



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN
ESCUELA DE BIO Y NANOTECNOLOGÍA**

**“ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIBIOFILM DE METABOLITOS
SECUNDARIOS DE PLANTAS MEDICINALES CONTRA AISLADOS
CLÍNICOS DE *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*”**

**Tesis presentada para optar al título de Doctor en Biología Molecular y
Biotecnología de la Universidad Nacional de San Martín**

Licenciado Nicolás Martín Vázquez

Directora: Dra. Estela María Galván

Co-Directora: Dra. Silvia Moreno

Laboratorio de Patogénesis Bacteriana y Laboratorio de Farmacología de
Bioactivos Vegetales, CEBBAD, Universidad Maimónides.

Buenos Aires - 2024

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. Silvia Moreno, a la Dra. Estela Galvan y a la Universidad Maimónides por permitirme realizar este doctorado y por darme un lugar de trabajo del cual me voy a llevar buenos recuerdos.

Al laboratorio y sus integrantes por el compañerismo, las charlas interminables, la ayuda y el crecimiento como persona y como profesional.

A Florencia por colaborar y acompañarme día a día en este proyecto, así como prestar el hombro en los momentos más frustrantes.

A Ana y Santiago por la buena onda y compañerismo, y que junto a Florencia son lo más preciado que me llevo de este doctorado.

A la gente del CEBBAD por todos los momentos hermosos que pasamos, por estar siempre presentes y con la mejor de las energías transformando estos años que recordaré toda mi vida.

A mis amigos y hermanos de la vida: Gonza, Alan, Cami y Agus por estar siempre y bancarse todas mis quejas. Las salidas, las viciadas y nuestras charlas fueron siempre mi cable a tierra.

A Sofia, mi amor y mi compañera en esta vida por acompañarme durante el doctorado, enseñarme, bancarme más que nadie y compartir tanto conmigo.

Finalmente quiero agradecer a mi familia a los cuales no hay palabras que puedan describir lo que siento por ellos. Sin ellos no sería nada. Fueron, son y serán mi pilar durante toda mi vida. Ojalá algún día pueda devolver algo de todo lo que me dieron incondicionalmente. Los quiero.

PUBLICACIONES

Vazquez, N. M., Mariani, F., Torres, P. S., Moreno, S., & Galván, E. M. (2020). Cell death and biomass reduction in biofilms of multidrug resistant extended spectrum β -lactamase-producing uropathogenic *Escherichia coli* isolates by 1,8-cineole. *PLOS ONE*, 15(11), e0241978. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241978>

Vazquez, N. M., Moreno, S., & Galván, E. M. (2022). Exposure of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* biofilms to 1,8-cineole leads to bacterial cell death and biomass disruption. *Biofilm*, 4, 100085. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2022.100085>

RESUMEN

Las infecciones ocasionadas por *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* suelen ser de difícil tratamiento debido al aumento de la multirresistencia a antibióticos (MDR) y a la capacidad para formar biofilms entre cepas de dichas especies. Esta tesis doctoral investigó la actividad antibiofilm del monoterpeno 1,8-cineol (1,8-C) contra aislados clínicos de *K. pneumoniae* y *E. coli* MDR y productores de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Se demostró que el compuesto reduce significativamente la viabilidad de las células del biofilm (descenso superior a 3 Log UFC/cm² en la mayoría de los aislados estudiados). El tratamiento óptimo se logró con 1% (v/v) de 1,8-C durante 1 hora a 37°C. Es de destacar la capacidad del fitoquímico para matar bacterias tanto en capas superficiales como en capas basales del biofilm, en ambas especies investigadas. Además, el compuesto disminuyó la biomasa del biofilm (38-65%) y la densidad de su matriz (28-50%). Habiendo observado que en *E. coli* la celulosa y las proteínas son importantes para la estabilidad de los biofilms, se exploró el mecanismo del 1,8-C para disgregar el biofilm. Se investigó si la liberación de enzimas hidrolíticas luego de la muerte celular causada por el compuesto estaba involucrada en dicho efecto. En este sentido, el tratamiento con 1,8-C a temperaturas inferiores a 20°C no redujo la biomasa del biofilm, aunque la capacidad del compuesto de permeabilizar la membrana bacteriana se mantuvo intacta. Además, se evidenció un alto porcentaje de identidad en glicosil hidrolasas (entre ellas, celulasa) y diversas proteasas periplasmáticas y citoplasmáticas (96,3-99,6%) en aislados uropatogénicos de *E. coli*, mediante análisis *in silico*. Estos resultados apoyan la hipótesis de un mecanismo en etapas, en donde en la primera etapa el 1,8-C penetra a través del biofilm y permeabiliza las membranas bacterianas. Posteriormente, la liberación al medio extracelular de enzimas hidrolíticas serían las responsables de degradar componentes de la matriz del biofilm induciendo pérdida de densidad y reducción de su biomasa. En conjunto, nuestros resultados sugieren que el 1,8-C es un candidato prometedor como un nuevo agente antibiofilm tanto contra cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* MDR-BLEE dada su capacidad para alterar la estructura y destruir las células dentro del biofilm.

ABREVIATURAS

- 1,8-C: 1,8-cineol
- BLEE: β -lactamasas de espectro extendido
- BSA: Albúmina sérica bovina
- CV: Cristal violeta
- CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute
- CLSM: microscopio confocal láser de barrido
- DO: densidad óptica
- Ec: *Escherichia coli*
- EPS: sustancias poliméricas extracelulares
- GRAM: Global Research on Antimicrobial Resistance
- ITU: Infecciones del tracto urinario
- Kp: *Klebsiella pneumoniae*
- LB: Luria - Bertani
- MDR: Multirresistentes a antibióticos
- MTS: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
- OMS: Organización mundial de la salud
- PMI: Proyecciones de máxima intensidad
- QS: Quórum sensing
- TSA: Tripteína soya sgar
- TSC: Tripteína soya caldo
- UFC: Unidades formadoras de colonias

TABLA DE CONTENIDO

Agradecimientos	2
Publicaciones	3
Resumen	4
Abreviaturas	5
1. Introducción	10
1.1. Las bacterias multirresistentes a antibióticos en el ámbito de la salud	10
1.2. El biofilm como factor de incremento de la tolerancia/resistencia a los antibióticos	12
1.2.1. Generalidades de los biofilms	12
1.2.2. Etapas de desarrollo del biofilm	13
1.2.3. La matriz del biofilm	15
1.2.4. La tolerancia antimicrobiana mediada por biofilms	16
1.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Escherichia coli</i> : dos enterobacterias de preocupación en el ámbito de la salud	18
1.3.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	20
1.3.2. <i>Escherichia coli</i> uropatógena	21
1.4. Las plantas como fuente de nuevas drogas: los metabolitos secundarios	22
1.4.1. Metabolitos secundarios vegetales como agentes antibiofilm	23
1.4.2. <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	25
1.4.3. 1,8-cineol	27
1.4.3.1. Características y propiedades químicas	27
1.4.3.2. Propiedades farmacológicas	28
2. Hipótesis y Objetivos	31
2.1. Hipótesis del Trabajo	31
2.2. Objetivo General	31

2.3. Objetivos Particulares	32
3. Materiales y Métodos	33
3.1. Aislados bacterianos	33
3.2. Medios y condiciones de cultivo	34
3.3. Ensayos de producción de biomasa de biofilm	36
3.4. Tratamiento de biofilms preformados con 1,8-C	36
3.5. Efecto del 1,8-C sobre la adhesión inicial bacteriana a la superficie de desarrollo del biofilm	37
3.6. Microscopía confocal de biofilms teñidos para determinar células vivas/muertas y matriz	38
3.7. Evaluación de la viabilidad de células desprendidas del biofilm luego del tratamiento con 1,8-C	39
3.8. Ensayos de susceptibilidad de células planctónicas al 1,8-C	40
3.9. Evaluación de los componentes de la matriz del biofilm relevantes para su estructura/biomasa	40
3.10. Análisis <i>in silico</i> de enzimas hidrolíticas que pueden degradar la matriz del biofilm	40
3.11. Evaluación de la actividad del 1,8-C sobre biofilms a bajas temperaturas	41
3.12. Análisis estadístico	41
4. Resultados	42
4.1. CAPÍTULO N°1: ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIBIOFILM DEL 1,8-C SOBRE AISLADOS CLÍNICOS MULTIRRESISTENTES DE <i>K. pneumoniae</i>	42
4.1.1. Producción de biofilm en <i>K. pneumoniae</i>	42
4.1.2. Evaluación de la actividad antibiofilm del 1,8-C en biofilm preformados: efectos de la concentración y el tiempo de exposición	43
4.1.3. Evaluación de la viabilidad de biofilms preformados de diferentes aislados de <i>K. pneumoniae</i> luego del tratamiento con 1,8-C	46

4.1.4. Análisis de la distribución espacial de células vivas/muertas en biofilms preformados de <i>K. pneumoniae</i> después del tratamiento con 1,8-C por microscopía confocal	48
4.1.5. Influencia del 1,8-C sobre la estructura de biofilms preformados de <i>K. pneumoniae</i>	53
4.1.6. Efecto del 1,8-C sobre la viabilidad de células planctónicas de <i>K. pneumoniae</i>	56
4.2. CAPÍTULO N°2: ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIBIOFILM DEL 1,8-C SOBRE AISLADOS CLÍNICOS MULTIRRESISTENTES DE <i>E. coli</i>	58
4.2.1. Producción de biofilm en <i>E. coli</i>	58
4.2.2. Análisis del efecto antibiofilm del 1,8-C en función de la concentración y el tiempo de aplicación sobre biofilms preestablecidos.....	59
4.2.3. Evaluación del efecto del 1,8-C sobre etapas tempranas de desarrollo de biofilms de Ec AM7	62
4.2.4. Efecto del tratamiento con 1,8-C sobre la viabilidad de biofilms preformados por diferentes aislados de <i>E. coli</i>	64
4.2.5. Estudio de la distribución espacial de células vivas/muertas en biofilms preformados de <i>E. coli</i> mediante microscopía confocal luego del tratamiento con 1,8-C	66
4.2.6. Efecto del 1,8-C sobre la estructura de biofilms preformados de <i>E. coli</i>	71
4.2.7. Evaluación de la viabilidad de las células desprendidas de biofilms preformados de <i>E. coli</i> por el tratamiento con 1,8-C	74
4.2.8. Efecto del 1,8-C sobre la viabilidad de células planctónicas de <i>E. coli</i>	76
4.3. CAPÍTULO N°3: ANÁLISIS DEL MECANISMO DE DISRUPCIÓN DE LA MATRIZ DE BIOFILMS INDUCIDO POR EL 1,8-C	78

4.3.1. Componentes de la matriz extracelular relacionados a la estabilidad e integridad estructural de los biofilms	78
4.3.2. Análisis in silico de enzimas hidrolíticas en <i>E. coli</i> capaces de degradar la matriz del biofilm	80
4.3.3. Capacidad del 1,8-C para disgregar biofilms a bajas temperaturas	83
4.3.4. Evaluación de la viabilidad de biofilms preformados de <i>E. coli</i> mediante microscopía confocal después de la aplicación de 1,8-C a baja temperatura	86
5. Discusión	89
6. Conclusiones	97
7. Perspectivas	99
8. Bibliografía	100
9. Anexo	123

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Las bacterias multiresistentes a antibióticos en el ámbito de la salud

El ser humano ha utilizado plantas y hongos para tratar enfermedades desde hace milenios. Un hallazgo revolucionario dentro del campo de la salud fue el descubrimiento del primer antibiótico, la penicilina a partir del hongo *Penicillium notatum* por Alexander Fleming en 1928. Así comenzó la era de los antibióticos para el tratamiento de las infecciones bacterianas en el uso clínico, uno de los avances médicos más importantes del siglo XX (Hutchings *et al.*, 2019).

La resistencia a la penicilina comenzó en 1947, sólo cuatro años después de su producción en masa, situación que desencadenó la búsqueda de nuevas clases de antibióticos (Álvarez-Martínez *et al.*, 2020). La capacidad de las bacterias para adaptarse rápidamente a condiciones adversas, como la presencia de antibióticos, ha desencadenado la propagación de patógenos farmacorresistentes que han adquirido nuevos mecanismos de resistencia para la mayoría de las familias de antibióticos actuales, hecho que compromete la capacidad para tratar infecciones comunes en la clínica (Figura 1).

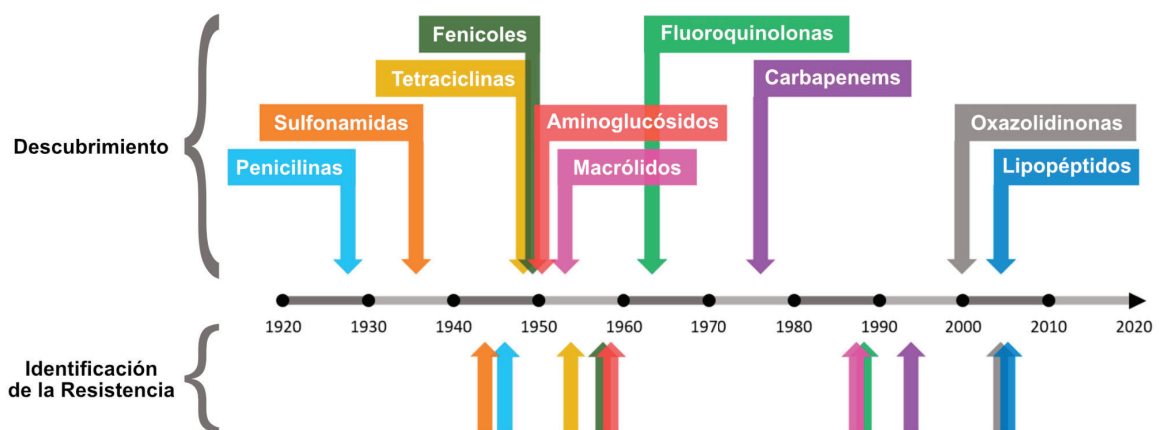


Figura 1. Descubrimiento de antibióticos y tiempo transcurrido hasta la aparición de resistencia (adaptado y modificado de Álvarez-Martínez *et al.*, 2020).

Se consideran diversas causas asociadas al incremento de la resistencia bacteriana a los antibióticos, entre ellas: 1) la prescripción demasiado frecuente de antibióticos de amplio espectro en lugar de antibióticos específicos seleccionados mediante un diagnóstico más preciso (Cižman y Srovin, 2018); 2) uso inadecuado por parte del paciente, al no respetar la dosis o la duración del tratamiento, permitiendo que algunas bacterias sobrevivan y se vuelvan resistentes así como la constante presión selectiva hacia los antimicrobianos existentes entre diferentes cepas bacterianas (Cižman y Srovin, 2018) y 3) la transferencia horizontal de genes de resistencias (Daubin y Szöllösi, 2016). Por otro lado, la falta de desarrollo de nuevos antibióticos ha creado un escenario en el cual las infecciones comunes podrían volverse nuevamente letales debido a la ineficacia de los antimicrobianos disponibles (Lewis, 2020). En este escenario la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera la resistencia antimicrobiana como una de las mayores amenazas para la salud mundial y estimó que las muertes por enfermedades asociadas a las resistencias antibióticas en 2050 rondarán las 10 millones de personas (OMS, 2019) (Figura 2).

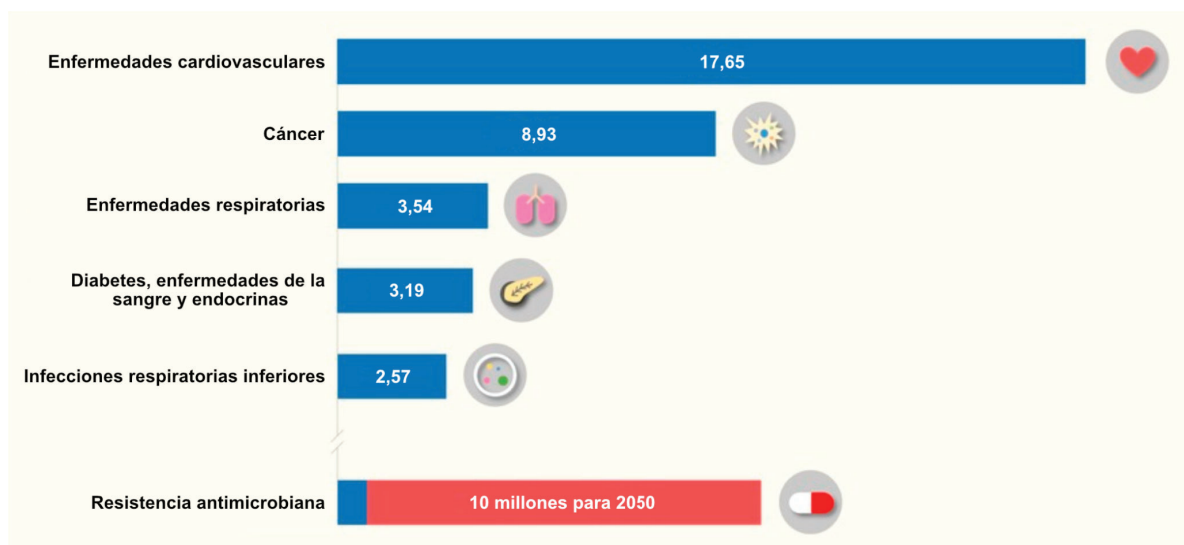


Figura 2. Número de muertes causadas por diversas patologías. Principales causas de muerte en el mundo en 2016 (barras azules) y pronóstico para las muertes relacionadas con la resistencia antimicrobiana en 2050 (barra roja) (adaptado de Álvarez-Martínez *et al.*, 2020).

Al presente, la tasa de crecimiento de la resistencia bacteriana supera a la creación de nuevos antibióticos. Dado que la resistencia a los antimicrobianos es un problema complejo que requiere un enfoque multidisciplinario, la OMS ha recomendado incentivar la inversión en proyectos de investigación y desarrollo de nuevos medicamentos antimicrobianos, vacunas y medios de diagnóstico para poder hacer frente a dicha amenaza en el campo de la salud (OMS, 2023). Dentro de la búsqueda de nuevas opciones se encuentran entre otras: vacunas, fagoterapia y péptidos antimicrobianos los cuales se usan de manera preventiva o como adyuvantes (Roncovic *et al.*, 2019; Hatfull *et al.*, 2022).

Además, como fuente de nuevos antimicrobianos para combatir diversas enfermedades infecciosas hay un renovado interés por el estudio de compuestos de origen vegetal que presentan actividad antibiótica (Li *et al.*, 2019^a). Los vegetales, los cuales representan el 80% de la biomasa terrestre, constituyen una rica fuente de compuestos bioactivos, entre ellos, un arsenal diverso de metabolitos secundarios (Bar-On *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2023).

1.2. El biofilm como factor de incremento de la tolerancia/resistencia a los antibióticos

1.2.1. Generalidades de los biofilms

Uno de los mayores avances en microbiología, realizado en los últimos 50 años, ha sido el conocimiento sobre el crecimiento y el desarrollo de microorganismos sobre diferentes superficies en la forma de complejas estructuras denominadas biofilms (Costerton *et al.*, 1995) Los biofilms son agregados de poblaciones homogéneas o heterogéneas de microorganismos que se encuentran embebidos en una matriz autoproducida de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que se adhieren entre sí y/o a una superficie biótica o abiótica.

Actualmente se sabe que en el 70% de las infecciones microbianas humanas las bacterias se encuentran en forma de biofilms y en general se asocian con infecciones persistentes tales como heridas crónicas no cicatrizantes,

endocarditis, periodontitis, rinosinusitis quística, fibrosis, meningitis, osteomielitis, infecciones renales, prótesis e infecciones relacionadas con dispositivos implantables (Sharma *et al.*, 2023). También los biofilms son responsables de la contaminación del agua utilizada en la industria (Flemming *et al.*, 2011), el deterioro de la calidad del agua potable (Wingender & Flemming, 2011) y corrosión influenciada por microorganismos (Little & Lee, 2014).

1.2.2. Etapas de desarrollo del biofilm

La formación de biofilms es un proceso dinámico y complejo influenciado por factores de diferente tipo (por ejemplo, químicos y biológicos) y en el cual se pueden identificar diversas etapas (Figura 3).

En una primera etapa hay una adhesión reversible de las células bacterianas a la superficie (ya sea biótica o abiótica) a través de interacciones inespecíficas que implica interacciones fisicoquímicas atractivas y repulsivas entre las bacterias y la superficie (Veerachamy *et al.*, 2014; Maikranz *et al.*, 2020). Dichas interacciones se ven fortalecidas mediante apéndices bacterianos como flagelos, pili y fimbrias (Gupta *et al.*, 2015; Vani *et al.*, 2023). La adhesión inicial es transitoria y fácilmente reversible (Veerachamy *et al.*, 2014), pero una vez que las fuerzas de adhesión a la superficie superan a las fuerzas de repulsión, comienza una segunda etapa de anclaje o adhesión irreversible donde hay una unión mediada por adhesinas de superficie que varían según el tipo de bacteria (Sharma *et al.*, 2023). La tercera etapa consiste en la multiplicación y división celular en donde se forman microcolonias, en la cual comienza la producción de EPS. En la cuarta etapa de maduración se experimenta un aumento en la biomasa del biofilm donde se alcanza la mayor producción de EPS que consolida la matriz del biofilm en un biofilm maduro formando estructuras tridimensionales con alturas de hasta 100 μm (Sharma *et al.*, 2023). Dicha matriz, además de funcionar como una barrera ante agentes externos, proporciona estructuras que actúan como canales por donde tanto el agua como los nutrientes y desechos celulares pueden circular a través del biofilm (Parsek y Singh, 2003). La maduración del biofilm se lleva a cabo

mediante la secreción de factores de señalización por parte de las células bacterianas adheridas, lo cual conduce a la expresión de genes específicos relacionados con el biofilm. Los factores de señalización se conocen como autoinductores y desempeñan un papel vital en el proceso de quórum sensing (QS), que consiste en la capacidad de las células bacterianas para detectar la densidad celular a través de la comunicación célula a célula y en consecuencia ajustar la expresión génica (Vani *et al.*, 2023). La quinta y última etapa del ciclo de formación de un biofilm es la dispersión. En ella, algunas bacterias dentro del biofilm vuelven a adquirir características de células planctónicas y se desprenden del mismo como consecuencia de señales que desencadenan una serie de mecanismos que permiten la modificación de la adhesión a la superficie o la degradación enzimática de EPS por proteínas endógenas y/o exógenas (Rumbaugh y Sauer, 2020). De este modo se logra diseminar la infección y comenzar nuevamente el ciclo de formación del biofilm (Sharma *et al.*, 2023).

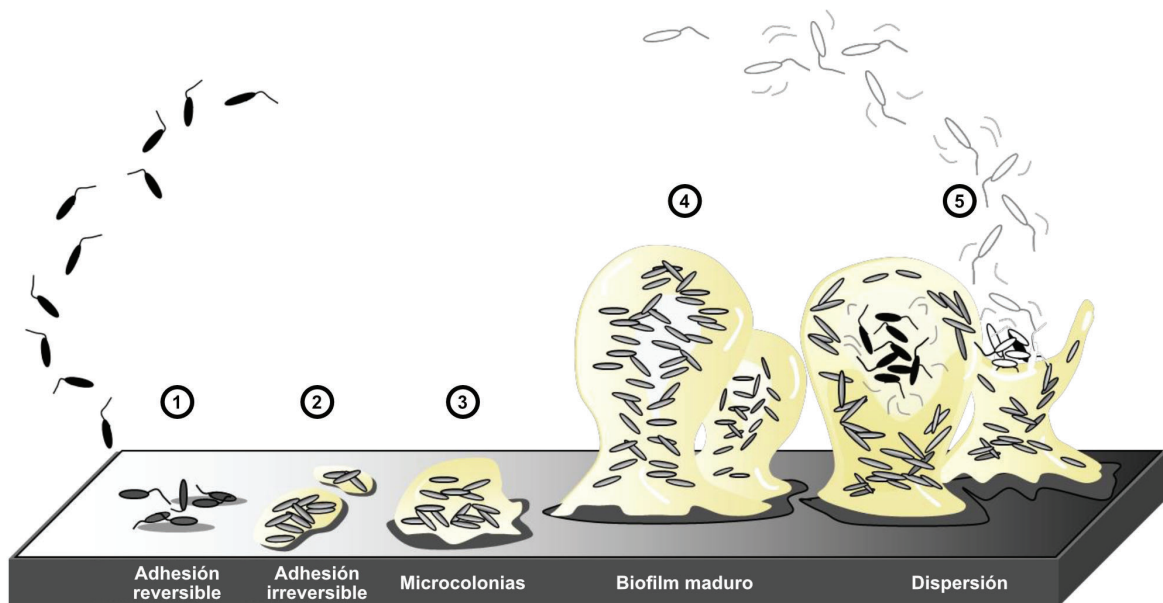


Figura 3. Etapas de desarrollo de un biofilm. La formación de biofilms es un proceso cíclico y progresivo en el cual se pueden distinguir cinco etapas. Comienza con la adhesión reversible de células planctónicas a la superficie (1), seguida de la adhesión irreversible (2). Luego, las bacterias se multiplican, formando microcolonias en la tercera etapa (3), y el biofilm madura en la cuarta etapa (4). En la quinta etapa, conocida como dispersión, parte de la biomasa se desprende, liberando células bacterianas para iniciar el ciclo en otro lugar (5) (adaptado de Sauer *et al.*, 2022).

1.2.3. La matriz del biofilm

La matriz desempeña un papel crucial como soporte estructural y constituye un entorno dinámico para las comunidades microbianas (mono o polimicrobianas) con propiedades emergentes claramente distintas a las de las células individuales planctónicas (Flemming *et al.*, 2016). La biomasa bacteriana embebida en la matriz de polímeros, formada principalmente por polisacáridos, proteínas, lípidos y ADN extracelular, representa el 10% del total mientras que el resto consiste en una solución acuosa (Flemming *et al.*, 2021) (Figura 4).

