiz, S. (2016). Antibacterial effects of cinnamon oil against carbapenem resistant nosocomial *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Industrial Crops and Products*, 81, 191–194. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.058>
- Khan, M. S. A., & Ahmad, I. (2012). Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*. *Journal of Ethnopharmacology*, 140(2), 416–423. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.01.045>
- Kim, Y. G., Lee, J. H., Kim, S. Il, Baek, K. H., & Lee, J. (2015). Cinnamon bark oil and its components inhibit biofilm formation and toxin production. *International Journal of Food Microbiology*, 195, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.028>
- Knezevic, P., Aleksic, V., Simin, N., Svircev, E., Petrovic, A., & Mimica-Dukic, N. (2016). Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* essential oils and their interactions with conventional antimicrobial agents against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Ethnopharmacology*, 178, 125–136. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.12.008>
- Koch, G. (2017). Medicinal Chemistry. *Chimia*, 71(10), 643. <https://doi.org/10.1021/ie50495a015>
- K. Lewis (2008). Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Current topics in microbiology and immunology*, 322, 107–131. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_6

Lu, L., Hu, W., Tian, Z., Yuan, D., Yi, G., Zhou, Y., & Li, M. (2019). Developing natural products as potential anti-biofilm agents. *Chinese Medicine (United Kingdom)*, 14(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13020-019-0232-2>

Ooi LS, Li Y, Kam SL, Wang H, Wong EY, Ooi VE. Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* Blume. *Am J Chin Med*. 2006;34(3):511-522.
doi:10.1142/S0192415X06004041

Ortiz-Herrera, M., Gerónimo-Gallegos, A., Cuevas-Schacht, F., Pérez-Fernández, L., & Coria-Jiménez, R. (2004). Caracterización, por RAPD-PCR, de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidos de pacientes con fibrosis quística.

Jim O'Neill (2014). Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations.

Salud Publica de Mexico, 46(2), 149–157. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342004000200009>

SALUD, S. D. (2011). “MEDICIÓN DE LA PREVALENCIA DE INFECCIONES NOSOCOMIALES EN HOSPITALES GENERALES DE LAS PRINCIPALES INSTITUCIONES PÚBLICAS DE SALUD”. México D.F.

Perez, F., Hujer, A. M., Hujer, K. M., Decker, B. K., Rather, P. N., & Bonomo, R. A. (2007). Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(10), 3471–3484.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01464-06>

Pontes, E. K. U., Melo, H. M., Nogueira, J. W. A., Firmino, N. C. S., de Carvalho, M. G., Catunda Júnior, F. E. A., & Cavalcante, T. T. A. (2019). Antibiofilm activity of the essential oil of citronella (*Cymbopogon nardus*) and its major component, geraniol, on the bacterial biofilms of *Staphylococcus aureus*. *Food Science and Biotechnology*, 28(3), 633–639. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0502-2>

G. Ramos-Gallardo (2016). Chronic Wounds in Burn Injury: A Case Report on Importance of Biofilms. *world journal of plastic surgery*, 175-80.

Reen, F. J., Gutiérrez-Barranquero, J. A., Parages, M. L., & O’Gara, F. (2018). Coumarin: a novel player in microbial quorum sensing and biofilm formation inhibition. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(5), 2063–2073.
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-8787-x>

Rehman, J. U., Ali, A., & Khan, I. A. (2014). Plant based products: Use and development as repellents against mosquitoes: A review. *Fitoterapia*, 95, 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2014.03.002>

René Arredondo, K. F. (2018). Estado Actual de la Resistencia Antimicrobiana en

México.

- Sikkema, J., De Bont, J. A. M., & Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, 59(2), 201–222. <https://doi.org/10.1128/membr.59.2.201-222.1995>
- Tetard, A., Zedet, A., Girard, C., Plésiat, P., & Llanes, C. (2019). Cinnamaldehyde induces expression of efflux pumps and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(10), 1–11. <https://doi.org/10.1128/AAC.01081-19>
- Toole, G. O., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). *B f m d*, 49–79.
- Topa, S. H., Palombo, E. A., Kingshott, P., & Blackall, L. L. (2020). Activity of cinnamaldehyde on quorum sensing and biofilm susceptibility to antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microorganisms*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030455>
- Vasconcelos, N. G., Croda, J., & Simionatto, S. (2018). Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: A review. *Microbial Pathogenesis*, 120, 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.04.036>
- Vázquez-López, R., Solano-Gálvez, S. G., Vignon-Whaley, J. J. J., Vaamonde, J. A. A., Alonzo, L. A. P., Reséndiz, A. R., ... Fortes, T. B. (2020). *Acinetobacter baumannii* resistance: A real challenge for clinicians. *Antibiotics*, 9(4), 1–22. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040205>
- Vlamakis, H., & Kolter, R. (2010). *Biofilms*, 1–12.
- WHO. (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Who, 7. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Licenciatura en Biología

Programa Educativo de Calidad *Acreditado* por el CACEB 2018-2023

Cuernavaca, Morelos a 20 de enero de 2021

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **ROSA FERNANDA TORRES LOZANO**, con el título del trabajo: **Efecto de extractos y compuestos comerciales de plantas en la formación y mantenimiento de biopelículas de cepas de *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación de: **Titulación por Tesis** como lo marca el artículo 4° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: DR. ALEXANDRE T. CARDOSO TAKETA

