

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA
PROGRAMA DOCENTE DE INGENIERO EN
BIOTECNOLOGÍA



“Carvacrol como inhibidor potencial de la enzima β -lactamasa causante de la resistencia a antibióticos en *Pseudomonas aeruginosa*”

Por:

ANA GABRIELA DÁVILA MARTÍNEZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Saltillo, Coahuila, México

Junio, 2023.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA
PROGRAMA DOCENTE DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA



Carvacrol como inhibidor potencial de la enzima β -lactamasa causante de la resistencia a antibióticos en *Pseudomonas aeruginosa*

Por:

ANA GABRIELA DÁVILA MARTÍNEZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Una firma manuscrita en azul que parece decir 'JAFOLCA'.

Dr. Julio César Tafolla Arellano
Asesor Principal UAAAN

Una firma manuscrita en azul que parece decir 'Jesús'.

Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala
Asesor Principal Externo

Saltillo, Coahuila, México.

Junio, 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA
PROGRAMA DOCENTE DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Carvacrol como inhibidor potencial de la enzima β -lactamasa causante de la
resistencia a antibióticos en *Pseudomonas aeruginosa*

Por:

ANA GABRIELA DÁVILA MARTÍNEZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por el Comité de Asesoría:

Dr. Julio César Tafolla Arellano
Asesor Principal UAAAN

Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala
Asesor Principal Externo

QFB. María Del Carmen Julia García
Coasesora

Dr. Melvin Roberto Tapia Rodríguez
Coasesor



M.C. Sergio Sánchez Martínez
Coordinador de la División de Ingeniería

Buenavista, Saltillo Coahuila, México.
Junio, 2023

DERECHO DE AUTOR Y DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

Todo material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor de los Estados Unidos Mexicanos, y pertenece al autor principal quien es el responsable directo y jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, gráficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente. Así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Por lo anterior nos responsabilizamos de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaramos que este trabajo no ha sido previamente presentado en ninguna otra institución educativa, organización, medio público o privado.

A t e n t a m e n t e.

Alma Terra Mater



Ana Gabriela Dávila Martínez

Autor principal



Dr. Julio César Tafolla Arellano

Asesor Principal

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** y a **San Benito**, por otorgarme la vida, la salud y la fortaleza para poder cumplir todos mis sueños y proyectos. Por las oportunidades, porque sé que, si no estuviera lista para ellas, no las habrían mandado.

A mi Alma Mater, la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, por brindarme una educación de calidad, permitirme conocer gente increíble y por el desarrollo personal que forjo en mí. ¡Buitres por siempre!

Al **Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT)** por el apoyo económico al proyecto 319752 “Modelaje de la combinación de antibióticos convencionales y terpenos de aceites esenciales para inhibir la resistencia y factores de virulencia de bacterias patógenas alimentarias”.

Al **Dr. Julio César Tafolla Arellano**, por la posibilidad de trabajar en su laboratorio, la confianza brindada, además del conocimiento compartido y la oportunidad brindada de poder realizar mis prácticas profesionales en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD).

A la **QFB. María del Carmen Julia García**, por su invaluable contribución y apoyo durante mi trayectoria académica. Gracias por el conocimiento, la dedicación y su constante disponibilidad para brindarme orientación a lo largo de estos cuatro años y medio. La quiero mucho profe.

Al **Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala**, por darme la oportunidad y la confianza de poder trabajar en este proyecto de tesis. Gracias por creer en mí y abrirme las puertas de su laboratorio, en donde gracias a todo el personal que lo conforma pude aprender muchísimo y sentirme como en un segundo hogar. Igualmente, por todo el conocimiento compartido, la paciencia para resolver todas mis dudas, la disponibilidad y los buenos momentos que compartimos.

Al **Dr. Melvin Roberto Tapia Rodríguez**, por aceptar ser mi asesor. Por todo el conocimiento que me brindo, la calma y dedicación con la que resolvía cada una de mis preguntas y la guía para llevar a cabo este proyecto (aunque a veces interrumpiera

la explicación para atrapar Shinys). Por demostrarme que la ciencia se puede aprender de maneras muy divertidas. También le agradezco mucho el cálido recibimiento que tuve en Hermosillo. Las “*Chiwis*” estamos muy agradecidas porque siempre nos incluía en sus planes y nos mostraba la ciudad. Gracias por todas las risas y las grandes memorias que me llevó.

Al **Laboratorio de Tecnologías Emergentes** del CIAD. Los **M.C Marcela, Daniela y Jorge**. A la **Dra. Yesi** y la **M.C Brenda**. Gracias por todo el aprendizaje que obtuve a través de su enseñanza y por los buenos momentos y el recibimiento. Los aprecio mucho.

A mis amigos de toda la vida: **Melissa Briseño, Angélica Cuellar, Blanca Acevedo, Karen Cruz, Antonio de Lira, Fernando Martínez, Litzy Villanueva, Mauricio Vélez, Angélica Ramos**. Eternamente agradecida de poder compartir la existencia con ustedes y vivir aventuras, risas y bellos momentos por más de siete años. *“Hay presencias que nos marcan, que nos cambian, que nos mejoran.”*

A mis roomies: **Sonia Durón, Nallely Monsiváis y Polet Sifuentes**. Gracias por aventurarse conmigo en una nueva ciudad, por las experiencias que vivimos y todas las historias que creamos en Hermosillo. Las quiero y estoy eternamente agradecida de poder haber compartido tanto con ustedes, *mis hermosillas*.

A las amistades tan valiosas que me dejó la universidad: **Elizabeth Muñoz, Alejandra Aldaco, Brisa Bernadac, Zaret García, Luisa Rojas, Sofía Lavreda y Shaladeny García**. *“Hay gente que se quiere a tiempo, a destiempo y todo el tiempo.”*

A mi tía, **Patricia Martínez** y mi primo **Armando Batres**, mi familia chiquita. Gracias por los gratos momentos y los recuerdos que hemos formado en cada viaje. Los quiero mucho.

A mis padrinos: **Gabriel Del Bosque y Nancy Arriaga**, mi segunda familia. Los quiero mucho. Gracias por tanto.

No menos importante, quiero agradecer a mis compañeras siempre fieles y amorosas: **Rita, Paquita, Pichita, Perry y Alf**.

DEDICATORIA

A mi *elemento vital*, mis padres: **Leticia Martínez Mendoza** y **Carlos Dávila Valdés**, porque no saben el privilegio que es para mí ser su hija. Nunca voy a poder terminar de agradecerles todo el esfuerzo que hacen por mí día a día, por todo el amor que me dan, el apoyo que nunca me falta para llevar a cabo mis sueños y por la educación y valores que me dieron. Espero siempre hacerlos sentir orgullosos. Los amo

A mi hermana: **Aída Mariana Dávila Martínez**, por siempre inspirarme a ser mejor cada día. Por ser la mejor hermana del mundo y siempre salvarme cuando me estoy ahogando en un vaso de agua. *“Si un día Dios me arrebatara todo lo que hasta ahora me ha regalado, nada me va a importar mientras tú te encuentres aquí a mi lado.”* Te amo hermana.

A mi abuelita, **Guadalupe Mendoza Morales** (†), porque, aunque no hayas alcanzado a ver mi paso por la Narro, sé que estás muy feliz y orgullosa de mí. Te amo abue.

A mi estrella fugaz, mi mejor amigo **Oscar González Alvarado** (†). No encuentro las palabras suficientes para agradecerte por todo. Por estar siempre conmigo, por tu amistad tan valiosa, por todas las aventuras que viví contigo y por los aprendizajes y lecciones que me diste. Este trabajo también es para ti y espero que estes orgulloso de mí. *“Y cuando sientas consuelo te alegraras de haberme conocido. Siempre serás mi amigo. Querrás reírte conmigo. Y abrirás a veces tu ventana, así, para divertirte... entonces dirás «Sí, las estrellas siempre me hacen reír».”* Te quiero por siempre Oscarin.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

DERECHO DE AUTOR Y DECLARACIÓN DE NO PLAGIO	IV
AGRADECIMIENTOS	V
DEDICATORIA	VII
ÍNDICE DE CUADROS	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
RESUMEN	XII
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Hipótesis	4
1.2 Objetivo general	4
1.3 Objetivo específico	4
II. ANTECEDENTES	5
2.1 El impacto de la resistencia a los antibióticos: Una mirada crítica al uso y abuso de los antibióticos.	5
2.2 Historia de los antibióticos	5
2.2.1 Comprendiendo la resistencia a los antibióticos: ¿Qué es y por qué es un problema?	7
2.2.2 Tipos de resistencia a los antibióticos	10
2.2.3 Imipenem: ¿Qué es y cómo se utiliza este antibiótico en el tratamiento de infecciones bacterianas?	13
2.2.4 Las consecuencias de la resistencia a antibióticos: impacto en la salud humana, economía y medio ambiente.	13
2.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : Características microbiológicas, virulencia y mecanismos de resistencia a los antibióticos.	15
2.3.1 β -lactamasas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en la resistencia antibiótica.	16
2.3.2 Los antibióticos ineficaces contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y la estrategia de combinación con inhibidores de β -lactamasas	17

2.4 Potencial de la combinación de terpenos vegetales e imipenem para inhibir la acción de la β -lactamasa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : Un enfoque prometedor en la lucha contra la resistencia antibiótica.	18
2.4.1 ¿Qué son los terpenos vegetales?	18
2.4.2 Carvacrol y Timol: Una visión general de sus propiedades y aplicaciones.	20
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1 Determinación de las energías de afinidad entre los terpenos y la β -lactamasa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
3.2 Determinación de las interacciones moleculares entre las combinaciones de terpenos y la β -lactamasa con mayor energía de afinidad.	23
3.3 Evaluación de la estabilidad de las interacciones moleculares entre combinaciones de terpenos y la enzima β -lactamasa a lo largo de una simulación de dinámica molecular.....	23
3.4 Establecimiento de la concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración mínima bactericida (CMB) y concentración inhibitoria fraccional (CIF) de carvacrol, timol e imipenem contra <i>P. aeruginosa</i>	24
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
4.1 Análisis <i>in silico</i> de las interacciones entre los ligandos y la proteína	26
4.2 Interacciones entre Imipenem y β -lactamasa.....	27
4.2.1 Interacciones entre carvacrol y β -lactamasa.....	28
4.2.2 Interacciones entre Timol y β -lactamasa.	30
4.3 Análisis <i>in vitro</i> de la actividad de terpenos vegetales combinados con imipenem contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
V. CONCLUSIONES	38
VI. LITERATURA CITADA.....	39

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de los antibióticos.	8
Cuadro 2. Clasificación de los terpenos	19
Cuadro 3. Energía de afinidad de los diferentes ligandos y la enzima β -lactamasa	27
Cuadro 4. Actividad antibacteriana (CMI y CMB) de carvacrol, timol e imipenem contra Pseudomonas aeruginosa.....	36
Cuadro 5. Concentración inhibitoria fraccional de imipenem y terpenos vegetales.	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de resistencia a los antibióticos.....	12
Figura 2. Estructura cristalográfica de la enzima β -lactamasa (5EPH) presente en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
Figura 3. Interacciones entre la enzima β -lactamasa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e Imipenem.	28
Figura 4. Interacciones entre Carvacrol y β -lactamasa.....	29
Figura 5. Interacciones entre timol y β -lactamasa.....	30
Figura 6. Cambios en la posición de los ligandos con respecto a su posición inicial en el sitio activo de la β -lactamasa.	33
Figura 7. Desplazamiento de imipenem en β -lactamasa durante la simulación.	33
Figura 8. Desplazamiento de carvacrol en β -lactamasa durante la simulación..	34
Figura 9. Desplazamiento de timol en β -lactamasa durante la simulación	35

RESUMEN

La creciente resistencia de las bacterias a los antibióticos, especialmente en *Pseudomonas aeruginosa*, es un problema crucial en el tratamiento de infecciones microbianas. Esta bacteria Gram-negativa, adquiere resistencia a través de mecanismos como la producción de la enzima β -lactamasa, dificultando así su tratamiento. El carvacrol y timol, compuestos fenólicos en aceites esenciales, como el de orégano, presentan propiedades antimicrobianas potenciales y podrían funcionar en sinergia con los antibióticos para mejorar su efectividad. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto combinado de diversos terpenos vegetales con imipenem para inhibir la virulencia y viabilidad de la enzima β -lactamasa en *P. aeruginosa*. Para lo cual se realizaron análisis *in silico* utilizando softwares de modelado para identificar las mejores interacciones ligando-proteína con una mayor energía de afinidad. Se analizaron las superficies hidrofóbicas y las interacciones a través de diagramas 2D y 3D, y se realizó una simulación dinámica para conocer la estabilidad de las interacciones con mayor energía de afinidad. Entre los terpenos, carvacrol y timol demostraron una alta energía de afinidad con -5.4 Kcal/mol cada uno. En las interacciones de la enzima β -lactamasa con imipenem, nuevamente el carvacrol y el timol mostraron diversas interacciones, como puentes de hidrogeno, enlaces Pi-alquilo, Carbono-Hidrógeno, Pi-Pi apilado, Pi-sigma, entre otros. Además, se analizaron los desplazamientos de los ligandos con las poses de mayor afinidad en tiempos distintos, demostrando que en el nanosegundo 10 se encuentra la salida de los sustratos del sitio activo de la proteína. Para la CMI se obtuvieron resultados de 5×10^{-4} mg/mL para imipenem, 0.075 mg/mL para carvacrol y 1.2 mg/mL para timol. En el caso de la CMB el imipenem mostro resultados de 1×10^{-3} mg/mL, 0.150 mg/mL para carvacrol y 2.4 mg/mL para timol. El índice de concentración inhibitoria fraccional para el caso de la combinación de carvacrol e imipenem dio resultados de 0.125 y para timol e imipenem se obtuvo 0.375, mostrando sinergismo en ambas combinaciones.