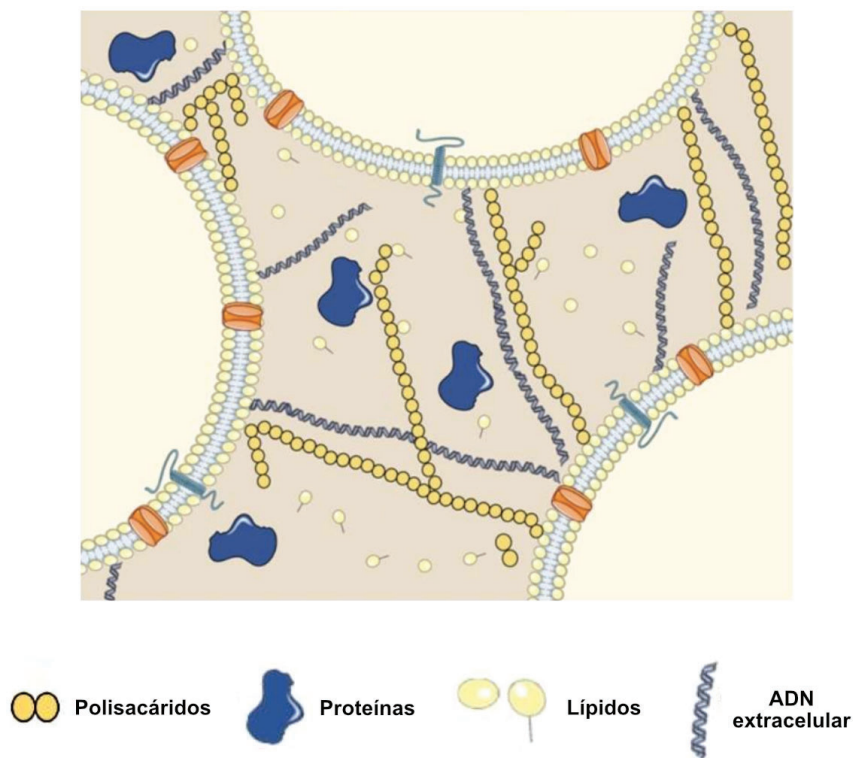


Figura 4. Representación esquemática de los principales componentes de la matriz del biofilm. Las principales biomoléculas son polisacáridos extracelulares, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos extracelulares (adaptado y modificado de Pinto *et al.*, 2020).

La matriz contribuye a la formación de gradientes localizados en parámetros como pH, oxígeno, potencial redox, nutrientes y concentración de productos metabólicos generando micro entornos diferenciados en diversas áreas del biofilm. En dicho espacio extracelular se capturan y retienen recursos como agua, productos celulares y residuos, actuando como un reservorio de moléculas para la síntesis biológica y proporcionando una defensa efectiva contra la deshidratación. La retención de enzimas extracelulares desempeña un papel fundamental al proporcionar productos enzimáticos en estrecha proximidad a las células, configurando un sistema general de digestión extracelular. También contribuyen a mejorar la comunicación intercelular y el comportamiento colectivo, promoviendo una respuesta continua de regeneración mediante la competencia frente a condiciones ambientales cambiantes (Flemming *et al.*, 2016; Flemming, 2016). Por otro lado, la matriz facilita diversas interacciones en los biofilms de diferentes especies permitiendo el desarrollo a largo plazo de consorcios sinérgicos que facilitan el intercambio génico y el reciclaje de ácidos nucleicos, constituyendo un pool genético para la transferencia horizontal de genes (Flemming *et al.*, 2016). En conjunto, las diversas funciones que desempeña la matriz extracelular delinean su papel esencial en la dinámica y adaptación de los biofilms en diversos entornos (Flemming *et al.*, 2021).

1.2.4. La tolerancia antimicrobiana mediada por biofilms

La tolerancia incrementada a los antibióticos y otros agentes antimicrobianos de hasta 1000 veces en comparación con las células bacterianas en estado planctónico es una de las propiedades distintivas de los biofilms (Mah, 2012). Dicho efecto se ha reportado para antibióticos como fosfomicina, fluoroquinolonas, ciprofloxacina, aminoglucósidos y carbapenemes utilizados para tratar infecciones causadas por Enterobacterias como *K. pneumoniae* y *E. coli* uropatógenicas, los cuales han mostrado una clara disminución en su efectividad a causa de la formación de biofilm (Lebeaux *et al.*, 2014; Mironova *et al.*, 2023).

Entre los mecanismos propuestos que explican la tolerancia del biofilm a los antimicrobianos, se encuentran: 1) penetración restringida: penetración limitada de antimicrobianos a través de la matriz, que en algunos casos se encuentra relacionada con la interacción específica del compuesto con la matriz (Khan *et al.*, 2021), 2) heterogeneidad metabólica: tasa de crecimiento variable en las bacterias a causa de la estratificación de los niveles de nutrientes dentro del biofilm (Shree *et al.*, 2023), y 3) respuestas adaptativas: subgrupo de microorganismos en el biofilm con características fenotípicas de alta resistencia a antimicrobianos debido a gradientes químicos y moléculas de quórum sensing conocidos como células persistentes (Wood *et al.*, 2013). Estas características estructurales de la matriz del biofilm son en gran medida las principales responsables del desarrollo de esta mayor tolerancia a los antimicrobianos por parte de los biofilms (Figura 5).

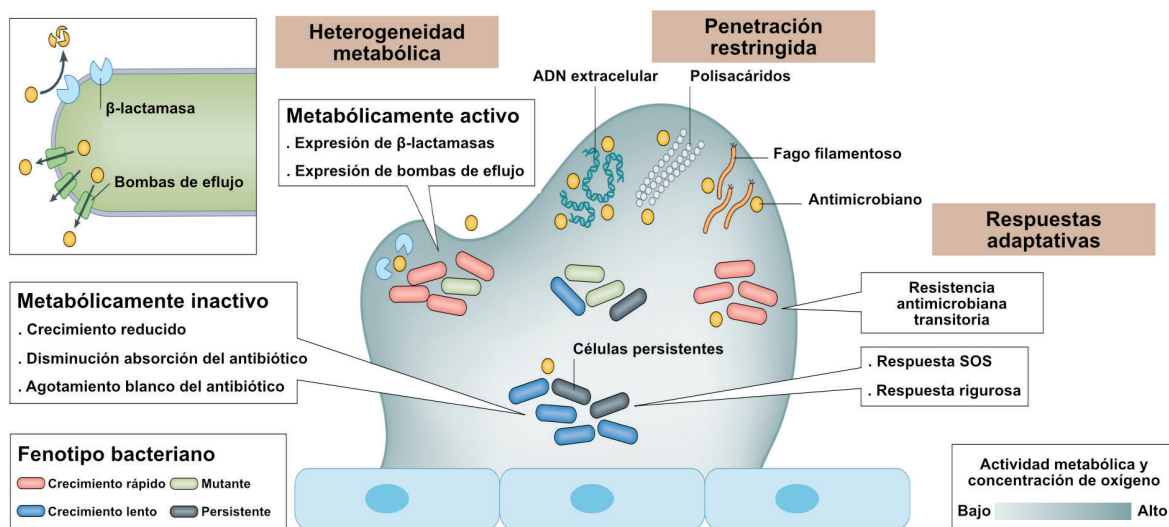


Figura 5. Mecanismos de tolerancia antimicrobiana de un biofilm. El esquema presenta los principales mecanismos que hacen a la tolerancia en los biofilms bacterianos. Entre ellos nos encontramos tres grandes grupos que engloban diferentes mecanismos: 1) penetración restringida: mecanismos que limitan la penetración de compuestos antimicrobianos a través del biofilm, 2) heterogeneidad metabólica: la estratificación de los niveles de nutrientes permite una variabilidad fenotípica que otorga tolerancia hacia los antimicrobianos, y 3) respuestas adaptativas: presencia de subgrupos de microorganismos con alta resistencia a antimicrobianos entre otros (adaptado y modificado de Ciofu *et al.*, 2022).

1.3. *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*: dos enterobacterias de preocupación en el ámbito de la salud

Las Enterobacterias son una extensa familia de bacilos gramnegativos no formadores de esporas, compuesta por más de 50 géneros y 210 especies que habitan diversos ambientes ecológicos como el suelo, reservorios de agua, plantas y animales (Jenkins *et al.*, 2017). Dicha familia incluye especies de alta relevancia clínica como son *K. pneumoniae* y *E. coli* (extraintestinales y uropatógenas), causa común de enfermedades en la comunidad y entornos clínicos como pueden ser infecciones del tracto urinario, bacteriemias, neumonía e infecciones neurológicas (van Duin y Paterson, 2016) (Figura 6).

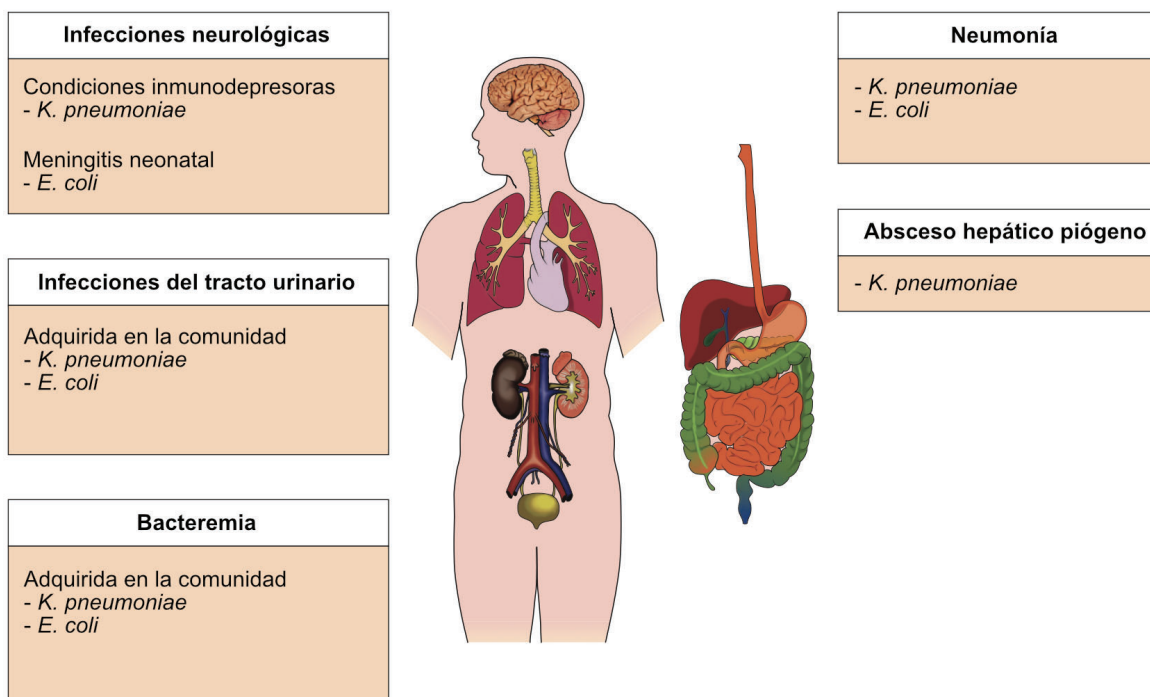
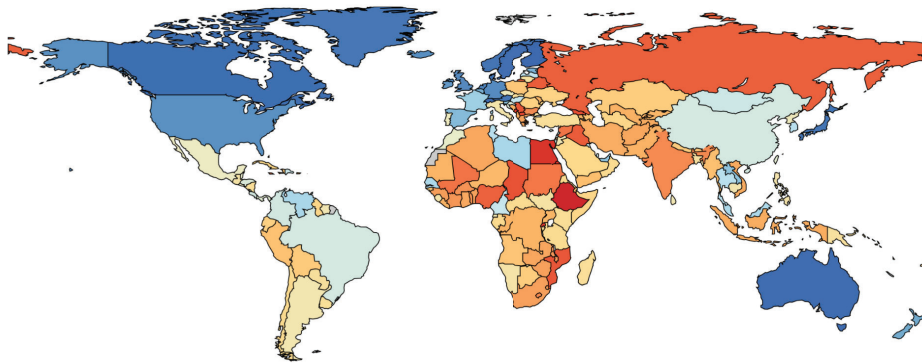


Figura 6. Infecciones causadas por *K. pneumoniae* y *E. coli*. Principales sitios de infección causados por *K. pneumoniae* y *E. coli* extraintestinales (adaptada y modificada de Jenkins *et al.*, 2017).

La Figura 7 muestra cómo en la actualidad hay un alto porcentaje de prevalencia mundial de aislados de *K. pneumoniae* y de *E. coli* con resistencia a las cefalosporinas de tercera generación (resistencia a β -lactamasas de espectro extendido o BLEE) (GRAM, 2022). Debido a este dramático incremento de la resistencia a las cefalosporinas, como así también a otros antibióticos como los carbapenems (última línea de defensa frente a bacterias gramnegativas), que la OMS incluyó a las Enterobacterias resistentes a las cefalosporinas de tercera generación, tales como *K. pneumoniae* y *E. coli*, como prioridad crítica en la lista de las bacterias para las que se necesita el desarrollo urgente de nuevas alternativas terapéuticas (OMS, 2017).

Porcentaje de *K. pneumoniae* con resistencia a cefalosporinas de tercera generación



Porcentaje de *E. coli* con resistencia a cefalosporinas de tercera generación

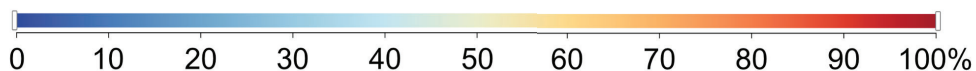
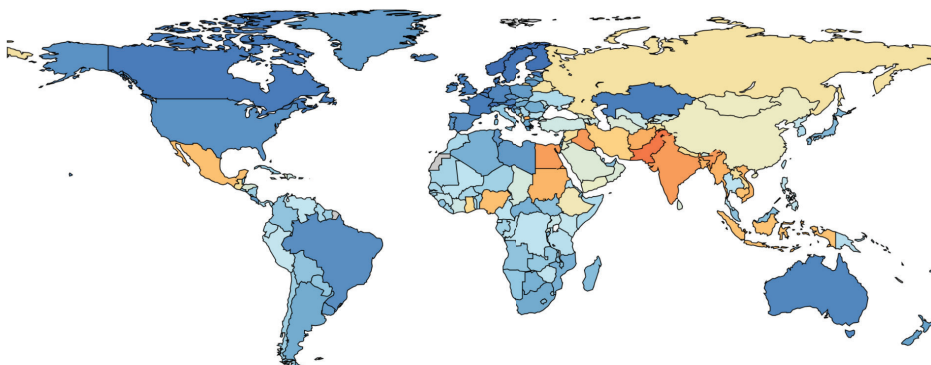


Figura 7. Mapa de prevalencia de resistencia antibiótica. Porcentaje de prevalencia de las resistencias a las cefalosporinas de tercera generación en *K. pneumoniae* y *E. coli* respectivamente durante el año 2019 (adaptada y modificada de GRAM, 2022).

1.3.1. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae, denominada así en honor al microbiólogo Edwin Klebs que la describió en 1887 en muestras de pacientes con neumonías, es una bacteria gramnegativa, encapsulada, no móvil, con un diámetro de 0,3 - 1,0 μm y longitud de 0,6 - 6 μm . Este patógeno oportunista de vías nasales y tracto digestivo, se ha convertido actualmente en una preocupación en el ámbito médico por hallarse asociada a infecciones tanto comunitarias como nosocomiales, con una alta tasa de resistencia a los antibióticos (Taconelli *et al.*, 2018; Chang *et al.*, 2021). *K. pneumoniae* ha demostrado una evolución desde ser una simple productora de β -lactamasas a ser productora de BLEE y finalmente a un ser resistente a un abanico de antibióticos, tales como aminoglucósidos, fluoroquinolonas y cefalosporinas, entre otras (Shadkam *et al.*, 2021). Además, se ha reportado una emergente resistencia a los antibióticos carbapenémicos (Shadkam *et al.*, 2021; Lee *et al.*, 2023). La aparición de cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE y de carbapenemasas es un problema grave en el ámbito de la salud pues deja limitadas opciones de tratamiento (Indrajitha *et al.*, 2020).

Por otra parte, se ha reportado que hasta un 40% de los aislados de *K. pneumoniae* obtenidos de diferentes focos de infección son productores de biofilm (Vuotto *et al.*, 2014). La formación de biofilms bacterianos tanto en superficies abióticas (dispositivos médicos, implantes, etc) como en superficies bióticas (respiratoria, urinarias o gastrointestinal) han demostrado estar estrechamente ligada a la formación de infecciones persistentes (Shadkam *et al.*, 2021; Guerra *et al.*, 2022). Los biofilms de *K. pneumoniae* constan de polisacáridos, proteínas, lípidos y ADN extracelular en general. Su proceso de formación depende de estructuras superficiales entre las cuales se destacan los pili tipo 3 y los polisacáridos capsulares. Los pili tipo 3 median la adhesión constante, mientras que los polisacáridos capsulares participan en estructura del biofilm y la comunicación intercelular (Wang *et al.*, 2020). Aunque la expresión y la cinética de formación de los biofilms de *K. pneumoniae* varía entre diferentes cepas, el proceso de formación es similar en todas ellas (Li y Ni, 2023).

1.3.2. *Escherichia coli* uropatógena

Escherichia coli es una bacteria gramnegativa, comensal, que mide aproximadamente 0,5 μm de diámetro y 3 μm de longitud, y normalmente ocupa un nicho en la microbiota intestinal de los humanos (y otros animales) desde donde emerge causando infecciones extraintestinales como las infecciones del tracto urinario (ITU) (Manges *et al.*, 2019). Las ITU se encuentran entre las infecciones bacterianas más comunes con aproximadamente 400 millones de casos y 230.000 muertes en todo el mundo en 2019 (Yang *et al.*, 2022).

En particular, las cepas de *E. coli* uropatógenas no sólo han adoptado mecanismos de virulencia para colonizar y proliferar fuera del tracto intestinal (Manges *et al.*, 2019), sino que han adquirido a lo largo del tiempo resistencia a los antibióticos lo que complica aún más el correcto tratamiento de las ITU. La aparición de resistencias a antibióticos especialmente tetraciclinas, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, macrólidos y por sobre todo a los β -lactámicos (como las penicilinas y cefalosporinas, entre otras) a través de la producción de BLEE dan como resultados que la mayoría de las opciones terapéuticas no sean efectivas, lo que conlleva a un aumento en las estadías hospitalarias y en los costos de tratamiento (Shrestha *et al.*, 2019; Alfuraiji *et al.*, 2022; Whelan *et al.*, 2023). Además, la capacidad para formar biofilm de las cepas de *E. coli* uropatógenas es otro factor crucial para el establecimiento, persistencia y recurrencia en las ITU. Estos biofilms pueden formarse en superficies abióticas o biológicas, como catéteres urinarios o epitelio del tracto urinario, otorgando protección a las *E. coli* frente condiciones adversas, agentes antimicrobianos y el sistema inmunológico del huésped (Naziri *et al.*, 2021). Los principales componentes de los biofilm de *E. coli* son la celulosa (polisacáridos) y el curli (proteínas) (Serra y Hengge, 2021). Su formación está gobernada por diversos factores de virulencia que cumplen funciones específicas durante diferentes etapas en la formación del biofilm. Dentro de ellos se destacan algunos como adhesinas fimbriales (fimbrias o pili tipo 1), sideróforos y polisacáridos capsulares (grupo II) (Sharma *et al.*, 2016). Además se ha reportado que, a diferencia de otras

especies, *E. coli* presenta un mayor grado de similitud en cuanto a la composición estructural de los biofilms entre diferentes cepas (Serra y Hengge, 2021).

1.4. Las plantas como fuente de nuevas drogas: los metabolitos secundarios.

Las plantas a través de la historia de la humanidad han desempeñado un papel fundamental como fuente de nuevas biomoléculas terapéuticamente activas. En la actualidad el 70-90% de la población de los países en desarrollo utilizan medicinas basadas en extractos de plantas (Anand *et al.*, 2019). Al presente, se ha reconocido la existencia de alrededor de 350.000 a 550.000 especies de plantas medicinales, de las cuales sólo se ha investigado su potencial medicinal en el 20% de ellas (Sen y Samanta *et al.*, 2014).

En conjunto, las plantas producen una gran diversidad de productos naturales de bajo peso molecular que incluyen alrededor de 1×10^5 compuestos orgánicos, conocidos como metabolitos secundarios. Los metabolitos secundarios se distinguen de los intermediarios del metabolismo primario en que generalmente no son esenciales para los procesos metabólicos básicos de la planta (Simpson *et al.*, 2018). Se acumulan en tejidos específicos en determinadas especies y/o familias de vegetales y se sintetizan como respuesta a estrés bióticos y abióticos como respuesta adaptativa al estrés ambiental y en defensa contra el ataque microbiano y/o la predación de insectos y animales. Ya han sido descubiertos más de 50.000 metabolitos secundarios en el reino vegetal, y en la actualidad son empleados tanto en hierbas medicinales como en medicamentos modernos (Teoh, 2015; Pye *et al.*, 2017).

Estos compuestos presentan una gran diversidad de estructuras químicas y los principales grupos son: terpenos, compuestos fenólicos, alcaloides y glucósidos. Los terpenos se clasifican según el número de isoprenos que contengan y se dividen en monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos y politerpenos que incluyen compuestos volátiles y no volátiles (Reshi *et al.*, 2023).

El análisis de los metabolitos secundarios vegetales ha tomado relevancia debido a sus variadas estructuras químicas y amplio espectro de actividades biológicas, tales como efectos antimicrobianos, anticancerígenos, antioxidantes y antiinflamatorios, entre otros (Compean y Ynalvez, 2014).

1.4.1. Metabolitos secundarios vegetales como agentes antibiofilm

La actividad antibiofilm ha sido reportada en extractos de diversas especies vegetales, aceites esenciales y compuestos aislados (Silva *et al.*, 2023). La Figura 8 muestra las principales especies vegetales y fitoquímicos que presentan actividad antibiofilm sobre diferentes etapas del desarrollo del biofilm: algunos compuestos inhiben la adhesión, mientras que otros interfieren en el desarrollo y maduración o desagregan los biofilm maduros.

La inhibición de la adhesión bacteriana a una superficie se logra principalmente mediante recubrimientos superficiales que alteran las propiedades de la superficie o impregnando la superficie con moléculas antimicrobianas. En esta línea se ha reportado que el polifenol proantocianidina de las hojas de *Pityrocarpa moniliformis* (Benth.) Luckow & R.W.Jobson era capaz de prevenir la adhesión inicial de *Staphylococcus epidermidis* a la superficie (Trentin *et al.*, 2015).

También existen compuestos capaces de inhibir la producción de EPS, interrumpiendo así el ciclo de formación de los biofilms al evitar su maduración. Un ejemplo de dicha actividad fue reportado en un extracto de arándano rico en polifenoles, el cual fue capaz de reducir la producción de la matriz inhibiendo la formación de biofilms maduros de *Vibrio cholerae* (Pederson *et al.*, 2018).

Otros compuestos atenúan factores de virulencia bacteriana involucrados en los pasos iniciales de la formación y maduración de los biofilms controlados por el quórum sensing, mecanismo de regulación de la expresión génica en respuesta a las fluctuaciones en la densidad de la población celular a través de señales químicas llamadas autoinductores. Se ha reportado que los monoterpenos como el carvacrol y metileugenol inhiben la expresión de factores de virulencia, entre ellos la violaceína y la actividad de quitinasa regulada por quórum sensing en

Chromobacterium violaceum (Burt *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2019). El ácido rosmarínico también suprimió varios factores de virulencia, como la producción de hemolisina, lipasa y elastasa en *Aeromonas hydrophila* (Rama Devi *et al.*, 2016). Se reportó la existencia de compuestos de origen vegetal capaces de producir la disrupción de biofilms maduros. Un extracto de la planta *Arisaema sinii* Krause disgregó biofilms maduros de *Mycobacterium tuberculosis*, mientras que un extracto metanólico de *Carum copticum* (cuyo compuesto mayoritario es el monoterpeno timol) disgregó biofilms de bacterias grampositivas y gramnegativas y además se observó disminución de la actividad metabólica de las células del biofilm bacteriano en algunas especies (Jiang *et al.*, 2019; Mohammadi *et al.*, 2019). En esa misma línea se observó que extractos de *Allium stipitatum* Regel. y *Peganum harmala* fueron capaces de disgregar y matar en simultáneo biofilms de aislados de *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Pseudomonas aeruginosa* (Karunanidhi *et al.*, 2018; Khadraoui *et al.*, 2022).