SECRETARIO: DR. NAHIM SALGADO MEDRANO

VOCAL: DR. VÍCTOR HUMBERTO BUSTAMANTE SANTILLÁN

SUPLENTE: DRA. VERÓNICA OBREGÓN BARBOZA

SUPLENTE: M. EN B. LUIS ENRIQUE CRUZ TRUJILLO

Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, C.P. 62209, Tel-fax: (777) 329 7047

www.uaem.mx/organizacion-institucional/unidades-academicas/facultades/ciencias-biologicas

**UA
EM**

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

VICTOR HUMBERTO BUSTAMANTE SANTILLAN | Fecha:2021-01-26 11:52:00 | Firmante
hfHxUJFQCAvgzpHt2M9DxxmJHp+HL48PNX36xKaLpU/3ufZcee0+a9fOF9dAXpCUVWcSmR1YixacLQu0Oxycyho3ldZ+fY1lJCHZ4YD5HzTbm0NTPFMkl99fVM2g8Xp8kY++qZh
wWM7u51JDDwtRrKavurTewOGMYymzPQXzmYqmPhcD8VFz4WO2feOany6U8p0/ko3VgOVan5cQv6T10qJ21Ng+2jViYHd36kVBBmIC0B3DFRRSvleKq8/L+rhk6PRtX2sWz
6s1DfR+NnD79sn4Dcgn1MEBmudQV6HRVColvrASqQ0sizDuL7np1ADoLYGHKiz6kGvDDpMYA==

VERONICA OBREGON BARBOZA | Fecha:2021-01-26 12:59:14 | Firmante
vzUODYiB+2/BceD1R/KfW0MQdlb30r+U11nz7ieC00Cm68I7hT18wBFJowqecQqDD4M11/aznrbCUB93QY3zpiA7fK9JuGSUBpFDxxizv6rho032JHeuKhs79zBTXvPaUqaxtuPQ
c9tbc1bME0571zJFOrePvoRG76kTJTADYBoQIBqxfbi+LWmVbcMoxgewQGDY9rInf0x6VfKkgQS/xuN0l9qyXzRyIM2D8qws7eRuJ1r1RtSdV81zCc0QhcJrh3CPcX+fog9uXkkQ
CPS0ZzdSagP8l0mgqDwhPft+6tuB4xj7/biQmnoHcpdMKnz9WE3hUUavzlgwzPpmuW==

LUIS ENRIQUE CRUZ TRUJILLO | Fecha:2021-01-26 14:05:38 | Firmante
E0o03wnquNZwT1bdVY1DNWNg0rKj6BStOJTWirakzQKqX3MM4vxVfOB+f4fGQpins0HCuOE5TR2PEUzKJ1ft9UN0y9s6iR5CjP8xFNX7pf9j+UtkdzTx6Zc5OjH90TB7004yL/UG
MW2S490gODk2j3dlUfzv4wIAE07yAezV4/RT5eA5PPugifbEBpaLu8+0UJxa6jaeEY85TEjloxMo4xE8DAd6Uzr4fV8KpcTATiW2wg5HKomawTLn0/UKEmOTopKrEvJksVWm+8v
yiQr3j+Uu9fIdAix47kIWum6uSc5Tga9weATMGapnAfqvdyTk+d3bPK2e4h8XPw14Mw==

ALEXANDRE TOSHIRICO CARDOSO TAKETA | Fecha:2021-01-27 11:47:36 | Firmante
pi9bm0BSqy2mot/KYLrpdXlKEUHP39j3/gmzo698PCBEa+0okmEYKc/Gi12oGw13luQI7vwei/f54ddZIZEJjgmL8kjLFfuxS3t8S5eHWRdbA4HkLxaCZCyz4mxjTLyP+iu9VT1cFon
3Yncpe3wiXpdGFUFURks3ls4B5uX7k6Lp5fY+VQ/1zBWB0Cil5lsBZRQTCmbj/Hy7f2W87BvQsnG51bicYIGyW71ZaMDMScSsigyUa5lNpXy7zaOgQvQknnL1jpUjaxeUwOr8647J
AKuUkfgVRIcGeu2UUsHnakzKQl0KniMIUD4TZ81/cu2x1aZxrocPtvUJUHYSiGw==

NAHIM SALGADO MEDRANO | Fecha:2021-01-28 14:45:41 | Firmante
RLMBJus4RiZxg+MGRW3Mx5BAN6pWRSLR+krmhS+C6zGgSg7OsPk3G2cBU5m2MW+DwPVsOHL2/IT1FutiwnKpe+wGTkdKSpPZPJ6VegQPcif6glyR9FemHmrRu2SXnfaeY
7Y+6f6GcmzK6w+JzNXtILn/THwFc5C7G3dIQGTHmc2AL2L3QjWKRFLYb9th7KWX/Rg3Lw9cS2gOaUOEw6KjnKfF5tH5rU1tamBX+h8I7Q4jL6OzYXqNwW40F7jRfRZvlkG+dBz
wP3MstP7aohaTLFqc59MhwUZchMuSIJ3ckLHeQ+U5n6cF8z3Q5Yfp40VSmwTMNISxtS7Tgw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



IGP9XI

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/GSQe7Z55LaP2J1f8HaKphtB1YLvGRhB1>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023