La combinación de los terpenos estudiados, especialmente el carvacrol con imipenem podría ser una estrategia potencial para superar la resistencia a los antibióticos en *P. aeruginosa*. Sin embargo, son necesarias más investigaciones para comprender completamente el mecanismo de esta sinergia y su aplicabilidad en un entorno clínico.

Palabras clave: Resistencia a antibióticos, *Pseudomonas aeruginosa*, β -lactamasa, carvacrol, timol, *análisis in silico*.

I. INTRODUCCIÓN

Las infecciones ocasionadas por bacterias son uno de los principales problemas en el sector médico, esto debido a su aumento y las dificultades que pueden presentarse en el transcurso de la enfermedad (Fernández-Ruiz et al., 2021). Con la aparición de los antibióticos se crearon mejores condiciones para los procedimientos médicos, ya que anteriormente la tasa de mortalidad causada por infecciones bacterianas era del 40% (Magna & Oteo-Iglesias, 2019). Sin embargo, la efectividad de los antibióticos se encuentra en riesgo por la resistencia que las bacterias van generando (Alós, 2015). Un reporte de las Naciones Unidas junto a diversos organismos internacionales menciona que, este problema podría generar alrededor de 10 millones de muertes al año a partir de 2050, además de aumentar los gastos que se podrían comparar con los de la crisis económica de 2008-2009, y para el año 2030 este problema podría dejar alrededor de 24 millones de personas en pobreza extrema (World Health Organization, 2019). Además de problemas económicos, la resistencia a los antibióticos genera problemas ambientales debido a su uso en la agricultura, veterinaria y hasta en el tratamiento de oleoductos (Fernández-Ruiz et al., 2021). *Pseudomonas aeruginosa* es conocida como una bacteria oportunista, ya que en humanos suele estar relacionada a diferentes infecciones, como neumonía asociada a ventilador e infecciones nosocomiales. Genera una mayor morbilidad y mortalidad en pacientes que padecen enfermedades como fibrosis quística y personas inmunodeprimidas (Pang et al., 2019). Esta bacteria también es asociada a enfermedades como meningitis, infecciones en tracto urinario, infección en corneas y tejidos blandos, etc. (Chatterjee et al., 2016).

P. aeruginosa presenta distintos mecanismos para atacar el buen funcionamiento de los antibióticos, generando resistencia hacia estos (Pang et al., 2019). Uno de estos mecanismos es la producción de β -lactamasas, que son un tipo de enzimas que se encargan de hidrolizar el enlace amida que se encuentra en el núcleo β -lactámico de diversos antibióticos, generando resistencia (Urquiza Ayala et al., 2018). La resistencia de *Pseudomonas* al imipenem es un problema clínico

importante, ya que este antibiótico es considerado el primer antibiótico de tipo carbapenémico aplicado a enfermedades como neumonía o infecciones urinarias, y abdominales, entre otras (Bhagunde et al., 2020). Una alternativa para evitar la resistencia a los antibióticos es la combinación de estos con terpenos vegetales. Los terpenos son un grupo grande y diverso de compuestos orgánicos producidos por una variedad de plantas, y algunos insectos. Son la clase principal de componentes aromáticos en los aceites esenciales de las plantas y contribuyen a sus fragancias, sabores y colores. Químicamente, los terpenos son compuestos de hidrocarburos construidos a partir de unidades de isopreno. Dependiendo del número de unidades de isopreno que contienen, los terpenos se pueden clasificar en monoterpenos (2 unidades), sesquiterpenos (3 unidades), diterpenos (4 unidades), entre otros. En adición a sus roles en la planta, como atraer polinizadores y repeler herbívoros, los terpenos también tienen una variedad de propiedades potencialmente terapéuticas en humanos, incluyendo propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales y antiinflamatorias (Andrews et al., 2016).

Los terpenos vegetales tienen una amplia variedad de aplicaciones, por ejemplo, en la industria farmacéutica son aplicados ya que han demostrado tener propiedades antiinflamatorias, sedantes, analgésicas y antibacterianas (Tetali, 2019). Los terpenos actúan inhibiendo la actividad de ciertas enzimas bacterianas, alterando la permeabilidad de la membrana celular bacteriana y, en algunos casos, interfiriendo con los procesos de replicación del ADN bacteriano. Este modo de acción sugiere que los terpenos pueden ser útiles en la lucha contra las infecciones bacterianas al dificultar la supervivencia y el crecimiento bacteriano. Por lo anterior surgen las siguientes preguntas de investigación: ¿Qué efecto presentan los terpenos vegetales contra la actividad de la enzima β -lactamasa de *P. aeruginosa*? Y ¿Cómo se refleja ese efecto en la viabilidad de la bacteria expuesta a la presencia del antibiótico imipenem?

Hodžić et al (2021) reportó un análisis de 120 cepas de *P. aeruginosa* en donde se aplicaron diversos tratamientos con antibióticos, como lo son la amikacina,

gentamicina, meropenem, imipenem, ciprofloxacina, piperacilina, ceftazidima, cefepime y aztreonam. Los resultados que se obtuvieron fue que la ciprofloxacina y la amikacina eran los antibióticos anti-*Pseudomonas* más eficientes. Después de las pruebas con antibióticos, se seleccionaron 28 de estos aislados para probar su sensibilidad *in vitro* con tres diferentes tipos de aceites esenciales (*O. compactum*, *T. serpyllum* y *O. majorana*). Los tratamientos con *O. majorana* y *T. serpyllum* no dieron resultados significativos, ya que no se encontraron aislados que mostraran sensibilidad hacia estos, en cambio con *O. compactum*, se utilizó un volumen de 50 µL mostrando que 21 de los 28 aislados fueron sensibles, esto debido a la presencia de carvacrol y timol, considerados los principales compuestos de este aceite. Por lo que en el presente trabajo de tesis evaluó el efecto de carvacrol y timol para reducir la resistencia de *P. aeruginosa* al antibiótico imipenem.

1.1 Hipótesis

La combinación de carvacrol o timol con imipenem presenta un efecto sinérgico contra *Pseudomonas aeruginosa* debido a la inhibición de los terpenos sobre β -lactamasa.

1.2 Objetivo general

Evaluar el efecto de carvacrol o timol para reducir la resistencia de *P. aeruginosa* al antibiótico imipenem.

1.3 Objetivo específico

- Determinar *in silico* la energía de afinidad entre terpenos vegetales y la β -lactamasa de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Analizar *in silico* las interacciones entre las poses terpeno- β -lactamasa que mostraron mayor energía de afinidad.
- Evaluar *in silico* la estabilidad de las interacciones terpeno- β -lactamasa que mostraron la mayor energía de afinidad.
- Evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de carvacrol, timol e imipenem individuales y combinadas contra *Pseudomonas aeruginosa*.

II. ANTECEDENTES

2.1 El impacto de la resistencia a los antibióticos: Una mirada crítica al uso y abuso de los antibióticos.

Las infecciones causadas por bacterias prevalecen como uno de los principales problemas en el sector médico, debido a su aumento y a las dificultades que suelen presentarse en el transcurso de la enfermedad. El uso de antibióticos ha prevenido diversas enfermedades además de disminuir la tasa de mortalidad y ayudar a disminuir el riesgo de procedimientos médicos como los trasplantes de órganos, prevenir infecciones después de una cirugía o en tratamientos como las quimioterapias. Aunque es un gran avance para el tratamiento de enfermedades, la aparición de cepas bacterianas resistentes a antibióticos va en aumento, lo que ocasionaría problemas como un nulo tratamiento para la enfermedad, una estadía más larga en centros hospitalarios, aumento en el costo de atención médica y un incremento en la tasa de mortalidad. En la actualidad se suma otro problema, que es el limitado desarrollo de nuevos antibióticos (Fernández-Ruiz et al., 2021).

2.2 Historia de los antibióticos

Los antibióticos son descritos como uno de los hallazgos más revolucionarios en la historia médica. Las bacterias son microorganismos pertenecientes a la familia procarionte, diferenciándose de la familia eucarionte por la falta de un núcleo, dejando libre el material genético. Algo destacable de la morfología de las bacterias es su pared celular, la cual le proporciona protección contra diversos factores, además de brindarle estabilidad. Una de las maneras en las que se pueden diferenciar a las bacterias, es en dos grandes grupos definidos como Gram-positivas y Gram-negativas. Por medio del método conocido como tinción de Gram, en donde a través de una tinción las bacterias se muestran de dos distintos colores, morado para las bacterias Gram-positivas y rojas para las bacterias Gram-negativas. Empleando este método se pueden dar a conocer las diferencias morfológicas, la de mayor importancia es que la pared celular de las

bacterias Gram-positivas presenta un grosor mayor que el de las Gram-negativas (Contreras Sánchez et al., 1994). Este grosor se presenta debido a que en la pared celular de las bacterias Gram-positivas se encuentra el peptidoglucano, haciendo que la bacteria sea más resistente (Mora, 2012). En cambio, las bacterias de tipo de Gram-negativas cuentan con una bicapa lipídica conformada por lipopolisacáridos, creando un tipo de protección sobre el peptidoglucano para así formar una resistencia superior cuando se presentan antibióticos. (Calvo & Martínez-Martínez, 2009).

Sin duda alguna el descubrimiento de la penicilina fue un hallazgo revolucionario. En 1928 un médico proveniente de Escocia llamado Alexander Fleming realizaba ensayos con la cepa de *Staphylococcus aureus* la cual fue contaminada por un hongo con el que se trabaja en el hospital, *Penicillium notatum*. No fue hasta el año de 1940 cuando Howard Walter Florey y Ernst Boris Chain trabajaron con este antibiótico, produciéndolo en grandes cantidades y examinándolo en animales (Marín-Flesia, 2011). Los siguientes años, como en 1944 se descubrió la estreptomina, en 1947 el cloranfenicol y en 1949 la colistina. Entrando la década de los 50's se dio la bienvenida a la vancomicina y eritromicina; después en 1960 se desplegaron las penicilinas semisintéticas, aunque también se descubrió *Pseudomonas* resistente a gentamicina y *Staphylococcus* resistente a meticilina. 1970 fue la década de las cefalosporinas y de la resistencia a la ampicilina y en los años 80's se desarrollaron las cefalosporinas de cuarta generación. Para finales de siglo, en los 90's se introdujeron los inhibidores de β -lactamasas, carbapenémicos y *Enterococcus* resistente a vancomicina. A partir de la década de los 2000 solo se prueban 1.6 antibióticos por año (Yu et al., 2021).