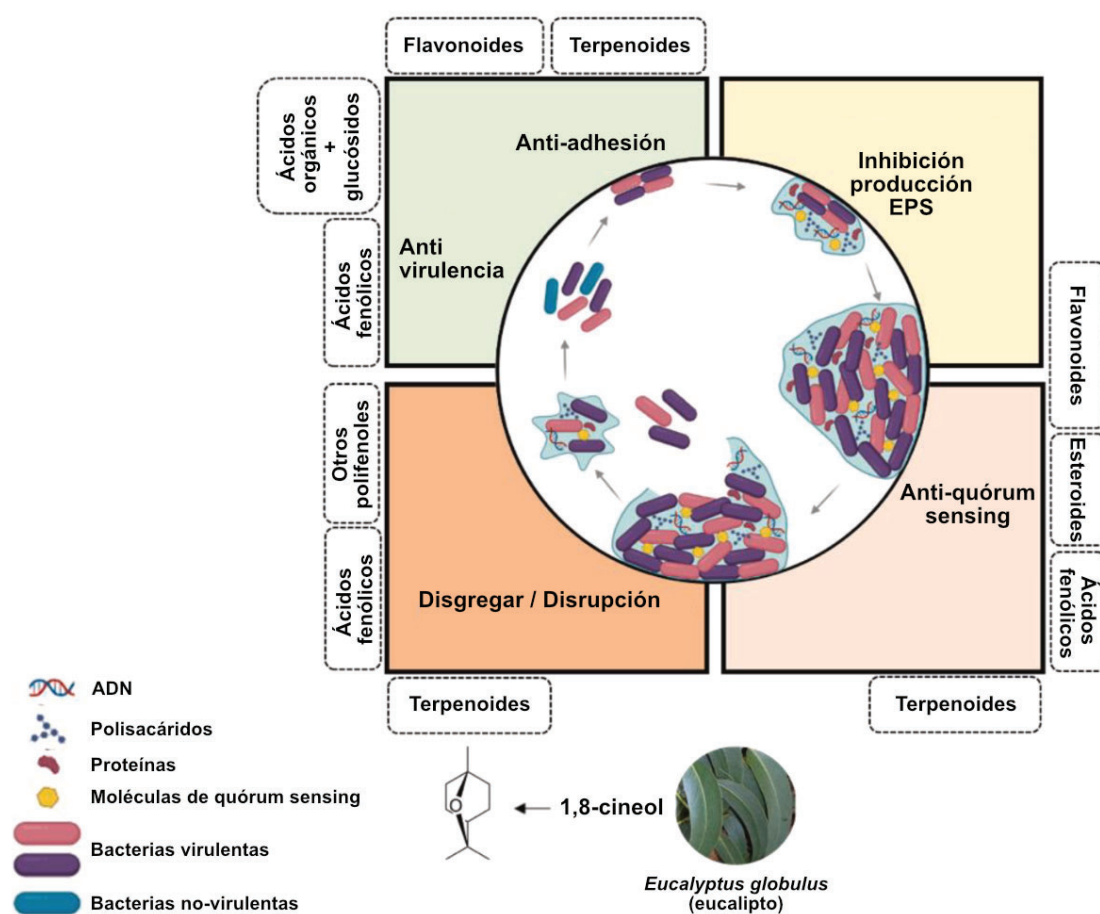


Figura 8. Etapas de desarrollo de un biofilm y principales mecanismos antibiofilm de los metabolitos secundarios vegetales. En este esquema, se asocian ejemplos de extractos de plantas o fitoquímicos (si se han identificado) a cada mecanismo de acción antibiofilm. (adaptado de Silva *et al.*, 2023)

1.4.2. *Rosmarinus officinalis* L.

R. officinalis L., conocida comúnmente como romero, es una planta perteneciente a la familia Lamiaceae de su uso culinario como aromatizante y conservante de alimentos. Se trata de un arbusto aromático de aproximadamente dos metros de altura, con flores azul-violáceas y hojas pequeñas opuestas en forma de aguja (de Oliveira *et al.*, 2019). Si bien es originaria de la región mediterránea, se cultiva en todo el mundo y se encuentra naturalizada en Argentina (Ojeda-Sana *et al.*, 2013^a; Borges *et al.*, 2018).

En la medicina tradicional se utiliza como colagogo, diaforético, emenagogo, laxante, en trastornos menstruales, nerviosos, cansancio, esguinces, contusiones, úlceras y heridas y en el cuidado del cabello y sus propiedades etnofarmacológicas incluyen efectos como antibacteriano, antiinflamatorio, antioxidante, antidiabético, hepatoprotector, antidiurético, antitrombótico, estimulante cognitivo (Habtemariam, 2016).

La especie es reconocida como una de las más importantes fuentes de compuestos bioactivos de naturaleza no-volátiles y volátiles (Bradley, 2006). Previamente, se identificaron y caracterizaron los compuestos antimicrobianos mayoritarios en extractos no-volátiles como el diterpeno fenólico ácido carnósico, y el éster del ácido cafeico denominado ácido rosmarínico (Moreno *et al.*, 2006; Romano *et al.*, 2009; Ojeda-Sana *et al.*, 2013^b; Vázquez *et al.*, 2016). En los aceites esenciales de especímenes argentinos de *R. officinalis* L. se identificaron los monoterpenos 1,8-cineol (1,8-C) y α -pineno como los principales compuestos antimicrobianos contra bacterias gramnegativas y grampositivas, respectivamente (Ojeda-Sana *et al.*, 2013^a).

Se ha reportado una clara tendencia al alza en el número de artículos sobre *R. officinalis* L. en los últimos 25 años, reflejado en la gran cantidad de investigaciones realizadas desde 2010 con una media de 120 publicaciones cada año (Andrade *et al.*, 2018). Gran parte del interés por estudiar los fitoquímicos de esta especie vegetal se debe a que presenta importantes actividades farmacológicas y se busca discernir los mecanismos implicados en las mismas para evaluar su real potencial en la medicina moderna, entre otros, como antimicrobiano, antioxidante, antiadipogénico, antitumoral y antiinflamatorio (Moreno *et al.*, 2006; Mengoni *et al.*, 2011; Barni *et al.*, 2012; Gaya *et al.*, 2013).

1.4.3. 1,8-cineol

El 1,8-cineol (1,8-C; 1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo[2,2,2]octano) es un monoterpeno oxigenado cíclico, conocido como eucaliptol, que se encuentra en gran cantidad en los aceites esenciales de plantas de eucalipto, romero y salvia (Figura 9).

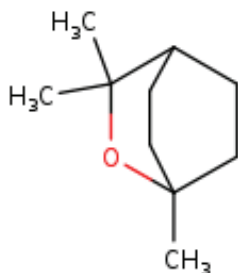


Figura 9. Estructura química del 1,8-C.

Ha sido utilizado históricamente en la medicina tradicional de diversas culturas, como las de China, India y Australia, para tratar una gran variedad de condiciones, incluyendo problemas respiratorios, trastornos digestivos, fiebre y dolores diversos (Chandorkar *et al.*, 2021). Actualmente, debido a su aroma y sabor, el 1,8-C se utiliza frecuentemente como aditivo alimentario, en fragancias y en cosmética.

1.4.3.1. Características y propiedades químicas

El 1,8-C a temperatura ambiente se presenta en forma de un líquido transparente con un punto de fusión a 1,5 °C y un punto de inflamación a 49 °C. Presenta un coeficiente de reparto entre lípidos y agua (Log P) de 2,74 lo cual lo transforma en una molécula hidrofóbica pero dado que su valor de Log P no dista mucho del 0 se lo considera una molécula de baja hidrofobicidad, lo cual le otorga un equilibrio óptimo entre solubilidad y permeabilidad para su biodisponibilidad oral (Prasanthi y Lakshmi, 2012). La farmacocinética muestra una absorción eficiente del compuesto en conejos alcanzando una concentración plasmática máxima en menos de 1 hora luego de la administración oral de 200 mg/kg (Miyazawa *et al.*,

1989). En animales como conejos y zarigüeyas el compuesto es biotransformado a derivados hidroxilados como 7-hidroxi-1,8-C y 9-hidroxi-1,8-C (Boyle *et al.*, 2000; Horst y Rychlik, 2010), mientras que en modelos con roedores se observó modificaciones oxidativas generando metabolitos como 2-hidroxi-1,8-C y 3-hidroxi-1,8-C, presentes dentro de las 2 horas posteriores a la administración oral.

1.4.3.2. Propiedades farmacológicas

El 1,8-C ha ganado una amplia atención debido a la variedad de propiedades biológicas que presenta tales como efectos antimicrobianos, antiinflamatorios, antioxidantes, mucolíticos/secretolíticos y broncodilatadores (Dhakad *et al.*, 2017; Cai *et al.*, 2020). Además, se ha reportado que presenta propiedades neuroprotectoras, analgésicas y proapoptóticas, subrayando su posible papel beneficioso en patologías como la enfermedad de Alzheimer, el dolor neuropático y el cáncer (Zheng *et al.*, 2019; Rodenak-Kladniew *et al.*, 2020; An *et al.*, 2022). Ensayos clínicos en pacientes con EPOC, asma, bronquitis y rinosinusitis respaldan dichos efectos positivos (Hoch *et al.*, 2023) (Figura 10).

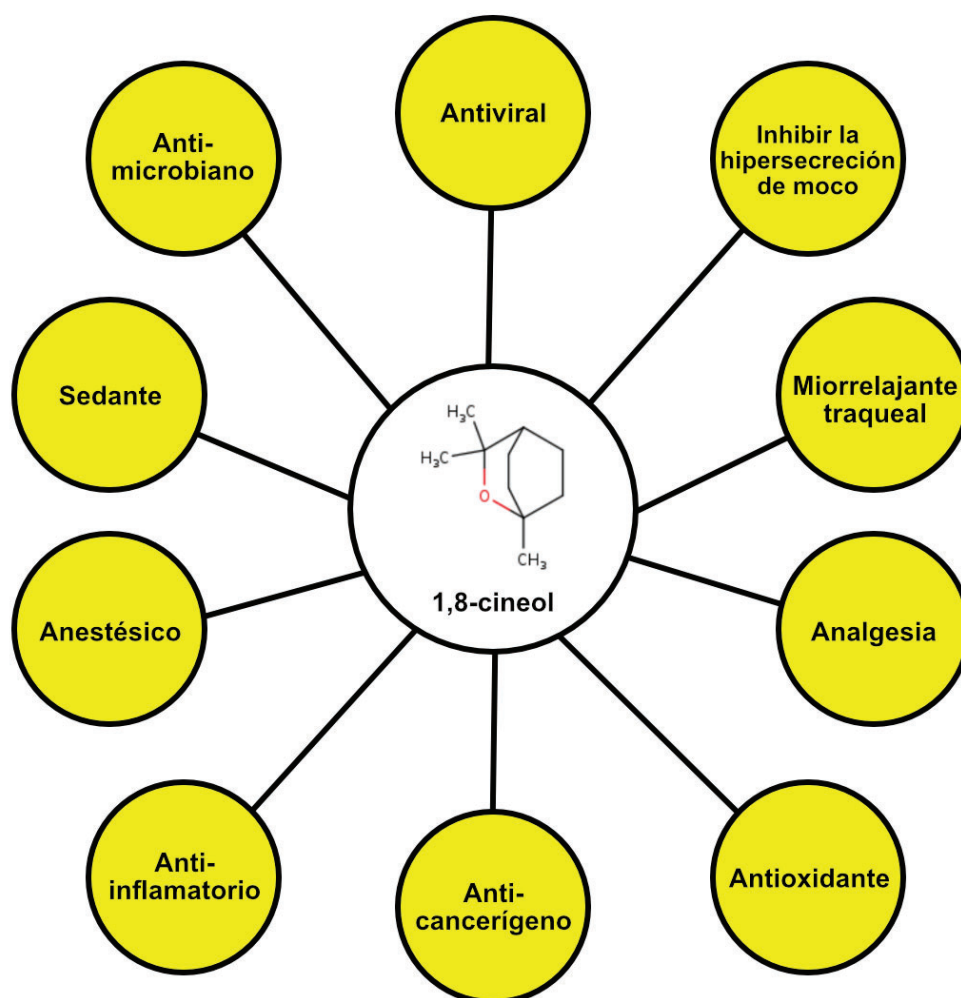


Figura 10. Propiedades farmacológicas del 1,8-C (adaptado y modificado de Cai et al., 2020).

Respecto a las capacidades del 1,8-C como antimicrobiano, se ha observado que posee actividad frente a varias cepas patógenas grampositivas, incluyendo *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus flavus* y *Staphylococcus epidermidis*, así como cepas gramnegativas, como *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis* y *Salmonella typhimurium* (Soković et al., 2010; Ojeda-Sana et al., 2013^a; Kifer et al., 2016; Şimşek y Duman, 2017; Cepas et al., 2019; Vijayakumar et al., 2020; Jiang et al., 2021; Farhanghi et al., 2022).

Las propiedades antimicrobianas del 1,8-C se atribuyen principalmente a su capacidad para causar la permeabilización de la membrana celular dada su

naturaleza hidrofóbica (Ojeda-Sana *et al.*, 2013^a; Hąc-Wydro y Szydło, 2016; Cepas *et al.*, 2019).

Otros estudios han demostrado un mayor efecto utilizándolo en combinación con otros antibióticos de uso clínico (Hriouech *et al.*, 2020; Kwiatkowski *et al.*, 2020; Mączka *et al.*, 2021). Se reportó actividad antibacteriana sinérgica del fitoquímico en combinación con el antibiótico nisina y β -lactámicos como penicilina G y metilicina contra aislados de *S. aureus* tanto sensibles como resistentes a metilicina (Farhanghi *et al.*, 2022)

Por otra parte, a dosis no inhibitorias, se ha observado que el 1,8-C inhibe sustancialmente la expresión del QS, el cual desempeña un papel crucial en la formación de los biofilms bacterianos (Kumar *et al.*, 2015). Además, el compuesto redujo significativamente la formación de biofilms y la motilidad en aislados de *Streptococcus pyogenes* (Vijayakumar *et al.*, 2020). También, se documentó una reducción en la formación de biofilm en *S. aureus*, la bacteria más prevalente en la sinusitis crónica (Schürmann *et al.*, 2019).

Si bien se ha indicado que el 1,8-C puede modificar la forma y el tamaño de células bacterianas tanto gramnegativas como grampositivas, su actividad antimicrobiana parece ser más pronunciada frente a las bacterias gramnegativas en comparación con las grampositivas, que poseen una pared celular y membrana más robusta (Li *et al.*, 2014). Esta última observación es relevante en el entorno clínico dada la eficacia limitada de los antibióticos convencionales frente a patógeno gramnegativos de alta prevalencia.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* contienen compuestos antimicrobianos que presentan la capacidad de inhibir el crecimiento planctónico de enterobacterias sensibles a antibióticos. Uno de los constituyentes mayoritarios de los mismos, el 1,8-C, exhibió capacidad antimicrobiana frente a aislados sensibles a antibióticos de *K. pneumoniae* y *E. coli*. Por lo tanto, en este trabajo doctoral se pone a prueba la hipótesis de su actividad antibiofilm frente a aislados clínicos multirresistentes a antibióticos de dichas especies bacterianas.

2.2. OBJETIVO GENERAL

El tratamiento de infecciones causadas por bacterias multirresistentes a antibióticos representa un desafío sanitario urgente a nivel mundial. El panorama aún es más complejo en caso de patógenos multirresistentes a antibióticos con capacidad para formar biofilm. Al formar dichas comunidades complejas, las bacterias desarrollan una alta tolerancia a los antibióticos (hasta 1.000 veces mayor) en comparación a las bacterias que crecen de manera individual. En la búsqueda de alternativas eficaces para combatir estas infecciones, los fitoquímicos con actividad antimicrobiana son considerados compuestos competentes con un alto potencial terapéutico.

El principal componente de la planta *Rosmarinus officinalis*, el 1,8-C, ha demostrado capacidad antimicrobiana frente a cepas sensibles a antibióticos de *K. pneumoniae* y *E. coli*. Dado que ambas bacterias son catalogadas como de prioridad crítica por la OMS, presentan una alta prevalencia de cepas multirresistentes productoras de BLEE y resistencia a los carbapenémicos, se propone en este trabajo de tesis investigar la acción antibiofilm del fitoquímico 1,8-C sobre aislados clínicos de *K. pneumoniae* y *E. coli* multirresistentes a antibióticos (MDR-BLEE).

2.3. OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto del 1,8-C sobre la viabilidad de células en biofilms preformados de *K. pneumoniae* y *E. coli* de manera global, mediante la determinación de las unidades formadoras de colonias, y de manera específica en distintas regiones de estos biofilms, mediante microscopía confocal.
- Evaluar el efecto del 1,8-C sobre la biomasa y la estructura de biofilms preformados de *K. pneumoniae* y *E. coli* mediante tinción con cristal violeta y microscopía confocal luego de tinción con calcofluor-white.
- Estudiar la viabilidad de células desprendidas de biofilms preformados de aislados clínicos de *E. coli* luego del tratamiento con 1,8-C.
- Estudiar la participación de enzimas hidrolíticas capaces de degradar la matriz del biofilm preformado de *E. coli* como posible mecanismo de acción antibiofilm del fitoquímico a través de pruebas de actividad enzimática luego del tratamiento con 1,8-C a diferentes temperaturas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Aislados bacterianos

Las cepas clínicas de *K. pneumoniae* y *E. coli* utilizadas en este estudio fueron aisladas de pacientes adultos y sus perfiles de resistencia se describen en la Tabla 1. Las cepas denominadas Kp AM y Ec AM provienen de muestras de orina recogidas de pacientes ingresados en un centro médico de la Ciudad de Buenos Aires (Argentina) entre 2017 y 2018 (Martinez, 2018), mientras que Kp 010, Kp 05 y Ec 07 provienen de pacientes con infecciones del tracto urinario asociadas a catéter en el Hospital General de Agudos “Dr. Ignacio Pirovano” (Ciudad de Buenos Aires, Argentina) (Moreno *et al.*, 2015; Galvan *et al.*, 2016). La identificación microbiológica y las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos se llevaron a cabo mediante métodos estándar, según los estándares del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2018). La producción de β -lactamasas de espectro extendido por parte de los aislados de *K. pneumoniae* y *E. coli* fue determinado por la prueba de sinergia de doble disco utilizando ceftazidima, cefotaxima y cefepima con y sin ácido clavulánico, de acuerdo con los estándares del CLSI. Todas las cepas clínicas utilizadas en este estudio fueron aisladas como parte de los procedimientos clínicos de rutina del hospital para diagnosticar infecciones y, por lo tanto, no se requirió aprobación ética, según las directrices institucionales correspondientes.

Tabla 1. Aislados de *K. pneumoniae* y *E. coli* utilizados en esta tesis

Cepa	Resistencia antibiótica	Clasificación	Fuente
Kp 010	AMP	Sensible	Moreno <i>et al.</i> , 2015
Kp AM4	AMK, AMC, AMP, CAZ, CEF, CIP, CTX, NIT, GEN, SXT, TZP	BLEE	Vazquez <i>et al.</i> , 2022
Kp AM7	AMC, AMP, CAZ, CEF, CIP, CTX, NIT, SXT	BLEE	Vazquez <i>et al.</i> , 2022
Kp 05	AMP, CHL, CAZ, CEF, CTX, GEN, NAL, RIF, TEC	BLEE	Galvan <i>et al.</i> , 2016
Ec ATCC 25922	Ninguna	Sensible	ATCC
Ec AM7	SXT, CIP, AMC, CTX, CAZ, CEF, GEN, AMK	BLEE	Vazquez <i>et al.</i> , 2020
Ec AM10	CIP, AMC, CTX, CAZ, CEF	BLEE	Vazquez <i>et al.</i> , 2020
Ec 07	AMP, CIP, CTX, CAZ, CEF, FEP, GEN, NAL	BLEE	Galvan <i>et al.</i> , 2016

AMK, amikacina; AMC, amoxicilina-Ac. clavulánico; AMP, ampicilina; CHL, cloranfenicol; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepime; CEF, cefaloridina; CIP, ciprofloxacina; CTX, cefotaxima; NIT, nitrofuratoína; GEN, gentamicina; NAL, ácido nalidíxico; RIF, rifampicina; SXT, trimetoprima-sulfametoxazol; TET, tetraciclina; TZP, piperacilina-tazobactam; ATCC, American Type Culture Collection.

3.2. Medios y condiciones de cultivo

Los aislados de *K. pneumoniae* y *E. coli* utilizados en este trabajo fueron conservados a -80°C en medio Luria - Bertani (LB) suplementado con 15% de glicerol. Las cepas fueron inoculadas en placas de Tripteína Soya Agar (TSA) y se incubaron a 37°C durante toda la noche (overnight u ON). Posteriormente se utilizaron colonias individuales para preparar los inóculos ON en 2 ml de medio Tripteína Soya Caldo (TSC) a 37°C con agitación a 200 RPM. El crecimiento bacteriano se evidenció como la turbidez del medio de cultivo medida por dispersión de luz a 600 nm (DO_{600nm}) en un espectrofotómetro (Spectrum SP-1102). Se estableció la relación entre la DO_{600nm} y el número de células viables ($1 DO_{600nm} = 6,3 \times 10^8$ UFC/ml) haciendo diluciones al décimo de los cultivos, inoculación en placas de TSA, incubación durante 16 horas a 37°C y posterior recuento de las unidades formadoras de colonia (UFC).

Finalmente cada inóculo se diluyó adecuadamente en medio mínimo M9 suplementado con 0,8% de glucosa para obtener una concentración bacteriana de 10^7 células/ml. La formulación de los medios de cultivo utilizados se encuentra detallada en la Tabla 2.

Tabla 2. Medios de cultivo

Medio de cultivo	Componentes	Cantidades
Luria – Bertani (LB)	Triptona	10 g/L
	Extracto de Levadura	5 g/L
	NaCl	5 g/L
	Agar (cuando es necesario)	15 g/L
Tripteína Soya Caldo / Agar (TSC / TSA)	Tripteína	17 g/L
	Peptona de Soja	3 g/L
	NaCl	5 g/L
	K ₂ HPO ₄	2,5 g/L
	Glucosa	2,5 g/L
Medio mínimo M9	Agar (cuando es necesario)	15 g/L
	Sales de M9 X10 *	100 ml/L
	CaCl ₂ 1M	100 µl/L
	MgSO ₄ 1M	2 ml/L
	Glucosa 40%	20 ml/L
	H ₂ O	878 ml/L
Tween 80 al 20% (cuando es necesario)	30 ml/L	

* 60 g de Na₂HPO₄, 30 g de KH₂PO₄, 5 g de NaCl y 10 g de NH₄Cl cada 1L.

3.3. Ensayos de producción de biomasa de biofilm

Los inóculos bacterianos en medio mínimo M9 (1×10^7 células/ml) se colocaron en placas de poliestireno de 96 pocillos (200 μ l por pocillo) o en placas de 24 pocillos (1 ml por pocillo) (DeltaLab, Barcelona, España) y se incubaron sin agitación a 37°C. Los biofilms se desarrollaron en M9 ya que este medio mínimo favorece la formación de biofilms más robustos en enterobacterias, como *K. pneumoniae* y *E. coli*, que un medio rico (por ejemplo, LB o TSC) (Naves *et al.*, 2008; Moreno *et al.*, 2015). Se permitió la adhesión a la superficie durante 3 horas y luego se reemplazó el medio cada 24 h. Los biofilms desarrollados en placas de 96 pocillos se lavaron tres veces con solución salina estéril al 0,9% antes de cuantificar la biomasa mediante tinción con cristal violeta (CV), determinando la absorbancia a 595 nm ($A_{595\text{nm}}$) (Ferrières *et al.*, 2007). Todos los ensayos de CV se realizaron al menos por triplicado y, para cada placa, se utilizaron como blancos tres pocillos conteniendo solamente M9. Los aislados bacterianos se clasificaron en base a los niveles de producción de biofilm de la siguiente manera: altos productores de biofilm ($A_{595\text{nm}} \geq 1$), bajos productores de biofilm ($0,2 \leq A_{595\text{nm}} \leq 1$) o no productores de biofilm ($A_{595\text{nm}} \leq 0,2$) (Lagha *et al.*, 2019).

3.4. Tratamiento de biofilms preformados con 1,8-C

Se prepararon soluciones del fitoquímico 1,8-C (Sigma-Aldrich, EE.UU.) (0,25 - 2%, v/v) en medio M9 suplementado con 0,5% Tween 80 (M9 - Tween 80) a partir de una solución de compuesto puro al 80% (v/v) en etanol. Los biofilms preformados (1 - 3 días) se lavaron con solución salina al 0,9%, luego se añadió cuidadosamente la concentración indicada de 1,8-C sobre los biofilms, y las placas se incubaron estáticamente a 37°C. Se realizaron controles con el vehículo, etanol correspondientes a cada dilución del fitoquímico en M9 - Tween 80 (Tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones utilizadas para el tratamiento de los biofilms

Concentración (% v/v)	
1,8-C	Control Etanol
0,12	0,03
0,25	0,06
0,50	0,12
1,00	0,25
2,00	0,50

A distintos tiempos, se retiró el medio y se lavaron los biofilms con solución salina al 0,9%. La viabilidad celular se determinó por recuento de UFC de las suspensiones bacterianas obtenidas luego de la disrupción mecánica de los biofilms. La cuantificación de la biomasa del biofilm se llevó a cabo como se mencionó en el ítem 3.3. La determinación de la actividad metabólica en las células se realizó mediante el ensayo colorimétrico de MTS, el cual se basa en la reducción de sales de formazan y cambio de color de amarillo a marrón debido a la presencia de actividad metabólica. Los experimentos se realizaron en triplicado biológico, y se realizaron duplicados técnicos para el recuento de UFC y quintuplicados técnicos para la determinación de biomasa por CV y actividad metabólica por MTS.

3.5. Efecto del 1,8-C sobre la adhesión inicial bacteriana a la superficie de desarrollo del biofilm

Se prepararon soluciones del fitoquímico con concentraciones subinhibitorias del 1,8-C (0,06 y 0,12% v/v) y el control con etanol en M9 - Tween 80 como se explicó en el ítem 3.4. Estas soluciones fueron colocadas en placas de poliestireno de 24 pocillos, se añadieron las bacterias (10^7 UFC/ml) y se incubó estáticamente durante 3 h a 37°C. Posteriormente se retiró el medio y las células adheridas fueron lavadas con solución salina al 0,9%. La viabilidad celular se determinó por

el recuento UFC como se explicó previamente. Los experimentos se realizaron en triplicado biológico y duplicados técnicos.

