

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



Efecto de terpenos vegetales y gentamicina sobre la actividad de glucosiltransferasa
responsable de la formación de biopelículas de *Escherichia coli*

Por:

SONIA PATRICIA DURÓN GARCÍA

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



Efecto de diferentes terpenos vegetales y gentamicina sobre la actividad de glucosiltransferasa responsable de la formación de biopelículas de *Escherichia coli*.

Por:

SONIA PATRICIA DURÓN GARCÍA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Dr. Julio César Tafolla Arellano
Asesor Principal UAAAN

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

Efecto de diferentes terpenos vegetales y gentamicina sobre la actividad de glucosiltransferasa responsable de la formación de biopelículas de *Escherichia coli*.

Por:

SONIA PATRICIA DURÓN GARCÍA

TESIS

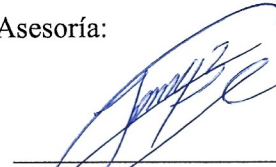
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

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



Dr. Jesús Omar Díaz Rivas
Coasesor



Dra. Samaria Lisdeth Gutiérrez Pacheco
Coasesora



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



Sonia Patricia Durón García

Autor principal



Dr. Julio César Tafolla Arellano

Asesor Principal

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de todo corazón a la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** por darme la oportunidad de pertenecer a esta prestigiosa institución. Durante mi estadía en la universidad, esta institución me brindó todo lo necesario para forjarme como profesionalista. Además, agradezco profundamente la oportunidad de formar grandes amistades a lo largo de mi trayectoria en la universidad. Amistades con las que compartí valiosos momentos juntos. Gracias a todos los profesores que han contribuido a mi formación y éxito académico.

Gracias al **CONAHCYT** por el apoyo brindado para la realización de la presente tesis, el cual se recibió a través de la convocatoria Paradigmas y Controversias de la Ciencia 2022, con el 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 Cesar Tafolla Arellano**, por abrirme las puertas del **Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular**, gracias por la oportunidad que me ha brindado de aprender y desarrollarme en este campo.

Agradezco especialmente al **Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala**, por la confianza que tuvo al permitirme formar parte de este proyecto y aceptarme como practicante. También agradezco su constante disponibilidad y todos los conocimientos que me dio a lo largo de estos meses. Gracias por adoptarnos durante nuestras prácticas profesionales haciendo que mi estancia en Hermosillo se convirtiera en una de las experiencias más bonitas que he vivido. Además, quiero reconocer su paciencia al ayudarme a terminar este trabajo de investigación y por despertar en mí un interés y cariño por la microbiología. De todo corazón, le agradezco por todo lo que ha hecho por mí. Lo quiero mucho y espero tener la oportunidad de trabajar nuevamente con usted en un futuro.

Agradezco a la **Dra. Samaria Lisdeth Gutiérrez Pacheco** por el tiempo, paciencia y dedicación que me brindó a lo largo de estos meses. Su apoyo y disposición fueron primordiales para lograr finalizar este proyecto. Su apoyo no solo se limitó a lo académico,

sino que también me hizo sentir motivada durante este proceso. Por todo ello, le tengo un gran respeto, cariño y aprecio.

Agradezco al **Dr. Melvin** por su gran paciencia al enseñarme todo sobre el laboratorio y permitirme aprender de mis errores. Su disposición y apoyo durante mi tiempo como practicante han sido invaluable. Gracias por adoptar a las chiwis y brindarnos una experiencia inolvidable en Hermosillo. Gracias por las risas compartidas y por las grandiosas experiencias que vivimos juntos. Me siento muy afortunada de haber tenido la oportunidad de trabajar contigo y compartir momentos tan especiales. Te quiero mucho chiwis mayor.

Al **Laboratorio de Tecnologías Emergentes del CIAD Hermosillo** por la confianza que tuvieron en mí y por todas las enseñanzas que adquirí durante mi tiempo en este laboratorio. Gracias a todos los que forman parte de este equipo de trabajo que me mostraron mucha paciencia y me ayudaron a resolver todas mis dudas. Le agradezco a **Brenda** por darnos un lugarcito en el laboratorio y por su constante atención y apoyo, gracias a **Dani, Marce, Jorge** y **Yessi** por adoptar a las chiwis y por todo el apoyo y compañerismo que me ofrecieron a lo largo de mi estancia.

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a mis amistades que siempre me han apoyado a lo largo de este trayecto. En especial, quiero agradecer a mis amigas **Mariana, Nayeli, Adamari, Alondra, Sofía** y **Ale** por su constante apoyo y por estar siempre a mi lado, las quiero.

Quiero agradecer a mi mejor amiga **Ana**. Durante los últimos 10 años, has estado a mi lado en cada momento, y eso es algo que valoro y aprecio de todo corazón. Gracias, por ser esa amiga en la que siempre puedo confiar. Saber que puedo contar contigo me hace sentir muy afortunada. Te quiero hermana.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las bellas amistades que he formado en la universidad. Agradezco de corazón a **Zaret** por tu presencia en mi vida y tu disposición para estar ahí para mí en todo momento. A **Eli**, quiero agradecerte por tu comprensión y por estar siempre presente, eso es algo que valoro enormemente. A **Brisa**, gracias por siempre sacarme una sonrisa y aceptar cualquier locura que se nos ocurra. A **Lidia**, agradezco por haber estado

a mi lado desde la preparatoria, gracias por ayudarme siempre. Las quiero mucho, espero que nuestra amistad perdure por siempre y que continuemos creando recuerdos juntas.

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mis roomies, quienes durante cuatro meses me soportaron día y noche. A **Polet**, gracias por tantos consejos y pláticas nocturnas, te agradezco sinceramente por todo tu apoyo y todos los momentos que hemos vivido juntas. A **Nallely**, gracias por compartir las mismas locuras y por sacarme una sonrisa en cada momento. Aprecio cada instante que compartimos juntas, gracias por estar a mi lado. A **Gaby**, quiero agradecerte por ser una amistad tan importante para mí. Tu compañía y apoyo durante este proceso han significado mucho, aprecio cada aventura que hemos vivido juntas. Las quiero muchísimo y valoro enormemente nuestra amistad. Espero que esta amistad dure por siempre y que continuemos apoyándonos mutuamente.

DEDICATORIA

A **Dios**, por permitirme llegar hasta donde estoy con salud y por guiarme en el cumplimiento de cada una de las metas que me he propuesto. Su presencia en mi vida ha sido mi mayor fortaleza y fuente de inspiración.

A mis padres, **Ramiro Durón Escareño** y **María del Carmen Julia García**, por su constante apoyo en cada uno de los pasos que he dado. Gracias por brindarme siempre su confianza inquebrantable y por hacer todo lo posible por ayudarme a culminar esta etapa de mi vida. Son el pilar fundamental de mi existencia y lo más valioso que tengo, los quiero mucho.

De manera especial, quiero dedicar este trabajo a mi mamá. Sin su apoyo incondicional y sus consejos, no hubiera sobrevivido estos años en la universidad. Su amor y dedicación han sido mi motor para alcanzar mis sueños. Gracias por estar siempre a mi lado, animándome a seguir adelante.

A mis abuelos, **Ramiro** y **Gregoria (†)**, por su cariño incondicional y su alegría sincera ante mis logros. Por todo su amor y apoyo, siempre los llevo en mi corazón. A mi abuela **Estela** y a mi tía **Martha**, aunque tal vez no hayan comprendido del todo mi carrera, siempre me brindaron su apoyo en todo momento, las llevo siempre en mi corazón.

A mi madrina **Rocío**, por celebrar mis logros y por estar a mi lado en cada etapa de mi vida, por todo el amor que me ha brindado, la quiero mucho. También quiero mencionar a mi tío **Juan (†)**, quien siempre me tuvo presente. Su apoyo y su ejemplo han dejado una huella en mí.

Deseo dedicar unas palabras a toda familia, quienes estuvieron presentes y me brindaron un apoyo para completar esta importante etapa de mi vida. A tíos, primos y demás familiares, quiero expresar mi gratitud por su presencia y palabras de aliento.

ÍNDICE GENERAL DEL CONTENIDO

DERECHO DE AUTOR Y DECLARACIÓN DE NO PLAGIO	IV
AGRADECIMIENTOS	V
DEDICATORIA	VIII
ÍNDICE GENERAL DEL CONTENIDO	IX
ÍNDICE DE CUADROS.....	XI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Hipótesis.....	3
1.2 Objetivo General	3
1.3 Objetivos específicos.....	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1 Resistencia bacteriana a antibióticos, uno de los problemas más importantes en la actualidad.....	4
2.2 Aplicación de aceites esenciales como estrategia de control en la formación de biopelículas.....	9
2.3 Efecto inhibitorio de los terpenos vegetales combinados con gentamicina sobre la actividad de la enzima glucosiltransferasa de <i>Escherichia coli</i>	12
III. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1 Estructuras de los ligandos y proteína utilizados en el estudio.	15
3.2 Determinación de interacciones moleculares entre glucosiltransferasa, gentamicina y terpenos vegetales.....	15
3.3 Evaluación de la estabilidad de las interacciones moleculares entre terpenos y la enzima glucosiltransferasa a lo largo de una simulación de dinámica molecular.....	16

3.4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de carvacrol contra <i>Escherichia coli</i>	16
3.5 Evaluación de cambios en la sensibilidad de <i>Escherichia coli</i> a la gentamicina mediante la medición del diámetro del halo de inhibición tras la exposición previa al carvacrol...	17
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
4.1 Energías de afinidad de diferentes ligandos competitivos y no competitivos hacia la enzima glucosiltransferasa.....	18
4.2 Tipos de interacciones y estabilidad dinámica entre los terpenos con mayor afinidad por la glucosiltransferasa en un panorama competitivo	20
4.3 Tipos de interacciones y estabilidad dinámica entre los terpenos con mayor afinidad por el lazo de entrada a la glucosiltransferasa en un panorama no competitivo	29
4.4 Cambios inducidos por el carvacrol en la sensibilidad de <i>Escherichia coli</i> a la gentamicina.....	37
V. CONCLUSIONES	40
VI. LITERATURA CITADA.....	41

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Clasificación de los antibióticos.....	5
Cuadro 2: Energías de Afinidad de Diferentes Ligandos Competitivos y No Competitivos hacia la Enzima Glucosiltransferasa	19
Cuadro 3: Concentración mínima inhibitoria (MIC) del terpeno carvacrol.....	37
Cuadro 4: Diámetro de los halos de inhibición con un tratamiento de gentamicina.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formación de biopelículas.	10
Figura 2. Estructura de la enzima glucosiltransferasa y su sitio activo (5E1Y).	13
Figura 4. Interacciones moleculares entre la UDP-glucosa y el sitio activo de la glucosiltransferasa.	21
Figura 5. Interacciones moleculares entre la gentamicina y el sitio activo de la glucosiltransferasa.	22
Figura 6. Interacciones moleculares entre el carvacrol y el sitio activo de la glucosiltransferasa.	23
Figura 7. Interacciones moleculares entre el timol y el sitio activo de la glucosiltransferasa.	24
Figura 8. Interacciones moleculares entre el cariofileno y el sitio activo de la glucosiltransferasa.	25
Figura 9. Cambios en la posición de los terpenos en el sitio activo de la glucosiltransferasa.	27
Figura 10. Estabilidad de UDP-glucosa con la enzima glucosiltransferasa.	27
Figura 11. Estabilidad del carvacrol con la enzima glucosiltransferasa.	28
Figura 12. Estabilidad del timol con la enzima glucosiltransferasa.	28
Figura 13. Interacciones moleculares entre el carvacrol y el sitio activo de la glucosiltransferasa (Panorama no competitivo).	30
Figura 14. Interacciones moleculares entre el timol y el sitio activo de la glucosiltransferasa (Panorama no competitivo).	31
Figura 15. Interacciones moleculares entre el cariofileno y el sitio activo de la glucosiltransferasa (Panorama no competitivo).	32
Figura 16. Cambios en la posición de los terpenos en el sitio activo de la glucosiltransferasa.	33
Figura 17. Estabilidad del carvacrol con la enzima glucosiltransferasa.	34

Figura 19. Estabilidad del cariofileno con la enzima glucosiltransferasa.....	35
Figura 20. Tratamiento con gentamicina.....	38

RESUMEN

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema de salud global junto con la falta de nuevos métodos de tratamiento, ha llevado a un incremento en los costos de atención médica y a un mayor riesgo para los pacientes. *Escherichia coli*, una bacteria común que causa infecciones del tracto digestivo y urinario en humanos ha desarrollado una creciente resistencia a los antibióticos en los últimos años. Uno de los mecanismos asociados a su resistencia es su capacidad de formar biopelículas, que pueden tolerar altas concentraciones de antibióticos y son difíciles de tratar por lo cual, es necesaria la búsqueda de alternativas para reducir su formación. Se ha reportado el uso de compuestos naturales, como los terpenos presentes en los aceites esenciales como el carvacrol, timol y cariofileno que presentan actividad antibacteriana contra *E. coli* y han demostrado eficacia en la inhibición de la formación de biopelículas. Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue analizar el efecto de los terpenos vegetales en la actividad de la enzima glucosiltransferasa de *Escherichia coli* y su influencia en la sensibilidad a la gentamicina. Se realizaron análisis *in silico* de acoplamiento molecular para analizar las interacciones y las energías de afinidad entre la glucosiltransferasa y los ligandos UDP-glucosa, carvacrol, timol y cariofileno. Los terpenos carvacrol y timol mostraron una notable energía de afinidad en comparación con el cariofileno, con valores de -7.3 kcal/mol y -6.9 kcal/mol, respectivamente. Estos terpenos establecieron múltiples interacciones con los aminoácidos de la enzima, lo que sugiere que estas interacciones podrían ser responsables de su alta afinidad. Además, se evaluó la estabilidad de las interacciones entre los ligandos y la enzima tanto en un panorama competitivo como no competitivo. Los resultados de las simulaciones de dinámica molecular revelaron que las interacciones entre la glucosiltransferasa y la UDP-glucosa, el timol y el carvacrol fueron estables durante 50 ns de simulación. Por último, se evaluó *in vitro* el efecto de la combinación de carvacrol y gentamicina en el crecimiento de *E. coli*. Se observó que el tratamiento previo con carvacrol aumentó la sensibilidad de *E. coli* a la gentamicina, lo que sugiere que el carvacrol podría actuar como un potenciador de la actividad antibiótica.

Palabras clave: Resistencia antibiótica, *Escherichia coli*, gentamicina, carvacrol, timol, cariofileno, análisis *in silico*.

I. INTRODUCCIÓN

La aparición de cepas bacterianas resistentes a antibióticos ha causado diversos problemas que afectan la salud a nivel mundial. Este tipo de resistencia se puede definir como la capacidad que tienen los microorganismos para inhibir los efectos de diversos antibióticos (Morehead & Scarbrough, 2018). La falta de nuevos métodos para tratar enfermedades o infecciones es uno de los mayores problemas de salud en la actualidad. El incremento en el número de bacterias resistentes ha causado que el costo de la atención médica sea más elevado y que los hospitales requieran cuidados más intensivos. Se estima que alrededor de 25,000 muertes al año son a causa de estas bacterias multirresistentes, y debido a estas grandes cifras, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha comenzado a promover el desarrollo de nuevas estrategias para optimizar el uso de los antibióticos (Aguinaga *et al.*, 2018).