2.2.1 Comprendiendo la resistencia a los antibióticos: ¿Qué es y por qué es un problema?

Con la aparición de los antibióticos se crearon mejores condiciones para los procedimientos médicos, ya que anteriormente la tasa de mortalidad causada por infecciones bacterianas era alta, rondando alrededor del 40% (Magna & Oteo-Iglesias, 2019). Debido a la rápida evolución de las bacterias, la efectividad de los antibióticos se ve amenazada por la resistencia que las bacterias están generando. La resistencia hacia los antibióticos es la capacidad que ha ganado una bacteria para subsistir en cantidades de antibiótico que pueden inhibir e incluso matar a otras bacterias (Alós, 2015). La resistencia a antibióticos persiste como una alarmante amenaza para la salud pública ya que se han encontrado diversas cepas bacterianas resistentes a una gran variedad de antibióticos. Estas bacterias resistentes tienden a sobrevivir e incrementarse, llegando a persistir por más tiempo y aumentando el número de fallecimientos (Magna & Oteo-Iglesias, 2019). Para definir la gravedad y tipo de resistencia que presentan las bacterias se establecen las siguientes definiciones:

- MDR: Por sus siglas en inglés “Multidrug-resistant” (multidrogoresistente) la resistencia que presentan las bacterias al menos a un antibiótico en tres o más categorías de antibióticos.
- XDR: Del inglés “Extensively drug-resistant” (extremodrogoresistente) es la resistencia por lo menos a un agente en todas las categorías de antibióticos exceptuando dos o menos.
- PDR: Su significado “Pan-drug resistant” (pandrogoresistente) es la resistencia a todos los antibióticos de todas las categorías descritas (Magiorakos et al., 2012).

La clasificación de los antibióticos se puede agrupar de acuerdo con el cuadro 1 (Etebu & Ariekpar, 2016)

Cuadro 1. Clasificación de los antibióticos.

Grupo	Clasificación	Antibiótico
β -lactámicos	Penicilinas	Penicilina G
		Penicilina V
		Oxacilina
		Metecilina
		Nafcilina
		Ampicilina
		Amoxicilina
		Piperacilina
		Ticarcilina
		Cefalosporinas 1ra. Generación
	Cefalosporinas 2da generación	Cefazolina
		Cefalotina
		Cefaloridina
		Cefapirina
		Cefadroxil
		Cefuroxima
		Cefamandol
		Cefonicid
		Moxalactam
		Cefoxitina
	Cefalosporinas 3ra generación	Cefiminox
		Cefotaxima
		Ceftazidime
		Cefoerazona
	Cefalosporinas 4ta generación	Cefpirome
		Cefodizima
		Cefepime
		Cefaclidina
	Cefoselis	
	Cefelidina	

	Monobactámicos	Aztreonam
	Carbapenémicos	Imipenem
		Meropenem
		Ertapenem
Macrólidos		Azitromicina
		Claritromicina
		Eritromicina
Tetraciclinas	1era generación	Tetraciclina
		Clorteciclina
		Oxitetraciclina
		Demeclociclina
	2da generación	Doxiciclina
		Limeciclina
		Meclociclina
		Minociclicna
		Rolitetraciclina
Quinolonas		Ácido nalidixico
		Ciprofloxacino
		Ofloxacino
		Moxifloxacino
		Levofloxacino
Aminoglucósidos		Estreptomicina
		Gentamicina
		Neomicina
		Tobramicina
		Amikacina

(Etebu & Ariekpar, 2016)

2.2.2 Tipos de resistencia a los antibióticos

Las bacterias cuentan con dos tipos diferentes de mecanismos de resistencia que podemos observar en la figura 1 resistencia natural y resistencia adquirida (Pérez-Gracia, 2021) , estos dos tipos cuentan con diferentes subdivisiones que serán explicadas más adelante:

- Resistencia natural o intrínseca

Se define como la resistencia en donde la bacteria tiene genes exclusivos que naturalmente generan resistencia a los antibióticos. Se basa principalmente en estos mecanismos para generar resistencia (Pérez-Gracia, 2021)

- Permeabilidad de la membrana externa

La función de la membrana citoplasmática es la de proporcionar una clase de barrera entre el citoplasma y el ambiente exterior, pero cuando disminuye la permeabilidad, también lo hace la fluidez, lo que puede ocasionar problemas en la estructura y actividad. Es por esto, que las bacterias Gram-negativas desarrollan otro tipo de barrera permeable, lo que ayuda a detener el paso de sustancias tóxicas a la célula.

- Ausencia de diana terapéutica o alelo resistente

La ausencia de diana terapéutica es la falta de una molécula o estructura específica en una célula que pueda ser objetivo de tratamiento terapéutico. Los alelos resistentes confieren resistencia a un tratamiento o terapia en particular.

- Bombas de eflujo

También conocidas como bombas de expulsión son proteínas de transporte activo que utilizan energía para expulsar selectivamente sustancias del interior de la célula hacia el medio extracelular.

- Modificación enzimática

Se pueden encontrar en elementos genéticos móviles. Son clasificadas dependiendo de su actividad: oxidoreductasas, hidrolasas y transferasas. En

oxidorreductasas la más popular es la TetX resistente a tetraciclinas. En transferasas destacan las enzimas modificadoras de aminoglicósidos y en hidrolasas se distinguen las β -lactamasas que actúan sobre los antibióticos β -lactámicos (Sanz García, 2020).

- Mecanismo de resistencia adquirida

La resistencia adquirida llega a presentarse solo en determinadas cepas de bacterias y es la forma de resistencia más común (Pérez-Gracia, 2021).

- Adquisición de nuevos genes

El que las bacterias puedan adaptarse a los distintos entornos se debe a la adquisición de genes, que generan defensas a diferentes clases de antibióticos. Cuando el microorganismo tiene cierto nivel de resistencia a los antibióticos, es cuando se comienza con la transferencia de genes de resistencia hacia otros microorganismos, esto se puede llevar a cabo por elementos genéticos móviles; en las bacterias se puede dar a través de bacteriófagos, ADN desnudo, transposones o plásmidos. La obtención de genes se puede llevar de manera intercelular, conocido como transferencia de genes horizontales o laterales. También puede ser intracelular a través de la transferencia de genes entre un plásmido y el cromosoma bacteriano (Loera-Valenzuela et al., 2016).

- Sobreexpresión y modificación de bombas

La sobreexpresión es un fenómeno biológico que se refiere al incremento en la producción y presencia de proteínas específicas en la membrana celular de un organismo, como las bacterias. Por otro lado, la modificación de las bombas de eflujo implica cambios en la estructura o actividad de estas proteínas de la membrana celular. Estas modificaciones pueden alterar la eficiencia con la que estas bombas expulsan antibióticos y otras sustancias nocivas fuera de la célula bacteriana. Las modificaciones pueden incluir cambios en la afinidad de las bombas por ciertos antibióticos, lo que podría permitir a las bacterias resistir a una gama más amplia de estos compuestos.

- Mutaciones

Pueden afectar directamente la permeabilidad de membrana, pudiendo modificar la conformación de las porinas o su expresión o desecharla.

- Modificación de la diana

Para que la bacteria cuente con un funcionamiento adecuado, se puede llegar a alterar el sitio en donde llega a actuar el antibiótico con la bacteria. Suele presentarse más en las bacterias de tipo Gram-positivas ya que estas producen cambios a nivel estructural en los sitios en donde actúan los antibióticos β -lactámicos a nivel de las proteínas de unión a la penicilina (Sanz García, 2020).

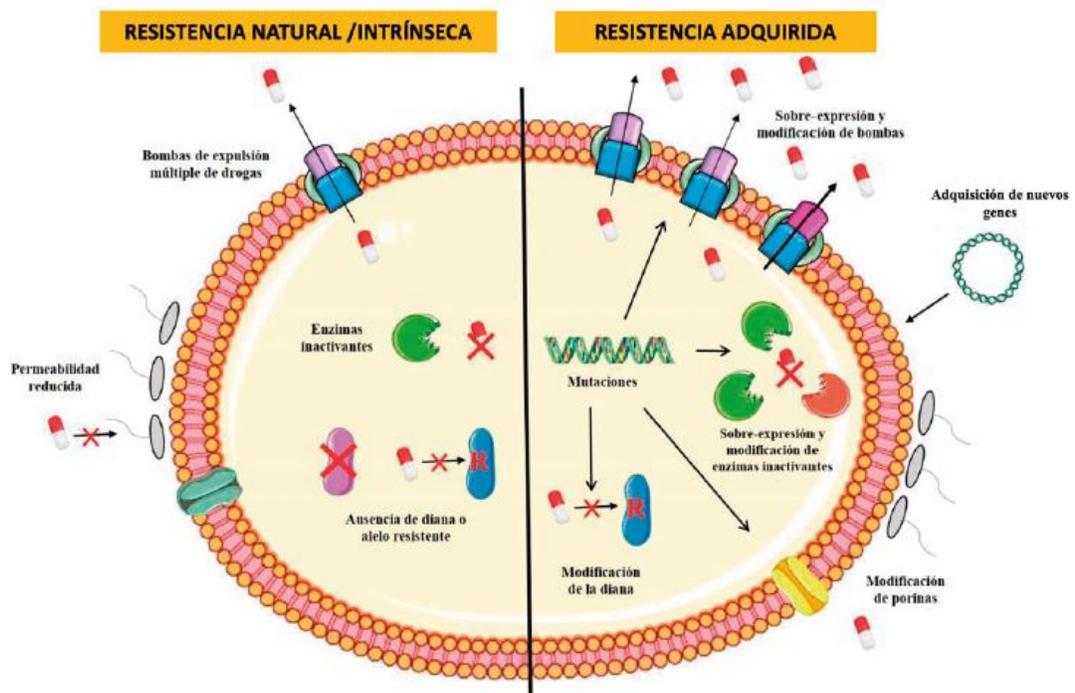


Figura 1. Tipos de resistencia a los antibióticos (Pérez-Gracia, 2021).

2.2.3 Imipenem: ¿Qué es y cómo se utiliza este antibiótico en el tratamiento de infecciones bacterianas?

El imipenem se considera el primer antibiótico de tipo carbapenémico que ha sido desarrollado para el consumo humano. Este suele ser sustraído por la tienamicina, un producto de *Streptomyces catleya* (Hellinger & Brewer, 1991). El uso de imipenem es aplicado a diversas enfermedades como lo es la neumonía, infecciones urinarias, abdominales o de la piel. Este antibiótico casi siempre es combinado con cilastatina, un tipo de inhibidor de dehidropeptidasa que previene que el imipenem sea degradado (Bhagunde et al., 2020). La manera de actuar del imipenem es incorporándose a las peptidasas bacterianas (proteínas bacterianas de unión a la penicilina) que obstruyen la creación de una pared celular, evitando el crecimiento de la célula y casi siempre ocasionando lisis y muerte celular. En bacterias de tipo Gram-negativas el proceso se lleva a cabo en el espacio periplásmico, y en Gram-positivas se origina en la superficie celular. Las causas de la resistencia al imipenem se deben a las diversas modificaciones en la membrana celular en bacilos de tipo Gram-negativos que obstruyen la acción de este carbapenémico (Hellinger & Brewer, 1991). *P. aeruginosa* cuenta con diferentes mecanismos de resistencia hacia los antibióticos, como pueden ser la sobreexpresión de bombas de eflujo, barreras de membrana externa e inactivación antimicrobiana. Imipenem es considerado un antibiótico eficaz, aunque en los últimos años se ha visto un aumento de cepas resistentes a carbapenémicos (Hassuna et al., 2020).

2.2.4 Las consecuencias de la resistencia a antibióticos: impacto en la salud humana, economía y medio ambiente.

Las Naciones Unidas junto con diversos organismos internacionales compartieron información acerca de la resistencia a los antibióticos, la cual detalla que si no se toman medidas rápidas este problema podría generar alrededor de 10 millones de muertes al año a partir del año 2050. Además de diversos problemas económicos que se podrían comparar con los de la crisis

económica de 2008-2009, y para el 2030 este problema lograría dejar alrededor de 24 millones de personas en la pobreza extrema (World Health Organization, 2019).