3.6. Microscopía confocal de biofilms teñidos para determinar células vivas/muertas y matriz

Se desarrollaron biofilms de Kp AM7, Kp 05, Ec ATCC 25922 y Ec AM7 en cubreobjetos de vidrio de 12 mm, como se describió previamente (ítem 3.3). Los biofilms preformados (2 o 3 días) se trataron con un 1% (v/v) de 1,8-C durante 1 h. Los controles con vehículo (etanol) se llevaron a cabo como se explicó anteriormente (ítem 3.4). La viabilidad bacteriana se ensayó utilizando el kit BacLight™ Bacterial Viability Kit (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) que permite la observación de células vivas y muertas a través de la tinción diferencial de ácidos nucleicos con el fluoróforo verde SYTO®9 (células vivas) y el fluoróforo rojo ioduro de propidio (células muertas). La matriz del biofilm se analizó mediante tinción con el fluoróforo calcofluor-white (Sigma-Aldrich, EE.UU.), el cual se une a polisacáridos β (1→4) presentes en la matriz de los biofilms de *K. pneumoniae* y *E. coli*. Todos los procedimientos de tinción se llevaron a cabo a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 minutos, con las siguientes concentraciones finales: SYTO®9 (1,1 μ M), ioduro de propidio (24 μ M) y calcofluor-white (0,5 mM). La observación de los biofilms se realizó utilizando un microscopio confocal (CLSM) Nikon Eclipse T1 (Nikon Corporation, Japón). Se tomaron imágenes representativas (regiones de 123 x 123 μ m para observación de células vivas/muertas y de 635 x 635 μ m para observación de matriz de biofilm) con una resolución de 512 x 512 píxeles. Para cada biofilm, se tomaron seis compilaciones de imágenes del eje z (z-stacks) en diferentes ubicaciones a lo largo del biofilm, con incrementos en el eje z de 1 μ m. Se utilizaron secciones no teñidas y teñidas individualmente para cada fluoróforo para restar todas las señales de fondo inespecífico. Se utilizó el software COMSTAT 2.1 (www.comstat.dk) (Heydorn *et al.*, 2000; Vorregaard *et al.*, 2008) e ImageJ para cuantificar tanto las células viables (SYTO®9; verde) y muertas (ioduro de propidio; rojo), como el volumen de

biomasa (calcofluor-white; cyan). Se generaron reconstrucciones 3D y galerías de imágenes a lo largo del eje z para los ensayos de viabilidad celular con el software Icy (de Chaumont *et al.*, 2012), mientras que se utilizó el software Huygens Essential (Scientific Volumetric Imaging, Países Bajos) para obtener proyecciones de intensidad máxima (PMI) de z-stacks de la matriz del biofilm y reconstrucciones 3D.

3.7. Evaluación de la viabilidad de células desprendidas del biofilm luego del tratamiento con 1,8-C

Los biofilms de *Ec* AM7 preformados durante 3 días fueron tratados con un 1% (v/v) 1,8-C durante 1 h a 37°C. Los controles con vehículo (etanol) se llevaron a cabo como se explicó anteriormente (ítem 3.4). Las bacterias en el medio circundante al biofilm (sobrenadante) (~1 ml) fueron recogidas y centrifugadas (12.000 RPM durante 5 minutos), y el pellet se resuspendió en 1 ml de solución salina al 0,9%. Para la cuantificación de las células viables se realizó el recuento de UFC como se explicó previamente. También se evaluó la viabilidad celular mediante citometría de flujo (BD FACSCanto II, Becton, Dickinson and Co., EE.UU.), luego de teñir las bacterias con yoduro de propidio, según se describe en Robertson *et al.*, 2019. Como control de muerte celular, las células bacterianas fueron inactivadas por exposición a isopropanol 70% durante 60 min. a 28°C. El análisis de citometría de flujo de bacterias teñidas con SYTO[®]9 y yoduro de propidio se llevó a cabo utilizando el software FlowJo v10.0.7 (Becton, Dickinson and Company, EE.UU.).

3.8. Ensayos de susceptibilidad de células planctónicas al 1,8-C

Suspensiones bacterianas (10^7 UFC/ml) en M9 - Tween 80 fueron desafiadas con 1,8-C al 1% (v/v) o etanol al 0,25% (v/v) durante distintos tiempos a 37°C. La actividad antibacteriana del fitoquímico se determinó por el recuento de UFC como se explicó previamente.

3.9. Evaluación de los componentes de la matriz del biofilm relevantes para su estructura/biomasa

Los biofilms de Ec ATCC 25922 preformados durante 3 días fueron tratados con 10 U/ml de celulasa de *Trichoderma* sp. (Sigma-Aldrich, EE.UU.), 100 µg/ml de proteinasa K (QIAGEN, Alemania) y 100 kunitz/ml de DNasa I (QIAGEN, Alemania) durante 1 hora a 37°C (Fleming *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2019). Se llevaron a cabo controles sin tratamiento reemplazando el medio de cultivo por medio fresco. Los biofilms tratados se lavaron tres veces con solución salina estéril al 0,9% antes de cuantificar la biomasa mediante tinción con CV (A_{595nm}).

3.10. Análisis *in silico* de enzimas hidrolíticas de *E. coli* que pueden degradar la matriz del biofilm

A partir de secuencias de aminoácidos de las enzimas hidrolíticas BcsZ (P37651), PgaB (P75906), Dcp (P24171), PepD (P15288), SohB (P0AG14), DegP (P0C0V0) y BepA (P66948) de *E. coli* K12, extraídas de la base de datos UniProt (www.uniprot.org), se buscaron secuencias homólogas en aislados de *E. coli* uropatogénicas con genoma secuenciado (ATCC 25922, UTI89, CFT073 y EcPF5) en la base de datos de proteínas del National Institutes of Health o NIH (www.ncbi.nlm.nih.gov/protein). Se realizaron alineamientos múltiples de dichas secuencias mediante el algoritmo Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo).

El porcentaje de identidad se calculó a partir del número de coincidencias halladas entre dos secuencias de aminoácidos alineadas sobre el total de de aminoácidos presentes en la secuencia de referencia.

3.11. Evaluación de la actividad del 1,8-C sobre biofilms a bajas temperaturas

Se expusieron biofilms de *Ec* ATCC 25922, preformados estáticamente durante 3 días a 37°C, a un tratamiento con un 1% (v/v) 1,8-C durante 1 h a diversas temperaturas inferiores a 37°C (6, 12, 20°C). Se llevaron a cabo controles sin tratamiento reemplazando el medio de cultivo por medio fresco. Los controles con el vehículo se realizaron utilizando concentraciones de etanol del 0,25% v/v en medio M9 - Tween 80. Los biofilms tratados se lavaron tres veces con solución salina estéril al 0,9% antes de cuantificar la biomasa mediante tinción con CV a una absorbancia de 595 nm. Cuando se indicó, se realizaron ensayos para determinar por microscopía confocal células vivas/muertas o matriz del biofilm (ítem 3.6).

3.12. Análisis estadístico

La significancia estadística entre las muestras tratadas con 1,8-C y los controles, o la diferencia entre distintos niveles de producción de biofilm se determinó utilizando la prueba *t* de Student (una cola) o el análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de la prueba post hoc de Bonferroni, utilizando el software GraphPad Prism versión 9 (GraphPad Software, EE.UU.). Las diferencias se consideraron significativas cuando los valores de *P* fueron menores a 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. CAPÍTULO N°1: ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIBIOFILM DEL 1,8-C SOBRE AISLADOS CLÍNICOS MULTIRRESISTENTES DE *K. pneumoniae*

4.1.1. Producción de biofilm en *K. pneumoniae*

Como primer paso se estudió la capacidad de formación de biofilm de los aislados clínicos urinarios de *K. pneumoniae*, cuyos perfiles de resistencia a antibióticos se muestran en Materiales y Métodos (Tabla 1). Como se mencionó en la Introducción, se ha reportado que *K. pneumoniae* es capaz de producir biofilm, sin embargo el nivel de producción puede variar de cepa en cepa. Por lo tanto, fue primordial determinar los niveles de producción de biofilm al comienzo del estudio. Para ello, se analizó la formación de biofilm en función del tiempo (entre 1 y 2 días) en los aislados clínicos MDR-BLEE: Kp AM4, Kp AM7 y Kp 05, y en la cepa sensible a antibióticos Kp 010, mediante la cuantificación de sus biomasas por el ensayo de tinción con cristal violeta (Figura 11). Los resultados obtenidos evidenciaron que todas las cepas eran capaces de producir biofilm, cuyo nivel fue significativamente mayor en el día 2 de desarrollo respecto al día 1. La cepa que presentó mayor producción de biofilm fue Kp 05 (A_{595nm} de 3,3), mientras que las cepas Kp 010, Kp AM4 y Kp AM7 mostraron una menor producción (A_{595nm} de 1,8, 1,3 y 1,2, respectivamente). Todos los aislados exhibieron niveles de producción que se pueden considerar como altas productoras de biofilm ($A_{595nm} > 1$) (Lagha *et al.*, 2019). Es importante destacar que al día 2 la cepa Kp 05 presentó una producción significativamente mayor de biofilm a la observada en la de menor producción de biofilm, la cepa Kp AM7.

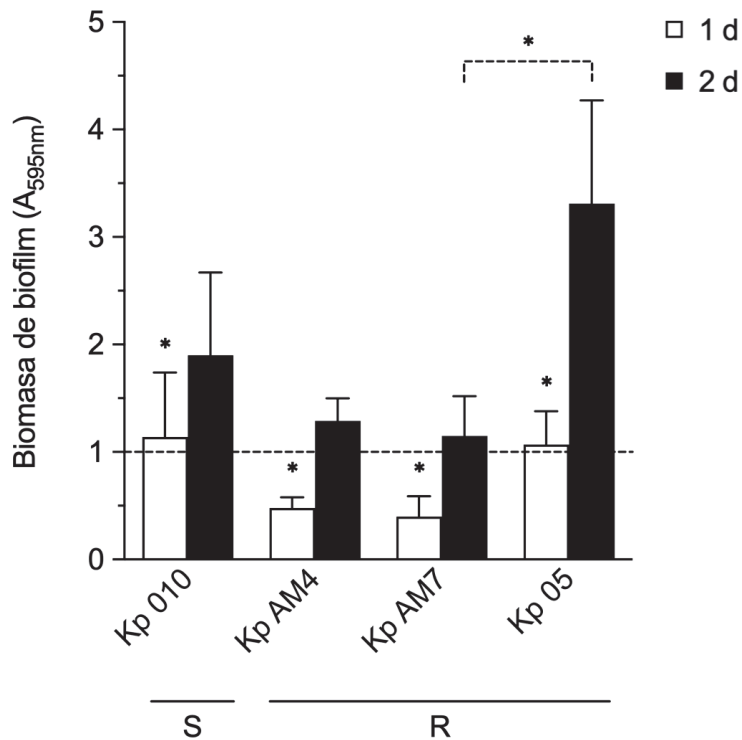


Figura 11. Formación de biofilm de aislados clínicos de *K. pneumoniae* mediante el ensayo de cristal violeta. Se determinó la producción de biomasa durante 1 y 2 días para la cepa sensible a antibióticos (S) Kp 010 y los aislados MDR (R) Kp AM4, Kp AM7 y Kp 05 por medición de la absorbancia a 595 nm (A_{595nm}) luego de la tinción con cristal violeta. Los datos se expresan como la media \pm D.E. de tres experimentos independientes. La línea punteada horizontal indica producción de biomasa correspondiente a una $A_{595nm} = 1$. (*) $p < 0,05$ al comparar cada cepa al día 1 vs día 2, y Kp 05 en comparación con Kp AM7 al día 2, mediante el test t de Student.

4.1.2. Evaluación de la actividad antibiofilm del 1,8-C sobre biofilms preformados: efectos de la concentración y el tiempo de exposición

Para abordar el estudio del efecto del 1,8-C frente a biofilms de *K. pneumoniae* se seleccionaron los aislados de menor producción (Kp AM7) y mayor producción (Kp 05); de esta manera es posible analizar el efecto del fitoquímico sobre aislados con diferente capacidad de producción de biofilm. Los ensayos se realizaron sobre biofilms preformados durante 2 días, realizando recuento de UFC en los biofilms tratados.

Los resultados de las curvas dosis-respuesta del 1,8-C mostrados en la Figura 12A revelaron un descenso significativo de la viabilidad celular aproximadamente de 1,8 y 4,9 Log luego del tratamiento con 0,5% (v/v) de 1,8-C durante 1 hora para Kp AM7 y Kp 05, respectivamente. Sin embargo, un efecto levemente mayor fue observado luego del tratamiento con concentraciones del fitoquímico $\geq 1\%$ (v/v), alcanzando descensos de la viabilidad celular de 2,2 Log en Kp AM7 y 5,3 Log en Kp 05. Estos resultados indican que el compuesto tuvo un efecto bactericida sobre Kp 05 a concentraciones mayores o iguales a 0,5% mientras que sobre Kp AM7 el 1,8-C causó muerte celular pero sin llegar a niveles bactericidas.

Posteriormente, se investigó el impacto del tiempo de tratamiento con el fitoquímico al 1% (v/v) sobre la viabilidad de biofilms. Como se aprecia en la Figura 12B, el fitoquímico logró reducir la viabilidad celular en 1,6 y 4,2 Log para Kp AM7 y Kp 05, respectivamente, luego del tratamiento por 15 minutos. La mayor caída se observó luego del tratamiento con el compuesto durante 60 minutos, donde se registró una disminución en el recuento de UFC de 2,8 Log para Kp AM7 y 5,3 Log para Kp 05. Un tiempo más prolongado de tratamiento (180 minutos) no resultó en un mayor efecto del 1,8-C sobre la viabilidad celular en comparación a lo observado con 60 minutos de tratamiento. Llamativamente, en biofilms de Kp 05 se observó un incremento significativo en el número de células viables a los 180 minutos de tratamiento comparado con lo observado a 60 minutos.

En conclusión, se determinó que la condición más eficaz para alcanzar el mayor efecto del compuesto sobre la viabilidad celular en biofilms preformados de *K. pneumoniae* es de 1% (v/v) durante 60 minutos (1 hora).

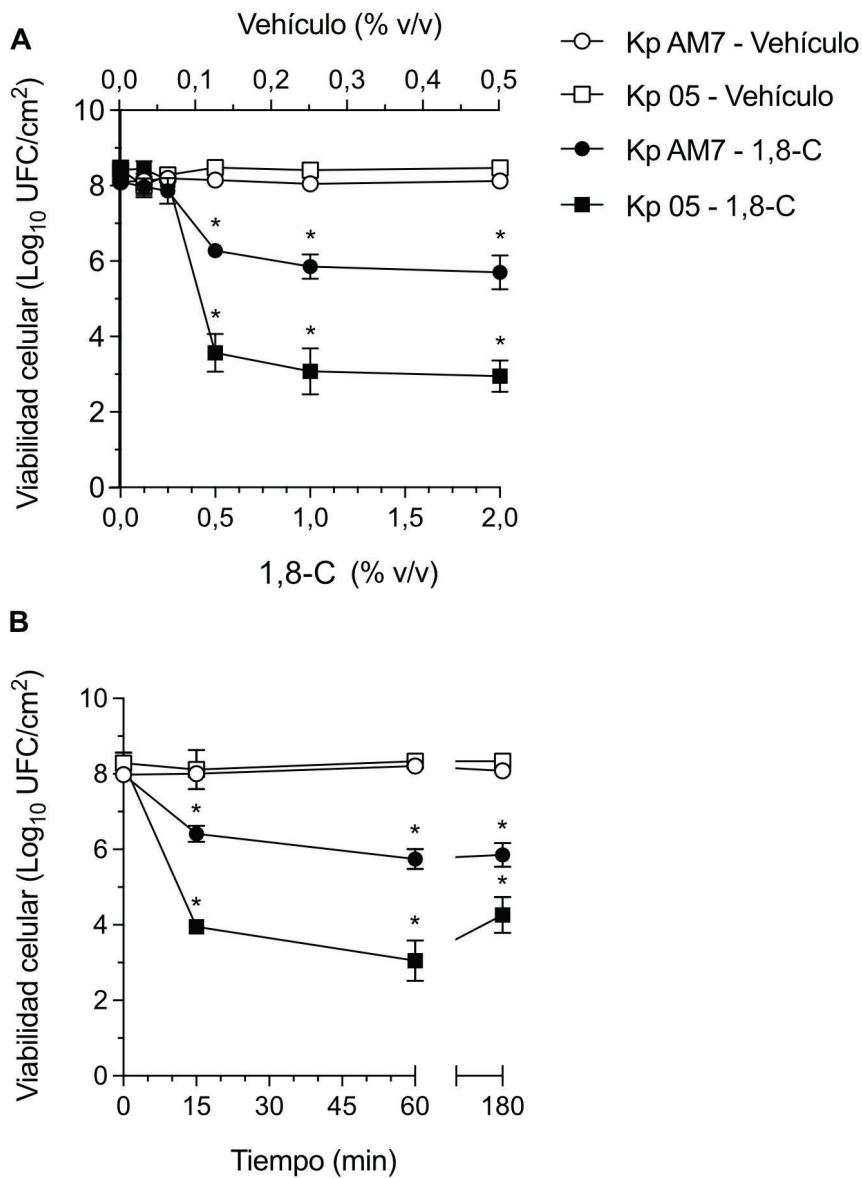


Figura 12. Efecto de la concentración (A) y tiempo de incubación (B) del 1,8-C sobre biofilms preformados de *K. pneumoniae*. Se determinó la viabilidad celular por recuento de UFC en biofilms de Kp AM7 y Kp 05 preformados por 2 días luego del tratamiento a diferentes concentraciones de 1,8-C y etanol (vehículo) durante 1 hora (A) y a diferentes tiempos a una concentración de 1,0 y 0,25% (v/v) del fitoquímico y el vehículo, respectivamente (B). Los datos se expresan como la media \pm D.E. de tres experimentos independientes. (*) $p < 0,05$ al comparar Kp AM7 y 05 tratados con 1,8-C vs Kp AM7 y Kp 05 tratados con el vehículo mediante el test t de Student.

4.1.3. Evaluación de la viabilidad de biofilms preformados de diferentes aislados de *K. pneumoniae* luego del tratamiento con 1,8-C

Se amplió el estudio del efecto antibiofilm del 1,8-C sobre otros aislados de *K. pneumoniae* en estudio. Los biofilms preformados de 2 días de Kp 010 y Kp AM4 fueron sometidos a un tratamiento con el fitoquímico al 1% (v/v) y el vehículo (etanol) al 0,25% durante 1 hora, y se evaluó el impacto sobre la actividad metabólica celular por el ensayo colorimétrico de MTS. Este ensayo se basa en la reducción de sales de formazan, cuyo cambio de color de amarillo a marrón permite determinar la actividad metabólica. También se determinó la viabilidad celular mediante el recuento de UFC.

Los resultados de MTS revelaron que los niveles de actividad metabólica en todos los aislados disminuyeron significativamente, con caídas entre un 77 y 93%, luego del tratamiento con el fitoquímico en comparación a biofilms tratados con el vehículo (Figura 13A). Por su parte, la Figura 13B muestra una disminución de 3,4 y 1,3 Log en el recuento de UFC para los biofilms de Kp 010 y Kp AM4 luego del tratamiento con 1,8-C, respectivamente.

Los resultados tanto de los niveles de actividad metabólica por MTS como la evaluación de la viabilidad celular por UFC indican que, al igual que lo que ocurrió con Kp AM7 y Kp 05, el compuesto demostró un claro efecto perjudicial sobre la viabilidad de las células en biofilm en todos los aislados ensayados de *K. pneumoniae*.

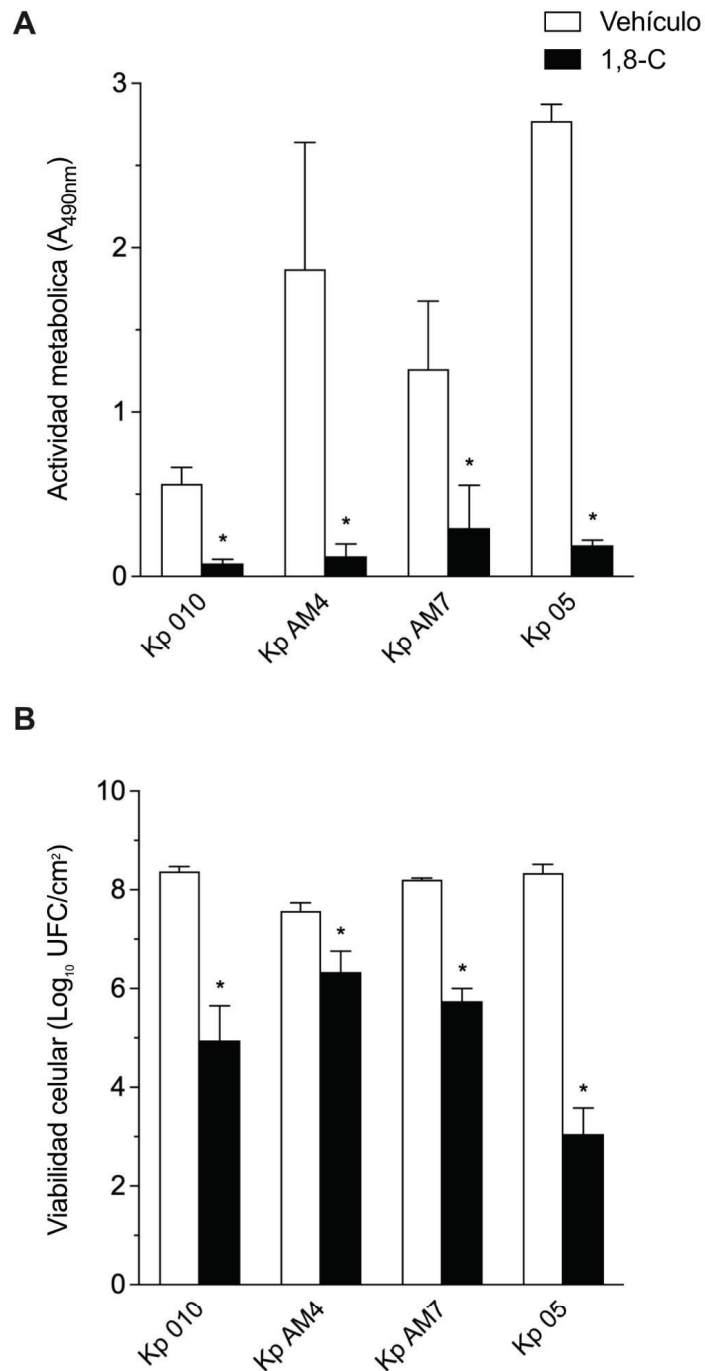


Figura 13. Determinación de la viabilidad de los biofilms en diferentes aislados de *K. pneumoniae* luego del tratamiento con 1,8-C mediante recuento de ensayo de MTS (A) y UFC (B). Los biofilms se trataron con etanol al 0,25 % (vehículo) o 1% (v/v) de 1,8-C durante 1 hora y se realizó la determinación de los niveles de actividad metabólica por el ensayo colorimétrico de MTS (A) y el recuento de UFC (B). Los valores representan la media de 3 ensayos independientes \pm D.E. (*) $p < 0,05$ al comparar cada cepa tratada con 1,8-C vs cada cepa tratada con el vehículo mediante el test t de Student.

4.1.4. Análisis de la distribución espacial de células vivas/muertas en biofilms preformados de *K. pneumoniae* después del tratamiento con 1,8-C por microscopía confocal

Con el fin de indagar en más detalle acerca de los efectos del fitoquímico sobre la viabilidad de los biofilms preformados de *K. pneumoniae*, se realizó la tinción de células vivas/muertas y posterior análisis por microscopía confocal de los biofilms de Kp 05 y Kp AM7.

Los biofilms preformados de 2 días de las cepas seleccionadas de *K. pneumoniae* se trataron con 1,8-C al 1% (v/v) o con el vehículo (etanol) al 0,25% durante 1 hora, se sometieron a tinción con el BacLight™ Viability Kit que permite la discriminación entre células vivas (verdes) y muertas (rojas) con los fluoróforos SYTO™9 e yoduro de propidio, respectivamente, para su posterior observación por microscopía confocal.

Las reconstrucciones tridimensionales de los biofilms de ambas bacterias tratadas solamente con el vehículo mostraron que la mayor parte de las células que forman estas estructuras se encontraban vivas, ya que adquirieron la tinción de color verde (Figuras 14A-B). Por otra parte, el tratamiento de los biofilms con 1,8-C provocó que la mayoría de las células del biofilm se tiñieran de color rojo (Figuras 14C-D). Cabe destacar que prácticamente la totalidad de las células en el biofilm de Kp 05 se visualizaron rojas luego del tratamiento con el fitoquímico indicando que el yoduro de propidio ingresó en las células por alteración de la membrana celular y/o muerte de las mismas. Por otro lado, en el aislado Kp AM7 se pudieron observar algunas células teñidas con verde en las capas cercanas a la base del biofilm.