Escherichia coli es una de las bacterias que causa infecciones del tracto digestivo en humanos y animales teniendo como principal vía de transmisión la mala manipulación de alimentos durante su procesamiento (Pajohi Alamoti *et al.*, 2022). Otras infecciones causadas por *E. coli* son las del tracto urinario (ITU), siendo esta bacteria responsable del 80% de los casos de esta enfermedad. Debido a esto, surge la necesidad de seleccionar los antibióticos apropiados para detener su efecto. Sin embargo, en los últimos años la velocidad en la que las cepas de *E. coli* se vuelven resistentes a la mayoría de los antibióticos ha ido en aumento (Lee *et al.*, 2018).

Un gran porcentaje de las infecciones están vinculadas a la resistencia mediada por biopelículas, las cuáles son una comunidad de células bacterianas que se encuentran unidas entre sí y adheridas a superficies. Las bacterias que forman biopelículas pueden llegar a tolerar hasta 1000 veces más antibióticos que las bacterias comunes (Yubinbai *et al.*, 2022), provocando que el tratamiento a las infecciones asociadas con estas sea más excesivo. Uno de los factores de virulencia que promueve el crecimiento de biopelículas es la expresión de enzimas como las glucosiltransferasas, las cuales utilizan azúcares para sintetizar glucanos que van a promover la formación de este mecanismo de defensa

(Zhang *et al.*, 2022). Las biopelículas están formadas por sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que ayudan a la formación de estas estructuras y sirven como barrera protectora contra los desinfectantes comerciales. Adicionalmente, se ha observado que la celulosa es uno de los principales componentes de las EPS en las biopelículas de *E. coli*; por lo tanto, es necesario obtener un método para poder inactivar este mecanismo de acción (Lim *et al.*, 2019).

En los últimos años se han comenzado a buscar estrategias para combatir las infecciones causadas por bacterias multirresistentes. Esto debido a que los tratamientos con antibióticos de uso común como la gentamicina resultan ser insuficientes por la presencia de la biopelícula que resulta ser una limitante para que el antibiótico ejerza su mecanismo de acción. Se ha reportado que los aceites esenciales o extractos de plantas brindan propiedades antimicrobianas por medio de cambios en funciones intracelulares, que pueden incluir la interacción de sus bioactivos con enzimas bacterianas vitales (Pajohi Alamoti *et al.*, 2022). Dentro de los aceites esenciales, terpenos como carvacrol, timol y cariofileno han demostrado actividad antibacteriana contra bacterias multirresistentes como *Escherichia coli*. Estos terpenos vegetales han demostrado tener eficacia para inhibir biopelículas las cuales representan uno de los problemas de resistencia bacteriana más estudiados (Ulanowska & Olas, 2021). Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue analizar el efecto de los terpenos vegetales en la actividad de la enzima glucosiltransferasa de *Escherichia coli* y su influencia en la sensibilidad a la gentamicina.

1.1 Hipótesis

Los terpenos vegetales inhiben la actividad de la enzima glucosiltransferasa de *Escherichia coli* y aumentan la sensibilidad a gentamicina.

1.2 Objetivo General

Analizar el efecto de los terpenos vegetales en la actividad de la enzima glucosiltransferasa de *Escherichia coli* y su influencia en la sensibilidad a la gentamicina.

1.3 Objetivos específicos

1.3.1 Identificar *in silico* las poses de terpenos con glucosiltransferasa con la mayor energía de afinidad.

1.3.2 Analizar *in silico* las interacciones entre las poses terpeno-glucosiltransferasa que mostraron mayor energía de afinidad.

1.3.3 Determinar la estabilidad de las interacciones ligando-proteína que mostraron mayor energía de afinidad (Panorama competitivo y no competitivo).

1.3.4 Determinar *in vitro* el efecto de la combinación de carvacrol y gentamicina sobre el crecimiento de *E. coli*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Resistencia bacteriana a antibióticos, uno de los problemas más importantes en la actualidad.

Los antibióticos son medicamentos utilizados para tratar infecciones y enfermedades bacterianas, además de también intentar prevenirlas. A partir del descubrimiento de la penicilina en el año 1928 comenzaron a surgir una gran cantidad de antibióticos con diversas características (Cuadro 1), los cuales lograron grandes avances en la medicina moderna. Sin embargo, con el paso del tiempo se ha observado que la comercialización de antibióticos disminuyó debido al mal uso que se les ha dado (Irfan *et al.*, 2022). Fleming expresó su preocupación al inadecuado uso de la penicilina y la facilidad con la que se lograba desarrollar una resistencia a ésta (Browne *et al.*, 2020). Este tipo de resistencia se puede definir como la capacidad que tienen los microorganismos para inhibir los efectos de diversos antibióticos (Morehead & Scarbrough, 2018). Es decir, cuando una bacteria se vuelve resistente significa que comienza a mutar como respuesta a la actividad del medicamento que se está aplicando. Esto ocasiona que enfermedades como la neumonía o la tuberculosis sean más difíciles y en algunas ocasiones imposibles de poder tratar causando miles de muertes al año además de ser un gran factor de riesgo para la salud humana.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2014 reconoció a la resistencia bacteriana a antibióticos como uno de los problemas que amenazan la salud mundial (Urban-chmiel *et al.*, 2022). El número de bacterias resistentes ha ido en aumento debido a la gran velocidad que tienen para propagarse. La resistencia a antibióticos pone en riesgo la capacidad de curar enfermedades comunes ya que al hacerse resistentes las bacterias causan infecciones cada vez más difíciles de ser tratadas (Irfan *et al.*, 2022). Se estima que para el año 2050 se podría alcanzar 10 millones de muertes, además de causarle al mercado pérdidas de 100 billones de dólares (Ragheb *et al.*, 2019). Según estudios la resistencia a estos fármacos se organiza en cuatro periodos de la historia: el primero entre 1945 a 1963 donde se comenzaban a conocer los riesgos sobre la resistencia, se identificó a *Staphylococcus aureus* como una bacteria que ocasiona brotes de enfermedades y muertes. El segundo periodo abarcó de 1963 a 1981, donde se reportó la propagación de bacterias resistentes como lo son *Salmonella*

typhymurium tanto en humanos como en animales. En el presente se ha dado a conocer que la resistencia además afecta al medio ambiente. El tercer periodo abarcó de 1981 a 1992 donde la OMS comenzó a tomar en cuenta las advertencias hechas con anterioridad, comenzando a difundir información sobre la patogenicidad y los mecanismos de acción de estas bacterias. Por último, el cuarto periodo abarcó los años de 1992 a 2013 donde se consideró como una amenaza emergente y se promovieron estrategias para disminuir el uso de antibióticos, además de señalar su impacto en la economía mundial.

Cuadro 1. Clasificación de los antibióticos

Grupo	Antibiótico	
Betalactámicos	Penicilinas	Penicilina G Penicilina V Cloxacilina Amoxicilina Ampicilina (+ sulbactam) Amoxicilina (+ clavulánica) Piperacilina Piperacilina (+tazabactam)
	Cefalosporinas	Primera generación: . Cefadroxilo
	Monobactamas	. Cefalexina . Cefazolina Segunda generación: . Cefaclor . Cefoxitina . Cefuroxima Tercera generación: . Cefditoreno . Cefixima . Cefminox . Cefpodoxima . Ceftazidima . Ceftriaxona

		Cuarta generación: Cefepima Aztreonam
	Carbapenémicos	Imipenem Meropenem Ertapenem
Tetraciclinas		Clortetraciclina Doxixiclina Minociclina Oxitetraciclina Tetraciclina Tigeciclina
Aminoglicósidos		Amikacina Espectinomicina Estreptomomicina Gentamicina Kanamicina Neomicina Tobramicina
Peptídicos	Polipeptídicos	Bacitracina Gramicidina
	Glucopéptidos	Vancomicina Teicoplanina
	Lipopéptidos	Daptomicina
	Polimixinas	Polimixina B Colistina
Quinolonas		Ácido pipemídico Ciproloxacino Levoloxacino Moxiloxacino Norloxacino Oloxacin

Fuente: Arco, (2014).

Entre las bacterias que se han vuelto resistentes a los antibióticos se encuentra *Escherichia coli* es una bacteria Gram negativa que causa el mayor número de infecciones graves tanto en humanos como en animales. Este patógeno se transmite principalmente por medio del mal manejo y procesamiento de los alimentos, además de ser una de las principales causas de mastitis en ganado, dando como resultado que se pueda transmitir el patógeno a los seres humanos por medio del consumo de productos lácteos. Debido a esto es que el uso en exceso de antibióticos ha provocado el desarrollo de cepas resistentes de *E. coli*. (Pajohi Alamoti *et al.*, 2022). Datos recientes indican que las cepas de *E. coli* son resistentes a todo tipo de antibióticos incluyendo la producción de betalactamasas, carbapenemasas, resistencia a fluoroquinolonas, aminoglucósidos y colistina. La resistencia de *E. coli* se debe al desarrollo de mecanismos como la inactivación del antibiótico y de algunas enzimas (Paitan, 2018).

Los antibióticos cuentan con diversos mecanismos de acción como la inhibición de la síntesis de la pared celular (antibióticos β -láctamicos y glucopéptidos), antibióticos que alteran a la membrana celular bacteriana (lipopéptidos cíclicos y polimixinas), antibióticos que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos (quinolonas y rifamicinas), antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas (tetraciclinas, aminoglucósidos, macrólidos, lincosamidas y oxazolidinonas) y sustancias antimicrobianas que interfieren con las vías metabólicas (sulfonamidas por si solas o en conjunto con trimetoprim) (Baran *et al.*, 2023). En caso de los aminoglucósidos las causas de su resistencia son mutaciones que alteran los sitios de unión de los antibióticos. Las bacterias que producen aminoglucósidos se protegen de sus propios metabolitos por medio de metiltransferasas las cuales inhiben la unión con su ARN. Otro de los mecanismos de resistencia son las enzimas que modifican a este tipo de antibióticos. Se dividen en tres grupos, las acetiltransferasas que catalizan la acetilación de los aminoazúcares, en nucleotidriltransferasas que unen nucleótidos a los grupos hidroxilo y por último se encuentran las fosfotransferasas las cuales fosforilan el grupo hidroxilo del antibiótico (Urban-chmiel *et al.*, 2022).

La gentamicina es un antibiótico aminoglucósido de amplio espectro que es usado preferentemente contra bacterias aerobias Gram negativas. Es uno de los aminoglucósidos más recetados debido a su bajo costo y su gran disponibilidad. Otro beneficio de la gentamicina es que genera sinergia cuando se combina con otros antibacterianos como los

betalactámicos (Tiwari *et al.*, 2021). Durante los últimos años se ha demostrado que la gentamicina tiene buenos resultados clínicos, es empleada también para el tratamiento de infecciones actinomicóticas, apendicitis, fibrosis quística, entre otras (Chen *et al.*, 2014). El mecanismo de acción de la gentamicina implica la inhibición de la síntesis proteica bacteriana al unirse al ribosoma bacteriano, lo que resulta en la detención de la síntesis de proteínas y afecta la función y supervivencia de la bacteria (Shan *et al.*, 2015).

La resistencia a los antibióticos es una crisis que debe abordarse lo antes posible para evitar que las enfermedades lleguen a ser más graves de lo que se han registrado (Podolsky, 2018). Son diversas las causas que originan que las bacterias obtengan tal resistencia, pero la mayoría se relaciona con el mal uso de agentes antimicrobianos en la medicina y en la industria agrícola. También influye la forma del cambio en la alimentación de la población, la contaminación de aguas residuales y residuos que se obtienen de las industrias farmacéuticas y de hospitales (Irfan *et al.*, 2022).

Las bacterias han desarrollado varios mecanismos de resistencia como las mutaciones que se observan al ser expuestas al antibiótico y la transferencia horizontal de genes, donde obtienen genes con mutaciones provenientes de bacterias que cuentan con una resistencia mayor. El desarrollo de nuevos antibióticos ha ido en decadencia ya que algunos de ellos se volvieron ineficaces para tratar enfermedades, por lo que se han intentado buscar nuevos métodos para evitarlo (Browne *et al.*, 2020).

El tipo más común de resistencia es la innata, esto sucede cuando una bacteria tiene la ausencia de un receptor necesario para el antibiótico, impermeabilidad de la pared celular o por la producción de ciertas enzimas. Estos cambios se dividen en dos grupos, cambios primarios y cambios secundarios, en el caso del primer grupo son el resultado de una mutación que se forma de manera espontánea y no es necesario que tenga contacto con el antibiótico. Se ha propuesto que las bacterias obtienen su resistencia eliminando la parte activa del antibiótico, provocando cambios a la estructura, cambios a nivel enzimático, la sobreexpresión de la enzima inactivada por el antibiótico, así como también por medio de nuevas vías metabólicas y por medio del aumento en la concentración de los metabolitos que inhiben la acción del antibiótico (Urban-chmiel *et al.*, 2022).

2.2 Aplicación de aceites esenciales como estrategia de control en la formación de biopelículas.

Una biopelícula es una comunidad de células bacterianas envueltas en una matriz polimérica extracelular que se adhiere a superficies bióticas y abióticas (Miquel *et al.*, 2016). La biopelícula está compuesta por sustancias poliméricas extracelulares (SPE) que son producidas por las células y se encuentran principalmente conformados por polisacáridos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Ortega-Ramirez *et al.*, 2020). Las SPE se encargan de proteger a las células de diversos factores ambientales incluyendo la exposición a agentes antimicrobianos, además le ofrecen una barrera física y química a la biopelícula para que esta pueda sobrevivir a condiciones agresivas, estas pueden incluir la exposición a agentes antimicrobianos, cambios en la temperatura, la presión osmótica, y otros estresores ambientales. (Miquel *et al.*, 2016). *E. coli* puede formar biopelículas en superficies que son usadas para transportar y almacenar alimentos o en superficies de acero inoxidable (Ryu & Beuchat, 2005). La formación de biopelículas puede favorecerse debido a diversos factores como los cambios de nutrientes, temperatura, presión osmótica, pH, entre otros. *E. coli* divide su proceso de formación de biopelículas en cinco etapas: adhesión reversible, adhesión irreversible, formación de colonias, maduración de biopelículas y por último dispersión (Zhou, *et al.*, 2022).

En la adhesión reversible los microorganismos captan nutrientes y por medio de sus orgánulos y proteínas de membrana van a intentar adherirse a la superficie. En la adhesión irreversible los microorganismos comienzan a expulsar SPE que ayudan a una mejor adhesión con la superficie. La formación de colonias ocurre cuando los microorganismos que se encuentran en la superficie comienzan a crecer. Durante este proceso las SPE van en aumento para así formar una capa de gel en la superficie que cumple como una barrera protectora para las bacterias. Durante la maduración de la biopelícula las colonias de la bacteria se acumulan y aumentan el grosor de la película para así pasar a tener una estructura tridimensional. Por último, la dispersión de la biopelícula se puede dividir en dos procesos, dispersión activa y pasiva, en el caso del primer tipo se producen enzimas que van a degradar la matriz de la biopelícula causando así su dispersión. Por otro lado, en la dispersión pasiva

la degradación dependerá de factores externos, siendo uno de ellos el desgaste de la biopelícula (Zhou, *et al.*, 2022).