La resistencia a los antibióticos representa un problema grave que afecta aspectos sanitarios, económicos, sociales y ambientales. Prolonga las estancias hospitalarias, aumenta la mortalidad y limita las opciones terapéuticas, afectando especialmente a los grupos vulnerables. Ambientalmente, el uso excesivo de antibióticos en la agricultura y su inadecuada eliminación generan resistencia bacteriana en el ecosistema. Además, este fenómeno obstaculiza avances en áreas como la cirugía y la oncología, que requieren de antibióticos efectivos. La resistencia a los antibióticos puede generar distintos problemas, como, por ejemplo:

- Repercusión económica

Las enfermedades causadas por bacterias resistentes generan más problemas al momento de tratarlas, por lo que producen procesos patológicos más largos y delicados, efectos secundarios y estadías más largas en hospitales, por lo que también aumentan los gastos de estadía, además de aumentar la tasa de mortalidad. En estudios realizados por el Banco Mundial, se espera que las terapias contra bacterias multirresistentes aumenten hasta un 400% y para Latinoamérica la pérdida será de \$2.9 trillones de dólares, lo que implicaría una crisis financiera (Camacho-Silvas, 2022).

- Repercusión en el sector farmacéutico

El incremento de bacterias consideradas resistentes causa la necesidad de crear nuevos antibióticos en plazos muy cortos, lo que genera problemas en cuanto a la innovación, evolución del sector farmacéutico y problemas económicos.

- Repercusión biológica

El uso de antibióticos además de aplicarse en el sector público se usa en agricultura, veterinaria y hasta en el tratamiento de oleoductos, generando

problemas en diversos ecosistemas, en donde llegan a establecer un nicho único, pudiendo disminuir la diversidad biológica y generando multirresistencia.

- Repercusión terapéutica

El surgimiento de cepas resistentes reduce las opciones para un adecuado tratamiento, teniendo que acudir al uso de antibióticos de amplio espectro que generalmente son utilizados en enfermedades más avanzadas. Además de presentarse una mayor mortalidad y un mayor tiempo de estancia hospitalaria.

- Repercusión epidemiológica

La selección de bacterias multirresistentes no solo es importante para los pacientes que están siendo tratados, ya que estas pueden terminar infectando a personas sanas o pacientes que no tienen esa enfermedad. Se puede propagar entre distintas áreas del hospital, entre hospitales de la zona y a veces puede provenir de otros estados o países (Fernández-Ruiz et al., 2021).

2.3 *Pseudomonas aeruginosa*: Características microbiológicas, virulencia y mecanismos de resistencia a los antibióticos.

Algunas de las características destacables de esta bacteria es que se encuentra dentro de la clasificación de Gram-negativas, se puede adaptar a cualquier tipo de entorno y es de la familia *Pseudomonadaceae* (Pang et al., 2019). Su temperatura ideal de crecimiento es de 25°C a 27°C pero también puede adaptarse hasta los 42°C (Wu et al., 2014). Su genoma es considerado mayor al de otras bacterias (5.5 – 7 Mbp) lo que atribuye a la gran cantidad de enzimas reguladoras que son fundamentales en el transporte, metabolismo y eflujo de material orgánico, así mismo esta diversidad en el genoma ayuda a la bacteria a adaptarse a los entornos. *Pseudomonas aeruginosa* es conocida como una bacteria oportunista, ya que en humanos suele estar relacionada a neumonía asociada a ventilador e infecciones nosocomiales, genera una mayor morbilidad y mortalidad en pacientes que padecen enfermedades como fibrosis quística y personas inmunodeprimidas (Pang et al., 2019). También se asocia

Pseudomonas a enfermedades como la meningitis, infecciones en tracto urinario, infección en córneas y tejidos blandos, etc (Chatterjee et al., 2016).

2.3.1 β -lactamasas de *Pseudomonas aeruginosa* en la resistencia antibiótica.

Las β -lactamasas son un tipo de enzima producida por diversas bacterias, entre ellas *P. aeruginosa*, tienen la capacidad de inactivar antibióticos β -lactámicos. Estas enzimas actúan hidrolizando el anillo β -lactámico presente en la estructura de estos antibióticos, lo que impide que puedan unirse e inhibir las enzimas responsables de la síntesis de la pared celular bacteriana. Se descubrieron alrededor del año 1963 en cepas de *E. coli*, encontrándose la TEM-1, SHV-1 y PSE-1 (Urquiza Ayala et al., 2018).

En *P. aeruginosa* podemos encontrar 2 tipos de β -lactamasas, las del tipo Amp-C que se encuentran en los cromosomas bacterianos de *Pseudomonas* y estas pueden ser incitadas por los antibióticos β -lactámicos. Cuando esto pasa se muestra resistencia a las penicilinas. El otro tipo de β -lactamasa son las BLEE que son codificadas por plásmidos y también se pueden presentar por la resistencia que presenta la bacteria a las penicilinas.

Pero esta no es la única clasificación de las β -lactamasas, también se pueden dividir en 4 tipos de clases A, B, C y D. Las β -lactamasas denominadas A, C y D son conocidas por contar con una serina, que se encarga de hidrolizar el anillo β -lactámico por medio de un grupo acilo que se encuentra pegado a la serina que está en el sitio activo. Las β -lactamasas cuentan con uno o varios iones de zinc que se encuentran en el sitio activo (Carcione et al., 2021).

Hace un par de años se identificó un tipo de BLEE, considerada divergente y nueva, aislada de una cepa de *P. aeruginosa* originaria de Bélgica. Una de sus principales características es que mostraba alrededor de un 50% de similitud con otros tipos de enzimas como la GES, además de diversas propiedades bioquímicas, como las tasas bajas de recambio o la baja afinidad por ceftazidima.

En la figura 2 se muestra la estructura cristalográfica de la enzima. Es conocida como β -lactamasa de espectro extendido en complejo con imipenem del cristal BEL-1 de *Pseudomonas aeruginosa* (ID PDB: 5EPH) (Pozzi et al., 2016)

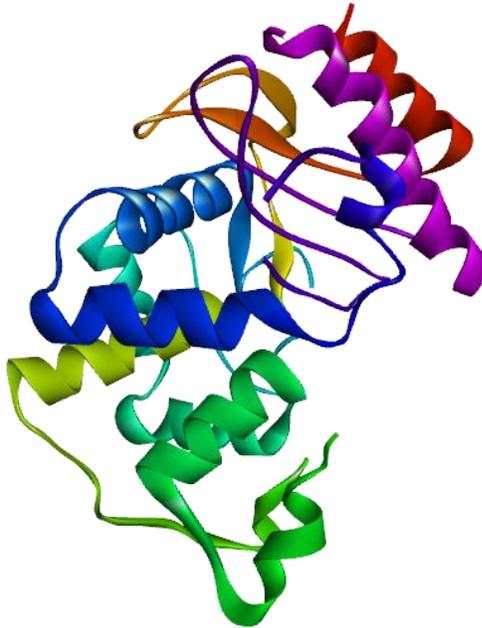


Figura 2. Estructura cristalográfica de la enzima β -lactamasa (5EPH) presente en *Pseudomonas aeruginosa* (Pozzi et al., 2016).

2.3.2 Los antibióticos ineficaces contra *Pseudomonas aeruginosa* y la estrategia de combinación con inhibidores de β -lactamasas

Dependiendo del tipo de cepa, *Pseudomonas aeruginosa* puede presentar resistencia a antibióticos como a penicilinas y los inhibidores de estas, cefalosporinas, monobactámicos, aminoglucósidos, algunos β -lactámicos, fluoroquinolonas y carbapenems (Pachori et al., 2019). Los inhibidores de β -lactamasas son un tipo de medicamento que es aplicado junto con antibióticos betalactámicos para evitar la resistencia a este tipo de antibióticos. Estos inhibidores pueden modificarse en sustratos que después se enlazan a la β -lactamasa, teniendo buena afinidad, pero interacciones estéricamente no funcionales. De igual manera, estos inhibidores pueden actuar como inhibidores suicidas, que inactivarán la enzima por medio de interacciones químicas

secundarias en el sitio activo (Khanna & Gerriets, 2022). Los inhibidores de β -lactamasas que han sido aplicados desde años atrás han sido piperacilina/tazobactam, amoxicilina/acido clavulánico y ampicilina/sulbactam (Carcione et al., 2021). La invención de estos inhibidores de betalactamasas significó un gran avance, ya que lo que se buscaba era recobrar la función de los antibióticos betalactámicos, pero cuentan con una desventaja, la cual es que su eficacia es reducida, ya que su actividad es específica para ciertos grupos de betalactamasas (Martin, 2002).

2.4 Potencial de la combinación de terpenos vegetales e imipenem para inhibir la acción de la β -lactamasa de *Pseudomonas aeruginosa*: Un enfoque prometedor en la lucha contra la resistencia antibiótica.

2.4.1 ¿Qué son los terpenos vegetales?

Los terpenos vegetales, también conocidos con el nombre de isoprenoides, son compuestos producidos por las plantas a través de las vías metabólicas específicas y se encuentran en varias partes de la planta, como las hojas, flores, frutos, raíces y tallos. Los terpenos están conformados por isoprenos (unidades compuestas de 5 átomos de carbono) y pueden abarcar desde una hasta las ocho unidades y pueden estar de manera cíclica o líneal (Tetali, 2019). Para clasificar a los terpenos se necesita conocer la cantidad de unidades de las que están compuestos, como podemos observar en el cuadro 2.

Cuadro 2. Clasificación de los terpenos según Andrews (2016).

Nombre del terpeno	Número de unidades de isoprenos	Número de carbonos
Monoterpeno	2	10
Sesquiterpeno	3	15
Diterpeno	4	20
Triterpeno	6	30
Tetraterpeno	8	40
Politerpeno	>8	>40

(Andrews et al., 2016).

Los terpenos vegetales tienen una amplia aplicación en la industria debido a sus propiedades:

- Industria farmacéutica

Los terpenos vegetales han demostrado tener propiedades antiinflamatorias, sedantes, analgésicas, antioxidantes y antitumorales.

- Industria cosmética

Son utilizados en productos cosméticos por sus beneficios y fragancias. Están asociados a productos del cuidado de la piel, esto por su efecto antioxidante, previniendo el envejecimiento de la piel, prevención de melanogénesis y el daño ocasionado por rayos UV.

- Industria alimentaria

Son aplicados como un tipo de aditivo natural para mejorar el sabor, aroma y propiedades nutricionales en los alimentos, son utilizados para la fabricación de bebidas, productos horneados, alimentos procesados, etc.

- Biocombustibles

Debido a la alta demanda de combustibles alternativos y que sean amigables con el medio ambiente, se comenzaron a producir hidrocarburos terpénicos. Los

caracterizan su mayor densidad energética, una buena fluidez a bajas temperaturas y su baja higroscopia (Tetali, 2019).

2.4.2 Carvacrol y Timol: Una visión general de sus propiedades y aplicaciones.

El carvacrol, conocido como 2-metil-5-(1-metiletil)-fenol es un fenol monoterpeno que suele ser encontrado en diversas plantas, como pueden ser *Origanum*, *Thymus*, *Thymbra capitata*, *Satureja*, etc. El carvacrol es usado ampliamente en industrias como la alimentaria, médica o empleado en fragancias. Es altamente reconocido por su papel como antimicrobiano, un ejemplo radica en la industria de los alimentos, en donde se ha demostrado que el carvacrol aplicado en manera de vapor ha sido eficiente contra bacterias que se transmiten por medio de alimentos, como lo son *Salmonella* o *E. coli*. En la industria farmacéutica el carvacrol ha dado resultados positivos contra patógenos respiratorios como lo son *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Hemophilus influenzae* y *Staphylococcus aureus*. El carvacrol es reconocido por su actividad contra microorganismos resistentes a diversos tipos de medicamentos, como por ejemplo el caso de *Staphylococcus aureus* y *S. epidermis* que muestran resistencia a la meticilina. El carvacrol ha mostrado valores de CMI (concentración mínima inhibitoria) de 0.015 y 0.03% v/v y se ha demostrado que su actividad antibacterial puede aumentar cuando se combina con diferentes antibióticos (Antonia Nostro & Teresa Papalia, 2012).

Según (Hodžić et al., 2021) en su estudio se trabajó con alrededor de 120 cepas de *P. aeruginosa* a las cuales se les aplicaron diversos tratamientos con antibióticos y aceites esenciales. Después de las diversas pruebas se sostuvo que la amikacina y la ciprofloxacina eran los antibióticos contra *Pseudomonas* más eficaces. Posteriormente se trabajaron con diferentes aceites esenciales de plantas como mejorana, orégano y tomillo, de los cuales uno de estos aceites obtuvo mejores resultados ya que en su composición se encontraban terpenos como lo son el carvacrol y el timol que aumentaban la efectividad en contra de la β -lactamasa en combinación con un antibiótico.