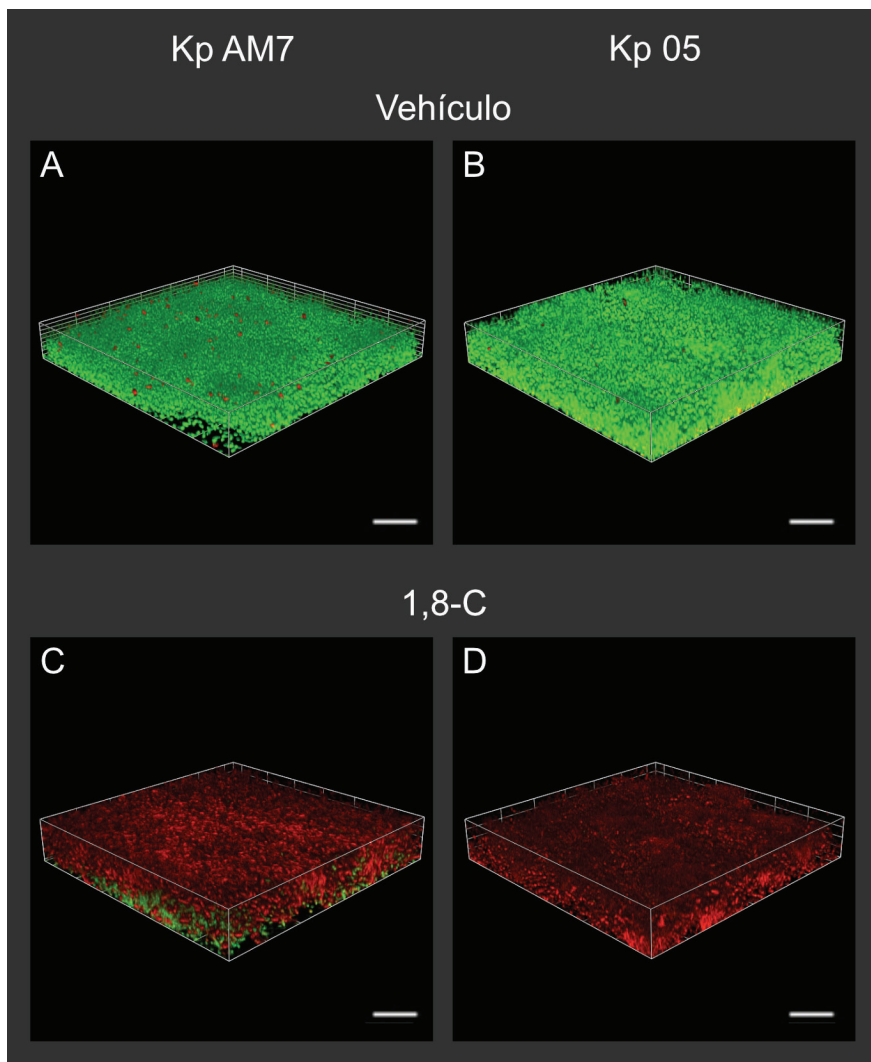


Figura 14. Análisis de células vivas/muertas de biofilms de Kp 05 y Kp AM7 por microscopía confocal. Reconstrucciones 3D de biofilms de Kp AM7 y Kp 05 de 2 días tratados con etanol al 0,25 % (vehículo) o 1 % (v/v) 1,8-C durante 1 hora, y teñidos con el kit BacLight™; células vivas (verdes) y muertas (rojas). Imágenes representativas elegidas de 6 campos observados de 2 experimentos independientes. Cada imagen representa un campo de 127 x 127 μm . Barras de escala: 20 μm .

Con el propósito de analizar la distribución de las células no viables en cada una de las secciones del biofilm, se examinaron las galerías de imágenes de los biofilms preformados de Kp AM7 y Kp 05 del ensayo previo, capturadas a intervalos de 1 μm a lo largo del eje Z.

La Figura 15 muestra galerías representativas de biofilms preformados por 2 días de Kp AM7 y Kp 05 tratados tanto con el vehículo (Figura 15, paneles superiores) o con el 1,8-C (Figura 15, paneles inferiores). Se puede observar que después del tratamiento con 1,8-C, en las capas inferiores del biofilm de Kp 05 la mayoría de las células se encontraron muertas, en contraste a lo observado en los biofilms de Kp AM7 donde aún se detectó presencia de células viables (teñidas de verde) en las capas más cercanas a la base del biofilm. Por otro lado, al examinar las secciones medias y superiores de los biofilms tratados con el fitoquímico, se observa para ambos aislados que las células están teñidas de rojo, lo cual sugiere una alta mortalidad celular. Por el contrario, en esas mismas secciones de los biofilms tratados con el vehículo las células permanecen viables.

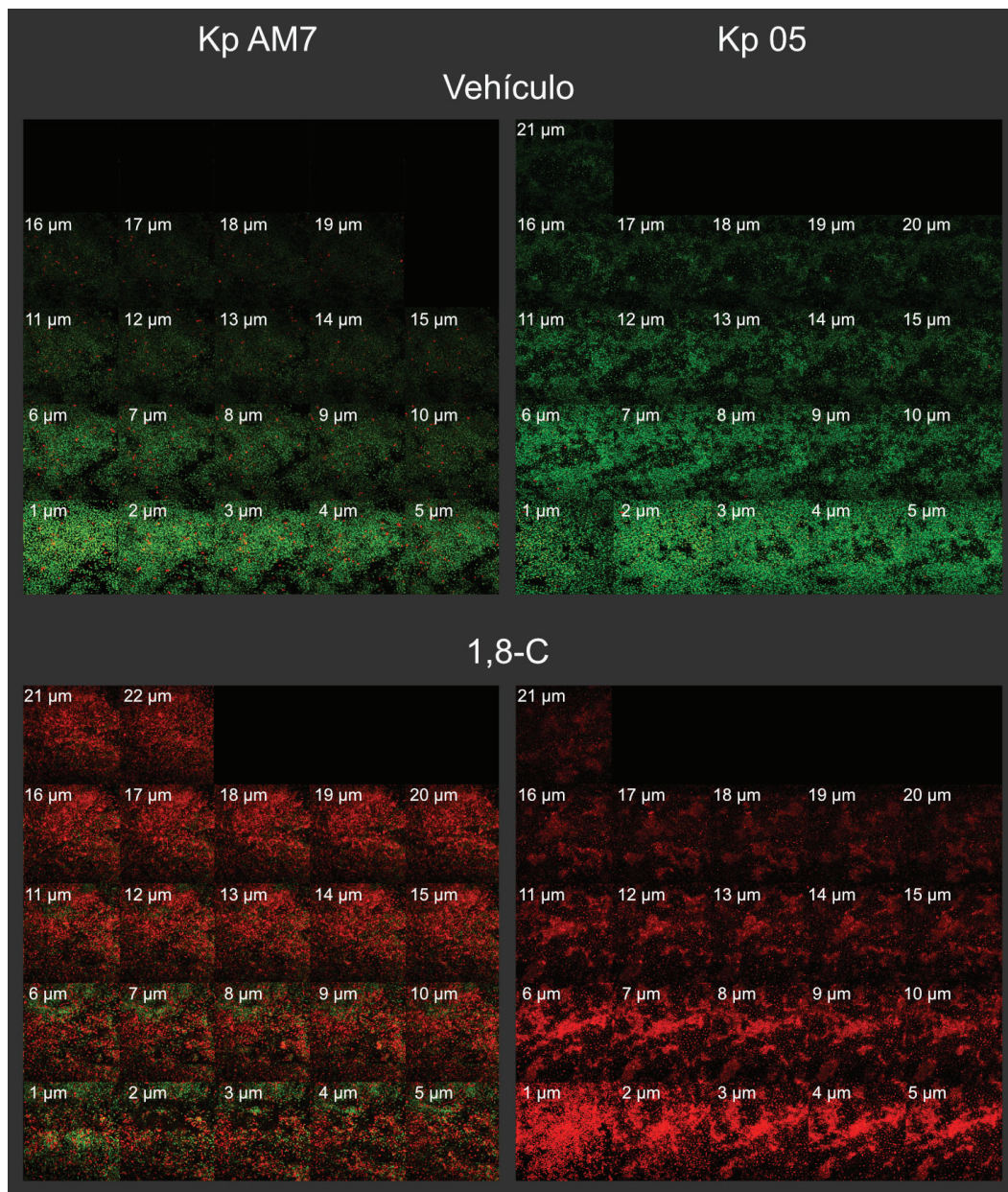


Figura 15. Galería de imágenes adquiridas a lo largo del eje Z de biofilms de Kp 05 y Kp AM7 tratados con 1,8-C. Imágenes representativas obtenidas a lo largo del eje Z de biofilms de Kp AM7 y Kp 05 de 2 días tratados con etanol al 0,25 % (vehículo) o 1 % (v/v) 1,8-C durante 1 hora, y teñidos con el kit BacLight™. Estas imágenes fueron obtenidas cada 1 μm desde la base (capa inferior) hasta la superficie (capa superior) del biofilm. Cada imagen representa un campo de 127 x 127 μm.

La cuantificación de células vivas/muertas mediante el software COMSTAT reveló que el 98-99% de las células de los biofilms de Kp AM7 y Kp 05 se encontraban viables luego del tratamiento con el vehículo, mientras que menos del 10% permanecieron vivas luego del tratamiento con 1,8-C (Figura 16). Los resultados analizados por microscopía confocal coinciden con lo previamente observado en el recuento de UFC en los biofilms de Kp AM7 y Kp 05.

Estos hallazgos señalan que el fitoquímico demuestra una alta eficacia para matar las células existentes en las capas superficiales y medias, abarcando incluso las capas inferiores. La muerte celular observada podría atribuirse a una buena capacidad de penetración del 1,8-C en el biofilm.

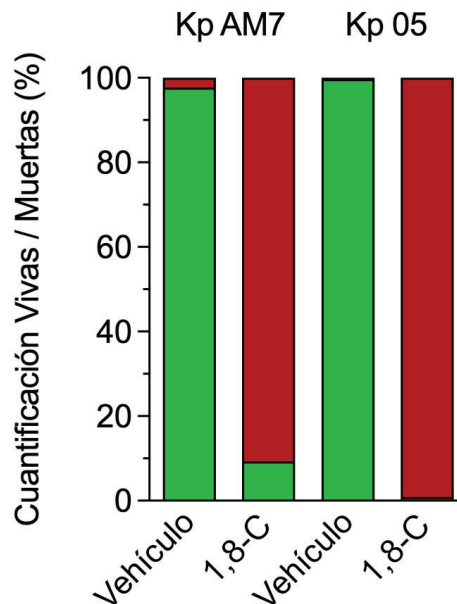


Figura 16. Cuantificación de células vivas/muertas en biofilms de Kp 05 y Kp AM7 por microscopía confocal. Biofilms de Kp AM7 y Kp 05 de 2 días tratados con etanol al 0,25 % (vehículo) o 1 % (v/v) 1,8-C durante 1 hora, y teñidos con el kit BacLight™. Las células vivas (verdes) y muertas (rojas/amarillas) se cuantificaron mediante el programa COMSTAT. Los resultados se expresan como porcentaje de vivas/muertas sobre el total de células en el biofilm. Los valores representan la media del porcentaje de vivas/muertas de 2 ensayos independientes, para los cuales se observaron 4 campos en cada uno.

4.1.5. Influencia del 1,8-C sobre la estructura de biofilms preformados de *K. pneumoniae*

Dada la observación de la efectividad del compuesto para matar las células en todas las capas del biofilm de *K. pneumoniae*, nos preguntamos si además es capaz de alterar la matriz del mismo.

Para llevar a cabo este análisis, se utilizó calcofluor-white, compuesto fluorescente que se une a polisacáridos β (1 \rightarrow 4) presentes en la matriz de los biofilms de *K. pneumoniae*, como por ejemplo la celulosa. Biofilms preformados de 2 días de Kp AM7 y Kp 05 tratados con el vehículo al 0,25% (etanol) o con el fitoquímico al 1% (v/v) durante 1 hora fueron teñidos con calcofluor-white y luego visualizados mediante microscopía confocal (Figura 17).

En las imágenes PMI y 3D de los biofilms tratados con el vehículo se aprecia la estructura de la matriz de los biofilms de ambas cepas de *K. pneumoniae* en estudio. La estructura del biofilm de Kp AM7 presentó una disposición similar a una telaraña, con clara interconexión a lo largo de toda la matriz mediada por fibras entrecruzadas, mientras que Kp 05 mostró una estructura compacta y poco interconectada, formando aglomeraciones. La cuantificación de las alturas promedio a través del software COMSTAT reveló una altura entre 19 y 22 μm para los biofilms de Kp AM7 y entre 21 y 25 μm para los biofilms de Kp 05. Por otro lado, luego del tratamiento con 1,8-C se observó una disminución significativa de la densidad de la matriz de los biofilms de Kp AM7 y Kp 05 (Figura 17). Análisis cuantitativos a través del software COMSTAT evidenciaron una reducción de entre un 30 y 50% del biovolumen ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) en biofilms tratados con 1,8-C en comparación con el vehículo (Tabla 4).

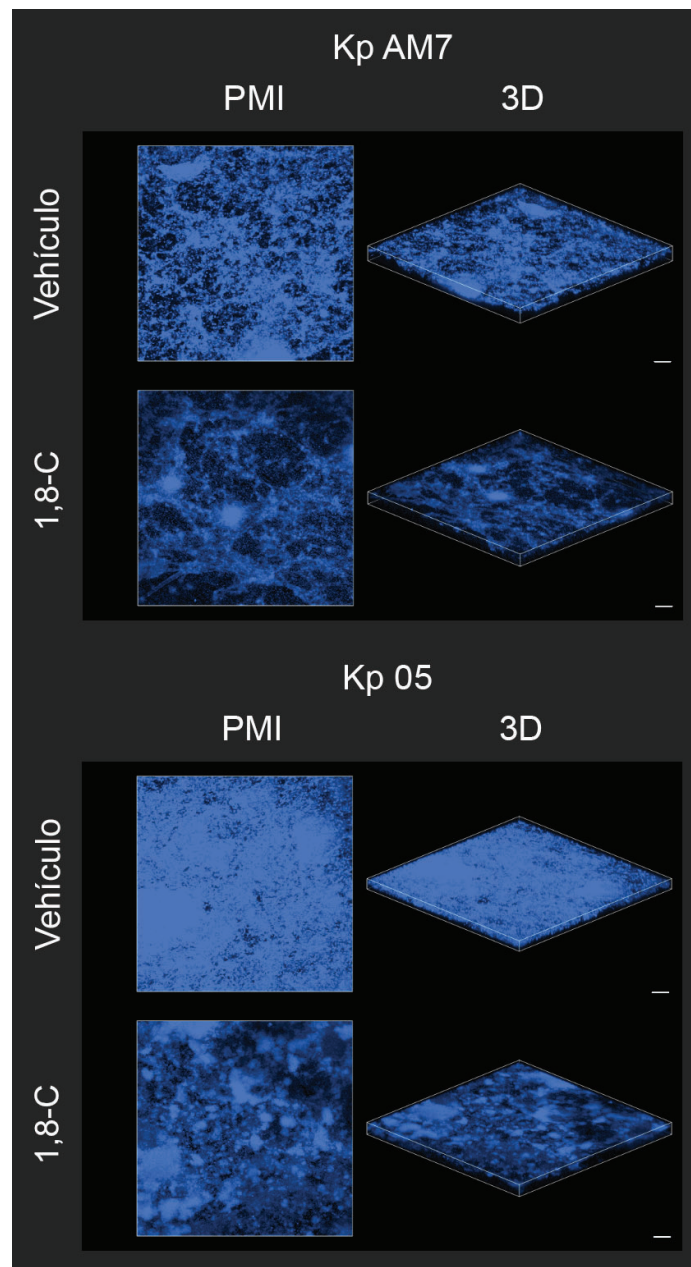


Figura 17. Visualización de la estructura de los biofilms de Kp AM7 y Kp 05 luego del tratamiento con 1,8-C por microscopía confocal luego de la tinción con calcofluor-white. Biofilms preformados de 2 días se trataron con etanol al 0,25 % (vehículo) o 1% (v/v) 1,8-C durante 1 hora. Se tiñeron con calcofluor-white y se obtuvieron proyecciones de máxima intensidad (PMI) del eje-Z (paneles izquierdos) y reconstrucciones 3D (paneles derechos) por el programa de análisis de imágenes Icy. Imágenes representativas elegidas de 6 campos observados de 2 experimentos independientes. Cada imagen representa un campo de 635 x 635 μm . Barras de escala: 50 μm .

Tabla 4. Determinación del biovolumen de la matriz de biofilms preformados de *K. pneumoniae* luego del tratamiento con 1,8-C.

Tratamientos	Biovolumen ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$)	
	Kp AM7	Kp 05
Vehículo	9,0 \pm 1,3	9,3 \pm 3,1
1,8-C	6,4 \pm 1,5	4,7 \pm 0,8

Los valores representan la media de 2 ensayos independientes \pm E.E. En cada ensayo se analizaron 6 campos representativos.

Luego, para ampliar el estudio sobre la capacidad del compuesto de afectar la estructura del biofilm de *K. pneumoniae*, se analizó si el 1,8-C era capaz disgregar la biomasa del biofilm de todas las cepas de *K. pneumoniae* en estudio mediante la tinción con cristal violeta. Para ello, se trataron los biofilms preformados de 2 días de los aislados Kp 010, Kp AM4, Kp AM7 y Kp 05 con el fitoquímico al 1% (v/v) o el vehículo al 0,25% (etanol) durante 1 hora, para luego ser teñidos con cristal violeta (Tabla 5). Los resultados arrojaron que tanto en la cepa sensible a antibióticos Kp 010 como las cepas MDR-BLEE Kp AM4, Kp AM7 y Kp 05 hubo una disminución de la biomasa entre un 38 y 62% luego del tratamiento con 1,8-C. En resumen, los datos muestran que el fitoquímico es capaz no sólo de afectar la matriz del biofilm de *K. pneumoniae*, sino que también es capaz de reducir la biomasa de forma efectiva.

Tabla 5. Determinación de la biomasa de biofilms preformados de *K. pneumoniae* luego del tratamiento con 1,8-C.

Aislado	Biomasa de biofilm (A_{595nm})		Disrupción de biofilm (%) (promedio \pm DE)
	Vehículo (promedio \pm DE)	Tratado con 1,8-C (promedio \pm DE)	
Kp 010	1,95 \pm 0,37	1,20 \pm 0,28	46 \pm 17
Kp AM4	3,53 \pm 1,33	1,66 \pm 0,95	45 \pm 17 *
Kp AM7	2,20 \pm 0,89	1,15 \pm 0,53	38 \pm 16
Kp 05	3,23 \pm 2,32	1,33 \pm 0,91	62 \pm 4 *

Los valores representan la media de 3 ensayos independientes \pm D.E. (*) $p < 0,05$ al comparar cada cepa tratada con 1,8-C vs cada cepa tratada con el vehículo mediante el test t de Student.

4.1.6. Efecto del 1,8-C sobre la viabilidad de células planctónicas de *K. pneumoniae*

Previamente se había reportado la capacidad del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* para disminuir el recuento de UFC en un cultivo planctónico de un aislado de *K. pneumoniae* sensible a antibióticos (Ojeda-Sana *et al*; 2013^a). Sin embargo, no se había explorado el efecto individual del 1,8-C frente a cultivos planctónicos de cepas MDR-BLEE. Es por ello que se realizó la determinación de la viabilidad en células planctónicas de diferentes aislados de *K. pneumoniae* luego del tratamiento con 1% (v/v) de 1,8-C a diferentes tiempos (entre 5 minutos y 24 horas) mediante recuento de UFC.

Como se observa en la Figura 18, los resultados evidenciaron que a tiempos muy cortos (entre 5 y 15 minutos) la viabilidad de las cepas Kp 010, Kp AM4 y Kp 05 disminuyó entre 1-3 Log. Tratamientos de 1 y 3 horas disminuyeron aún más la viabilidad en estas cepas (entre 4 y 4,5 Log). Por otro lado, con estos tiempos cortos de tratamiento (entre 5 minutos y 3 horas) la cepa Kp AM7 disminuyó su

viabilidad en menos de 1 Log. Sorpresivamente, todos los aislados de *K. pneumoniae* a las 24 horas recuperaron los niveles de viabilidad observados previos al tratamiento con el 1,8-C.

Este hallazgo revela que el fitoquímico también tiene la capacidad de disminuir de manera significativa la viabilidad de las células en cultivos planctónicos de *K. pneumoniae* después de un breve periodo de tratamiento.

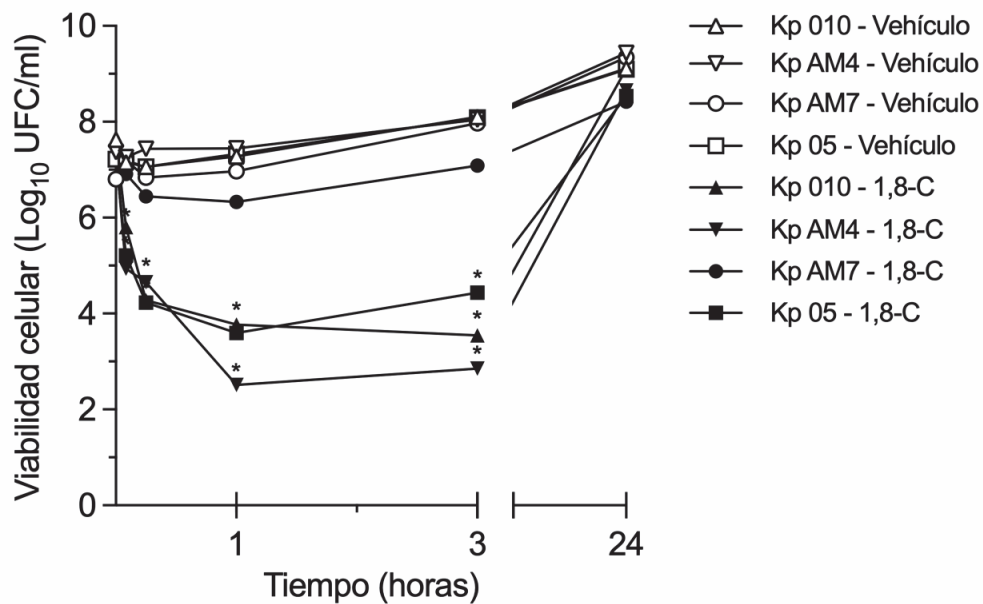


Figura 18. Determinación de la viabilidad en células planctónicas de diferentes aislados de *K. pneumoniae* luego del tratamiento con 1,8-C a diferentes tiempos mediante recuento de UFC. Se trataron las bacterias con 0,25% de etanol (vehículo) o 1% (v/v) de 1,8-C durante 1 hora. La concentración inicial de bacterias fue de 1×10^5 UFC/mL. Los valores representan la media de 3 ensayos independientes \pm D.E. (*) $p < 0,05$ al comparar cada cepa tratada con 1,8-C vs cada cepa tratada con el vehículo mediante el test *t* de Student.

En resumen, hemos demostrado que el 1,8-C es capaz de penetrar en el biofilm, mostrando una alta eficacia para matar las células de *K. pneumoniae* MDR-BLEE. Además el fitoquímico demostró ser capaz de desestabilizar y disgregar el biofilm preformado.

4.2. CAPÍTULO N°2: ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIBIOFILM DEL 1,8-C SOBRE AISLADOS CLÍNICOS MULTIRRESISTENTES DE *E. coli*

4.2.1. Producción de biofilm en *E. coli*

Previamente a la evaluación de la actividad antibiofilm del 1,8-C en biofilms preformados de *E. coli*, se determinó la capacidad de formación de biofilm de los aislados clínicos MDR-BLEE: Ec AM7, Ec AM10 y Ec 07, y en la cepa sensible a antibióticos: Ec ATCC 25922 (Tabla 1). Para ello, se analizó la formación de biofilm de dichos aislados en función del tiempo (entre 1 y 3 días) a través del ensayo de tinción con cristal violeta y posterior cuantificación de su biomasa (Figura 19).

Los resultados evidenciaron una creciente producción de biofilm a lo largo del tiempo en todas las cepas analizadas. A partir del día 3 se observó como las cepas Ec ATCC 25922 y Ec AM7 presentaron una producción significativamente mayor al resto con valores de A_{595nm} de 1,67 y 2,24, respectivamente. Por lo tanto, se pueden considerar como altas productoras de biofilm ($A_{595nm} > 1$) (Lagha *et al*; 2019). Por el contrario las cepas Ec AM10 y Ec 07 que evidenciaron valores de A_{595nm} de 0,65 y 0,6, respectivamente, se consideraron como bajas productoras de biofilm ($0,2 \leq A_{595nm} \leq 1$).

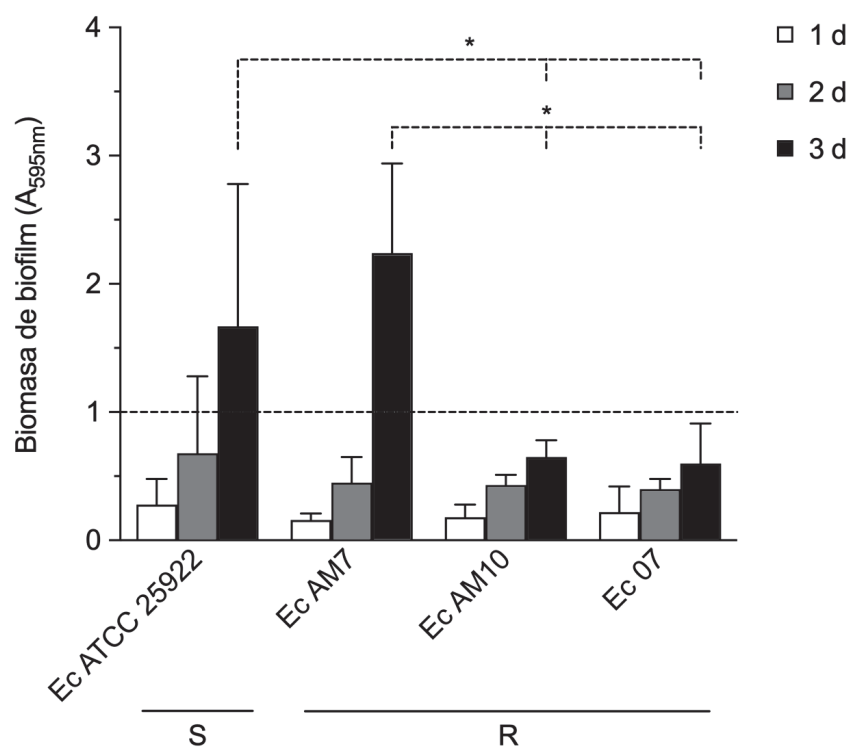


Figura 19. Formación de biofilm de aislados clínicos de *E. coli* mediante el ensayo de cristal violeta. Se determinó la producción de biomasa durante 1, 2 y 3 días para la cepa sensible a antibióticos (S) Ec ATCC 25922 y los aislados MDR (R) Ec AM7, Ec AM10, Ec 07 por medición de la absorbancia a 595 nm (A_{595nm}). Los datos se expresan como la media \pm D.E. de tres experimentos independientes. La línea punteada horizontal indica producción de biomasa correspondiente a una $A_{595nm} = 1$. (*) $p < 0,05$ de los biofilms de 3 días de Ec ATCC 25922 y Ec AM7 en comparación a los biofilms de 3 días de Ec AM10 y Ec 07 mediante análisis ANOVA seguido del test de Tukey.