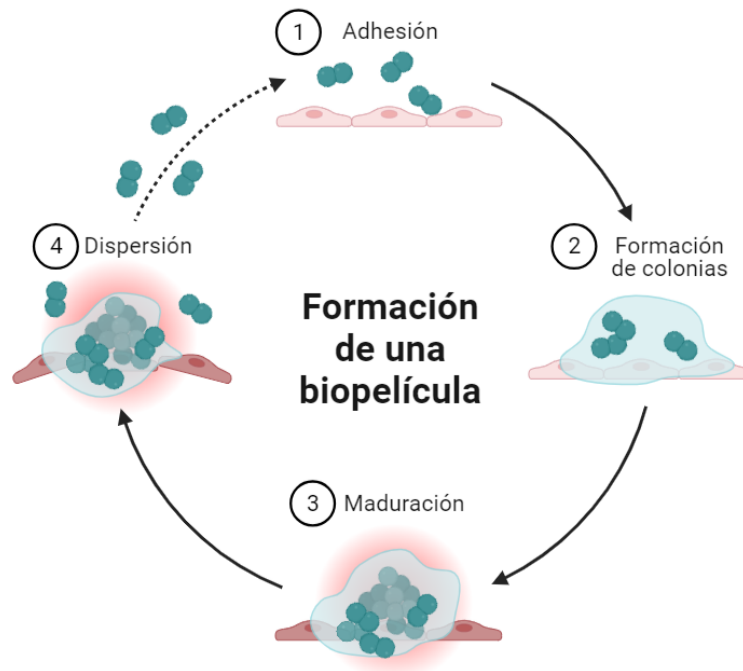


Figura 1. Formación de biopelículas.

Elaboración propia con base en Zhou *et al.*, (2022).

La formación de biopelículas en *E. coli* resulta ser una amenaza al momento de procesar y producir alimento. Una vez que la biopelícula se forma la bacteria aumenta 500 veces más su resistencia a desinfectantes por lo cual el uso de estos deberá aumentar entre 10 a 100 veces más para lograr la muerte de la bacteria. *E. coli* puede encontrarse en todas las etapas de la producción de alimentos por su facilidad de formar biopelículas en superficies de acero inoxidable, desagües y paredes en áreas de procesamiento de alimentos. Si se observa la presencia de *E. coli* en un alimento este deberá ser retirado ya que representa una gran amenaza para la salud de los consumidores y puede representar grandes pérdidas económicas (Zhou, *et al.*, 2022).

Debido a esta problemática se requiere encontrar agentes antimicrobianos alternativos y con mayor eficacia para combatir a la resistencia a los antibióticos que causan las biopelículas (Basavegowda & Baek, 2022).

Como estrategia para combatir la resistencia a antibióticos, el uso de extractos de plantas puede fungir como una estrategia prometedora por su contenido de compuestos bioactivos. Compuestos como alcaloides, fenoles, taninos, flavonoides y péptidos son responsables de la actividad antimicrobiana de los extractos que los contienen, Se ha observado que las combinaciones de dos o más extractos de plantas producen una mejor capacidad antimicrobiana, la cual puede aumentar su eficacia si se combina con algún antibiótico. Otra estrategia que se ha desarrollado es el uso de la combinación de aceites esenciales y antibióticos (Basavegowda & Baek, 2022). Los aceites esenciales son sustancias hidrofóbicas provenientes del metabolismo secundario de plantas aromáticas. Estos aceites pueden encontrarse en flores, raíces, tallos y hojas de dichas plantas y han logrado disminuir la resistencia bacteriana (Ersanli *et al.*, 2023). Son aceptados por los consumidores debido a su alta volatilidad y su capacidad de ser biodegradables (Pajohi Alamoti *et al.*, 2022).

Los aceites esenciales son conocidos por su actividad antimicrobiana, que se debe tanto a su composición química como a la cantidad de cada componente presente en el aceite. Están compuestos principalmente por terpenos y terpenoides, siendo hidrófobos en su mayoría. Esta hidrofobicidad les permite penetrar la membrana celular bacteriana y provocar su destrucción, lo que resulta en la muerte de la célula. Además, su mecanismo de acción inhibe el crecimiento bacteriano y también tiene la capacidad de prevenir la formación de biopelículas. Los componentes hidrofóbicos impregnan las sustancias lipídicas de la membrana celular y disminuyen la formación de biopelículas, mientras que los hidrofílicos se difunden a través de la matriz de exopolisacáridos de la biopelícula (Ersanli *et al.*, 2023). La eficacia de un aceite esencial cambia según la especie de planta de la que provengan y la bacteria a la cual se le está aplicando según la estructura de su pared celular. Se ha reportado que en aceites esenciales comerciales como lo son de anís, canela, comino, clavo, limón, orégano y laurel se encuentran componentes como el timol y carvacrol los cuales tienen una mayor actividad antibacteriana en diferentes microorganismos como *S. typhimurium* y *E. coli* (Basavegowda & Baek, 2022).

Los aceites esenciales actúan de manera sinérgica, es decir, al combinar dos sustancias se crea un efecto mayor que el que tendría cada componente de manera individual. En el caso de los agentes antimicrobianos se observa que la sinergia entre la combinación ya sea de extractos de plantas o aceites esenciales con antibióticos convencionales ha demostrado ser una estrategia prometedora para el prevenir el desarrollo de resistencia bacteriana (Basavegowda & Baek, 2022),

2.3 Efecto inhibitorio de los terpenos vegetales combinados con gentamicina sobre la actividad de la enzima glucosiltransferasa de *Escherichia coli*.

Las biopelículas de *E. coli* contienen celulosa, un exopolisacárido que ha demostrado inhibir a los desinfectantes. La síntesis de la celulosa está mediada por la enzima glucosiltransferasa, que se divide en complejos BcsA, BcsB y BcsC. Estos complejos son responsables de la polimerización y secreción de la celulosa, promoviendo la formación de biopelículas (Ortega-Ramirez *et al.*, 2020). La celulosa es un polímero formado por moléculas de glucosa unidas a los carbonos C1 y C4, y su síntesis se lleva a cabo mediante glucosiltransferasas que polimerizan la glucosa activada por UDP. Las subunidades BscA y BscB forman un complejo que transporta y sintetiza la celulosa en las biopelículas de *E. coli*. La glucosiltransferasa contiene una hélice corta, también conocida como "hélice dedo", que interactúa con la glucosa aceptora de la celulosa. La activación de BscA y BscB se produce mediante la molécula c-di-GMP, la cual controla la expresión de genes específicos en las células bacterianas (Ortega-Ramirez *et al.*, 2020). La estructura de la BscA-BscB consta de 18 glucosas, un "lazo de entrada" que permite a la glucosa terminal tener contacto con la entrada del canal transmembranal (TM) de BscA, que contiene el aminoácido Trp383. Cuando el dedo hélice se posiciona hacia la entrada del canal TM, el aminoácido Asp343 se acerca al C4 de la glucosa terminal de la celulosa (Figura 2). Esto provoca que el sitio activo de BscA quede vacío, lo que da lugar a que la estructura de la enzima inicie nuevamente un ciclo de elongación de la cadena de glucosas (Morgan *et al.*, 2016).

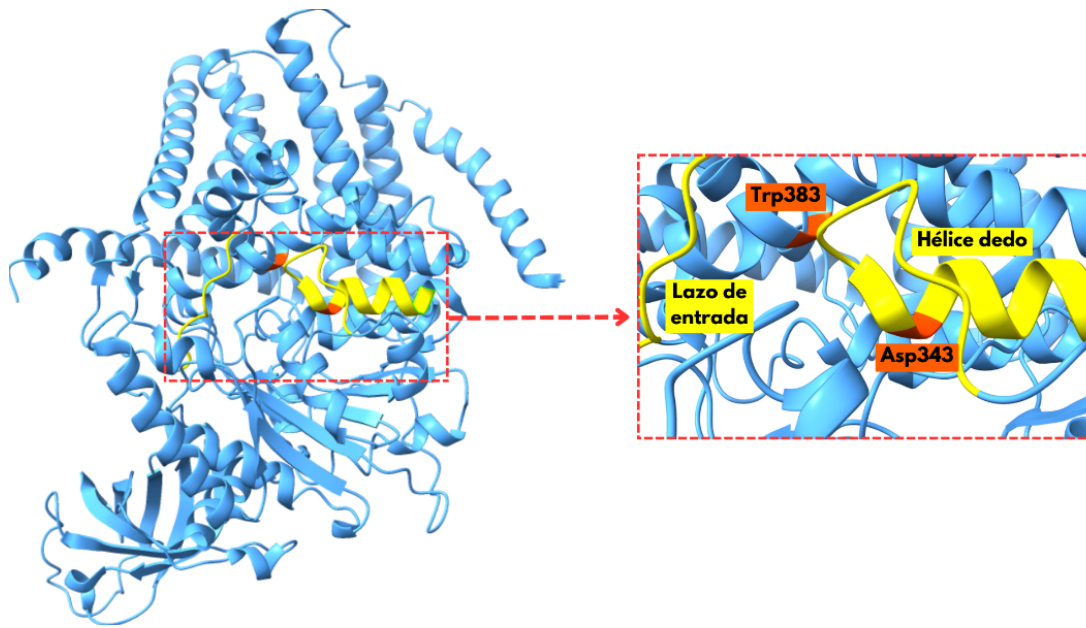


Figura 2. Estructura de la enzima glucosiltransferasa y su sitio activo (5E1Y).

Elaboración propia con base en Morgan *et al.*, (2016).

Las biopelículas pueden ser difíciles de eliminar ya que son resistentes a desinfectantes. Sin embargo, se ha descubierto que ciertos compuestos naturales, como los terpenos vegetales, tienen propiedades antibiopelícula. Los terpenos vegetales son compuestos naturales que se producen en plantas y desempeñan un papel importante en la protección de esta contra patógenos y otros factores estresantes, pueden ser tóxicos para insectos, hongos y bacterias (Kotsinis *et al.*, 2023). Los terpenos vegetales se pueden encontrar en una gran variedad de aceites esenciales, los cuales se han estudiado en la inhibición de la formación de biopelículas (Y. G. Kim *et al.*, 2016). Las sustancias de origen vegetal, han sido utilizadas en la medicina tradicional desde tiempos antiguos. Actualmente, hay alrededor de 300 aceites esenciales disponibles en el mercado, que ya han sido incorporados en varios productos para consumo humano debido a su seguridad en dosis pequeñas y bajo recomendaciones específicas. Los terpenos del orégano tienen una excelente actividad antimicrobiana, aunque su sabor y olor es fuerte pueden ser suavizados al combinarlos con otros compuestos (Scandorieiro *et al.*, 2023).

El aceite esencial de orégano, ha demostrado tener actividad antibiopelícula contra patógenos gram positivos y gram negativos, incluyendo cepas resistentes a múltiples antibióticos. Se ha reportado que el aceite esencial de orégano y sus principales compuestos carvacrol y timol presentan potencial para utilizarse como agentes antimicrobianos (Figura 3).

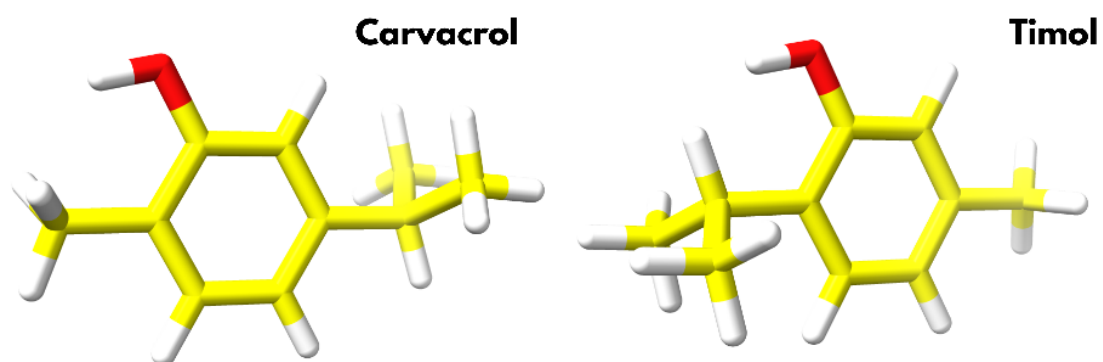


Figura 3. Terpenos vegetales.

Elaboración propia, estructuras obtenidas de PubChem

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Estructuras de los ligandos y proteína utilizados en el estudio.

Para la siguiente investigación se llevó a cabo una recopilación de las estructuras de los compuestos estudiados usando la plataforma PubChem (S. Kim *et al.*, 2021) para conocer las características fisicoquímicas y la estructura del Carvacrol (CID [10364](#)), Timol (CID [6989](#)), Cimeno (CID [7463](#)), Citral (CID [638011](#)), Eugenol (CID [3314](#)), Eucaliptol (CID [2758](#)), Mirreno (CID [31253](#)), Limoneno (CID [22311](#)), Cariofileno (CID [5281515](#)) y Linalool (CID [6549](#)). De igual forma se obtuvo la estructura del antibiótico Gentamicina (CID [3467](#)). Por su parte la estructura cristalográfica de la Glucosiltransferasa ([5E1Y](#), EC [2.4.1.12](#)) se obtuvo de la plataforma Protein Data Bank (Berman *et al.*, 2000).

3.2 Determinación de interacciones moleculares entre glucosiltransferasa, gentamicina y terpenos vegetales.

Para el procedimiento de anclaje molecular se empleó el software UCSF Chimera versión 1.16 (Pettersen *et al.*, 2004) para procesar las estructuras de los terpenos vegetales, el antibiótico gentamicina y la enzima glucosiltransferasa. Después, se realizó la minimización de la estructura de cada molécula con el fin de optimizar las posiciones de los átomos y garantizar su estabilidad energética. Posteriormente, se seleccionaron las coordenadas de interacción en el sitio activo de la glucosiltransferasa, simulando panoramas competitivos y no competitivos. Estas coordenadas se introdujeron en la herramienta "Autodock-vina" para llevar a cabo el acoplamiento molecular y obtener datos que permitieran identificar la mejor pose de interacción ligando-proteína con una alta energía de afinidad (expresada en Kcal/mol) y una baja desviación cuadrática media (RMSD). Mientras que 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 terpenos y la enzima glucosiltransferasa a lo largo de una simulación de dinámica molecular.

Con el objetivo de evaluar la estabilidad de las interacciones moleculares entre las combinaciones de terpenos y la enzima glucosiltransferasa, se llevó a cabo una simulación de dinámica molecular utilizando el software GROMACS. Este software proporciona un conjunto de herramientas altamente eficientes y escalables para la simulación molecular. El proceso comenzó con la preparación de la topología de las moléculas, que define las características físicas y químicas del sistema de estudio. Esta etapa incluyó una descripción detallada de las moléculas y las fuerzas interatómicas. Después, se procedió a la preparación del sistema de simulación, que involucró la solvatación del sistema ligando-enzima, la minimización y la adición de iones. La solvatación consistió en la creación de un entorno acuoso para simular las condiciones biológicas en las que suelen tener lugar las interacciones moleculares. La minimización se realizó para reducir la energía potencial del sistema y garantizar un estado inicial estable para la simulación. La adición de iones se llevó a cabo para neutralizar la carga del sistema. Posteriormente, se realizó el equilibrio de la simulación, un proceso esencial para estabilizar las condiciones de temperatura y presión en el sistema. Una vez alcanzado el equilibrio, se procedió a 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 realizó un análisis detallado de la desviación cuadrática media de la posición del ligando en la enzima durante un período de 50 nanosegundos. Esta medida proporcionó información sobre la estabilidad de las interacciones ligando-enzima a lo largo del tiempo, permitiendo evaluar la viabilidad de las combinaciones de terpenos para inhibir la actividad de la glucosiltransferasa.

3.4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de carvacrol contra *Escherichia coli*.

Se evaluó el efecto antibacteriano del carvacrol (W282197, Sigma Aldrich, Toluca, México) contra *E. coli*, siguiendo el protocolo descrito por Tapia-Rodríguez (2018). Se prepararon diferentes concentraciones de carvacrol en un rango de 0 a 3 mg/mL utilizando tubos de ensayo que contenían 6 mL de medio de cultivo Luria Bertani y un inóculo ajustado a 10⁶ UFC/mL de *E. coli*. Los tubos se incubaron a 37°C durante 24 horas.