El timol, nombrado también como 5-metil-2-isopropilfenol y 2-isopropil-5-metilfenol es un fenol monoterpeneo. Se obtiene a partir del aceite de *Thymus vulgaris*, conocida como tomillo. También se ha podido extraer de otras plantas como lo son *Origanum L*, *Ocimum gratissimum* o *Trachyspermum ammi*. Las características principales que puede presentar este fenol es ser incoloro, el olor peculiar y la cristalinidad. Es considerado isómero del carvacrol (Escobar et al., 2020). El timol cuenta con propiedades antibacterianas, antiespasmódicas, antimicrobianas, expectorantes y antioxidantes. Además de presentar propiedades medicinales para diversos trastornos que afectan el sistema nervioso, cardiovascular y respiratorio e igualmente puede proporcionar efectos antiinflamatorios y anticancerígenos. De las propiedades antimicrobianas con las que cuenta el timol, se pueden incluir a las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, en donde se incorporan bacterias como *Salmonella*, *Escherichia Coli*, *Pseudomonas*, *Listeria*, entre otras (Salehi et al., 2018).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Determinación de las energías de afinidad entre los terpenos y la β -lactamasa de *Pseudomonas aeruginosa*.

En la sección de análisis *in silico*, se llevó a cabo un acoplamiento molecular en donde se analizaron las interacciones de la enzima β -lactamasa en contacto con los diferentes terpenos vegetales e imipenem. Para llevar a cabo este acoplamiento, se contempló el procedimiento descrito por Tapia-Rodríguez, (2018). Del repositorio PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) se obtuvieron las estructuras de los diferentes terpenos vegetales; cariofileno (CID: 5281515), carvacrol (CID: 10364), cimeno (CID: 7463), citral (CID: 638011), eucaliptol (CID: 2758), eugenol (CID: 3314), limoneno (CID: 22311), linalool (CID: 6549), mirceno (CID: 31253) y timol (CID: 6989). Y el antibiótico imipenem (CID 104838). De la base de datos PDB (<https://www.rcsb.org/>) se recabó la información de la enzima β -lactamasa (Entry ID: 5EPH).

Para continuar con el procedimiento de anclaje molecular se utilizó el software UCSF Chimera (versión 1.16), en donde se procesaron las estructuras de los terpenos vegetales, el antibiótico imipenem y la enzima. Posteriormente para cada molécula se minimizó su estructura esto con la finalidad de optimizar las posiciones de los distintos átomos y estabilidad energética. El paso siguiente fue la selección de coordenadas de interacción simulando un panorama competitivo en el sitio activo de la β -lactamasa, con las coordenadas listas se prosiguió a ingresarlas en la herramienta “Autodock-vina” en donde se realizaría el acoplamiento molecular y se obtendrían datos que serían utilizados para seleccionar la mejor pose de interacción ligando-proteína con mayor energía de afinidad (Kcal/mol) y menor desviación cuadrática media (RMSD).

3.2 Determinación de las interacciones moleculares entre las combinaciones de terpenos y la β -lactamasa con mayor energía de afinidad.

Con el software BIOVIA Discovery Studio 2021 se seleccionaron las interacciones del ligando, para después hacer la selección de superficies hidrofóbicas en el receptor y finalizar con la visualización de las interacciones en el diagrama 2D y 3D.

3.3 Evaluación de la estabilidad de las interacciones moleculares entre combinaciones de terpenos y la enzima β -lactamasa a lo largo de una simulación de dinámica molecular.

Para evaluar la estabilidad de las interacciones moleculares entre combinaciones de terpenos y la enzima β -lactamasa, se realizó una simulación de dinámica molecular mediante el uso del software GROMACS, un conjunto de herramientas altamente eficientes y escalables para la simulación molecular (Hess et al., 2008). El primer paso implicó la preparación de la topología de las moléculas, esencial para definir las características físicas y químicas del sistema de estudio. Esta preparación abarcó la descripción detallada de las moléculas y de las fuerzas interatómicas. En el siguiente paso, se realizó la preparación del sistema de simulación, lo que incluyó la solvatación del sistema ligando-receptor, la minimización y la adición de iones. La solvatación implicó la creación de un ambiente acuoso para imitar las condiciones biológicas en las que las interacciones moleculares suelen tener lugar. La minimización es un procedimiento para reducir la energía potencial del sistema, asegurando un estado inicial estable para la simulación. La adición de iones sirvió para neutralizar la carga del sistema. A continuación, se equilibró la simulación, un proceso esencial para estabilizar las condiciones de temperatura y presión en el sistema. Una vez equilibrado, se procedió con la ejecución de la simulación, utilizando el desplazamiento cuadrático medio (RMSD) para evaluar la similitud estructural del ligando en diferentes momentos de la simulación. Finalmente, se llevó a cabo un análisis detallado de la desviación cuadrática media de la posición del ligando en el receptor durante un periodo de 50 nanosegundos. Esta medición

aportó información sobre la estabilidad de las interacciones ligando-proteína a lo largo del tiempo, permitiendo evaluar la viabilidad de las combinaciones de terpenos para inhibir la actividad de la β -lactamasa.

3.4 Establecimiento de la concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración mínima bactericida (CMB) y concentración inhibitoria fraccional (CIF) de carvacrol, timol e imipenem contra *P. aeruginosa*

Se evaluó el efecto antibacteriano de Carvacrol (W282197, Sigma Aldrich, Toluca, México) y el de timol (21574, Sigma Aldrich, Toluca, México) e imipenem (Biogalenic) contra *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10154) de, siguiendo el protocolo descrito por Tapia-Rodríguez (2018). Se determinaron diferentes concentraciones de ambos terpenos y el antibiótico antes mencionado en concentraciones de 0-3 mg/mL utilizando tubos de ensayo que contenían 6 mL de medio de cultivo Luria Bertani con un inóculo ajustado a 10^6 UFC/mL. Después se incubaron a 37°C por 24 horas. Para determinar la CMI (mg/mL) se seleccionó la concentración más baja que inhibió el crecimiento bacteriano de cada uno de los tratamientos. Posteriormente, la CMB (mg/mL) fue determinada utilizando dosis superiores a la CMI, por lo cual se inocularon 20 μ L de cada dosis en placas que contenían 20 mL de agar tipo Luria Bertani, incubándose a 37°C por 24 horas, siendo la CMB la dosis que no presento crecimiento bacteriano. Estos experimentos se realizaron por triplicado.

Para determinar el efecto antibacteriano de la combinación ternaria de carvacrol y timol con imipenem se empleó el método de tablero de ajedrez (Bernal-Mercado, 2019) en el cual se compara el resultado antibacteriano de la combinación a diferentes concentraciones con el efecto individual de cada compuesto. Se analizaron las mezclas binarias utilizando fracciones de la CMI (0.0, 0.6, 0.125, 0.25, 0.5, 1.2 x CMI) de un terpeno (carvacrol y timol) en combinación con fracciones de la CMI del antibiótico imipenem. (carvacrol + imipenem) (timol + imipenem). Para establecer el resultado de la combinación, se usó la concentración fraccionada inhibitoria (Σ CFI), la cual se puede calcular de esta manera:

$$\Sigma CFI = \frac{CMI \text{ a combinación}}{CMI \text{ a individual}} + \frac{CMI \text{ b combinación}}{CMI \text{ b individual}}$$

La interacción entre los compuestos en la combinación se obtiene partiendo de los valores de ΣCFI : sinergismo si $\Sigma CFI \leq 0.5$, aditivo si $0.5 < \Sigma CFI \leq 1$, indiferente si $1 < \Sigma CFI \leq 4$, antagonista si $\Sigma CFI > 4$. Estos análisis se realizaron por triplicado.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis *in silico* de las interacciones entre los ligandos y la proteína.

Los resultados del cuadro 3 muestran la energía de afinidad competitiva y no competitiva de los terpenos vegetales antes mencionados, en comparación con el imipenem, que es un antibiótico utilizado para tratar afecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, una bacteria resistente a antibióticos. Los resultados muestran que carvacrol y timol tienen energías de afinidad similares en los panoramas de inhibición competitiva y no competitiva, respectivamente. Las energías de afinidad mostraron valores de -5.4 kcal/mol para la afinidad competitiva y -5.1 kcal/mol para la afinidad no competitiva, lo cual sugiere que ambos compuestos tienen posibilidad de interactuar con la enzima β -lactamasa de *P. aeruginosa*. Estos resultados respaldan la hipótesis establecida, ya que demuestran que carvacrol y timol tienen potencial como inhibidores de la actividad de la β -lactamasa. Sin embargo, es importante señalar que la energía de afinidad del imipenem, sustrato de la β -lactamasa, tiene una energía de afinidad mayor (-6.5 Kcal/mol) a la de ambos terpenos (-5.1 Kcal/mol), por lo que en caso del evento competitivo los terpenos estarían en desventaja. Mientras que en el evento no competitivo los terpenos podrían actuar. Además, otros terpenos como eugenol, cariofileno, citral y limoneno también muestran cierta afinidad hacia la β -lactamasa, aunque en menor medida que carvacrol y timol. Por otro lado, terpenos como cimeno, linalool, eucaliptol y mirceno muestran energías de afinidad más bajas, lo que indica una menor interacción con la enzima. Estos resultados sugieren que carvacrol y timol son terpenos vegetales específicos que tienen potencial como inhibidores de la actividad de la β -lactamasa de *P. aeruginosa*. Además, el pretratamiento de la bacteria con estos terpenos seleccionados podría aumentar la eficacia del imipenem, lo que respalda la hipótesis establecida en la investigación.

Cuadro 3. Energía de afinidad de los diferentes ligandos y la enzima β -lactamasa

Ligando	Energía de afinidad competitiva (Kcal/mol)	Energía de afinidad no competitiva (Kcal/mol)
Imipenem	-6.5	
Carvacrol	-5.4	-5.1
Timol	-5.4	-5.1
Eugenol	-5.3	-5.0
Cariofileno	-5.1	-5.0
Cimeno	-4.6	-4.7
Limoneno	-4.6	-4.6
Citral	-4.5	-4.3
Linalool	-4.3	-4.3
Eucaliptol	-4.3	-4.2
Mirceno	-4.1	-3.9

4.2 Interacciones entre Imipenem y β -lactamasa.

Para la selección de los posibles inhibidores y la comprensión de sus interacciones, primero es importante conocer las interacciones de la enzima con su sustrato natural, en este caso el imipenem. En la figura 3 se muestran las interacciones entre este antibiótico y la β -lactamasa de la bacteria. Se puede observar que el imipenem tiene una energía de afinidad de -6.5 kcal/mol, lo que indica una fuerte interacción con la β -lactamasa. El imipenem forma puentes de hidrógeno con varios aminoácidos de la enzima, como la tirosina 97, asparagina 125, serina 123, lisina 65 y serina 230. Estos puentes de hidrógeno son interacciones fuertes y estables que contribuyen a la afinidad del imipenem hacia

la β -lactamasa. El imipenem presenta una interacción carbono-hidrógeno y otra Pi-alquilo con la tirosina 97 de la β -lactamasa. Estas interacciones adicionales también contribuyen a la afinidad del imipenem hacia la enzima. En general, esta imagen muestra como el imipenem se une y forma interacciones específicas con la β -lactamasa de *P. aeruginosa*, lo cual es importante para su actividad como antibiótico. Estos resultados muestran el panorama natural de interacción del sustrato imipenem con la enzima, lo que permitirá conocer el potencial de los ligandos estudiados como inhibidores.