4.2.2. Análisis del efecto antibiofilm del 1,8-C en función de la concentración y el tiempo de aplicación sobre biofilms preestablecidos

Para abordar el estudio del efecto del 1,8-C frente a biofilms robustos de *E. coli* se seleccionaron las cepas Ec ATCC 25922 y Ec AM7 que fueron las dos mayores productoras de biofilm a los 3 días y que además permiten estudiar el comportamiento del fitoquímico frente a cepas sensibles y resistentes a antibióticos.

La Figura 20A muestra la curva dosis-respuesta del 1,8-C sobre la viabilidad del biofilm preformado de 3 días de Ec AM7. Los resultados revelan un descenso

significativo de la viabilidad celular aproximadamente de 1,5 Log luego del tratamiento con 0,5% (v/v) de 1,8-C durante 1 hora, sin embargo el mayor efecto se observó con una dosis de 1% (v/v), la cual disminuyó significativamente la viabilidad celular en 3 Log. Una disminución similar se observó al aumentar la concentración del fitoquímico al 2% (v/v). Estos resultados indican que, a partir de concentraciones del 1% (v/v), el 1,8-C presenta efecto bactericida luego de 1 hora de tratamiento sobre biofilms de *E. coli* MDR-BLEE.

Luego se estudió el efecto del tiempo de tratamiento del 1,8-C al 1% (v/v) sobre biofilms de Ec AM7 preformados durante 3 días. En la Figura 20B se observó que el compuesto disminuyó la viabilidad celular aproximadamente 1,3 Log en el recuento de UFC a los 15 minutos, mientras que el efecto a los 60 minutos de tratamiento fue significativamente mayor (reducción de 3 Log). Además, un mayor tiempo de exposición frente al fitoquímico no registró una mayor disminución en la viabilidad celular a la observada con 1 hora de tratamiento.

En resumen, se determinaron como condiciones óptimas para la actividad antibiofilm del 1,8-C contra biofilm de *E. coli* al desafío con 1% (v/v) de 1,8-C durante 1 hora.

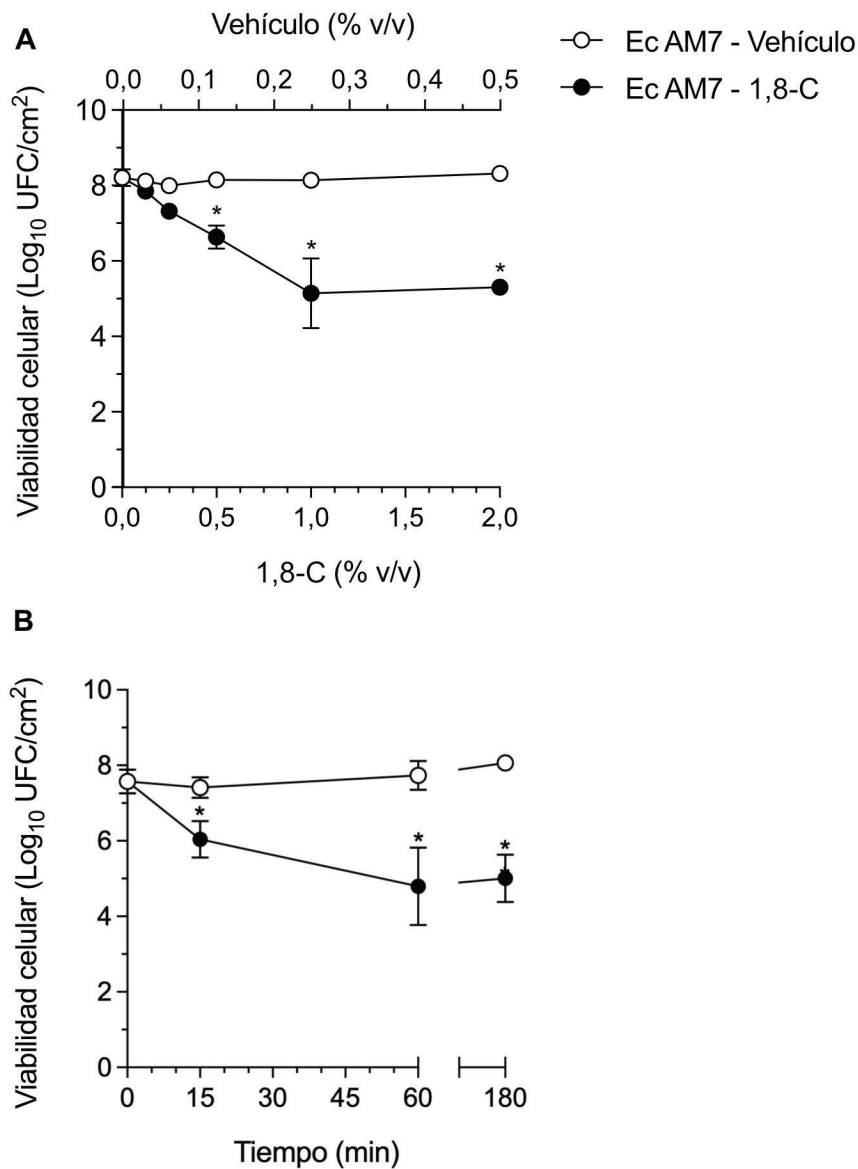


Figura 20. Efecto de la concentración (A) y tiempo de incubación (B) del 1,8-C sobre biofilms preformados de *E. coli*. Se determinó la viabilidad celular por recuento de UFC en biofilms de Ec AM7 preformados por 3 días luego del tratamiento a diferentes concentraciones de 1,8-C y etanol durante 1 hora (A) y a diferentes tiempos a una concentración de 1 y 0,25% (v/v) del fitoquímico y el vehículo, respectivamente (B). Los datos se expresan como la media \pm D.E. de tres experimentos independientes. (*) $p < 0,05$ al comparar Ec AM7 tratada con 1,8-C vs Ec AM7 tratada con el vehículo mediante el test *t* de Student.

4.2.3. Evaluación del efecto del 1,8-C sobre etapas tempranas de desarrollo de biofilms de Ec AM7

Se estudió también el efecto del compuesto sobre etapas tempranas del desarrollo de biofilms de *E. coli*, como lo son biofilms preformados durante 1 y 2 días (diferentes densidades de biomasa) y la adhesión inicial.

Para ello, primero se expusieron biofilms preformados de 1 y 2 días de Ec AM7 a 0,25% de etanol (vehículo) o 1% (v/v) de 1,8-C durante 1 hora y se analizó el efecto sobre su viabilidad por recuento de UFC, en comparación con biofilms preformados de 3 días. Se observó una disminución significativa en la viabilidad (entre 2 y 3 Log) de los biofilm preformados de 1 y 2 días en comparación a los biofilms tratados con el vehículo (Figura 21). Además, se evidenció un número similar de UFC en los biofilms preformados por 1, 2 y 3 días luego del tratamiento, lo que sugiere que la eficiencia del compuesto no se ve afectada por la densidad de biomasa que presenta el biofilm.

Posteriormente, se estudió el efecto del fitoquímico sobre la etapa de adhesión de las cepas Ec ATCC 25922 y Ec AM7. Para ello se ensayaron concentraciones inferiores al 1% (v/v) del compuesto y se buscaron concentraciones que no afectaran la viabilidad celular para evidenciar un posible efecto sobre la etapa inicial de la adhesión (Tabla 6). Se encontró un número similar de células adheridas en las muestras tratadas con 0,0625 y 0,125% (v/v) del fitoquímico en comparación con las tratadas con el vehículo para el aislado Ec ATCC 25922. Mientras que las mayores concentraciones (0,25 y 0,5% v/v) inhibieron la viabilidad celular. En el caso de la cepa Ec AM7 se encontraron resultados similares. Estos resultados indican que el 1,8-C no evidenció efecto sobre la adhesión celular en ambas bacterias estudiadas.

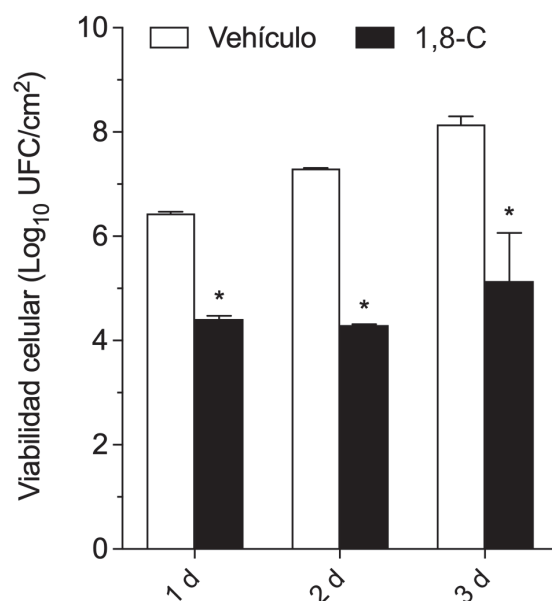


Figura 21. Efecto del 1,8-C sobre la viabilidad de biofilms preformados por 1, 2 y 3 días de *E. coli*. Los biofilms se trataron con etanol al 0,25 % (vehículo) o 1% (v/v) de 1,8-C durante 1 hora y se realizó el recuento de UFC. Los datos se expresan como la media \pm D.E. de tres experimentos independientes. (*) $p < 0,05$ en comparación con los biofilms tratados con el vehículo mediante el test *t* de Student.

Tabla 6. Efecto de diferentes concentraciones de 1,8-C sobre la adhesión de biofilms *E. coli*.

Tratamientos	Células viables			
	Ec ATCC 25922		Ec AM7	
	Adheridas (Log ₁₀ UFC/cm ²)	Suspensión (Log ₁₀ UFC/ml)	Adheridas (Log ₁₀ UFC/cm ²)	Suspensión (Log ₁₀ UFC/ml)
Vehículo 0,25%	5,48 \pm 0,80	7,87 \pm 0,33	5,89 \pm 0,79	7,93 \pm 0,13
1,8-C 0,0625% (v/v)	5,39 \pm 0,88	7,79 \pm 0,12	5,70 \pm 0,31	7,96 \pm 0,08
1,8-C 0,125% (v/v)	5,55 \pm 0,86	7,72 \pm 0,22	5,55 \pm 0,49	7,94 \pm 0,11
1,8-C 0,25% (v/v)	3,20 \pm 0,83	5,03 \pm 1,35	5,45 \pm 0,41	7,75 \pm 0,24
1,8-C 0,5% (v/v)	1,98 \pm 0,50	2,70 \pm 0,27	3,91 \pm 0,55	5,91 \pm 0,44

Los valores representan la media de 3 ensayos independientes \pm D.E.

4.2.4. Efecto del tratamiento con 1,8-C sobre la viabilidad de biofilms preformados por diferentes aislados de *E. coli*

Se extendió el análisis del efecto antibiofilm del 1,8-C observado sobre el aislado Ec AM7 a otros aislados formadores de biofilm en estudio. Para ello, biofilms de Ec ATCC 25922, Ec AM10 y Ec 07 preformados de 3 días se trataron con el vehículo (etanol) al 0,25% y el fitoquímico al 1% (v/v) durante 1 hora y se determinó los niveles de actividad metabólica por el ensayo colorimétrico de MTS y la viabilidad por UFC.

Se determinaron los niveles de actividad metabólica a través del ensayo colorimétrico de MTS, como otro parámetro para corroborar si el compuesto afecta la viabilidad celular. Los resultados muestran una drástica disminución en la actividad metabólica en los 4 aislados testeados (A_{490nm} entre 0,02 y 0,12) luego del tratamiento con 1,8-C, mientras que los biofilms tratados con el vehículo la actividad metabólica se encontró en valores de A_{490nm} entre 0,8 y 2 (Figura 22A).

Además, la Figura 22B muestra una disminución en el recuento de UFC de 4,1 Log para la cepa Ec ATCC 25922 y entre 3 a 3,8 Log en los aislados de Ec AM10 y Ec 07, respectivamente, luego del tratamiento con 1,8-C, en comparación con el vehículo. Estos resultados indican que el compuesto presenta efecto bactericida sobre todos los aislados. Además, la actividad antibiofilm parece ser comparable al efecto observado sobre la cepa Ec AM7.

Por lo tanto, mediante los dos métodos realizados se encontró que el fitoquímico afectó significativamente la viabilidad de todos los biofilms de las cepas de *E. coli*.

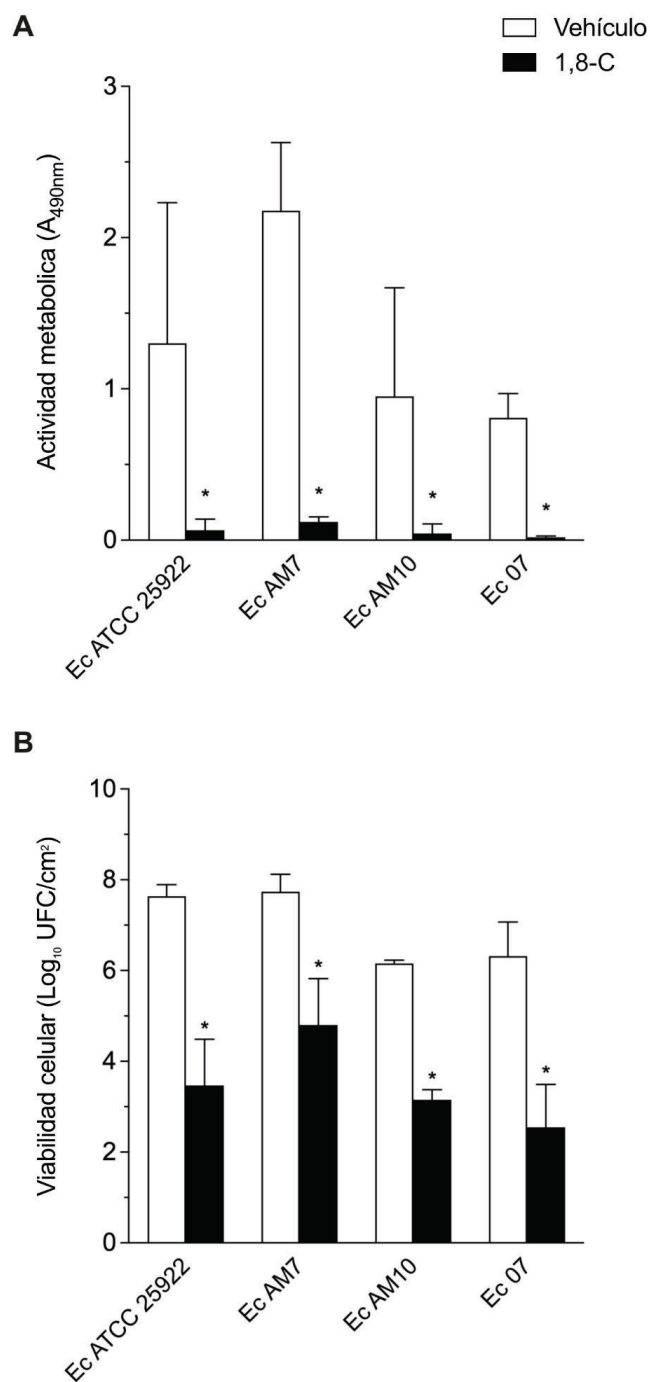


Figura 22. Determinación de la viabilidad de los biofilms en diferentes aislados de *E. coli* luego del tratamiento con 1,8-C mediante recuento de ensayo de MTS (A) y UFC (B). Los biofilms se trataron con etanol al 0,25 % (vehículo) o 1% (v/v) de 1,8-C durante 1 hora y se realizó la determinación de los niveles de actividad metabólica por el ensayo colorimétrico de MTS (A) y el recuento de UFC (B). Los valores representan la media de 3 ensayos independientes \pm D.E. (*) $p < 0,05$ al comparar cada cepa tratada con 1,8-C vs cada cepa tratada con el vehículo mediante el test *t* de Student.

4.2.5. Estudio de la distribución espacial de células vivas/muertas en biofilms preformados de *E. coli* mediante microscopía confocal luego del tratamiento con 1,8-C

Se indagó acerca de los efectos del fitoquímico sobre la viabilidad de los biofilms preformados de *E. coli* más en detalle, mediante tinción de células vivas/muertas y posterior análisis cualitativo y cuantitativo por microscopía confocal.

Los biofilms de Ec ATCC 25922 y Ec AM7 preformados de 3 días sobre cubreobjetos y tratados con el vehículo (etanol) al 0,25% o con 1,8-C al 1% (v/v) durante 1 hora, se sometieron a tinción con el BacLight™ Viability Kit que permite la discriminación entre células vivas (verdes) y muertas (rojas) con los fluoróforos SYTO™ 9 e yoduro de propidio, respectivamente, para su posterior observación por microscopía confocal.

Las reconstrucciones tridimensionales de los biofilms de ambas bacterias tratados solamente con el vehículo evidenciaron que la mayoría de las células que forman estas estructuras se encuentran vivas ya que adquieren la tinción de color verde (Figura 23A-B). Por otra parte, el tratamiento de los biofilms con 1,8-C provocó que todas las células del mismo se tiñieran de color rojo (Figuras 23C y D). Estos resultados indican que el compuesto fue capaz de penetrar a través de todas las capas del biofilm, permeabilizar las membranas bacterianas y por ende el yoduro de propidio fue capaz de ingresar en las células, indicando alteración de la membrana y/o muerte celular.

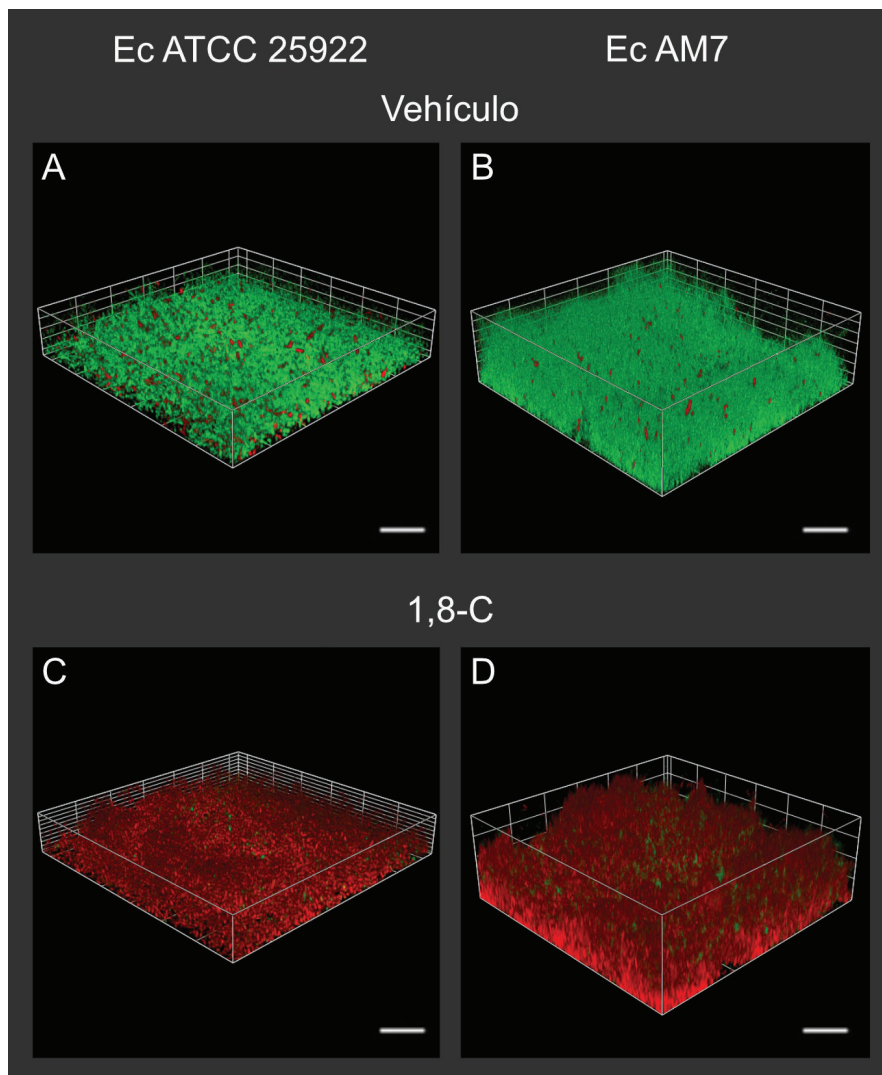


Figura 23. Análisis de células vivas/muertas de biofilms de Ec ATCC 25922 y Ec AM7 por microscopía confocal. Reconstrucciones 3D de biofilms de Ec ATCC 25922 y Ec AM7 de 3 días tratados con etanol al 0,25 % (vehículo) o 1 % (v/v) 1,8-C durante 1 hora, y teñidos con el kit BacLight™; células vivas (verdes) y muertas (rojas). Imágenes representativas elegidas de 6 campos observados de 2 experimentos independientes. Cada imagen representa un campo de 127 x 127 μm . Barras de escala: 20 μm .

Además se analizaron las galerías de imágenes de los biofilms preformados del experimento anterior adquiridas cada 1 μm a lo largo del eje Z con el objetivo de observar en detalle la distribución de las células muertas en cada una de las secciones del biofilm.

La Figura 24 muestra galerías representativas de biofilms preformados por 3 días de Ec ATCC 25922 y Ec AM7 tratados con el vehículo (Figura 24, paneles superiores) o con 1,8-C (Figura 24, paneles inferiores). Se observó que luego del tratamiento con 1,8-C prácticamente la totalidad de las células cercanas a las capas inferiores de los biofilms tanto de Ec ATCC 25922 y Ec AM7 se encontraron muertas (rojas). Por otro lado, todas las células cercanas a las capas inferiores en los biofilms tratados con el vehículo se encontraron teñidas de verde y por tanto lo viables. Cuando se visualizan las secciones medias y superficiales de los biofilm tratados con el fitoquímico de ambas bacterias se puede visualizar las células teñidas de rojo, resultado que indica mortalidad celular. En contraste, en dichas secciones en biofilms tratados con el vehículo las células permanecen viables.

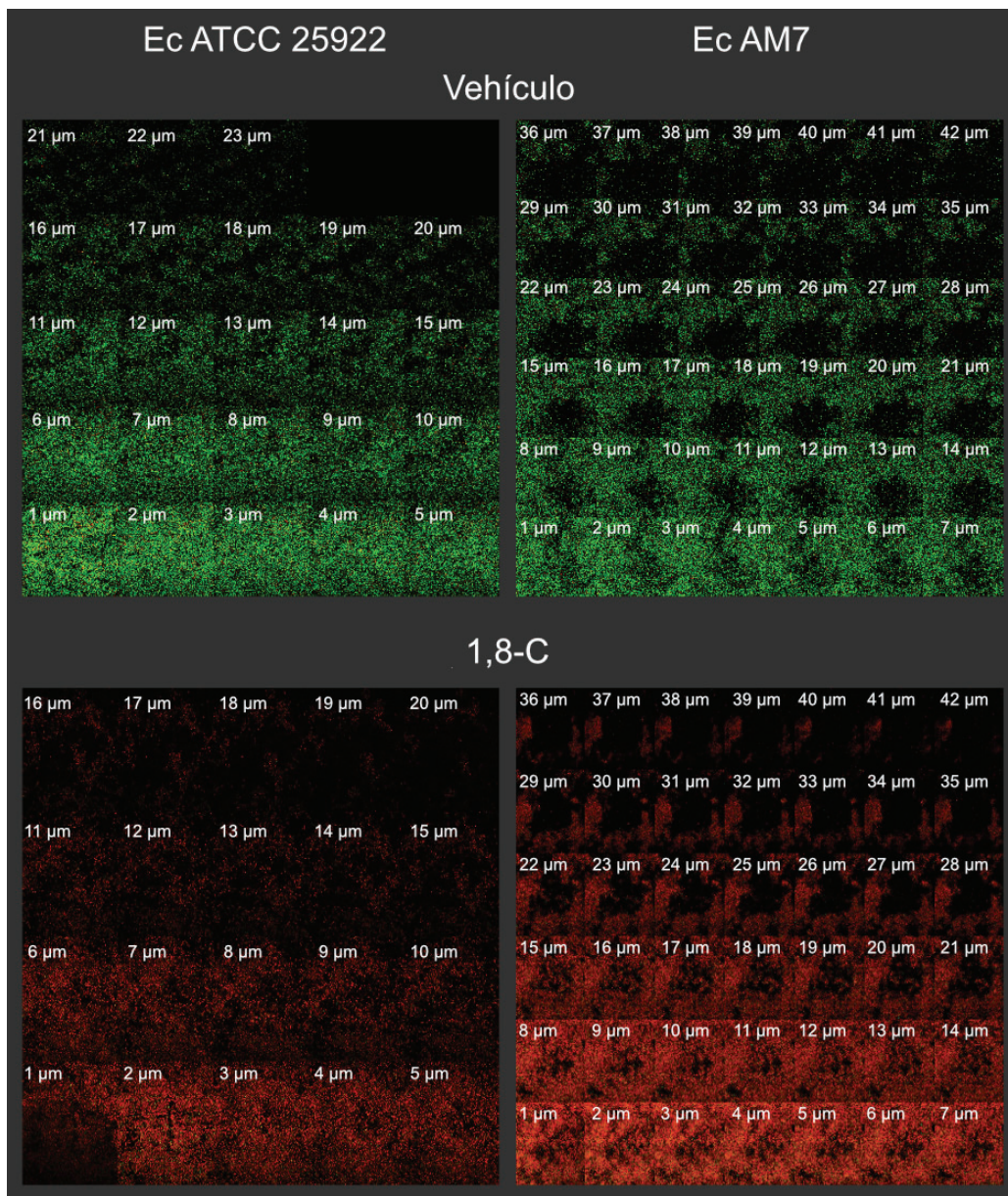


Figura 24. Galería de imágenes adquiridas a lo largo del eje Z de biofilms de Ec ATCC 25922 y Ec AM7 tratados con 1,8-C. Imágenes representativas obtenidas a lo largo del eje Z de biofilms de Ec ATCC 25922 y Ec AM7 de 3 días tratados con etanol al 0,25 % (vehículo) o 1 % (v/v) 1,8-C durante 1 hora, y teñidos con el kit BacLight™. Estas imágenes fueron obtenidas cada 1 μm desde la base (capa inferior) hasta la superficie (capa superior) del biofilm. Cada imagen representa un campo de $127 \times 127 \mu\text{m}$.