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (mg/mL) se determinó como la concentración más baja de carvacrol que inhibió el crecimiento bacteriano de *E. coli*. Se identificó visualmente la menor concentración que no presentó crecimiento visible de la bacteria. Todos los experimentos se realizaron en triplicado.

3.5 Evaluación de cambios en la sensibilidad de *Escherichia coli* a la gentamicina mediante la medición del diámetro del halo de inhibición tras la exposición previa al carvacrol.

Una vez determinada la CMI de carvacrol contra *E. coli*, se procedió a evaluar los cambios en la sensibilidad de la bacteria a la gentamicina (discos con 10 µg) utilizando el método de disco de difusión. Se prepararon placas de agar con medio de cultivo Mueller-Hinton, utilizando cepas previamente expuestas a la CMI de carvacrol y un control con la bacteria sin exposición previa. Se colocaron discos impregnados con gentamicina en la superficie de las placas, asegurando una distribución uniforme. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Después de la incubación, se midió el diámetro del halo de inhibición formado alrededor de cada disco de gentamicina. Este diámetro refleja la sensibilidad de *E. coli* a la acción antibacteriana de la gentamicina. Se registraron los valores de los diámetros de inhibición para el grupo control y el grupo tratado con carvacrol. Se compararon los diámetros de inhibición (mm) obtenidos entre los dos grupos para determinar los cambios en la sensibilidad a la gentamicina tras la exposición previa a carvacrol. Todos los experimentos se llevaron a cabo en triplicado.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Energías de afinidad de diferentes ligandos competitivos y no competitivos hacia la enzima glucosiltransferasa

Los resultados muestran una variación en la afinidad de diferentes ligandos hacia la enzima glucosiltransferasa, esencial en la formación de la biopelícula de *E. coli*. Se observa una clara tendencia en la cual el carvacrol y el timol, dos terpenos derivados de plantas, exhiben una alta afinidad tanto en un panorama competitivo como no competitivo.

El carvacrol muestra una afinidad competitiva de -7.3 kcal/mol, siendo el terpeno con la segunda mayor afinidad después del sustrato natural, UDP-glucosa (Cuadro 2). Además, en condiciones no competitivas, el carvacrol sigue manteniendo una alta afinidad de -4.7 kcal/mol (Cuadro 2). Estos resultados sugieren que el carvacrol puede tener un papel importante como inhibidor de la glucosiltransferasa, interfiriendo en la síntesis de la biopelícula de *E. coli*. De manera similar, el timol también presenta una alta afinidad competitiva y no competitiva de -6.9 kcal/mol y -4.7 kcal/mol, respectivamente. Estos resultados respaldan la idea de que el timol podría funcionar como un potencial inhibidor de la glucosiltransferasa.

El cariofileno también muestra una afinidad competitiva significativa de -6.9 kcal/mol y no competitiva de -4.9 kcal/mol, lo que indica su posible papel en la inhibición de la glucosiltransferasa (Cuadro 2). Estos hallazgos resaltan el potencial del carvacrol, timol y cariofileno como inhibidores competitivos y no competitivos de la glucosiltransferasa. Estos compuestos naturales pueden desempeñar un papel clave en la interferencia de la formación de la biopelícula bacteriana, lo que representa un nuevo enfoque en la lucha contra las infecciones bacterianas.

Cuadro 2: Energías de Afinidad de Diferentes Ligandos Competitivos y No Competitivos hacia la Enzima Glucosiltransferasa.

Ligando	Afinidad competitiva (kcal/mol)	Afinidad no competitiva (kcal/mol)
UDP-glucosa (sustrato)	-10.9	ND
Gentamicina	-8.3	ND
Timol	-6.9	-5.5
Cariofileno	-6.9	-6.2
Linalool	-6.2	-4.4
Eugenol	-6.5	-5.1
Eucaliptol	-6.1	-4.8
Citral	-6.3	-4.7
Mirceno	-6.1	-4
Carvacrol	-7.3	-5.3
Cimeno	-6.6	-5
Limoneno	-6.7	-5.1

ND. No determinado

Estos resultados aportan un significativo avance en el entendimiento de la interacción entre terpenos y la enzima glucosiltransferasa, responsable de la síntesis de la celulosa en la formación de la biopelícula de *E. coli*. En el contexto competitivo, la evidencia sugiere que los terpenos, en particular el carvacrol, timol y cariofileno, muestran una considerable afinidad por la enzima, rivalizando incluso con el sustrato natural, la UDP-glucosa, y con el antibiótico gentamicina. En el escenario no competitivo, también se observó una marcada afinidad con el timol y el carvacrol mostrando niveles similares de interacción.

Estos hallazgos resaltan el potencial de estos terpenos como inhibidores efectivos de la enzima glucosiltransferasa, lo que sugiere la posibilidad de su uso en estrategias de mitigación de la formación de biopelículas en *E. coli*. El estudio de estas interacciones a nivel molecular puede ayudar a desvelar nuevos enfoques en la lucha contra las bacterias resistentes a los antibióticos y proporciona un fundamento para el desarrollo de futuras investigaciones y posibles aplicaciones terapéuticas de estos compuestos. Estos resultados son especialmente relevantes en el contexto actual, en el que la resistencia a los antibióticos se ha convertido en una preocupación mundial. La posibilidad de encontrar compuestos naturales que puedan contribuir a la lucha contra este fenómeno es una perspectiva alentadora y necesaria para el avance de la medicina.

4.2 Tipos de interacciones y estabilidad dinámica entre los terpenos con mayor afinidad por la glucosiltransferasa en un panorama competitivo

La UDP-glucosa, sustrato principal de la glucosiltransferasa, manifiesta una marcada afinidad por esta enzima, reflejada en un valor de energía de afinidad de -10.9 kcal/mol, indicativo de una interacción favorable y robusta. Esta afinidad se ve reforzada por la formación de enlaces de hidrógeno con una serie de aminoácidos en la enzima, incluyendo ASP180, ASN229, GLU151, LYS226, TRP383, LYS508, ARG382 y THR506. Estos enlaces de hidrógeno facilitan la fijación del sustrato al sitio activo de la enzima, proporcionando un marco estable para la reacción catalítica. Además de los enlaces de hidrógeno, la interacción entre la UDP-glucosa y la glucosiltransferasa también incluye enlaces carbono-hidrógeno con los aminoácidos ALA225, SER148 y GLY319, así como enlaces π -alquilo con los aminoácidos ALA225 y LYS226 (Figura 4). Estos enlaces adicionales contribuyen a la estabilidad general del complejo enzima-sustrato. Sin embargo, no todas las interacciones entre la UDP-glucosa y la glucosiltransferasa son favorables. El aminoácido ASP246, que presenta una carga positiva, interactúa con el sustrato, pero la naturaleza de esta interacción no es favorable.

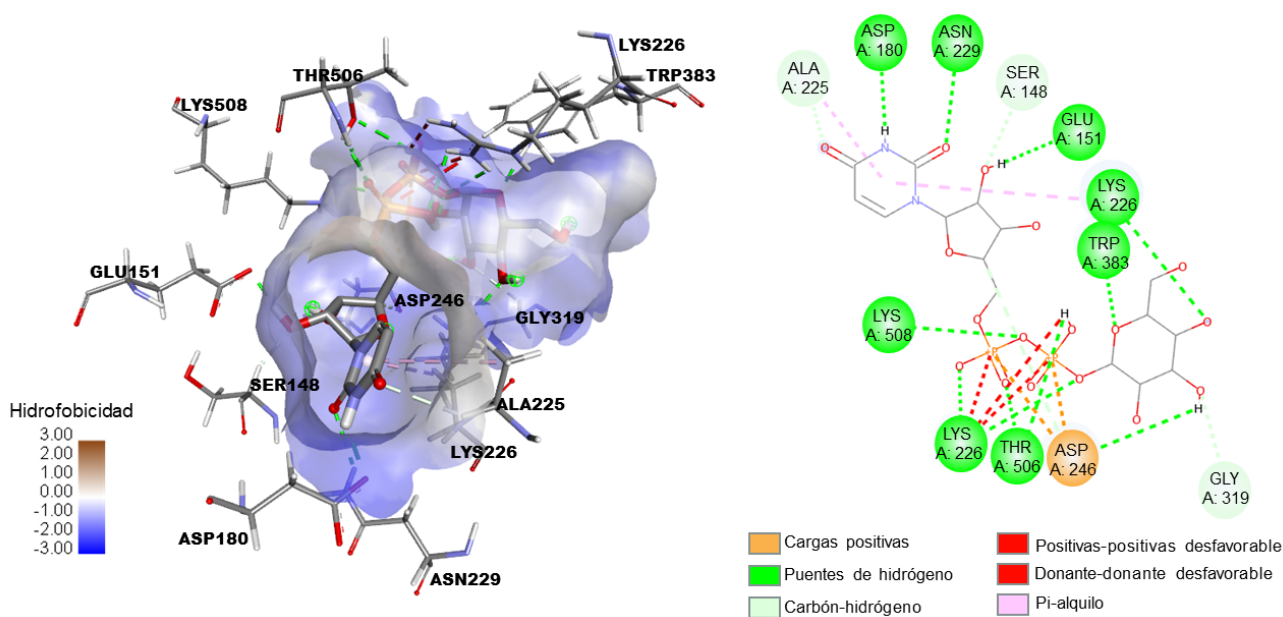


Figura 4. Interacciones moleculares entre la UDP-glucosa y el sitio activo de la glucosiltransferasa.

En una posible situación competitiva, la gentamicina muestra una interacción notable con la glucosiltransferasa de *E. coli*, reflejada en una energía de afinidad de -8.3 kcal/mol. Esta interacción comprende una variedad de enlaces, sugiriendo un posible efecto competitivo contra el sustrato natural, la UDP-glucosa. La gentamicina establece enlaces de hidrógeno con los aminoácidos ARG382 y LYS226, similares a las interacciones que la UDP-glucosa realiza con estos residuos. Esto sugiere una potencial competencia por estos sitios de interacción. Además, la gentamicina establece enlaces carbono-hidrógeno con los aminoácidos THR506 y HIS276. Además, se destaca la presencia de cargas positivas generadas por la gentamicina en los aminoácidos GLU342, ASP343, ASP180, ASP248, ASP246 y GLU151. Estas cargas positivas pueden interactuar electrostáticamente con la enzima, lo que podría interferir con la interacción normal de la enzima con la UDP-glucosa. La gentamicina también forma puentes salinos con los aminoácidos ASP246 y ASP343, una interacción que no está presente con la UDP-glucosa. Un enlace pi-alkilo generado por el aminoácido HIS249 se establece con la gentamicina, una interacción que no se observa con la UDP-glucosa.

La energía de afinidad de la gentamicina y su potencial competitivo puede ser atribuido a su interacción con los residuos ASP246 y TRP383 que interaccionan con la glucosa terminal en la síntesis de la celulosa. Aunque la gentamicina también genera enlaces desfavorables con el aminoácido LYS508, el balance de estas interacciones puede dar lugar a una inhibición competitiva de la actividad de la glucosiltransferasa por parte de la gentamicina (Figura 5).

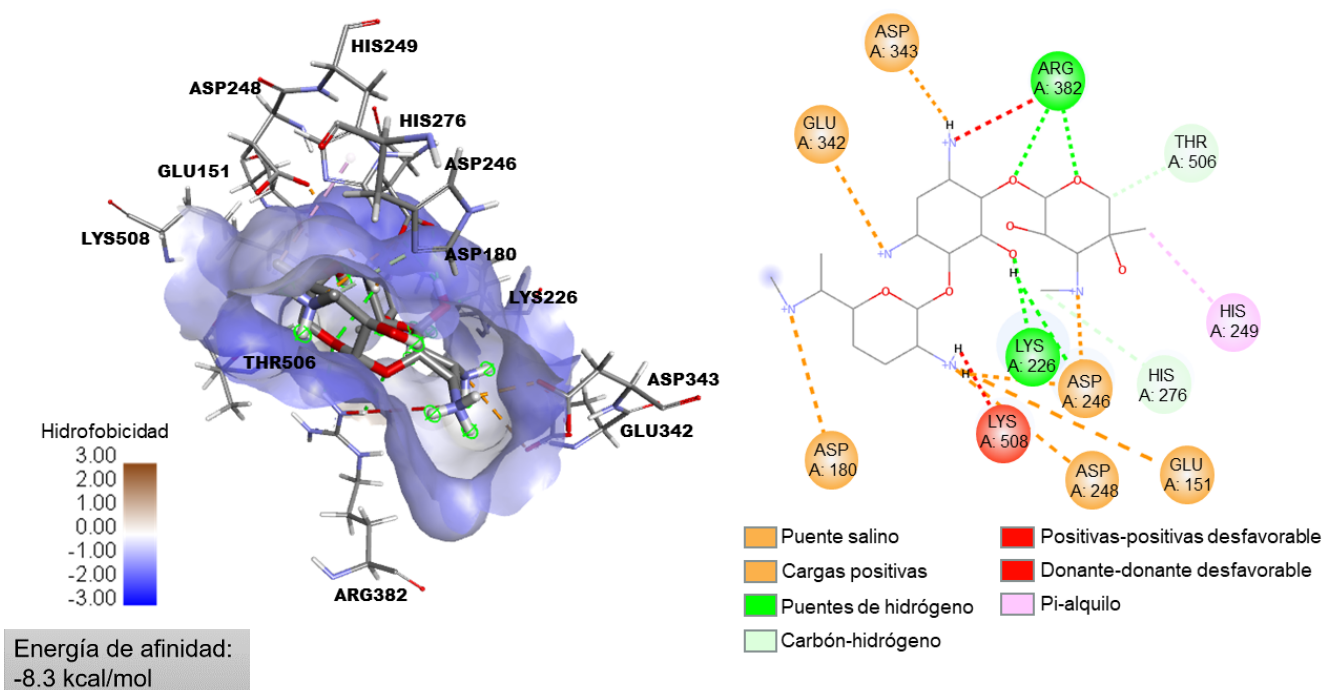


Figura 5. Interacciones moleculares entre la gentamicina y el sitio activo de la glucosiltransferasa.

En un contexto de competencia potencial, el terpeno carvacrol muestra una afinidad significativa hacia la glucosiltransferasa de *E. coli*, reflejada en una energía de afinidad de -7.3 kcal/mol. Esta interacción, aunque menor que la de la UDP-glucosa, es notable y podría tener implicancias en la actividad de la enzima. El carvacrol establece múltiples interacciones con la enzima, incluyendo enlaces pi-sigma y apilamientos pi-pi con el aminoácido TYR149, un residuo que no interactúa con la UDP-glucosa. Esto sugiere un posible sitio de unión alternativo para el carvacrol. Además, el carvacrol genera apilamientos pi-amida con el aminoácido SER148, y enlaces pi-alquilo con los aminoácidos LYS226, PHE503 y TYR149.

Esta última interacción es notable, ya que la LYS226 también establece interacciones con la UDP-glucosa y la gentamicina, sugiriendo una competencia potencial. Además, el carvacrol establece enlaces alquilo con los aminoácidos PRO147, LYS226 y ALA225, ampliando aún más su rango de interacción con la glucosiltransferasa (Figura 6). Estos hallazgos sugieren que el carvacrol tiene la capacidad de interactuar con la glucosiltransferasa, posiblemente interfiriendo con la unión y procesamiento de la UDP-glucosa. Esta interacción puede inhibir la actividad de la glucosiltransferasa, bloqueando potencialmente la síntesis de la celulosa y, en última instancia, la formación de la biopelícula por parte de *E. coli*.