Interacciones entre β -lactamasa e Imipenem

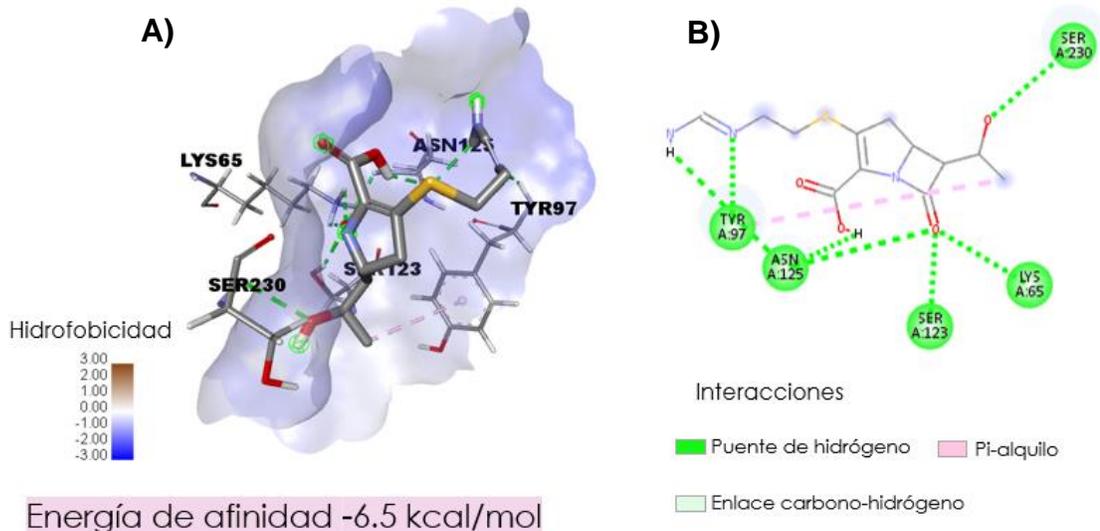


Figura 3. Interacciones entre la enzima β -lactamasa de *Pseudomonas aeruginosa* e Imipenem.

A) Se muestra el diagrama 3D que incluye la hidrofobicidad de la superficie del sitio activo y las interacciones entre el ligando y los residuos vecinos de esta región. B) Se muestra el diagrama 2D que señala las principales interacciones detectadas entre ligando y residuos vecinos del sitio activo.

4.2.1 Interacciones entre carvacrol y β -lactamasa.

Las interacciones entre el carvacrol y la enzima β -lactamasa de *P. aeruginosa* señaladas en la figura 4 muestran que el carvacrol tiene afinidad con la enzima,

mostrando valores de energía de -5.4 kcal/mol, mayor que la de los demás terpenos, demostrando la potencial interacción entre el compuesto y la enzima. Además, se observa que el carvacrol establece puentes de hidrógeno con los aminoácidos lisina 65 y serina 123 de la enzima, lo que indica que hay una interacción favorable entre los grupos funcionales del carvacrol y los aminoácidos de la enzima. Por otro lado, el aminoácido tirosina 97 interactúa con el carvacrol a través de interacciones Pi-sigma, Pi-Pi apilado y Pi-alquilo. Estas interacciones Pi indican que hay una transferencia de electrones entre el carvacrol y la enzima, lo que podría contribuir a la formación de un complejo estable. Los ensayos de estabilidad de la interacción se describen en la sección 4.3.

Interacciones entre Carvacrol y β -lactamasa

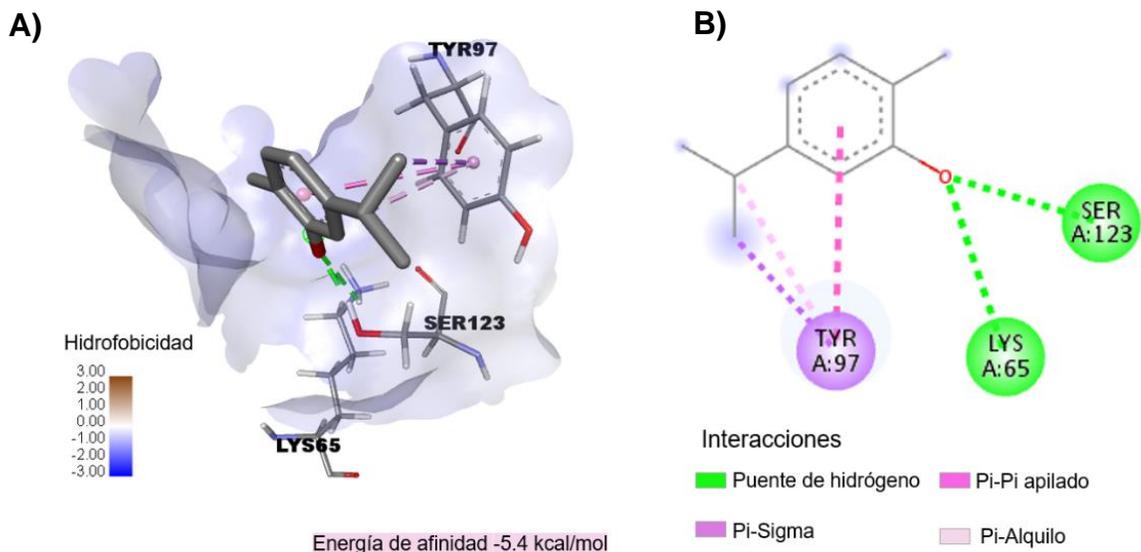


Figura 4. Interacciones entre Carvacrol y β -lactamasa.

A) Se muestra el diagrama 3D que incluye la hidrofobicidad de la superficie del sitio activo y las interacciones entre el ligando y los residuos vecinos de esta región. B) Se muestra el diagrama 2D que señala las principales interacciones detectadas entre ligando y residuos vecinos del sitio activo.

4.2.2 Interacciones entre Timol y β -lactamasa.

Los resultados de las interacciones mostrados en la Figura 5 sobre el timol y la enzima β -lactamasa, revelan una energía de afinidad idéntica a la del carvacrol, de -5.4 kcal/mol, lo que indica una interacción favorable. El timol establece puentes de hidrógeno con la asparagina 125 de la enzima, lo que indica una interacción favorable entre el timol y este aminoácido. Sin embargo, se señala la serina 123, ya que genera una interacción de donante desfavorable, lo que sugiere que la interacción entre el timol y la serina 123 podría no ser adecuado desde el punto de vista energético y afectar la estabilidad y eficacia del timol como inhibidor de la enzima. La tirosina 97 interactúa con el timol a través de enlaces Pi-sigma y Pi-pi apilado. Estas interacciones Pi indican que hay una transferencia de electrones entre el timol y la enzima, lo que podría contribuir a la formación de un complejo estable.

Interacciones entre Timol y β -lactamasa

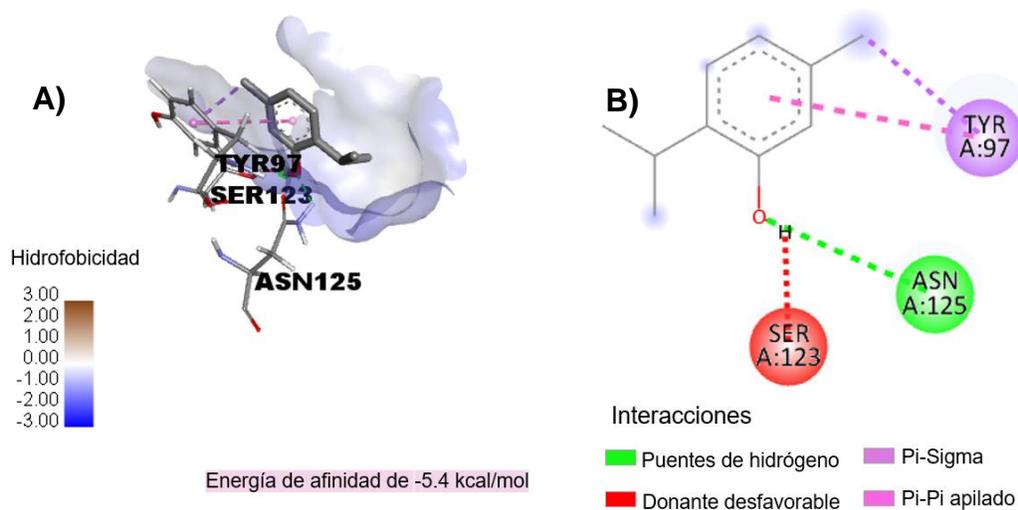


Figura 5. Interacciones entre timol y β -lactamasa.

A) Se muestra el diagrama 3D que incluye la hidrofobicidad de la superficie del sitio activo y las interacciones entre el ligando y los residuos vecinos de esta región. B) Se muestra el diagrama 2D que señala las principales interacciones detectadas entre ligando y residuos vecinos del sitio activo.

El carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) y timol (2-isopropil-5-metilfenol) son monoterpenoides que cuentan con un solo anillo fenólico en su estructura conformados a partir de dos moléculas de isopreno. Estos dos compuestos cuentan con un grupo hidroxilo unido en la posición C-1, la diferencia radica que, en el carvacrol, el grupo metilo está en la posición C-2 y el grupo isopropilo en la posición C-5, mientras que, en el timol, el metilo está en la posición C-5 y el isopropilo en la posición C-2. El grupo hidroxilo y electrones deslocalizados propician la actividad antimicrobiana de estos compuestos. El carvacrol y timol muestran propiedades antibacterianas contra diversas bacterias, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, etc. Dentro de los principales mecanismos de acción de estos compuestos se encuentra:

- Carvacrol y timol son compuestos hidrófobos, por lo que se añaden a las membranas celulares de las bacterias, provocando alteraciones en correcto funcionamiento de esta. Estos monoterpenos se aglomeran en las cadenas de ácidos grasos de la membrana, haciendo transformaciones de la bicapa lipídica.
- En concentraciones subinhibitorias de estos terpenos, se impidió la formación de biopelículas.
- En diversos estudios se mostró como el timol y carvacrol minimizaron la motilidad de *Listeria monocytogenes* (Kachur & Suntres, 2020).

El imipenem procede incorporándose en las proteínas bacterianas de unión a la penicilina que impiden la creación de la pared celular, así previenen el crecimiento de la bacteria, provocando lisis y muerte (Hellinger & Brewer, 1991). El acoplamiento de carvacrol y timol con antibióticos es una opción al problema de la resistencia bacteriana (Kachur & Suntres, 2020). Dentro de los límites de la revisión de literatura no se han detectado estudios publicados de inhibición específica de terpenos sobre β -lactamasas. Por lo que profundizar en estos estudios podría contribuir al potencial uso de terpenos con estos efectos.

4.3 Desplazamiento de los ligandos en las poses con mayor afinidad a la β -lactamasa

La Figura 6 ilustra la estabilidad de las interacciones entre los distintos terpenos, el imipenem y la enzima β -lactamasa durante una simulación de dinámica molecular de 50 nanosegundos. El eje horizontal representa el tiempo transcurrido durante la simulación, mientras que el eje vertical refleja la raíz del cuadrado medio de la desviación de la posición de cada ligando respecto a la proteína. Como se observa, no existen fluctuaciones significativas en la estabilidad de los ligandos en relación con el sitio activo de la proteína. No obstante, las Figuras 7, 8 y 9 revelan una alteración notable en la posición de los diferentes terpenos y el antibiótico, con un cambio de posición más evidente en el décimo nanosegundo, lo que indica una posible salida de los compuestos del sitio activo.

La salida de imipenem, el sustrato de la β -lactamasa, del sitio activo en el décimo nanosegundo durante la simulación de dinámica molecular tiene implicaciones significativas en la comprensión de la interacción entre esta enzima y sus sustratos. Esta observación sugiere que, bajo las condiciones de simulación, el imipenem no mantiene una interacción estable con la enzima durante un período prolongado, lo que puede estar asociado con su capacidad para ser degradado por la β -lactamasa. Además, la salida simultánea de los terpenos carvacrol y timol del sitio activo en el mismo instante temporal sugiere una posible competencia o interacción entre estos compuestos y el imipenem. Esta observación podría indicar que los terpenos tienen el potencial para influir en la actividad de la β -lactamasa, posiblemente a través de la alteración de su interacción con el imipenem. Sin embargo, estas interpretaciones deben tomarse con cautela, ya que las simulaciones de dinámica molecular son una representación simplificada de la realidad y las condiciones experimentales reales pueden ser más complejas. Para confirmar estas observaciones, sería necesario realizar experimentos *in vitro*.