La cuantificación de células vivas y muertas por recuento del número de células a través del software COMSTAT mostró en los biofilms de Ec ATCC 25922 y Ec AM7 un alto porcentaje de células vivas luego del tratamiento con el vehículo (entre 82 -

84%), mientras que solo el 1 - 2% permanecieron vivas luego del tratamiento con 1,8-C (Figura 25).

En resumen estos resultados indican que el fitoquímico muestra una alta eficacia para matar en forma homogénea las células presentes en todas las capas del biofilm: superficiales, medias e inferiores. Se podría atribuir la muerte celular observada a una buena capacidad de penetración del 1,8-C en el biofilm.

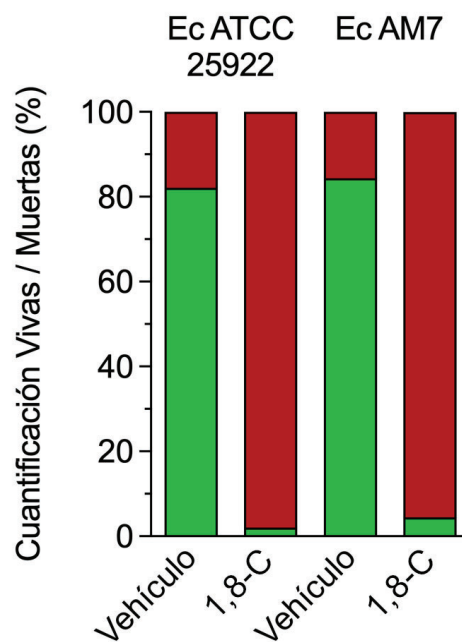


Figura 25. Cuantificación de células vivas/muertas en biofilms de *Ec ATCC 25922* y *Ec AM7* por microscopía confocal. Las células vivas (verdes) y muertas (rojas/amarillas) se cuantificaron mediante el programa COMSTAT. Los resultados se expresan como porcentaje de vivas/muertas sobre el total de células en el biofilm. Los valores representan la media del porcentaje de vivas/muertas de 2 ensayos independientes, para los cuales se observaron 4 campos en cada uno.

4.2.6. Efecto del 1,8-C sobre la estructura de biofilms preformados de *E. coli*

Como se evidenció en el apartado anterior, el 1,8-C tendría una buena capacidad de penetración en el biofilm. Por lo tanto, resultó interesante analizar si el fitoquímico altera la estructura de los biofilms preformados de *E. coli*.

Para ello se utilizó la tinción con calcofluor-white, compuesto fluorescente que se une a polisacáridos β (1 \rightarrow 4) presentes en la matriz de los biofilms de *E. coli*, como por ejemplo la celulosa. Biofilms preformados de 3 días de Ec ATCC 25922 y Ec AM7 tratados con el vehículo al 0,25% (etanol) o con el fitoquímico al 1% (v/v) durante 1 hora se tiñeron con el fluoróforo y a continuación se visualizaron mediante microscopía confocal.

Las imágenes obtenidas de los tratamientos con vehículo permitieron apreciar una diferencia estructural entre los biofilms de ambas cepas de *E. coli* (Figura 26). En particular, la estructura de los biofilms de la Ec ATCC 25922 presentó una forma de telaraña, observándose una fuerte interconexión entre diferentes sectores de la matriz por la presencia de puentes que se cruzan unos a otros, mientras que los biofilms de la Ec AM7 presentaron una estructura más compacta, formando aglomeraciones y una matriz menos interconectada con islas no conectadas entre sí. La cuantificación de las alturas promedio de estos biofilms utilizando el software COMSTAT mostró para Ec ATCC 25922 biofilms con una altura en el rango de 20-25 μm , mientras que en los biofilms de Ec AM7 la altura varió entre 30 y 40 μm . Es importante destacar que estos resultados concuerdan con lo observado en la producción de biomasa de biofilm (ver Figura 19), donde se observó que la cepa Ec AM7 produce mayor biomasa que la cepa Ec ATCC 25922.

Por otra parte, el tratamiento con 1,8-C afectó la estructura de los biofilms de ambas cepas de *E. coli*, lo cual se reflejó tanto en las PMI como en las imágenes 3D que se muestran en la Figura 26. Los análisis cuantitativos a través del software COMSTAT de los biofilms de Ec ATCC 25922 y Ec AM7 tratados con el fitoquímico evidenciaron una reducción de entre un 28 y 43% del biovolumen ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) de su matriz (Tabla 7).

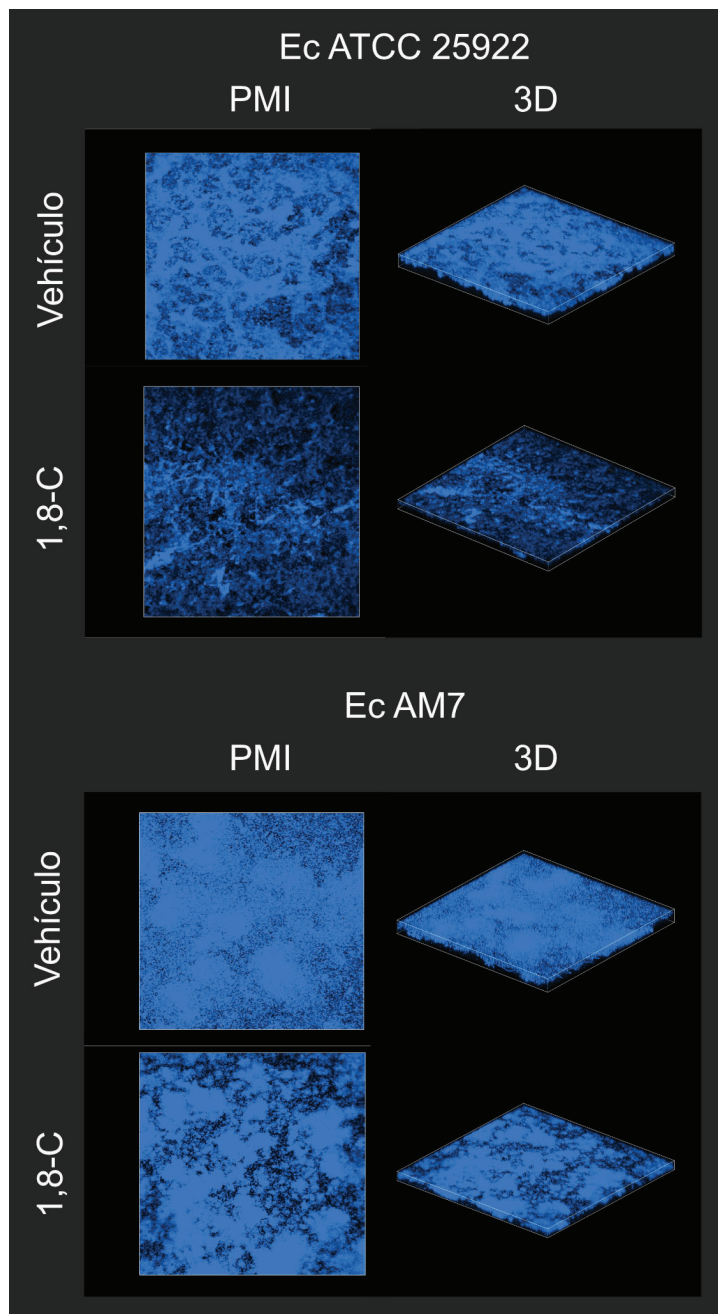


Figura 26. Visualización de la estructura de los biofilms de Ec AM7 luego del tratamiento con 1,8-C por microscopía confocal luego de la tinción con calcofluor-white. Biofilms preformados de 3 días se trataron con etanol al 0,25 % (vehículo) o 1% (v/v) 1,8-C durante 1 hora. Se tiñeron con calcofluor-white y se obtuvieron proyecciones de máxima intensidad (PMI) del eje-Z (paneles izquierdos) y reconstrucciones 3D (paneles derechos) por el programa de análisis de imágenes Icy. Imágenes representativas elegidas de 6 campos observados de 2 experimentos independientes. Cada imagen representa un campo de 635 x 635 μm . Barras de escala: 50 μm .

Tabla 7. Determinación del biovolumen de la matriz de biofilms preformados de *E. coli* luego del tratamiento con 1,8-C.

Tratamientos	Biovolumen ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$)	
	Ec ATCC 25922	Ec AM 7
Vehículo	11,6 \pm 1,8	9,8 \pm 1,9
1,8-C	6,6 \pm 2,0	7,0 \pm 2,1

Los valores representan la media de 2 ensayos independientes \pm E.E. En cada ensayo se analizaron 6 campos representativos.

Otra aproximación para estudiar el efecto del 1,8-C sobre la estructura de los biofilms preformados fue analizar si era o no capaz de disgregar la biomasa del mismo. Para ello, se investigó la capacidad del fitoquímico para disgregar biomasa de biofilms preformados por 3 días de los 4 aislados de *E. coli* en estudio luego del tratamiento con el vehículo al 0,25% (v/v) o el fitoquímico al 1% (v/v) durante 1 hora mediante tinción por cristal violeta (Tabla 8).

Los resultados obtenidos muestran en todos los casos una disminución significativa de la biomasa de los biofilms luego del tratamiento con el fitoquímico. El mayor efecto se obtuvo sobre los aislados Ec 07 y Ec ATCC 25922, con un descenso de la biomasa del 65 y 60%, respectivamente. Una menor disminución de biomasa se observó en los aislados Ec AM7 y Ec AM 10 (48 y 49%, respectivamente).

En consecuencia, los datos obtenidos muestran que el compuesto es capaz de alterar la estructura de la matriz del biofilms de *E. coli*, así como de reducir significativamente su biomasa.

Tabla 8. Determinación de la biomasa de biofilms preformados de *E. coli* luego del tratamiento con 1,8-C.

Aislado	Biomasa de biofilm (A_{595nm})		Disrupción de biofilm (%) (promedio \pm DE)
	Vehículo (promedio \pm DE)	Tratado con 1,8-C (promedio \pm DE)	
Ec ATCC 25922	1,76 \pm 0,76	0,74 \pm 0,44	60 \pm 12 *
Ec AM7	2,66 \pm 0,33	1,34 \pm 0,37	48 \pm 18 *
Ec AM10	0,73 \pm 0,2	0,39 \pm 0,25	49 \pm 21 *
Ec 07	0,45 \pm 0,12	0,16 \pm 0,05	65 \pm 02 *

Los valores representan la media de 3 ensayos independientes \pm D.E. (*) $p < 0,05$ al comparar cada cepa tratada con 1,8-C vs cada cepa tratada con el vehículo mediante el test *t* de Student.

4.2.7. Evaluación de la viabilidad de las células desprendidas de biofilms preformados de *E. coli* por el tratamiento con 1,8-C

Dado que los datos obtenidos muestran que el compuesto es capaz de disgregar la biomasa de los biofilm en todas las cepas examinadas de *E. coli*, resultó de interés estudiar si, luego del tratamiento con 1,8-C, las células desprendidas de los biofilm se encuentran vivas o muertas. Para ello, se testeó la viabilidad de las células desprendidas de biofilms de aislados de *E. coli* preformados durante 3 días tratados bajo las mismas condiciones descriptas anteriormente, mediante recuento de UFC.

Los resultados muestran, para las cuatro cepas estudiadas, una disminución significativa en la viabilidad entre 3 y 4 Log en las células desprendidas de los biofilms tratados con 1,8-cineol respecto a aquellas provenientes de los biofilms tratados con vehículo (Figura 27).

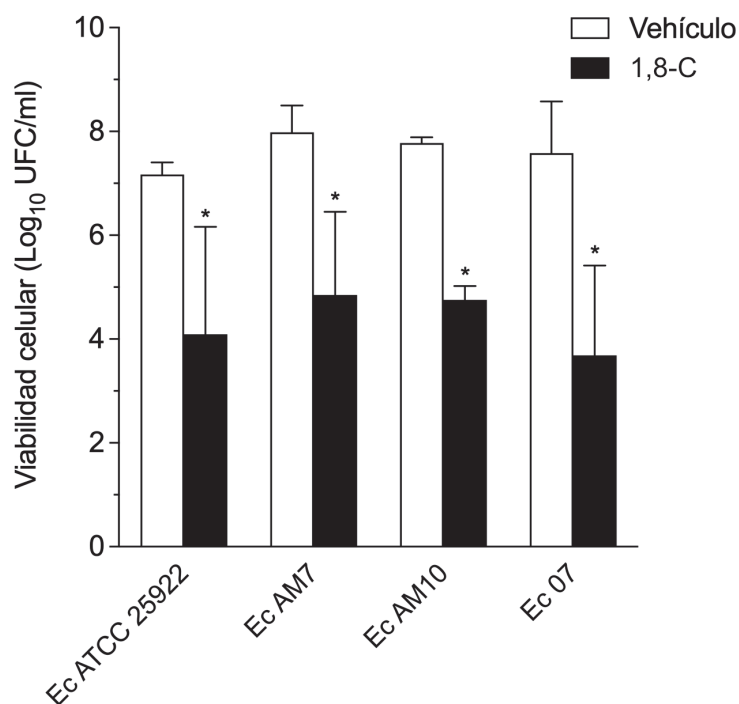


Figura 27. Determinación de la viabilidad de células desprendidas de biofilms de diferentes aislados de *E. coli* luego del tratamiento con 1,8-C mediante recuento de UFC. Se trataron los biofilms con etanol 0,25 % (vehículo) o 1% (v/v) de 1,8-C durante 1 hora, y se determinó en el sobrenadante de los biofilms la viabilidad celular mediante recuento de UFC. Los valores representan la media de 3 ensayos independientes \pm D.E. (*) $p < 0,05$ al comparar cada cepa tratada con 1,8-C vs cada cepa tratada con el vehículo mediante el test *t* de Student.

Posteriormente, se cuantificó la muerte celular por citometría de flujo dado que esta técnica permite conocer la proporción de células muertas sobre el total de células presentes en una muestra. Para ello, las células desprendidas de biofilms preformados de 3 días de Ec AM7 tratados con 1% (v/v) del fitoquímico durante 1 hora, fueron teñidas con el fluoróforo yoduro de propidio, que como se explicó anteriormente (en el ítem 4.2.5) ingresa en aquellas células con permeabilidad alterada/muertas. A continuación las muestras se analizaron por citometría de flujo.

Los resultados obtenidos, mostrados en la Figura 28, indican que el tratamiento con el fitoquímico disminuyó la viabilidad de las células desprendidas del biofilm en aproximadamente un 98%, mientras que en las células tratadas con el vehículo solo el 2,1% de las células se hallaron muertas.

Así, se evidencia que la mayoría de las células desprendidas del biofilm luego del tratamiento con el 1,8-C no se encuentran viables.

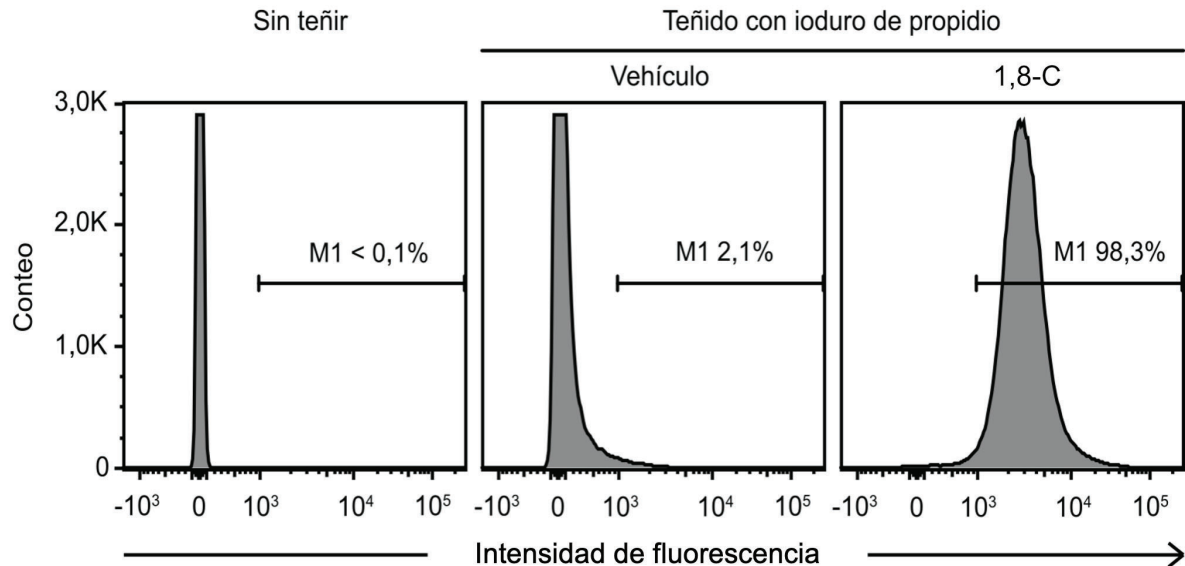


Figura 28. Cuantificación de muerte celular por citometría de flujo de las células desprendidas de biofilms de *Ec AM7* después del tratamiento con 1,8-C. Se trataron los biofilms con etanol 0,25 % (vehículo) o 1% (v/v) de 1,8-C durante 1 hora y se colectaron las células desprendidas de los mismos. Los datos muestran los histogramas de recuento de eventos bacterianos (eje y) vs. intensidad de fluorescencia de yoduro de propidio (eje x) de un ensayo representativo de 3 experimentos independientes. M1 corresponde a la región de células con tinción positiva para yoduro de propidio. Se analizaron 10^5 células por cada muestra.

4.2.8. Efecto del 1,8-C sobre la viabilidad de células planctónicas de *E. coli*

Al igual que con *K. pneumoniae*, resultó de interés describir el efecto del 1,8-C frente a cultivos planctónicos de *E. coli*, particularmente sobre cepas MDR-BLEE. Es por ello que se realizó la determinación de la viabilidad en células planctónicas de diferentes aislados de *E. coli* luego del tratamiento con 1% (v/v) de 1,8-C a diferentes tiempos (entre 5 minutos y 24 horas) mediante recuento de UFC.

La Figura 29 muestra que a tiempos muy cortos (5 - 15 minutos) todos los aislados de *E. coli* disminuyeron su viabilidad (entre 1 y 3 Log), alcanzando la mayor disminución (2 - 5 Log) con tratamientos entre 1 y 3 horas. A las 24 horas la mayoría de las cepas recuperaron los niveles de viabilidad previos al tratamiento

con 1,8-C, excepto Kp 010 que apenas sube 2 Log luego de haber bajado hasta 10^2 UFC/ml.

Este hallazgo indica que el fitoquímico también es capaz de disminuir significativamente la viabilidad de las células en cultivos planctónicos a tiempos cortos de tratamiento.

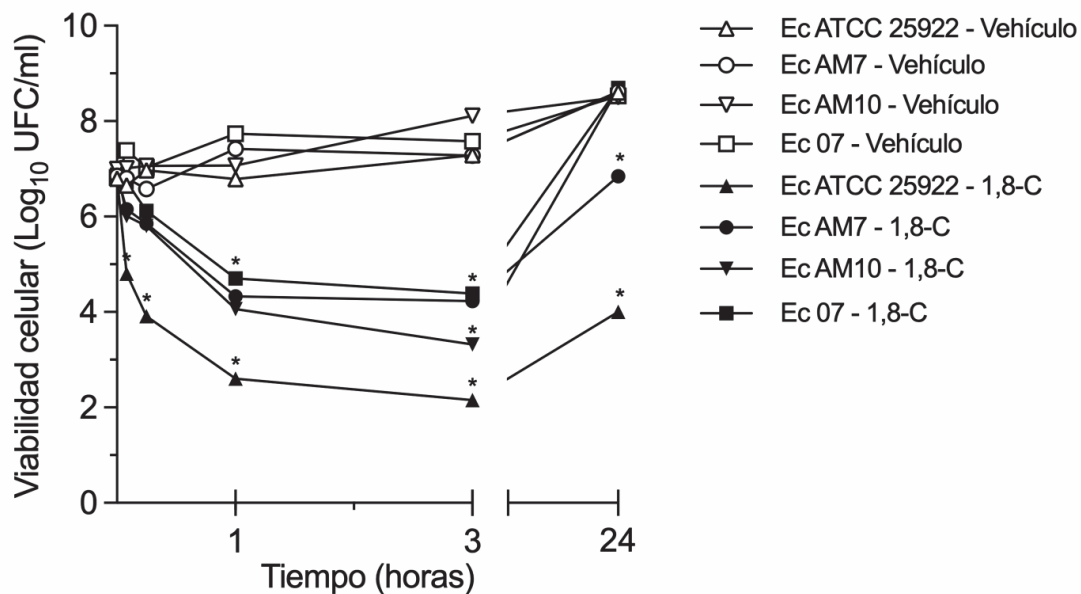


Figura 29. Efecto de la concentración del 1,8-C sobre la viabilidad en células planctónicas de diferentes aislados de *E. coli*. Se determinó la viabilidad celular por recuento de UFC en cultivos planctónicos de Ec ATCC 25922, Ec AM7, Ec AM10 y Ec 07 Ec AM7 luego del tratamiento con 1% (v/v) de 1,8-C o 0,25% de etanol (vehículo) a diferentes tiempos. La concentración inicial de bacterias fue de 1×10^7 UFC/ml. Los datos se expresan como la media \pm D.E. de tres experimentos independientes. (*) $p < 0,05$ al comparar cada cepa tratada con 1,8-C vs cada cepa tratada con el vehículo mediante el test *t* de Student.

Nuestros resultados han demostrado que el 1,8-C, al igual que lo ya descrito en *K. pneumoniae* (Capítulo 1), es capaz de penetrar, desestabilizar y disminuir la viabilidad del biofilm preformado de aislados MDR-BLEE de *E. coli*. Además, provoca la muerte de las células desprendidas del biofilm.

4.3. CAPÍTULO N°3: ANÁLISIS DEL MECANISMO DE DISRUPCIÓN DE LA MATRIZ DE BIOFILMS INDUCIDO POR EL 1,8-C

Los resultados mostrados anteriormente revelaron que el 1,8-C presenta actividad antibiofilm provocando la muerte de las células dentro del biofilm y también de las desprendidas del mismo y además reduce significativamente su biomasa y altera su estructura. Dado que la matriz extracelular es fundamental para mantener la estructura y estabilidad del biofilm es posible que el fitoquímico sea capaz de inducir la desestabilización de la matriz que resulte finalmente en la reducción de su biomasa y los cambios en la estructura observada.

Con el fin de profundizar en el mecanismo de acción del 1,8-C involucrado en la disgregación del biofilm preformado maduro, se estudió la posibilidad de un efecto indirecto del compuesto sobre la matriz del biofilm, mediado por enzimas hidrolíticas liberadas desde las bacterias en el biofilm luego de su muerte y consecuente lisis de sus membranas. Se tomó como organismo modelo para estos estudios la cepa *Ec* ATCC 25922 (cepa uropatogénica cuyo genoma completo se encuentra secuenciado) dada su alta capacidad de producción de biofilm (Figura 19) y porque se ha reportado una alta homogeneidad en la composición de la matriz del biofilm entre diferentes aislamientos de *E. coli* (Serra y Hengge, 2021).

4.3.1. Componentes de la matriz extracelular relacionados a la estabilidad e integridad estructural de los biofilms

Las matrices de los biofilms están constituidas por diferentes componentes: polisacáridos, proteínas, lípidos y ADN extracelular; ha sido ampliamente reportado que la cantidad y tipo de los mismos puede variar según la especie (Flemming y Wingender, 2010). Entre los principales polisacáridos en *E. coli* se encuentran la celulosa, la poli- β -1,6-N-acetilglucosamina (PNAG) y el ácido colánico, mientras que la fimbria tipo 1 (pili) y la proteína curli son los

componentes proteicos más abundantes (McCrate *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2016; Balasubramanian *et al.*, 2021). Se ha observado que la proporción de la fimbria curli varía según las condiciones de crecimiento del biofilm, (temperatura y disponibilidad de nutrientes) (Evans y Chapman *et al.*, 2013).

En primer lugar, se estudió la importancia de los componentes de la matriz de biofilms de *E. coli* en su estabilidad e integridad estructural bajo las condiciones experimentales ensayadas en este trabajo de tesis (biofilms desarrollados a 37°C en medio M9 suplementado con glucosa) mediante el tratamiento con enzimas hidrolíticas. Para ello, biofilms de Ec ATCC 25922 preformados durante 3 días se trataron con celulasa, proteinasa K y DNAsa I durante 1 hora a 37°C. Luego, se determinó la biomasa remanente del biofilm por tinción con cristal violeta.

La Figura 30 muestra que el tratamiento con celulasa disminuyó significativamente (en promedio un 89% de reducción) la biomasa de los biofilms preformados de *E. coli*, mientras que el tratamiento con proteinasa K provocó una reducción promedio del 68%. Por el contrario, el tratamiento con DNAsa I no modificó significativamente la biomasa de los biofilms.

Estos resultados evidencian que tanto la celulosa como las proteínas son componentes importantes para la estabilidad e integridad estructural de los biofilms de la cepa estudiada.