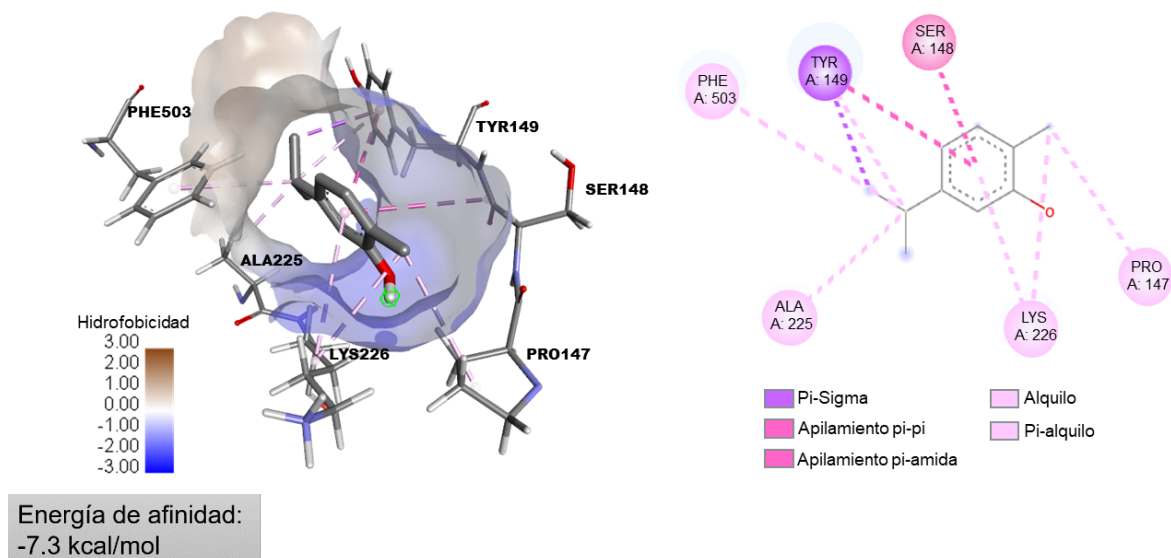


Figura 6. Interacciones moleculares entre el carvacrol y el sitio activo de la glucosiltransferasa.

En el caso del terpeno timol, se presenta una afinidad notable hacia la enzima glucosiltransferasa de *E. coli*, mostrando una energía de afinidad de -6.9 kcal/mol. Aunque este valor es menor que el de la UDP-glucosa y el carvacrol, todavía sugiere una interacción potencialmente relevante con la enzima. El timol establece un enlace de hidrógeno con el aminoácido ASP180, una interacción electrostática que no es compartida por el carvacrol, y que sí es presente en la interacción entre la UDP-glucosa y la enzima.

Este hallazgo sugiere una posible competencia entre el timol y la UDP-glucosa por el sitio de unión en la glucosiltransferasa.

Además, el timol genera una interacción pi-sigma con el aminoácido TYR149, al igual que el carvacrol, lo que sugiere un posible sitio de unión alternativo para el timol. También se observan enlaces alquilo con los aminoácidos LYS226 y ALA225, al igual que en la interacción entre el carvacrol y la enzima. Esta observación es notable dado que la LYS226 también establece interacciones con la UDP-glucosa y la gentamicina, lo que sugiere un panorama de competencia potencial. El timol también establece enlaces pi-alquilo con los aminoácidos VAL505, PHE503 y ALA225, lo que indica una interacción diversa con la enzima (Figura 7). En conjunto, estos hallazgos sugieren que el timol puede interactuar con la glucosiltransferasa de *E. coli* a través de múltiples interacciones débiles. Aunque se necesitan más estudios para confirmar la relevancia biológica de estas interacciones, estos resultados indican un posible papel del timol en la inhibición de la glucosiltransferasa, potencialmente interfiriendo en la síntesis de la celulosa y, por lo tanto, en la formación de la biopelícula en *E. coli*.

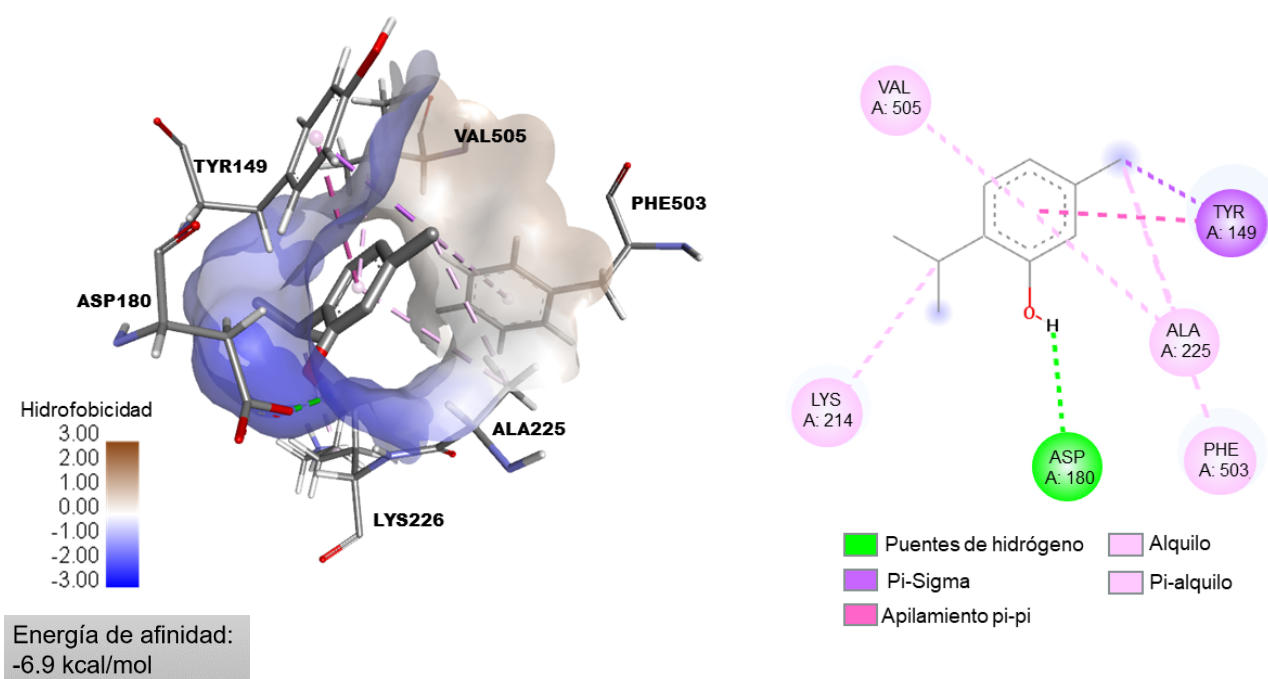


Figura 7. Interacciones moleculares entre el timol y el sitio activo de la glucosiltransferasa.

El cariofileno, un terpeno, exhibe interacciones notables con la enzima glucosiltransferasa de *E. coli*, mostrando una energía de afinidad de -6.9 kcal/mol. Aunque esta energía es más baja en comparación con otros compuestos como la UDP-glucosa o el carvacrol, aún sugiere una interacción significativa con la enzima. El cariofileno establece enlaces alquilo con los aminoácidos PRO147, LYS226 y VAL505, lo que demuestra una posible interacción hidrofóbica con la enzima. Esto es interesante, ya que estas interacciones hidrofóbicas no son comunes con la UDP-glucosa y otros inhibidores potenciales como el carvacrol o el timol. Además, el cariofileno establece enlaces pi-alquilo con los aminoácidos TYR149 y PHE503, proporcionando evidencia de interacciones de tipo van der Waals con la enzima. Estas interacciones indican un panorama de unión alternativo y quizás complementario al de otros compuestos que se unen a la glucosiltransferasa (Figura 8). En consecuencia, estos hallazgos sugieren que el cariofileno podría tener un impacto en la actividad de la glucosiltransferasa de *E. coli*. La capacidad del cariofileno para interactuar con la enzima y posiblemente alterar su estructura y función sugiere un posible papel en la inhibición de la glucosiltransferasa y, por lo tanto, en la interrupción de la formación de biopelículas en *E. coli*. Esta información añade otro nivel de comprensión a la gama de estrategias potenciales para combatir las infecciones por *E. coli* resistentes a los medicamentos.

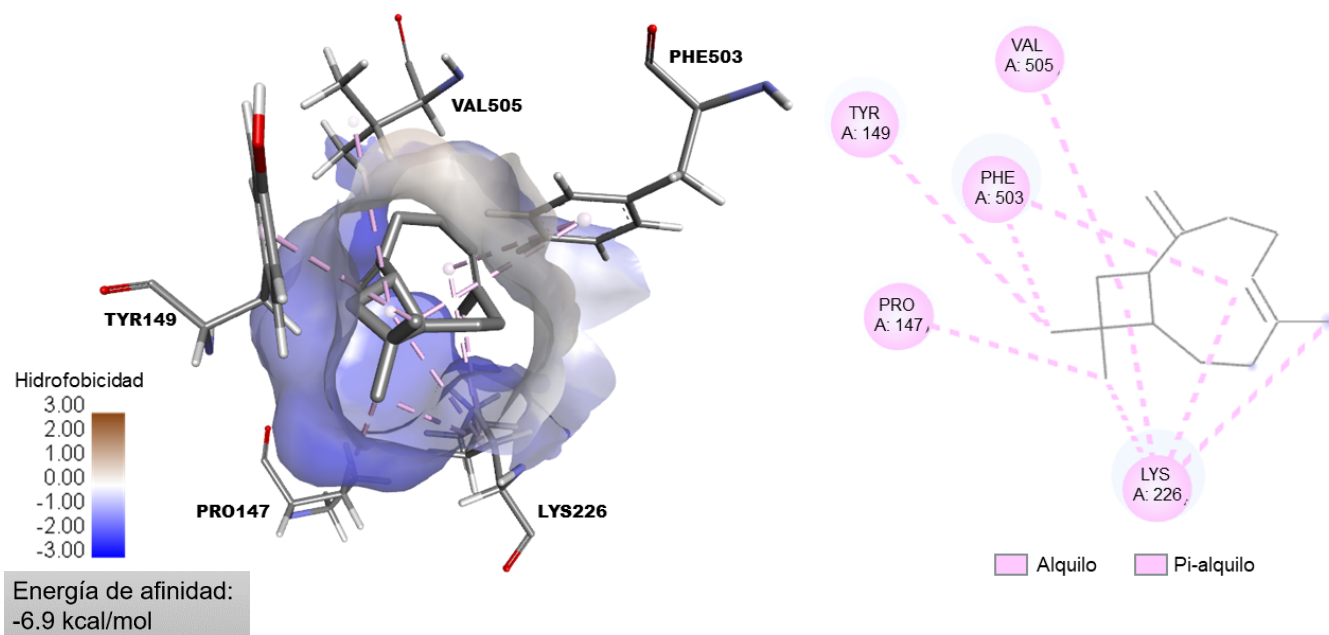


Figura 8. Interacciones moleculares entre el cariofileno y el sitio activo de la glucosiltransferasa.

En un estudio anterior, Ortega-Ramírez *et al.* (2020) investigaron el efecto de terpenos vegetales, como el citral y el geraniol, en la actividad de la enzima glucosiltransferasa. Mediante análisis de acoplamiento, se observó que estos terpenos interactuaban con el lazo de entrada y el dedo hélice de la enzima, mostrando una alta afinidad con valores de energía de -5.8 kcal/mol para el citral y -6.1 kcal/mol para el geraniol. Estos terpenos demostraron ser capaces de inhibir el crecimiento planctónico de *E. coli* al degradar las proteínas presentes en la membrana celular. En este caso, el citral exhibió una mayor actividad antibacteriana debido a las interacciones hidrofóbicas que estableció.

Las simulaciones de dinámica molecular en GROMACS se utilizaron para analizar la estabilidad de las interacciones entre la glucosiltransferasa y los tres ligandos: UDP-glucosa, timol y carvacrol. Las fluctuaciones en el RMSD del backbone (Figura 9), que pueden interpretarse como medidas de la estabilidad de las interacciones proteína-ligando que proporcionan una visión cuantitativa de estas relaciones. Durante una simulación de 50 nanosegundos las interacciones de la UDP-glucosa y el timol con la glucosiltransferasa se mantuvieron estables (Figura 10 y 12), ya que las variaciones en el RMSD del backbone no excedieron los 0.1 nm. Esto sugiere que ambos ligandos, uno como sustrato y el otro como potencial inhibidor competitivo, mantuvieron su posición y orientación con respecto a la enzima a lo largo de la simulación, evidenciando una posible unión fuerte y estable. Sin embargo, el carvacrol durante una simulación de 50 nanosegundos (Figura 11), mostró una ligera desviación mayor en su RMSD del backbone, pasando de 0.1 nm, lo que indica una mayor variabilidad en su interacción con la glucosiltransferasa. Aunque esto podría sugerir una menor estabilidad en comparación con la UDP-glucosa y el timol, también podría reflejar una mayor flexibilidad del carvacrol en su unión con la enzima, lo que podría ser relevante para su mecanismo de acción.

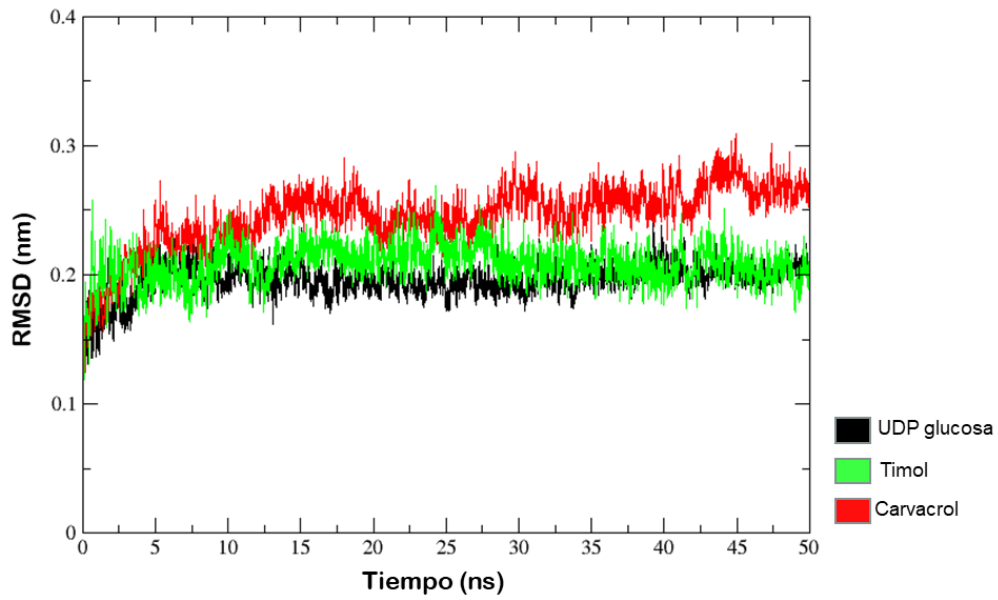


Figura 9. Cambios en la posición de los terpenos en el sitio activo de la glucosiltransferasa.