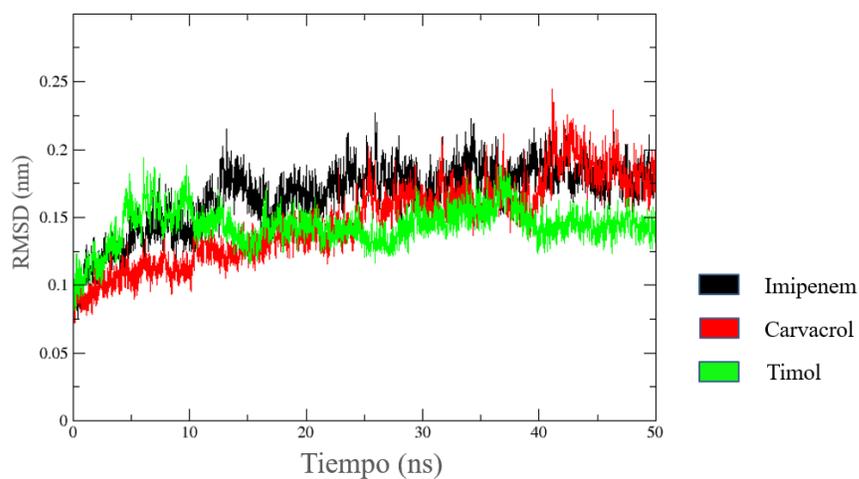


Figura 6. Cambios en la posición de los ligandos con respecto a su posición inicial en el sitio activo de la β -lactamasa.

La posición inicial es la indicada por las poses con energías de afinidad mayores descritas anteriormente.

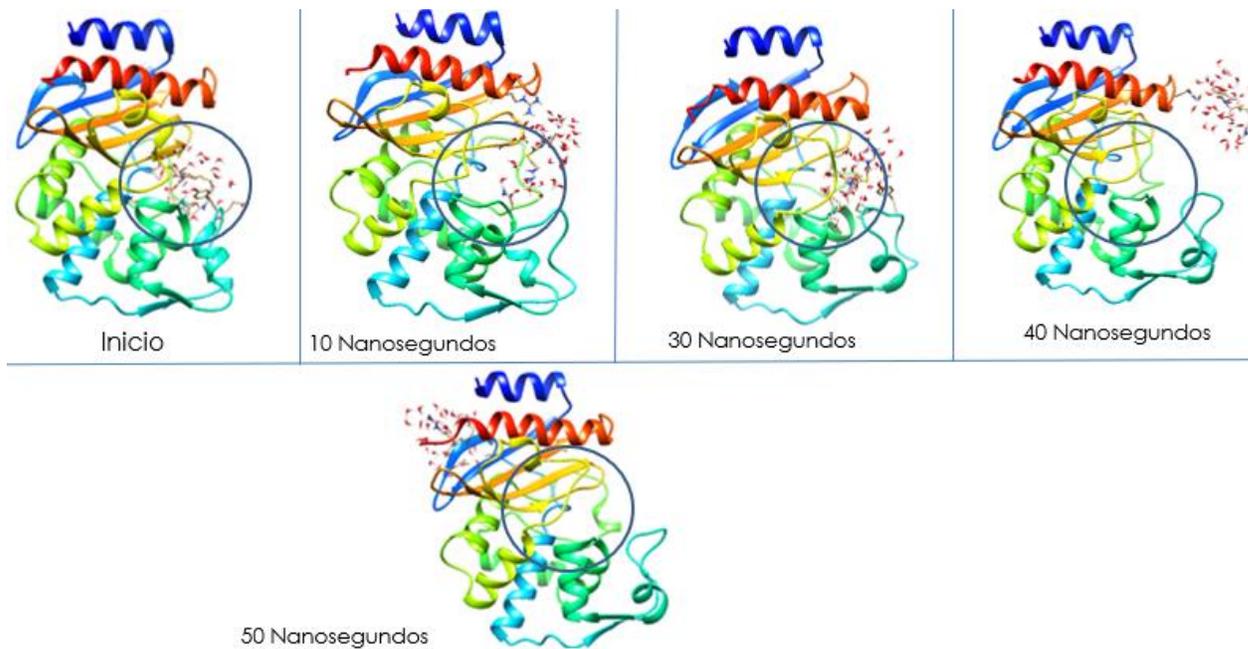


Figura 7. Desplazamiento de imipenem en β -lactamasa durante la simulación

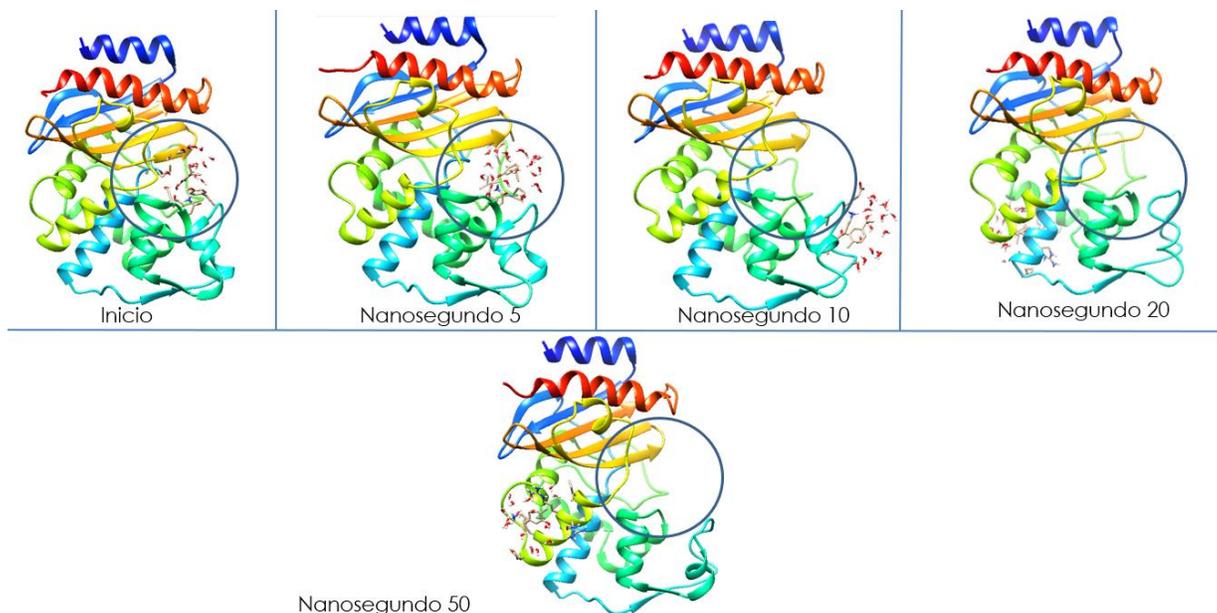


Figura 8. Desplazamiento de carvacrol en β -lactamasa durante la simulación

Las observaciones realizadas a partir de las simulaciones de dinámica molecular de las interacciones entre la enzima β -lactamasa y los terpenos carvacrol y timol, en combinación con imipenem, proporcionan un nuevo marco para entender la resistencia antibiótica. Previamente, estudios como el de Hyldgaard et al (2012) y Marchese et al (2016) ya habían evidenciado el potencial antimicrobiano de los terpenos, incluyendo carvacrol y timol. A pesar de ello, su impacto directo sobre β -lactamasas era menos conocido. Los resultados sugieren que los terpenos podrían competir con el imipenem por la interacción con la β -lactamasa, lo que tiene implicaciones en la hipótesis propuesta. Específicamente, si los terpenos pueden efectivamente inhibir la β -lactamasa, esto podría permitir que el imipenem sea más efectivo en la inhibición de *P. aeruginosa*, una bacteria comúnmente resistente a los antibióticos, proporcionando así un posible efecto sinérgico. Mientras que la resistencia a los antibióticos sigue siendo un desafío persistente, los hallazgos de este estudio aportan una nueva estrategia potencial: la combinación de terpenos con antibióticos tradicionales para aumentar su

eficacia. Sin embargo, es importante destacar que estos resultados son *in silico* y necesitan ser validados experimentalmente.

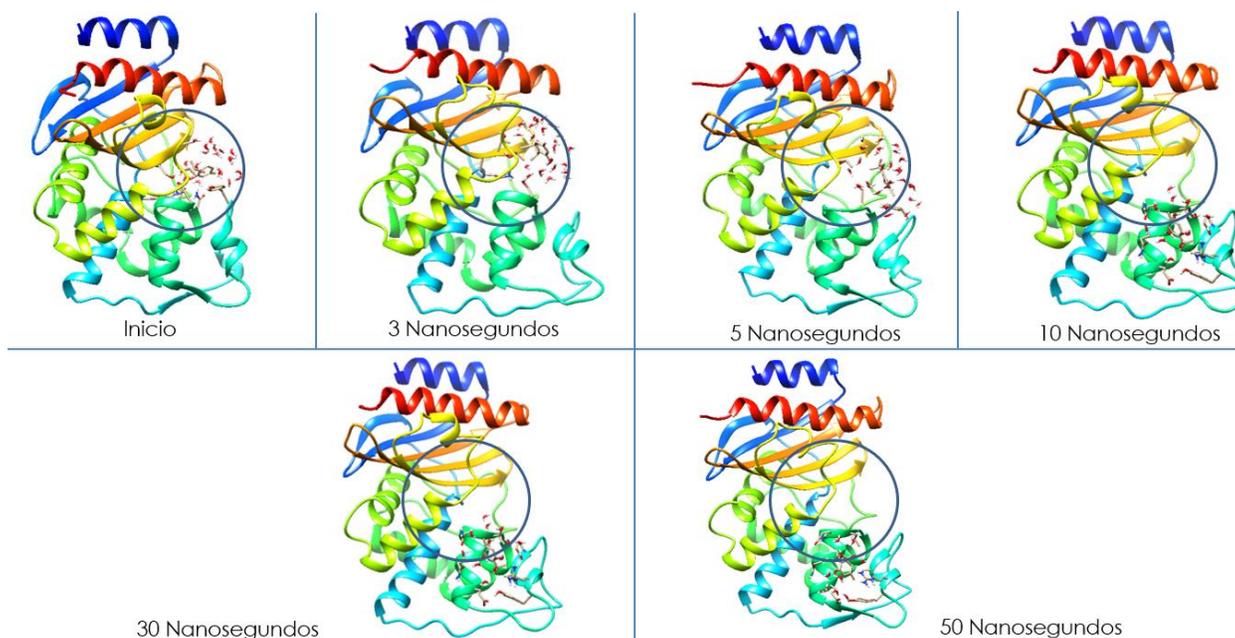


Figura 9. Desplazamiento de timol en β -lactamasa durante la simulación

4.3 Análisis *in vitro* de la actividad de terpenos vegetales combinados con imipenem contra *Pseudomonas aeruginosa*.

En el cuadro 4 podemos encontrar las CMI de los terpenos vegetales carvacrol y timol y del antibiótico imipenem aplicado en la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 10154. La concentración mínima inhibitoria aplicada fue de 0.075 mg/mL de carvacrol, 5×10^{-4} mg/mL de imipenem y 1.2 mg/mL de timol. Asimismo, se muestran los resultados de la concentración mínima bactericida de los terpenos. Para carvacrol fue de 0.150 mg/mL y de 2.4 mg/mL para el timol. Posteriormente, se realizó el procedimiento de concentración inhibitoria fraccional (CIF) en donde se combinó carvacrol con imipenem y timol con imipenem para evaluar la interacción que tienen estos agentes entre sí. Estos resultados los podemos encontrar en el cuadro 5. Según (Mansilla et al., 2020) si el valor de la CIF es <0.5 , se trata de una combinación sinérgica. Si la CIF es igual a 1, se considera aditiva. Si el resultado es $>0.5 - <4.0$ se trata de una combinación indiferente lo

indica ausencia de interacción. En cambio, si el resultado es >4 es una combinación antagónica. En este caso, la IFIC de imipenem y carvacrol es de 0.125 y el resultado de la IFIC de imipenem y timol es de 0.375, dando como resultado sinergismo entre las distintas combinaciones.

Cuadro 4. Actividad antibacteriana (CMI y CMB) de carvacrol, timol e imipenem contra *Pseudomonas aeruginosa*

	Imipenem (mg/mL)	Carvacrol (mg/mL)	Timol (mg/mL)
CMI	5x10 ⁻⁴	0.075	1.2
CMB	1x10 ⁻³	0.150	2.4

Cuadro 5. Concentración inhibitoria fraccional de imipenem y terpenos vegetales.