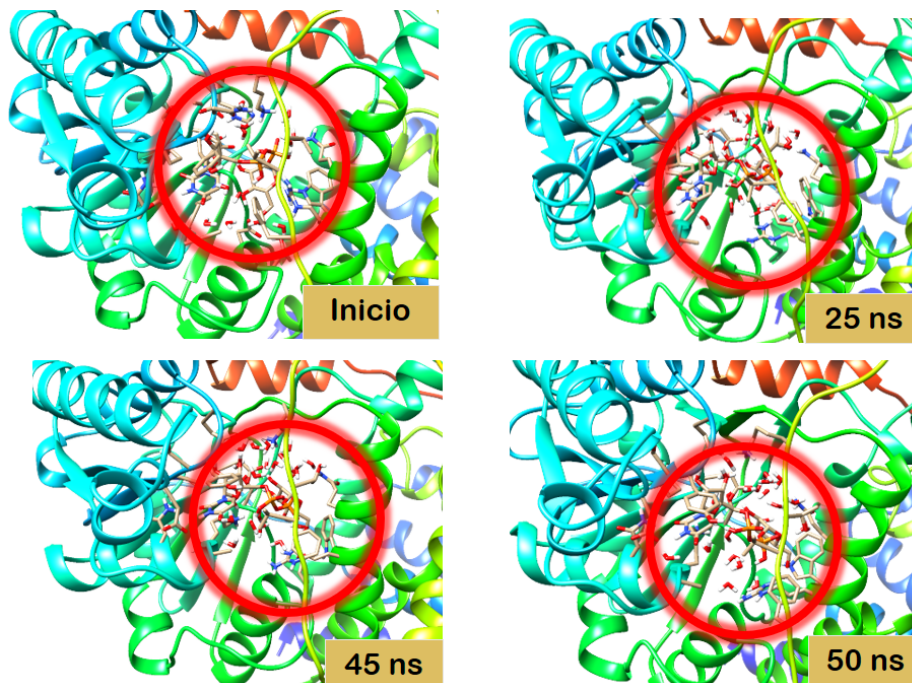


Figura 10. Estabilidad de UDP-glucosa con la enzima glucosiltransferasa.

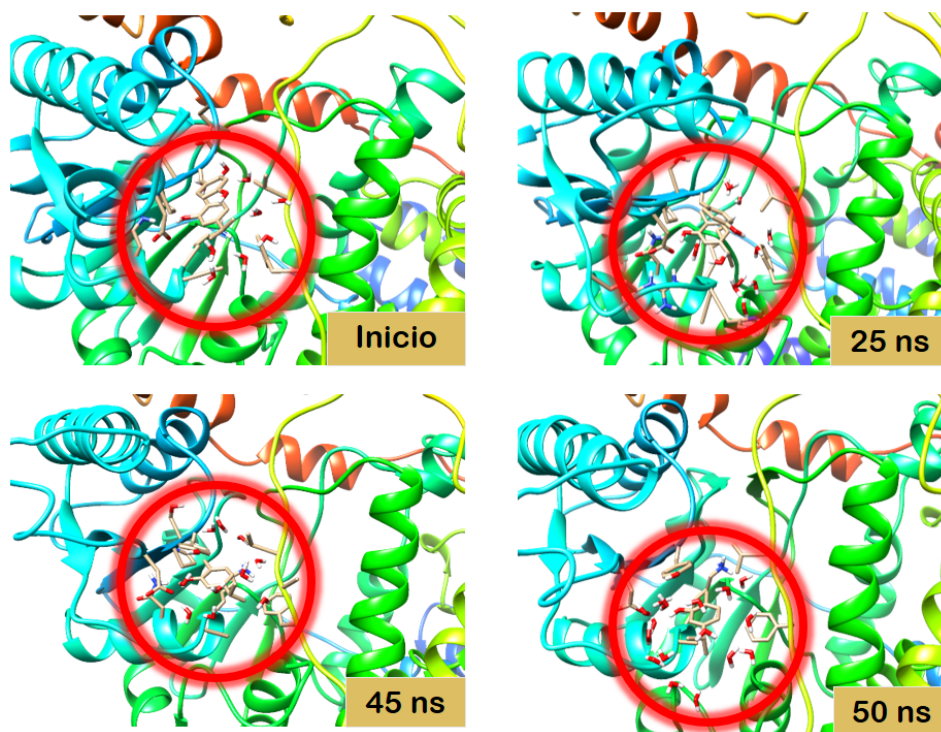


Figura 11. Estabilidad del carvacrol con la enzima glucosiltransferasa.

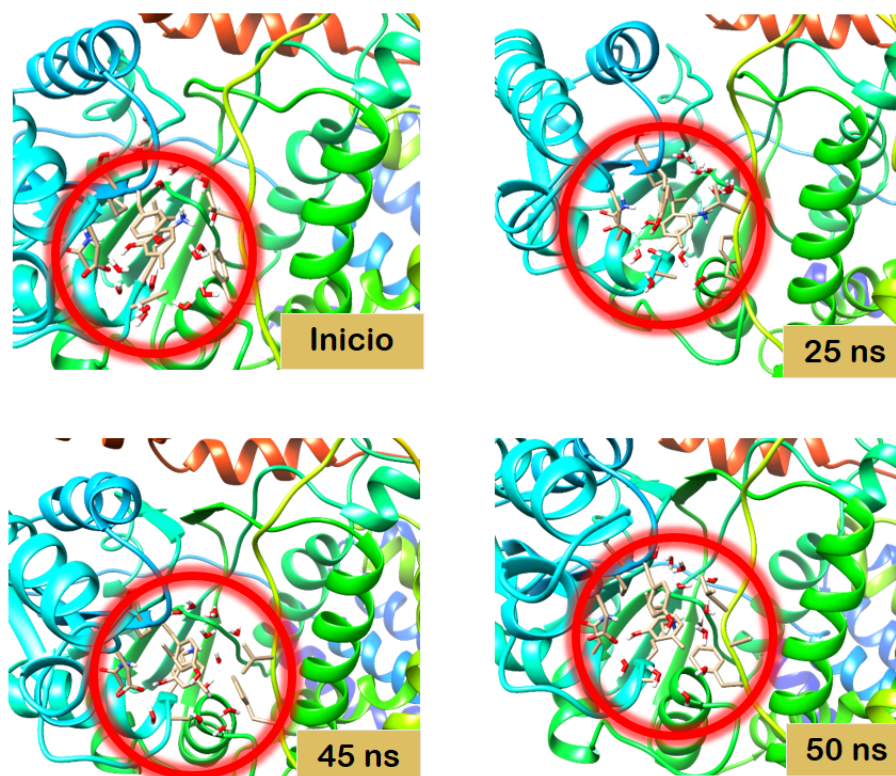


Figura 12. Estabilidad del timol con la enzima glucosiltransferasa.

El análisis de las interacciones y estabilidad de los terpenos (timol y carvacrol) con la enzima glucosiltransferasa aporta información valiosa para entender su potencial actividad antibacteriana, específicamente contra *E. coli*. La formación de biopelículas por esta bacteria es un problema significativo en la salud humana y en diversas industrias, por lo que encontrar maneras de inhibir su formación es de gran importancia. La interacción de los terpenos con la enzima glucosiltransferasa, que está implicada en la síntesis de la celulosa y la formación de biopelículas, sugiere que estos compuestos podrían ser candidatos potenciales para inhibir este proceso. En particular, el timol y el carvacrol demostraron una unión y una estabilidad notables en el sitio activo de la enzima durante las simulaciones de dinámica molecular, lo que podría reflejar una posible inhibición de la actividad enzimática. Estos hallazgos representan un avance en la comprensión de cómo los terpenos pueden actuar como agentes antibacterianos, y abre el camino para futuros estudios experimentales que verifiquen estos resultados *in silico*. Estos resultados podrían contribuir a la búsqueda de nuevas estrategias para combatir la formación de biopelículas de *E. coli*, utilizando compuestos naturales como los terpenos, que podrían tener un menor impacto en la resistencia bacteriana comparado con los antibióticos convencionales.

4.3 Tipos de interacciones y estabilidad dinámica entre los terpenos con mayor afinidad por el lazo de entrada a la glucosiltransferasa en un panorama no competitivo

Las interacciones observadas para el carvacrol con el lazo de entrada de la glucosiltransferasa revelaron la presencia de dos puentes de hidrógeno. El primero se formó entre el carvacrol y el residuo de glutamato (GLU514), mientras que el segundo puente de hidrógeno se estableció con el residuo de serina (SER513). Estas interacciones de puente de hidrógeno, junto con las interacciones de tipo pi-pi apiladas y pi-alquilo con el residuo de tirosina (TYR516), contribuyen a la estabilidad de la unión entre el carvacrol y la enzima. La interacción de carvacrol con SER513, GLU514 y TYR516 podría afectar la actividad de la enzima debido a que son residuos que forman parte del lazo de entrada al sitio activo. Dicha unión podría afectar la flexibilidad del lazo impidiendo el posicionamiento necesario para la traslocación de la UDP-glucosa al sitio activo. Estas interacciones específicas, junto con la energía de afinidad en este sitio de -4.7 kcal/mol, proporcionan información crucial sobre los mecanismos de unión y la fuerza de interacción entre el carvacrol y el lazo de entrada de la glucosiltransferasa (Figura 13).

Estos hallazgos respaldan el potencial del carvacrol como un inhibidor de la actividad de la enzima y su posible impacto en la formación de biopelículas en *E. coli*.

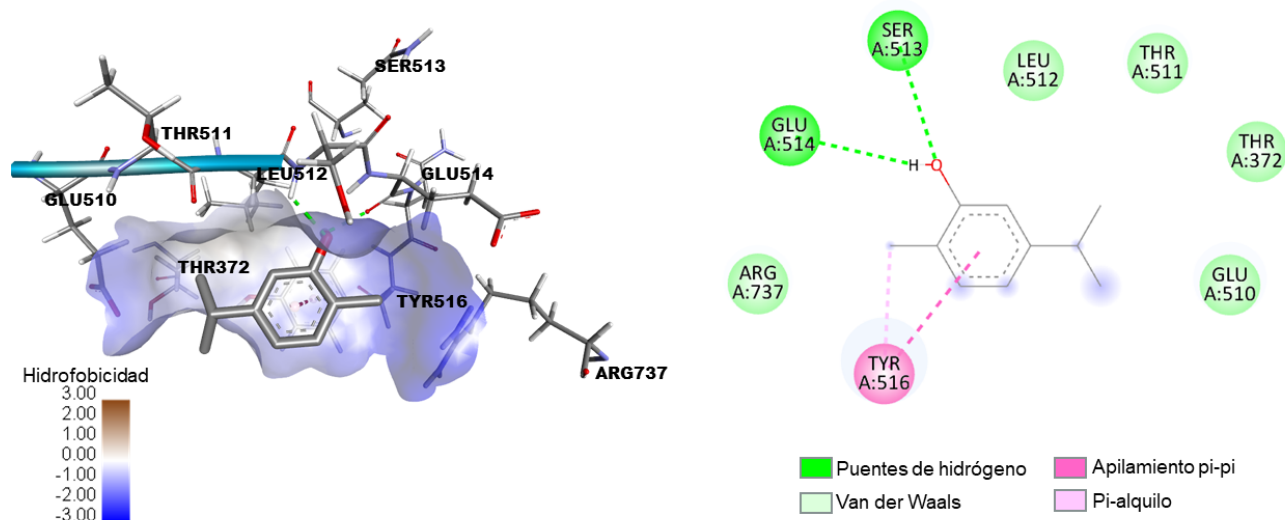


Figura 13. Interacciones moleculares entre el carvacrol y el sitio activo de la glucosiltransferasa (Panorama no competitivo).

Las interacciones observadas para el timol con el lazo de entrada de la glucosiltransferasa mostraron una energía de afinidad de -4.7 kcal/mol. Durante la interacción, se formaron dos puentes de hidrógeno, uno con el residuo de serina (SER513) y otro con el residuo de glutamato (GLU514). Estas interacciones de puente de hidrógeno contribuyen a la estabilidad de la unión entre el timol y la enzima. Además de los puentes de hidrógeno, se detectó una interacción de tipo pi-pi alquilada entre el timol y el residuo de tirosina (TYR516). Esta interacción involucra el apilamiento de los sistemas de electrones aromáticos del timol y la tirosina, lo que fortalece la unión entre ambos. También se observó una interacción de tipo pi-alkilo con el residuo de leucina (LEU512), donde el timol se acopla a la cadena alquílica de la leucina. Estas interacciones específicas, junto con la energía de afinidad de -4.7 kcal/mol, resaltan la capacidad del timol para establecer una unión favorable con el lazo de entrada de la glucosiltransferasa (Figura 14). De manera similar al carvacrol, la interacción con los residuos mencionados podría afectar el movimiento del lazo de entrada necesario para la apertura y cerrada del sitio activo.

Estos hallazgos respaldan el potencial del timol como un inhibidor de la actividad enzimática y su posible implicación en la interferencia con la formación de biopelículas en *E. coli*.

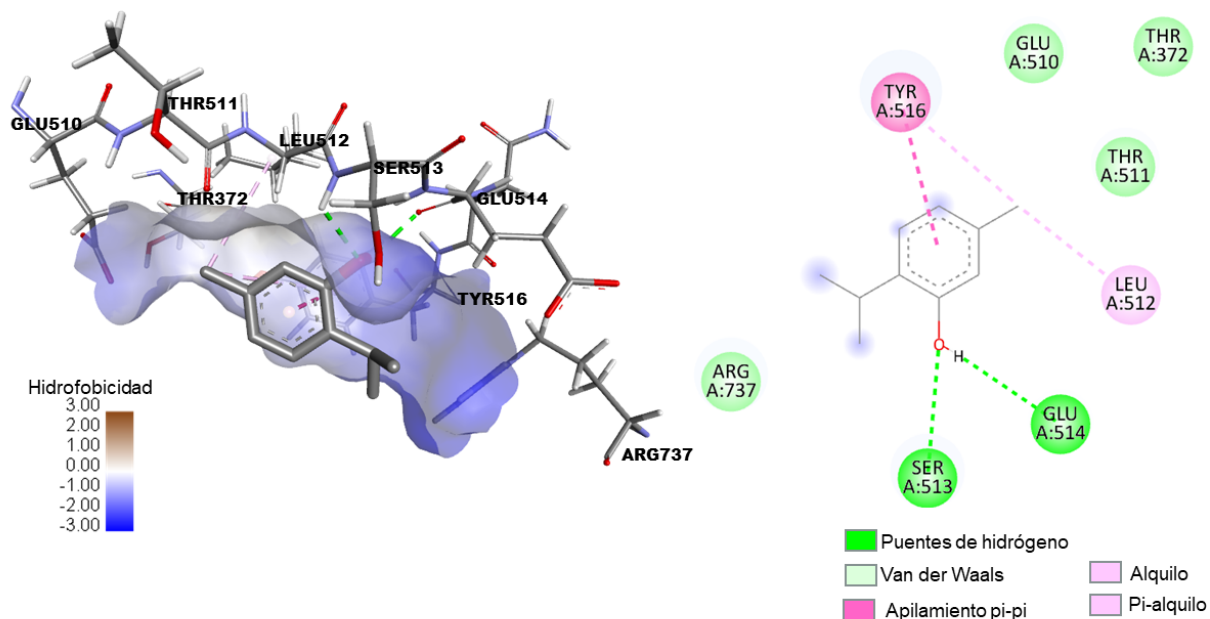


Figura 14. Interacciones moleculares entre el timol y el sitio activo de la glucosiltransferasa (Panorama no competitivo).

Las interacciones observadas para el cariofileno con el lazo de entrada de la glucosiltransferasa mostraron una energía de afinidad de -6.9 kcal/mol. Se observa que el cariofileno genera enlaces alquilo con el residuo de valina (VAL490), lo que implica una interacción hidrofóbica entre ambos. Además, se han identificado varias interacciones tipo van der Waals entre el cariofileno y varios residuos de arginina (ARG489, ARG502 y ARG382), treonina (THR385), isoleucina (ILE340 y ILE377), glicina (GLY381), glutamina (GLN378), tirosina (TYR486) y leucina (LEU487) de la glucosiltransferasa. Estas interacciones de tipo van der Waals son interacciones débiles pero significativas en la estabilización de la unión entre el cariofileno y la enzima. La interacción de cariofileno con ARG502 podría afectar la flexibilidad del lazo de entrada por la interacción de PHE503 uno de aminoácidos críticos en la actividad catalítica (Figura 15).

En conjunto, estos resultados sugieren que el cariofileno podría afectar la actividad de la glucosiltransferasa a través de interacciones específicas en un panorama no competitivo, estos hallazgos respaldan el potencial del timol como un inhibidor de la actividad enzimática y su posible implicación en la interferencia con la formación de biopelículas en *E. coli*.

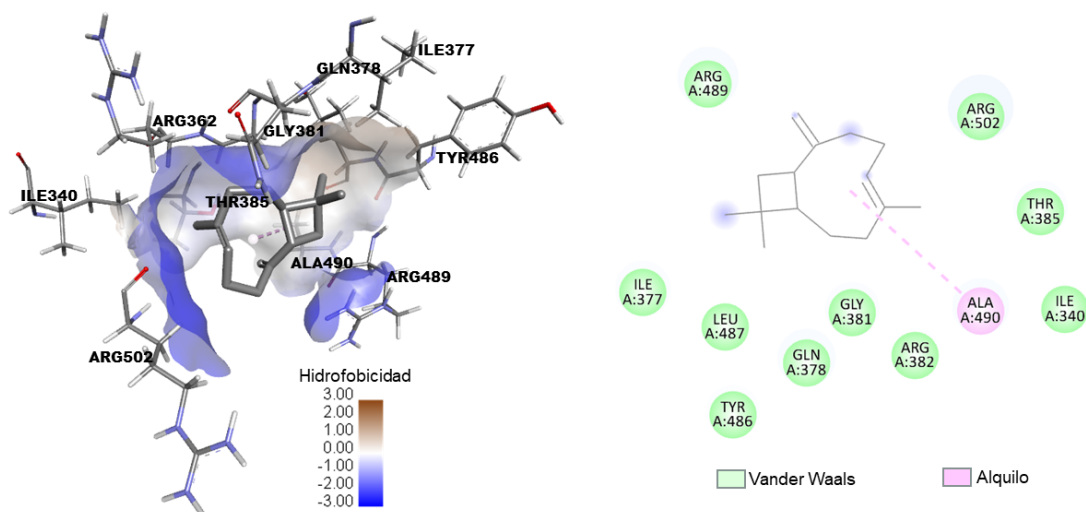


Figura 15. Interacciones moleculares entre el cariofileno y el sitio activo de la glucosiltransferasa (Panorama no competitivo).

Se observó que tanto el carvacrol, el timol y el cariofileno inicialmente interactuaron con residuos del lazo de entrada de la glucosiltransferasa (Figura 16). Sin embargo, a medida que transcurría la simulación, se observó que el carvacrol y el cariofileno se movieron y se separaron de los residuos del lazo de entrada (Figura y 19). En contraste, el timol continuó interactuando de manera persistente con los residuos del lazo de entrada a lo largo de la simulación (Figura 18). Estas interacciones estables entre el timol y los residuos del lazo de entrada indican una mayor afinidad y capacidad de unión en comparación con los otros terpenos. Estos hallazgos sugieren que el timol muestra una mayor tendencia a permanecer y mantener interacciones específicas con los residuos del lazo de entrada de la glucosiltransferasa durante la actividad enzimática.

Esta preferencia puede deberse a factores estructurales y a la naturaleza de las interacciones moleculares entre el timol y los residuos del lazo. Estos resultados proporcionan una comprensión más detallada de cómo los diferentes terpenos interactúan con el lazo de entrada de la glucosiltransferasa y cómo estas interacciones pueden influir en la actividad enzimática y en la formación de biopelículas en *E. coli*.

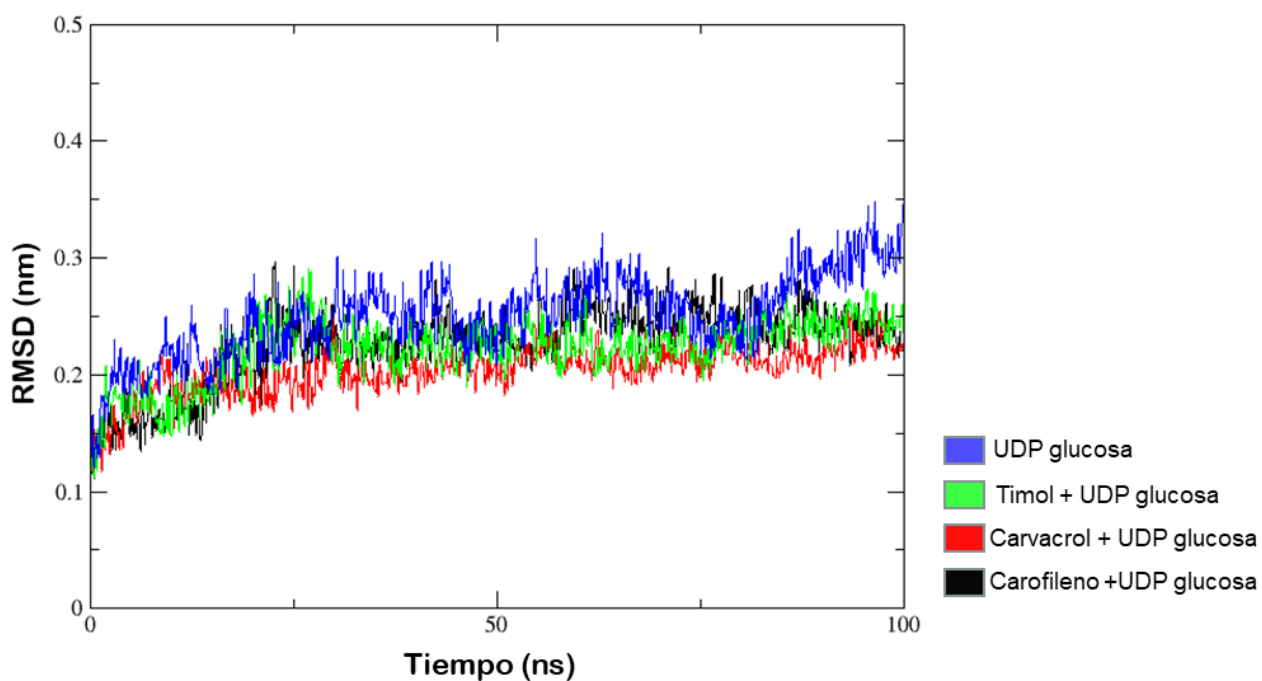


Figura 16. Cambios en la posición de los terpenos en el sitio activo de la glucosiltransferasa.

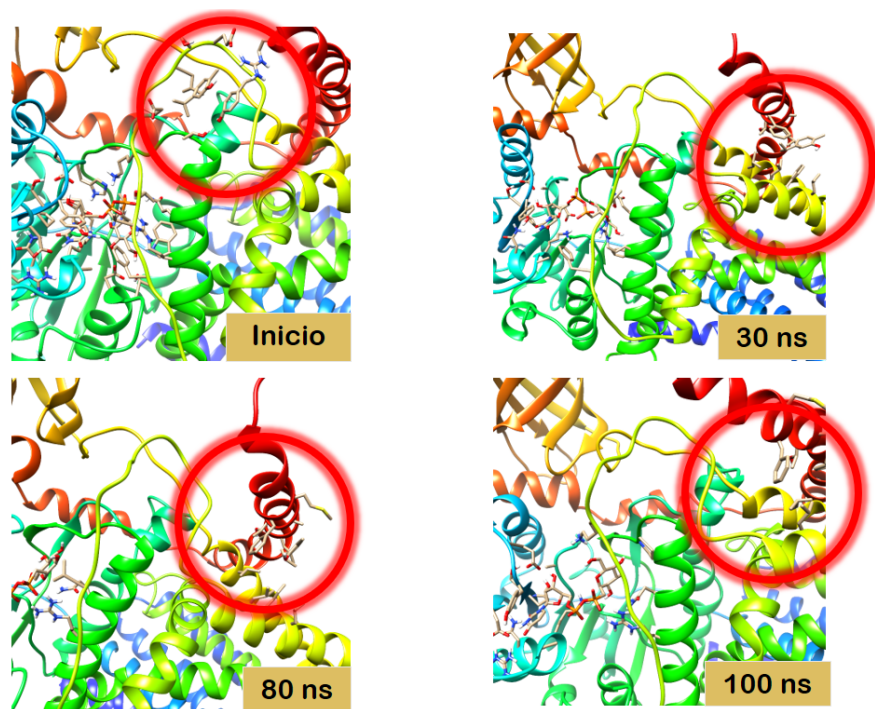


Figura 17. Estabilidad del carvacrol con la enzima glucosiltransferasa.

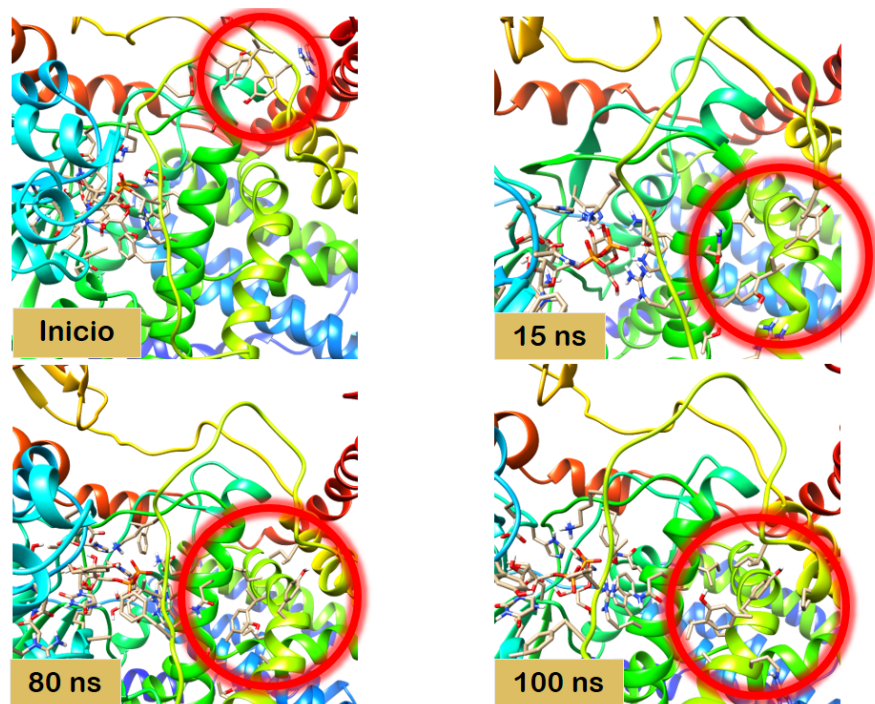


Figura 18. Estabilidad del timol con la enzima glucosiltransferasa.

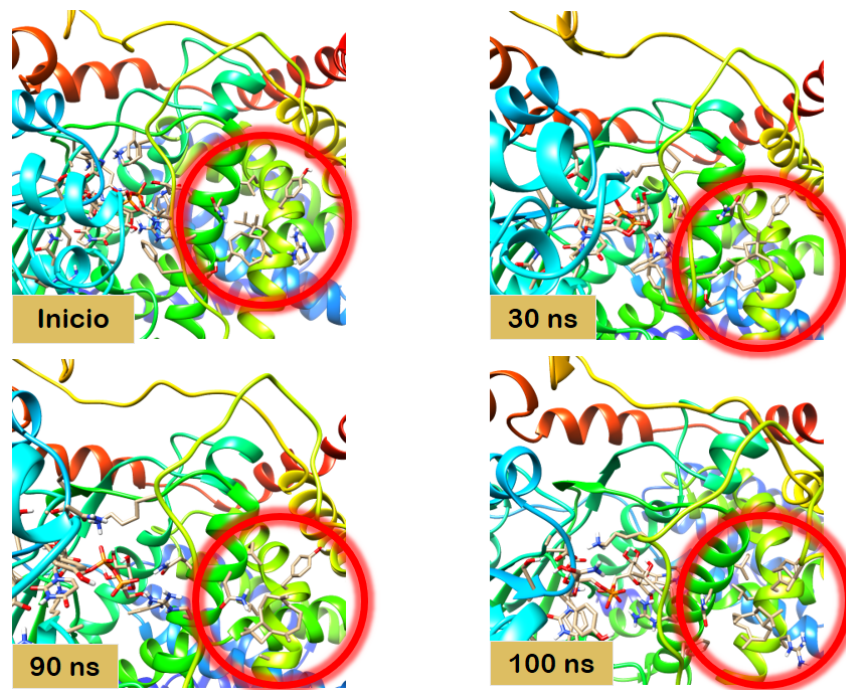


Figura 19. Estabilidad del cariofileno con la enzima glucosiltransferasa.

Durante la actividad de la enzima glucosiltransferasa involucrada en la producción de celulosa durante la formación de biopelículas, el lazo de entrada también desempeña un papel significativo. El lazo de entrada es una región estructural de la enzima que se encuentra en las proximidades del sitio activo y participa en la interacción con los sustratos y los ligandos. Se ha observado que el lazo de entrada puede experimentar movimientos flexibles y cambios conformacionales durante la actividad enzimática. Estos movimientos pueden ser necesarios para permitir la unión y el procesamiento eficiente de los sustratos, como la UDP-glucosa utilizada en la síntesis de celulosa. Los movimientos del lazo de entrada pueden ser inducidos por la interacción con el sustrato y otros ligandos, lo que facilita la formación de complejos enzima-sustrato estables y específicos. Estos movimientos pueden implicar cambios en la estructura y la dinámica del lazo de entrada, lo que contribuye a la adaptación del sitio activo de la enzima para realizar las reacciones de transferencia de glucosa.

El estudio de los movimientos del lazo de entrada durante la actividad de la glucosiltransferasa proporciona información valiosa sobre los mecanismos de unión y catálisis de la enzima. Comprender cómo se regulan y modulan estos movimientos puede ayudar a optimizar la producción de celulosa, así como diseñar estrategias para modular la actividad enzimática y regular la formación de biopelículas en bacterias patógenas.

El descubrimiento de las interacciones no competitivas estables entre la glucosiltransferasa y los terpenos, así como su estabilidad a lo largo de la simulación de dinámica molecular, tiene varias implicaciones importantes para la problemática estudiada. Esta problemática se centra en la resistencia bacteriana y la necesidad de encontrar nuevas estrategias para combatirla, con un enfoque particular en *E. coli* y su capacidad para formar biopelículas mediante la producción de celulosa. En primer lugar, las interacciones no competitivas sugieren que los terpenos podrían potencialmente actuar como inhibidores alostéricos de la glucosiltransferasa, en lugar de competir directamente con el sustrato para el sitio activo de la enzima. Esto podría representar una nueva estrategia para inhibir la actividad de la glucosiltransferasa y, por ende, la formación de biopelículas en *E. coli*. Además, la estabilidad de estas interacciones a lo largo de la simulación de dinámica molecular sugiere que estos terpenos pueden ser capaces de unirse de manera estable y duradera a la enzima, lo que podría resultar en una inhibición más prolongada de la actividad enzimática. Esto es particularmente relevante si se considera que la formación de biopelículas es un proceso que puede durar varias horas o incluso días, por lo que la capacidad de inhibir de manera sostenida la actividad de la glucosiltransferasa podría ser crucial para prevenir este proceso. Ortega-Ramírez et al. evaluaron el proceso de formación de biopelícula de *E. coli* en una superficie de acero inoxidable observando una formación significativa de biopelícula a partir de las 2 h de crecimiento con un crecimiento máximo a las 12 h. La formación de biopelícula fue relacionado a la formación de glucanos con una formación de 23 EG/cm²). Los hallazgos encontrados en este estudio proporcionan una valiosa información sobre el potencial de los terpenos como inhibidores de la glucosiltransferasa y abren nuevas vías de investigación para desarrollar estrategias de combate contra la formación de biopelículas en *E. coli* y, en última instancia, contra la resistencia bacteriana.