Carvacrol (mg/mL)	Imipenem (mg/mL)	ICIF	Timol (mg/mL)	Imipenem (mg/mL)	ICIF
4.68x10 ⁻³	3.125x10 ⁻⁵	0.125	0.13	0.000125	0.375
		sinergia			sinergia

Los resultados de las pruebas *in vitro* muestran una evidente sinergia entre los terpenos y el imipenem, lo cual resulta en un notable descenso en las dosis necesarias para lograr un efecto antimicrobiano similar. Por ejemplo, se logró un efecto similar al de una dosis de 0.0005 mg/mL de imipenem al combinar solamente 0.00003125 mg/mL de este con 0.00468 mg/mL de timol. Esto representa una disminución de más de 15 veces en la dosis de imipenem requerida. De igual manera, la combinación de 0.13 mg/mL de carvacrol con 0.000125 mg/mL de imipenem equivale al efecto antimicrobiano de una dosis individual de 0.075 mg/mL de carvacrol o de 1.2 mg/mL de timol. En estos casos, vemos que se necesitan 0.6 veces la dosis de carvacrol y 27.6 veces menos la dosis de timol para producir un efecto similar. Estos hallazgos enfatizan el

potencial de estas combinaciones para reducir la necesidad de grandes dosis de antimicrobianos, mitigando potencialmente el desarrollo de resistencia.

Esta sinergia tiene un impacto significativo ya que permite la utilización de cantidades menores de antibióticos y terpenos para lograr el mismo efecto antimicrobiano. Esta reducción en la dosis requerida disminuye el riesgo de efectos secundarios y toxicidad para los pacientes, al tiempo que reduce el coste del tratamiento. Además, la sinergia observada tiene el potencial de ayudar en la lucha contra la resistencia a los antibióticos. Al necesitar menos cantidad de antibiótico para lograr el mismo efecto, se reduce la presión selectiva sobre las bacterias, lo que podría disminuir la velocidad de desarrollo de nuevas resistencias. También, el uso de terpenos podría ofrecer un nuevo mecanismo de acción contra las bacterias, lo que dificulta su capacidad para desarrollar resistencia a múltiples fármacos.

La combinación de carvacrol e imipenem podría tener un efecto sinérgico en la reducción en la resistencia bacteriana. Se ha demostrado que el carvacrol podría tener un efecto sinérgico con los antibióticos, aumentando su efectividad contra las bacterias resistentes a los mismos. El carvacrol puede aumentar la permeabilidad de la membrana celular de las bacterias, lo que podría facilitar la entrada del imipenem en la célula bacteriana, aumentando su eficacia. De acuerdo con Vidal-García (2019) y su estudio sobre sinergismo farmacológico entre extractos vegetales y cloxacilina frente a SARM, hay resultados prometedores, ya que el extracto de cistus probado frente a SARM mostro resultados favorables, generado sinergia, por lo que las cepas que eran resistentes a los antibióticos se convierten sensibles frente a estos y frente a los extractos vegetales utilizados, aminorando la resistencia de las bacterias. En el caso de la CIF de imipenem y timol, se considera indiferente, lo que sugiere que los efectos de estos compuestos no se potencian entre sí y que actúan de manera independiente.

V. CONCLUSIONES

- Los análisis *in silico* mostraron que el carvacrol y el timol tienen alta afinidad hacia la β -lactamasa de *Pseudomonas aeruginosa*. Estos terpenos mostraron interacciones específicas con la enzima, para el caso del carvacrol se observaron puentes de hidrógeno, enlaces Pi-sigma y Pi-pi alquilo; para el caso del timol se observaron puentes de hidrógeno, enlaces Pi-sigma, Pi-pi apilado y donantes desfavorables.
- El ensayo de estabilidad *in silico* mostró que la unión entre la enzima y el sustrato imipenem se limita a <10 nanosegundos, tiempos similares de estabilidad se observaron para carvacrol y timol. Lo que podría indicar que estos tiempos de interacción entre los terpenos y el sitio activo de la β -lactamasa pudiera ser suficiente para interferir en su actividad contra el imipenem.
- La actividad inhibitoria del carvacrol fue mayor a la observada para el timol, sin embargo, la actividad del imipenem se observó a dosis menores. Al realizar la combinación entre el antibiótico y cada terpeno se detectaron interacciones sinérgicas, en especial para carvacrol se lograron utilizar las menores dosis mezcladas con imipenem para inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa*.

VI. LITERATURA CITADA

- Alós, J. I. (2015). Antibiotic resistance: A global crisis. In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 33, Issue 10, pp. 692–699). Elsevier Doyma. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>
- Andrews, H. E., Rodriguez, R. R., Marquez, E. G., Fajardo, J. A. G., Martinez, L. G. T., Martinez, E. G., & Silvas, J. E. U. (2016). Los compuestos bioactivos y tecnologías de extracción. In *Los compuestos bioactivos y tecnologías de extracción*. CIATEJ. https://ciatej.mx/files/divulgacion/divulgacion_5a43b85320f15.pdf#page=40
- Antonia Nostro, & Teresa Papalia. (2012). Antimicrobial Activity of Carvacrol: Current Progress and Future Prospectives. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 7(1), 28–35. <https://doi.org/10.2174/157489112799829684>
- Bernal-Mercado, A. T. (2019). *Combinación de compuestos fenólicos para inhibir la formación de biopelículas de Escherichia coli uropatógena en superficies de silicona*.
- Bhagunde, P., Colon-Gonzalez, F., Liu, Y., Wu, J., Xu, S. S., Garrett, G., Jumes, P., Lassetter, K., Marbury, T., Rizk, M. L., Lala, M., Rhee, E. G., Butterson, J. R., & Boundy, K. (2020). Impact of renal impairment and human organic anion transporter inhibition on pharmacokinetics, safety and tolerability of relebactam combined with imipenem and cilastatin. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 86(5), 944–957. <https://doi.org/10.1111/bcp.14204>
- Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>
- Camacho-Silvas, L. A. (2022). *Factores clínicos asociados a resistencia bacteriana derivados de la atención en salud en una institución médica de segundo nivel en la ciudad de Chihuahua, Chihuahua, México*. www.fm.uach.mx

- Carcione, D., Siracusa, C., Sulejmani, A., Leoni, V., & Intra, J. (2021). Old and new beta-lactamase inhibitors: Molecular structure, mechanism of action and clinical use. In *Antibiotics* (Vol. 10, Issue 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080995>
- Chatterjee, M., Anju, C. P., Biswas, L., Anil Kumar, V., Gopi Mohan, C., & Biswas, R. (2016). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. *International Journal of Medical Microbiology*, 306(1), 48–58. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2015.11.004>
- Contreras Sanchez, M., González Flores, T., Ayora Talavera, T., Evangelista Martínez, Z., & Pacheco Lopez, N. (1994). ¿Qué son?
- Escobar, A., Pérez, M., Romanelli, G., & Blustein, G. (2020). Thymol bioactivity: A review focusing on practical applications. In *Arabian Journal of Chemistry* (Vol. 13, Issue 12, pp. 9243–9269). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.11.009>
- Etebu, E., & Arikekpar, I. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *IJAMBR*, 4, 90–101.
- Fernández-Ruiz, D., Quirós-Enrique, M., & Cuevas-Pérez, O. (2021). *Los antibióticos y su impacto en la sociedad Antibiotics and their impact on society*. <http://www.medisur.sld.cu/index.php/medisur/article/view/4898>
- Hassuna, N. A., Darwish, M. K., Sayed, M., & Ibrahem, R. A. (2020). Molecular epidemiology and mechanisms of high-level resistance to meropenem and imipenem in *pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Drug Resistance*, 13, 285–293. <https://doi.org/10.2147/IDR.S233808>
- Hellinger, W. C., & Brewer, N. S. (1991). Imipenem. *Mayo Clinic Proceedings*, 66(10), 1074–1081. [https://doi.org/10.1016/S0025-6196\(12\)61732-7](https://doi.org/10.1016/S0025-6196(12)61732-7)
- Hess, B., Kutzner, C., Van Der Spoel, D., & Lindahl, E. (2008). GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular

- simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 4(3), 435–447. <https://doi.org/10.1021/ct700301q>
- Hodžić, S., Husejnagić, D., Tihic, N., Kadrić, M., Hercegovac, A., Avdić, A., & Ibišević, M. (2021). In vitro susceptibility of Beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates to antibiotics and essential oils. *Acta Medica Saliniana*. <https://doi.org/10.5457/542>
- Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3(JAN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>
- Kachur, K., & Suntres, Z. (2020). The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 60, Issue 18, pp. 3042–3053). Bellwether Publishing, Ltd. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1675585>
- Khanna, N., & Gerriets, V. (2022). Beta Lactamase Inhibitors. *StatPearls Publishing*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557592/>
- Loera-Valenzuela, P. B., López-Ortiz, C. E., Romero-Vela, C. D., Luévanos Escareño, M. P., & Balagurusamy, N. (2016). Mecanismos De Resistencia Intrínseca y Adquirida a Antibióticos En Bacterias. *Revista Medicina de Torreón*, 8.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Magna, A., & Oteo-Iglesias, J. (2019). *Comprendiendo la resistencia a antibióticos*. www.riecs.es

- Mansilla, E. C., Moreno, R. C., Reilly, M. I. M., Blasco, A. C., Blanco, A. C., Aguilar, M. D., & García, C. S. (2020). Métodos microbiológicos para la determinación in vitro de la actividad de combinaciones de antimicrobianos. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.
- Marchese, A., Orhan, I. E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, S. F., Gortzi, O., Izadi, M., & Nabavi, S. M. (2016). Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. In *Food Chemistry* (Vol. 210, pp. 402–414). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.111>
- Marín-Flesia, M. (2011). Penicilina. *Universidad de Belgrano*.
- Martin, N. (2002). Resistencia Bacteriana a b-lactámicos. Evolución y Mecanismos. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-02642002000100016#:~:text=Las%20PBPs%20\(protein%20binding%20pe nicillin,membrana%20citoplasm%C3%A1tica%20de%20las%20bacterias](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-02642002000100016#:~:text=Las%20PBPs%20(protein%20binding%20pe nicillin,membrana%20citoplasm%C3%A1tica%20de%20las%20bacterias).
- Mora, X. (2012). *Diferenciando bacterias Gram+ y Gram-*.
- Pachori, P., Gothwal, R., & Gandhi, P. (2019). Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. In *Genes and Diseases* (Vol. 6, Issue 2, pp. 109–119). Chongqing University. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.04.001>
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. In *Biotechnology Advances* (Vol. 37, Issue 1, pp. 177–192). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>
- Pérez-Gracia, M. T. (2021). *La pandemia silenciosa: resistencia bacteriana a los antibióticos*. www.uchceu.es
- Pozzi, C., De Luca, F., Benvenuti, M., Poirel, L., Nordmann, P., Rossolini, G. M., Mangani, S., & Docquier, J. D. (2016). Crystal structure of the *Pseudomonas*

aeruginosa BEL-1 extended-spectrum β -lactamase and its complexes with moxalactam and imipenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(12), 7189–7199. <https://doi.org/10.1128/AAC.00936-16>

Salehi, B., Mishra, A. P., Shukla, I., Sharifi-Rad, M., Contreras, M. del M., Segura-Carretero, A., Fathi, H., Nasrabadi, N. N., Kobarfard, F., & Sharifi-Rad, J. (2018). Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. In *Phytotherapy Research* (Vol. 32, Issue 9, pp. 1688–1706). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/ptr.6109>

Sanz García, F. (2020). *Predicción de la resistencia a antibióticos, intrínseca y adquirida en Pseudomonas aeruginosa*.

Tapia-Rodríguez, M. R. (2018). *Carvacrol como inhibidor de comunicación intercelular responsable de la formación de biopelículas de Pseudomonas aeruginosa*.

Tetali, S. D. (2019). Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. In *Planta* (Vol. 249, Issue 1). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-3056-x>

Urquiza Ayala, G., Jackeline Arce Chuquimia, D., & Gladys Alanoca Mamani, D. (2018). Resistencia bacteriana por Beta-lactamasas de espectro extendido: Un problema creciente. Bacterial resistance by extended spectrum Beta-lactamase: A growing problem. In *Rev Med La Paz* (Issue 2).

Vidal-García, S. (2019). *Sinergismo farmacológico entre extractos vegetales y cloxacilina frente a Staphylococcus aureus resistente a meticilina*.

World Health Organization. (2019, April 29). *New report calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis*. <https://www.who.int/news/item/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis>

Wu, W., Jin, Y., Bai, F., & Jin, S. (2014). *Pseudomonas aeruginosa*. In *Molecular Medical Microbiology* (pp. 753–767). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00041-X>

Yu, H., Han, X., & Quiñones-Pérez, D. (2021). La humanidad enfrenta un desastre: la resistencia antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*.