4.4 Cambios inducidos por el carvacrol en la sensibilidad de *Escherichia coli* a la gentamicina

Los resultados obtenidos a través de las pruebas de sensibilidad antibiótica evidencian un cambio significativo en la susceptibilidad de *E. coli* al antibiótico gentamicina cuando la bacteria es pretratada con la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de carvacrol (0.175 mg/mL) (Cuadro 3). En la condición sin tratamiento previo con carvacrol, el halo de inhibición generado por gentamicina sobre *E. coli* fue de 13.03 mm. Sin embargo, cuando la bacteria fue pretratada con carvacrol, el halo de inhibición aumentó a 17 mm (Cuadro 4). Esta diferencia de casi 4 mm sugiere que la presencia de carvacrol en la concentración usada puede sensibilizar a la bacteria a la gentamicina, potenciando su efecto antibacteriano. Estos hallazgos proporcionan evidencia de que el carvacrol puede actuar como potenciador del efecto de los antibióticos, en este caso la gentamicina, en contra de *E. coli*. Es posible que el carvacrol esté perturbando la biopelícula bacteriana o alterando la permeabilidad de la membrana de *E. coli*, permitiendo una mayor penetración del antibiótico, y así aumentando su eficacia. Esta observación abre una potencial vía de estudio para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en el combate de las infecciones por *E. coli*, mediante la combinación de compuestos naturales como carvacrol y antibióticos tradicionales como la gentamicina.

Cuadro 3: Concentración mínima inhibitoria (MIC) del terpeno carvacrol

CMI de carvacrol (mg/mL).
0.175

Cuadro 4: Diámetro de los halos de inhibición con un tratamiento de gentamicina.

Tratamiento	Promedio de medida del halo de inhibición (mm)
Gentamicina	13.03 ± 0.55
Gentamicina+ CMI de carvacrol	17 ± 0.2

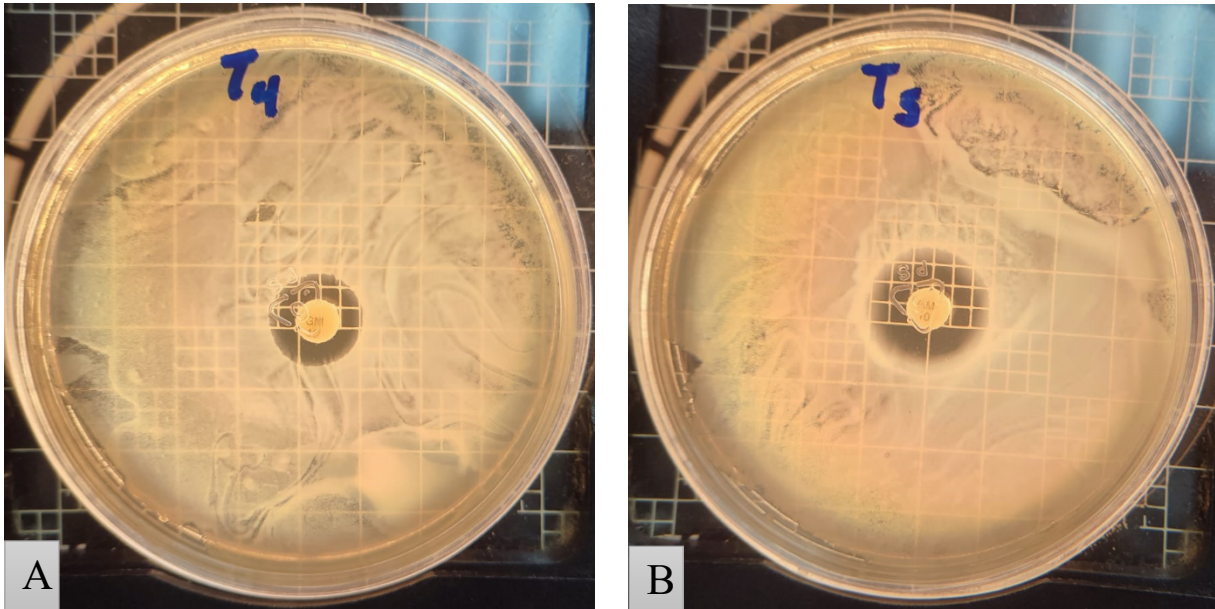


Figura 20. Tratamiento con gentamicina

(A), tratamiento con gentamicina y CMI de carvacrol (B).

El aumento en la sensibilidad de *E. coli* al antibiótico gentamicina tras el pretratamiento con carvacrol tiene implicaciones significativas en la lucha contra las infecciones resistentes a los antibióticos (Figura 20). Este resultado, junto con la evidencia de las interacciones estables entre el carvacrol y la enzima glucosiltransferasa, resalta el potencial del carvacrol como un agente potenciador de los antibióticos y, posiblemente, como un inhibidor de la formación de biopelículas bacterianas. Las biopelículas son comunidades de bacterias que se adhieren a las superficies y están envueltas en una matriz de polímeros extracelulares, lo que les confiere resistencia a los antibióticos. En este contexto, la glucosiltransferasa juega un papel crucial, ya que es responsable de la síntesis de celulosa, uno de los componentes de la biopelícula. El hecho de que el carvacrol interactúe con esta enzima y muestre una estabilidad de interacción, podría implicar que este terpeno tiene la capacidad de alterar la formación de la biopelícula, posiblemente inhibiendo la actividad de la glucosiltransferasa. Esta inhibición podría debilitar la biopelícula, permitiendo una mayor penetración y eficacia del antibiótico, como se observó en el aumento del halo de inhibición de la gentamicina.

Estos hallazgos proporcionan un nuevo enfoque en el estudio de la resistencia a los antibióticos y en la búsqueda de nuevas estrategias para combatir las infecciones bacterianas. La combinación de antibióticos con compuestos naturales como el carvacrol puede ser una opción prometedora para superar la resistencia a los antibióticos y mejorar la eficacia de los tratamientos existentes.

V. CONCLUSIONES

Se logró identificar *in silico* las poses de terpenos con glucosiltransferasa con la mayor energía de afinidad. Los terpenos carvacrol y timol presentaron una energía de afinidad significativa en comparación con otros terpenos estudiados, lo que sugiere que pueden tener una interacción potencialmente fuerte con la enzima glucosiltransferasa. A través del análisis *in silico*, se descubrieron las interacciones clave entre las poses de terpeno-glucosiltransferasa que mostraron mayor energía de afinidad. Tanto el carvacrol como el timol presentaron múltiples interacciones con los aminoácidos de la enzima, sugiriendo que estas interacciones pueden ser responsables de su alta afinidad.

Se determinó la estabilidad de las interacciones ligando-proteína que mostraron mayor energía de afinidad, tanto en un panorama competitivo como no competitivo. Los resultados de las simulaciones de dinámica molecular mostraron que las interacciones entre la glucosiltransferasa y la UDP-glucosa, el timol y el carvacrol fueron estables durante un tiempo de simulación de 50 ns. Finalmente, se demostró *in vitro* el efecto de la combinación de carvacrol y gentamicina sobre el crecimiento de *E. coli*. El tratamiento previo con carvacrol aumentó la sensibilidad de *E. coli* a la gentamicina, lo que indica que el carvacrol podría actuar como un potenciador de la actividad antibiótica.

En conjunto, estos resultados sugieren que los terpenos como el carvacrol, timol y cariofileno podrían ser candidatos prometedores para el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos para combatir las infecciones bacterianas, posiblemente a través de la inhibición de la actividad de la glucosiltransferasa y la mejora de la efectividad de los antibióticos. Sin embargo, se requieren más investigaciones para confirmar estos hallazgos y para explorar más a fondo el mecanismo de acción de estos terpenos.

VI. LITERATURA CITADA

- Aguinaga, A., Alvaro, A., & Baquedano, C. E. (2018). *Infecciones del tracto urinario . Estudio de sensibilidad antimicrobiana en Navarra Uncomplicated urinary tract infections . Antimicrobial susceptibility. 41*, 17–26.
- Arco, J. D. E. L. (2014). *Farmacia Abierta Antibióticos : situación actual. 28*, 29–33.
- Bai, Y., Wang, W., Shi, M., Wei, X., Zhou, X., Li, B., & Zhang, J. (2022). Novel Antibiofilm Inhibitor Ginkgetin as an Antibacterial Synergist against Escherichia coli. *International Journal of Molecular Sciences, 23*(15). <https://doi.org/10.3390/ijms23158809>
- Baran, A., Kwiatkowska, A., & Potocki, L. (2023). Antibiotics and Bacterial Resistance—A Short Story of an Endless Arms Race. *International Journal of Molecular Sciences, 24*(6), 5777. <https://doi.org/10.3390/ijms24065777>
- Basavegowda, N., & Baek, K. H. (2022). Combination Strategies of Different Antimicrobials: An Efficient and Alternative Tool for Pathogen Inactivation. *Biomedicines, 10*(9). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10092219>
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 28, Issue 1). <http://www.rcsb.org/pdb/status.html>
- Browne, K., Chakraborty, S., Chen, R., Willcox, M. D. P., Black, D. S., Walsh, W. R., & Kumar, N. (2020). A new era of antibiotics: The clinical potential of antimicrobial peptides. *International Journal of Molecular Sciences, 21*(19), 1–23. <https://doi.org/10.3390/ijms21197047>
- Chen, C., Chen, Y., Wu, P., & Chen, B. (2014). Update on new medicinal applications of gentamicin: Evidence-based review. In *Journal of the Formosan Medical Association* (Vol. 113, Issue 2, pp. 72–82). <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2013.10.002>
- Ersanli, C., Tzora, A., Skoufos, I., Fotou, K., Maloupa, E., Grigoriadou, K., Voidarou, C., & Zeugolis, D. I. (2023). The Assessment of Antimicrobial and Anti-Biofilm Activity of

- Essential Oils against *Staphylococcus aureus* Strains. *Antibiotics*, 12(2).
<https://doi.org/10.3390/antibiotics12020384>
- Irfan, M., Almotiri, A., & Alzeyadi, Z. A. (2022). *Antimicrobial Resistance and Its Drivers — A Review*.
- Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., & Bolton, E. E. (2021). PubChem in 2021: New data content and improved web interfaces. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D1388–D1395.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa971>
- Kim, Y. G., Lee, J. H., Gwon, G., Kim, S. Il, Park, J. G., & Lee, J. (2016). Essential Oils and Eugenols Inhibit Biofilm Formation and the Virulence of *Escherichia coli* O157:H7. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep36377>
- Kotsinis, V., Dritsoulas, A., Ntinokas, D., & Giannakou, I. O. (2023). Nematicidal Effects of Four Terpenes Differ among Entomopathogenic Nematode Species. *Agriculture*, 13(6), 1143.
<https://doi.org/10.3390/agriculture13061143>
- Lee, D. S., Lee, S., & Choe, H. (2018). *Community-Acquired Urinary Tract Infection by Escherichia coli in the Era of Antibiotic Resistance. 2018*.
- Lim, E. S., Koo, O. K., Kim, M. J., & Kim, J. S. (2019). Bio-enzymes for inhibition and elimination of *Escherichia coli* O157:H7 biofilm and their synergistic effect with sodium hypochlorite. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46363-w>
- Miquel, S., Lagrèfeuille, R., Souweine, B., & Forestier, C. (2016). Anti-biofilm activity as a health issue. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7, Issue APR). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00592>
- Morehead, M. S., & Scarbrough, C. (2018). Emergence of Global Antibiotic Resistance. *Primary Care Clinics in Office Practice*, 45(3), 467–484. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2018.05.006>
- Morgan, J. L. W., McNamara, J. T., Fischer, M., Rich, J., Chen, H. M., Withers, S. G., & Zimmer, J. (2016). Observing cellulose biosynthesis and membrane translocation in crystallo. *Nature*, 531(7594), 329–334. <https://doi.org/10.1038/nature16966>

- Ortega-Ramirez, L. A., Gutiérrez-Pacheco, M. M., Vargas-Arispuro, I., González-Aguilar, G. A., Martínez-Téllez, M. A., & Fernando Ayala-Zavala, J. (2020). Inhibition of glucosyltransferase activity and glucan production as an antibiofilm mechanism of lemongrass essential oil against escherichia coli O157:H7. *Antibiotics*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9030102>
- Paitan, Y. (2018). Current trends in antimicrobial resistance of escherichia coli. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 416, pp. 181–211). Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/82_2018_110
- Pajohi Alamoti, M., Bazargani-Gilani, B., Mahmoudi, R., Reale, A., Pakbin, B., Di Renzo, T., & Kaboudari, A. (2022). Essential Oils from Indigenous Iranian Plants: A Natural Weapon vs. Multidrug-Resistant Escherichia coli. *Microorganisms*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010109>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Podolsky, S. H. (2018). The evolving response to antibiotic resistance (1945–2018). *Palgrave Communications*, 4(1). <https://doi.org/10.1057/s41599-018-0181-x>
- Ragheb, M. N., Thomason, M. K., Hsu, C., Nugent, P., Gage, J., Samadpour, A. N., Kariisa, A., Merrikh, C. N., Miller, S. I., Sherman, D. R., & Merrikh, H. (2019). Inhibiting the Evolution of Antibiotic Resistance. *Molecular Cell*, 73(1), 157-165.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.10.015>
- Ryu, J. H., & Beuchat, L. R. (2005). Biofilm formation by Escherichia coli O157:H7 on stainless steel: Effect of exopolysaccharide and curli production on its resistance to chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 247–254. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.247-254.2005>
- Scandorieiro, S., Teixeira, F. M. M. B., Nogueira, M. C. L., Panagio, L. A., de Oliveira, A. G., Durán, N., Nakazato, G., & Kobayashi, R. K. T. (2023). Antibiofilm Effect of Biogenic Silver

Nanoparticles Combined with Oregano Derivatives against Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antibiotics*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040756>

Shan, Y., Lazinski, D., Rowe, S., Camilli, A., & Lewis, K. (2015). Genetic basis of persister tolerance to aminoglycosides in *Escherichia coli*. *MBio*, 6(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00078-15>

Tiwari, A., Sharma, P., Vishwamitra, B., & Singh, G. (2021). Review on surface treatment for implant infection via gentamicin and antibiotic releasing coatings. In *Coatings* (Vol. 11, Issue 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/coatings11081006>

Ulanowska, M., & Olas, B. (2021). Biological properties and prospects for the application of eugenol—a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7). <https://doi.org/10.3390/ijms22073671>

Urban-chmiel, R., Marek, A., St, D., Nowaczek, A., & Osek, J. (2022). *Antibiotic Resistance in Bacteria — A Review*. 1–40.

Zhang, Z., Yang, Y., Sun, Q., Zeng, W., & Li, Y. (2022). Inhibition of Biofilm Formation and Virulence Factors of Cariogenic Oral Pathogen *Streptococcus mutans* by Shikimic Acid. *Microbiology Spectrum*, 10(4). <https://doi.org/10.1128/spectrum.01199-22>

Zhou, F., Wang, D., Hu, J., Zhang, Y., & Tan, B. K. (2022). *Control Measurements of Escherichia coli Biofilm : A Review*. 1–11.