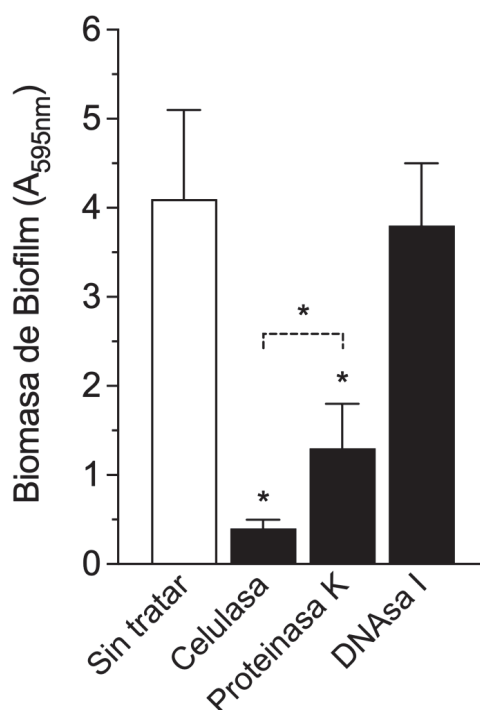


Figura 30. Efecto de enzimas hidrolíticas sobre biofilms preformados de *E. coli*. Biofilms de *Ec* ATCC 25922 preformados durante 3 días se trataron con 10 U/ml de celulasa, 100 µg/ml de proteinasa K y 100 kunitz/ml de DNAsa I durante 1 hora a 37°C. Se determinó la biomasa por medición de la absorbancia a 595 nm (A_{595nm}) luego de la tinción con cristal violeta. Los datos se expresan como la media \pm D.E. de tres experimentos independientes. (*) $p < 0,05$ al comparar biofilms tratados con celulasa o proteinasa K vs biofilms sin tratar, y biofilms tratados celulasa en comparación con biofilms tratados con proteinasa K, mediante el test t de Student.

4.3.2. Análisis *in silico* de enzimas hidrolíticas en *E. coli* capaces de degradar la matriz del biofilm

Diversas enzimas hidrolíticas se han propuesto como estrategias prometedoras para disgregar biofilms y revertir las células bacterianas a un estado planctónico en entornos clínicos e industriales (Kaplan, 2010; Snarr *et al.*, 2018). Los tratamientos enzimáticos han mostrado ser efectivos tanto en biofilms en crecimiento como en biofilms preformados, requiriendo concentraciones relativamente bajas para lograr una alta especificidad y eficacia.

Como se postuló la participación de enzimas hidrolíticas, liberadas desde las bacterias del biofilm, en la disrupción de la matriz observada luego del tratamiento

con 1,8-C fue relevante analizar la presencia de las mismas en *E. coli*, particularmente en cepas uropatógenicas.

En *E. coli*, se han descrito enzimas hidrolíticas capaces de degradar polisacáridos presentes en la matriz de los biofilms, como la celulasa BcsZ y la PNAGasa PgaB (Mazur y Zimmer, 2011; Krasteva *et al.*, 2017; Little *et al.*, 2018). La proteína BcsZ pertenece al complejo de síntesis de celulosa bacteriana (bcs, bacterial cellulose synthase), cuyos genes se encuentran dispuestos en el operón *bcs* (Figura 31A). Este complejo es el encargado del ensamblaje y el transporte desde el interior celular al exterior de las cadenas de celulosa (poli- β -1,4-glucano). BcsZ es una enzima periplásmica con actividad β -1,4-endoglucanasa (Figura 31A), cuya función es la de controlar la longitud del polímero antes de ser translocado al medio extracelular. Por su parte, la enzima PgaB es una proteína periplásmica que contiene un dominio N-terminal deacetilasa y un dominio C-terminal con función deacetilasa y glicosil hidrolasa y pertenece al complejo de síntesis de poli- β -1,6-N-acetilglucosamina (Figura 31B). Al igual que BcsZ la proteína PgaB se encarga de controlar la longitud de los polímeros de poli- β -1,6-N-acetilglucosamina para que luego sean translocados al medio exterior. También las enzimas proteolíticas se consideran efectivas para erradicar biofilms mediante la hidrólisis tanto de proteínas de la matriz como de proteínas de adhesión a la superficie (adhesinas) (Baidamshina *et al.*, 2017). Entre las proteasas localizadas en el citoplasma de *E. coli* y que presentan función dipeptidasa frente a un amplio espectro de oligopéptidos se encuentran las proteínas Dcp y PepD (Heinrich *et al.*, 1993; Schroeder *et al.*, 1994). *E. coli* también posee proteasas periplásmicas encargadas de la eliminación de proteínas dañadas o mal plegadas, como por ejemplo SohB, DegP y BepA (Baird *et al.*, 1991; Bryant *et al.*, 2020; Ramírez-Larrota y Eckhard, 2022). La Tabla 9 y la Figura 31C resumen las enzimas hidrolíticas que podrían estar participando de la degradación de la matriz del biofilm en *E. coli*.

Se realizó la búsqueda de secuencias homólogas a estas enzimas hidrolíticas en cepas de *E. coli* uropatógenicas con genoma secuenciado. En cuatro cepas seleccionadas al azar (*E. coli* ATCC 25922, UT189, CFT073 y EcPF5), la totalidad

de las enzimas de interés se encontraron presentes. El alineamiento de secuencias múltiples (MSAs) frente a las secuencias de referencia de las enzimas provenientes de *E. coli* K12 evidenciaron un nivel de identidad de más del 97% en todos los casos (Tablas Anexo).

Los resultados evidencian que las enzimas hidrolíticas BcsZ, PgaB, Dcp, PepD, SohB, DegP y BepA en todos los aislados de *E. coli* uropatógenicos presentaron un alto nivel de identidad y avalan su presencia en cepas patogénicas. Por lo tanto, es posible que una o más de ellas sean las responsables de degradar el biofilm luego del tratamiento con el 1,8-C.

Tabla 9. Enzimas hidrolíticas potencialmente implicadas en la disrupción del biofilm.

Proteína	Gen	Organismo	Accession Number	Ubicación	Función	Referencia
BcsZ	<i>bcsZ</i>	<i>E. coli</i> K12	P37651	Periplasma	β -1,4-endoglucanasa	Mazur & Zimmer <i>et al.</i> , 2011
PgaB	<i>pgaB</i>	<i>E. coli</i> K12	P75906	Periplasma	β -1,6-glicosil hidrolasa	Little <i>et al.</i> , 2018
Dcp	<i>dcp</i>	<i>E. coli</i> K12	P24171	Citoplasma	Dipeptidil carboxipeptidasa	Henrich <i>et al.</i> , 1993
PepD	<i>pepD</i>	<i>E. coli</i> K12	P15288	Citoplasma	Dipeptidasa	Schroeder <i>et al.</i> , 1994
SohB	<i>sohB</i>	<i>E. coli</i> K12	P0AG14	Periplasma	Degradación de proteínas dañadas o mal plegadas	Baird <i>et al.</i> , 1991
DegP	<i>degP</i>	<i>E. coli</i> K12	P0C0V0	Periplasma	Degradación de proteínas dañadas o mal plegadas	Kolmar <i>et al.</i> , 1996
BepA	<i>bepA</i>	<i>E. coli</i> K12	P66948	Periplasma	Degradación de proteínas dañadas o mal plegadas	Bryant <i>et al.</i> , 2020

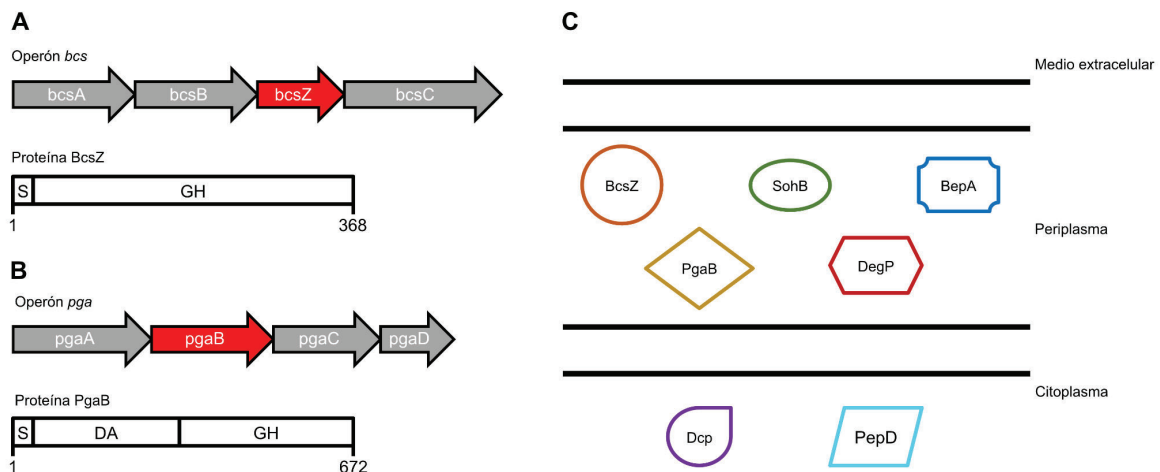


Figura 31. Enzimas hidrolíticas que pueden afectar a la matriz de *E. coli*. Operon *bcs* y dominios proteicos de la enzima BcsZ (A). Operon *pga* y dominios proteicos de la enzima PgaB (B). Localización de las enzimas hidrolíticas presentes en *E. coli* (C). S: péptido señal; GH: glicosilhidrolasa; DA: deacetilasa.

4.3.3. Capacidad del 1,8-C para disgregar biofilms a bajas temperaturas

Dado que *E. coli* es una bacteria mesófila y la temperatura óptima de sus enzimas es $> 23^{\circ}\text{C}$ (Kumar y Libchaber, 2013), se investigó si menores temperaturas disminuyen la capacidad del 1,8-C de disgregar biofilms. Se sabe que a baja temperatura la velocidad de las reacciones enzimáticas disminuyen considerablemente, lo cual podría inhibir la acción de enzimas que median la hidrólisis de los componentes de la matriz, si es que este mecanismo tuviera lugar. Se trataron biofilms preformados durante 3 días de Ec ATCC 25922 con 1% (v/v) de 1,8-C a 6, 12, 20 y a 37°C durante 1 hora (Tabla 10). Los resultados obtenidos a 37°C confirman resultados previos, ya que se observó una reducción significativa en la biomasa del biofilm después del tratamiento con el fitoquímico (disminución de $37 \pm 8\%$ de la biomasa). En cambio, a temperaturas menores como 20, 12 y 6°C , el 1,8-C no disminuyó significativamente la biomasa del biofilm respecto a los controles desafiados con el vehículo (sólo se observó una ligera variación, menor al 10%).

Tabla 10. Determinación de la biomasa de biofilms preformados de *E. coli* ATCC 25922 luego del tratamiento con 1,8-C a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Biomasa de biofilm (A_{595nm})	
	Vehículo (promedio \pm DE)	Tratado con 1,8-C (promedio \pm DE)
6	4,95 \pm 1,5	4,28 \pm 1,2
12	4,95 \pm 1,6	4,54 \pm 1,2
20	4,46 \pm 1,3	3,95 \pm 1,1
37	5,55 \pm 1,6	3,45 \pm 1,1

Los valores representan la media de 3 ensayos independientes \pm D.E. (*) $p < 0,05$ al comparar cada cepa tratada con 1,8-C vs cada cepa tratada con el vehículo mediante el test t de Student.

También se analizó la estructura de la matriz del biofilm preformados tratados con el fitoquímico a 6 °C, y a 37°C luego de la tinción con calcofluor-white y observación a través de microscopía confocal.

El tratamiento con 1% (v/v) de 1,8-C a 6°C sobre los biofilms de *Ec* ATCC 25922 no modificó la biomasa y la altura de los biofilms en comparación con los tratados con el vehículo a la misma temperatura (Figura 32 y Tabla 11). Por el contrario, como se mostró en el Capítulo 2, el tratamiento con el fitoquímico a 37°C provocó una disminución significativa en la biomasa y altura del biofilm (43% y 10 μ m, respectivamente).

En consecuencia, los datos obtenidos muestran que el efecto del 1,8-C sobre la disgregación de la matriz disminuye considerablemente cuando se realiza el tratamiento a baja temperatura.

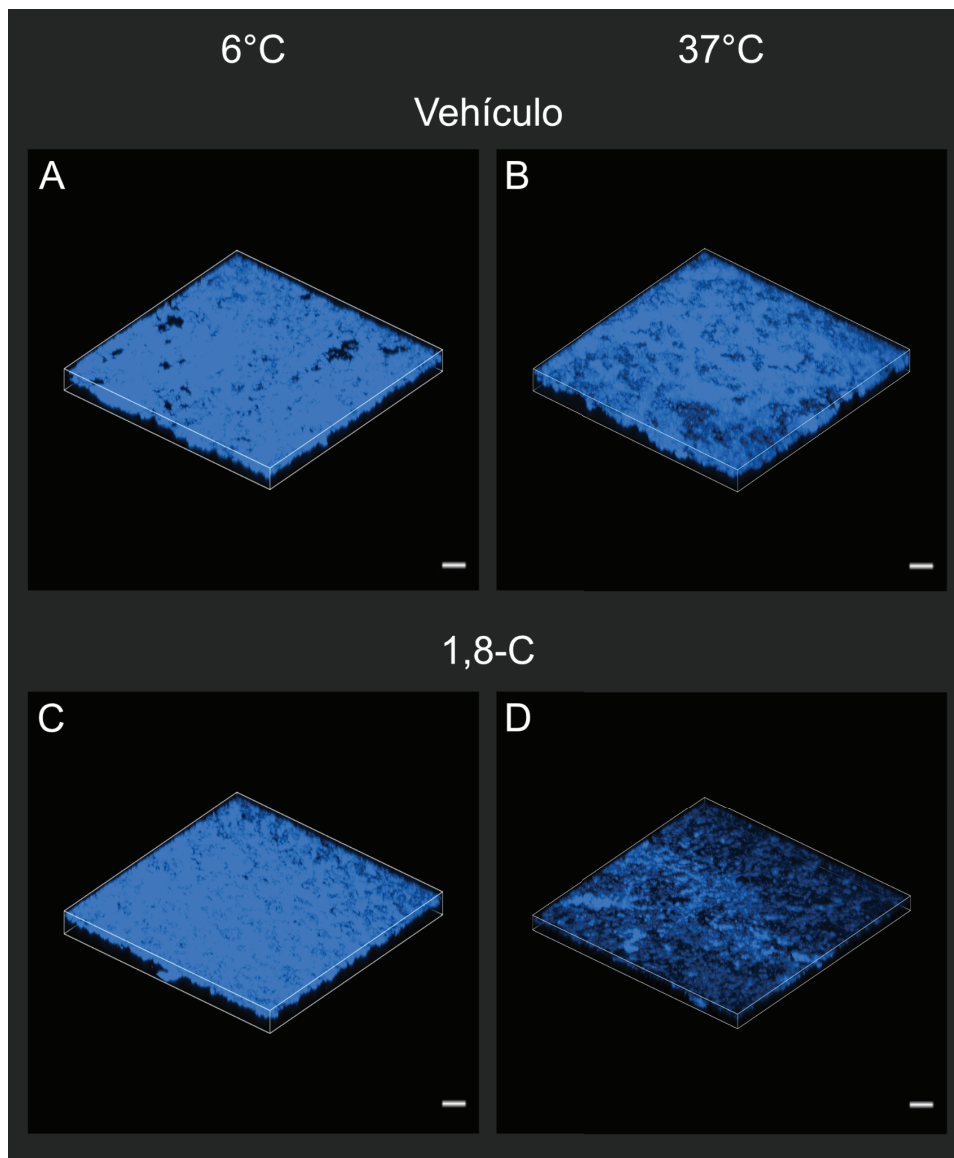


Figura 32. Visualización de la estructura de la matriz de los biofilms de Ec ATCC 25922 luego del tratamiento con 1,8-C a 6°C y 37°C por microscopía confocal luego de la tinción con calcofluor-white. Biofilms preformados de 3 días se trataron con etanol al 0,25 % (vehículo) o 1% (v/v) 1,8-C durante 1 hora. Se tiñeron con calcofluor-white y se obtuvieron las reconstrucciones 3D por el programa de análisis de imágenes Icy. Imágenes representativas elegidas de 6 campos observados de 2 experimentos independientes. Cada imagen representa un campo de 635 x 635 μm . Barras de escala: 50 μm .

Tabla 11. Biovolumen y alturas de biofilms preformados de *E. coli* ATCC 25922 luego del tratamiento con 1,8-C a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Biovolumen ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$)		Altura (μm)	
	Vehículo (promedio \pm DE)	Tratado con 1,8-C (promedio \pm DE)	Vehículo (promedio \pm DE)	Tratado con 1,8-C (promedio \pm DE)
37	11,58 \pm 1,85	6,60 \pm 2,0	18,8 \pm 2,0	18,8 \pm 2,0
6	11,45 \pm 1,60	11,14 \pm 1,52	27,8 \pm 2,5	27,8 \pm 2,5

Los valores representan la media de 6 campos observados de 2 ensayos independientes \pm E.E.

4.3.4. Evaluación de la viabilidad de biofilms preformados de *E. coli* mediante microscopía confocal después de la aplicación de 1,8-C a baja temperatura.

Se sabe que la baja en la temperatura impacta negativamente en la fluidez de las membranas celulares y se vuelven más rígidas. Es por ello, que no se puede descartar que el compuesto a bajas temperaturas no pueda permeabilizar la membrana. Para investigar dicho aspecto se determinó la viabilidad celular en biofilms preformados de *E. coli* luego del tratamiento con 1,8-C a 6°C, por tinción fluorescente de células vivas/muertas y posterior análisis por microscopía confocal. Biofilms de *Ec* ATCC 25922 preformados durante 3 días sobre cubreobjetos y tratados con el vehículo (etanol) al 0,25% o con 1,8-C al 1% (v/v) durante 1 hora a 6°C y 37°C, se sometieron a tinción con el BacLight™ Viability Kit y posterior observación por microscopía confocal.

Las representaciones tridimensionales de los biofilms, sometidos a tratamientos con el vehículo a 6°C y 37°C, revelaron la mayoría de las células teñidas en verde y por lo tanto viables (Figura 33). En contraste, en los biofilms tratados con 1,8-C a ambas temperaturas, prácticamente la totalidad de las células se encuentran teñidas de rojo y por lo tanto muertas.

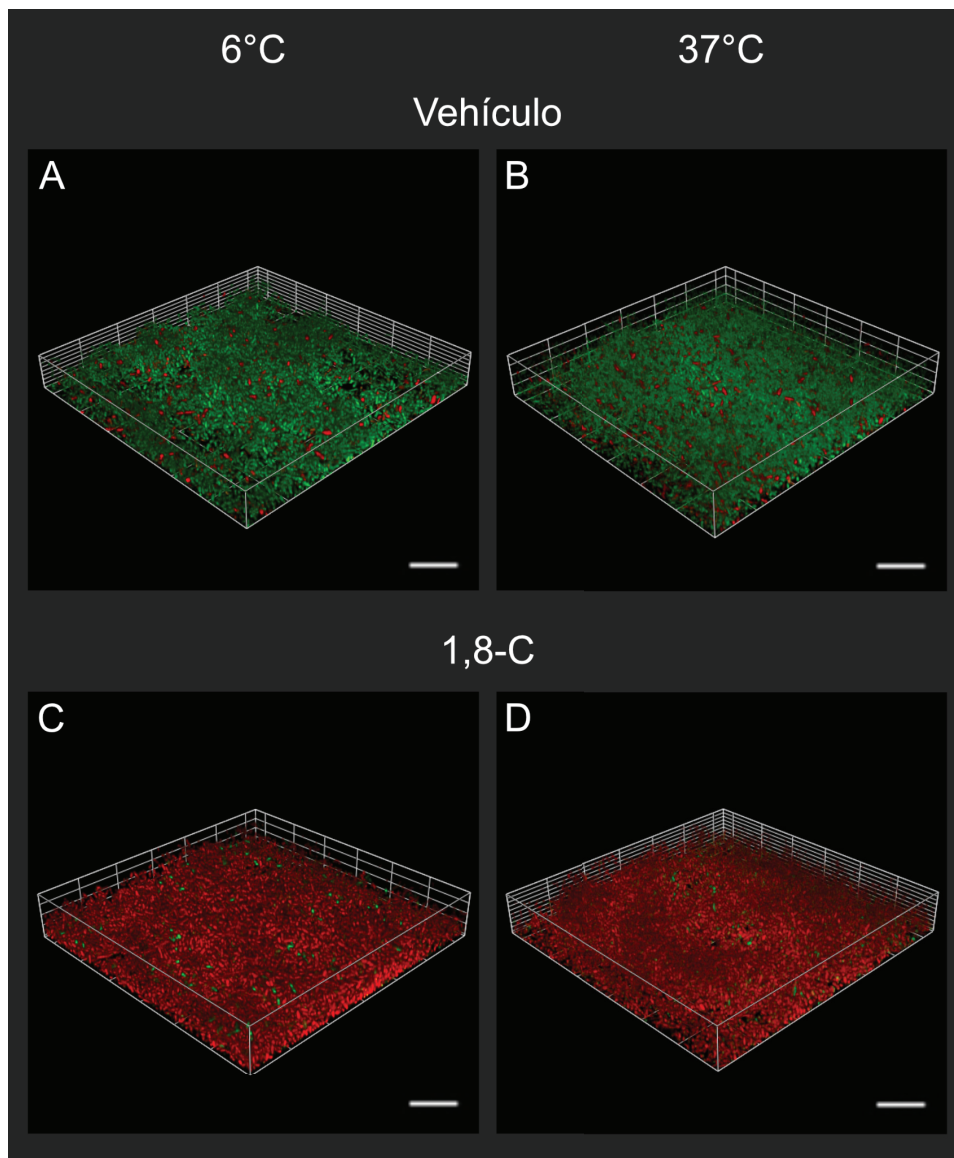


Figura 33. Análisis de células vivas/muertas de biofilms de Ec ATCC 25922 luego del tratamiento con 1,8-C a diferentes temperaturas por microscopía confocal. Reconstrucciones 3D de biofilms de Ec ATCC 25922 de 3 días tratados con etanol al 0,25 % (vehículo) o 1 % (v/v) 1,8-C durante 1 hora, y teñidos con el kit BacLight™; células vivas (verdes) y muertas (rojas). Imágenes representativas elegidas de 6 campos observados de 2 experimentos independientes. Cada imagen representa un campo de 127 x 127 µm. Barras de escala: 20 µm.

La cuantificación de células vivas y muertas mediante el software COMSTAT reveló en los biofilms de *Ec* ATCC 25922, expuestos al vehículo, ya sea a 6°C o 37°C, un alto porcentaje de células vivas (entre el 86 y el 82%, respectivamente), mientras que sólo el 2 - 4% permanecieron vivas luego del tratamiento con 1,8-C tanto a 37°C como a 6°C (Figura 34).

Por lo tanto, la capacidad del fitoquímico de permeabilizar las membranas celulares no se vio afectada por una disminución en la temperatura durante el tratamiento y está a favor de una menor actividad enzimática y consiguiente menor disrupción del biofilm a bajas temperaturas.

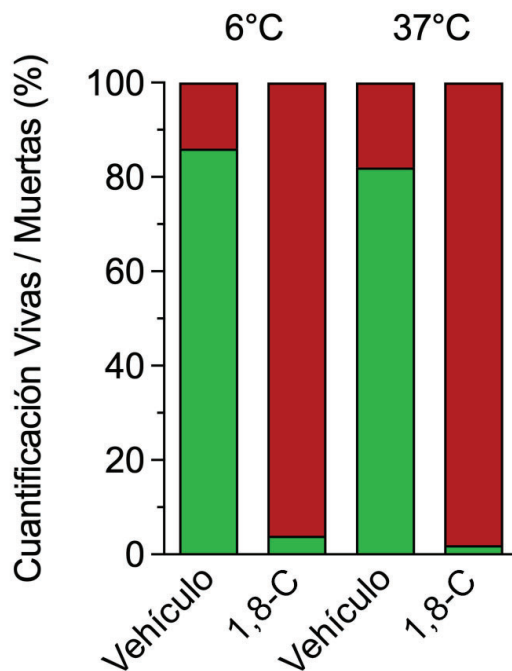


Figura 34. Cuantificación de células vivas/muertas en biofilms de *Ec* ATCC 25922 luego del tratamiento con 1,8-C a diferentes temperaturas por microscopía confocal. Las células vivas (verdes) y muertas (rojas/amarillas) se cuantificaron mediante el programa COMSTAT. Los resultados se expresan como porcentaje de vivas/muertas sobre el total de células en el biofilm. Los valores representan la media del porcentaje de vivas/muertas de 2 ensayos independientes, para los cuales se observaron 6 campos (127 x 127 µm) en cada uno.

5. DISCUSIÓN

Las infecciones causadas por cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* uropatógenas MDR-BLEE y productoras de biofilm ponen en riesgo la salud de la población a nivel mundial debido al aumento en los niveles de resistencia a diversas generaciones de antibióticos de uso en la clínica, con la consecuente limitación de opciones terapéuticas (Guerra *et al.*, 2022). En particular, la resistencia a carbapenémicos ha sido reconocida por la OMS como una prioridad crítica para el desarrollo de nuevos antimicrobianos. Además, ambos patógenos se asocian a infecciones con elevada mortalidad en hospitales, hogares de cuidado crónico y entre pacientes que necesitan ser atendidos con dispositivos invasivos como ventiladores y catéteres intravenosos (OMS, 2017).

Ante la necesidad de nuevos compuestos antimicrobianos eficaces contra dichos patógenos, se abordó el estudio de las propiedades antimicrobianas del monoterpeno 1,8-C y se analizó su capacidad como agente antibiofilm. Los resultados obtenidos demuestran que el 1,8-C presenta actividad antibiofilm contra aislados clínicos de *K. pneumoniae* y de *E. coli* uropatógenas MDR-BLEE. Se demostró sobre biofilms preformados maduros que el compuesto causa la muerte de las células dentro del biofilm y además altera su estructura, lo cual resulta en una reducción significativa de su biomasa .

En ambas especies en estudio, el efecto sobre la viabilidad celular en biofilms fue dependiente de la concentración y el tiempo de exposición al compuesto, observándose una actividad máxima al desafiar los mismos con una concentración de 1% (v/v) durante una hora. Además, se observó que el 1,8-C ocasiona la muerte celular a través de todas las capas del biofilm mediante CLSM después de la tinción con las sondas fluorescentes SYTO[®]9 e yoduro de propidio. Dicho comportamiento puede explicarse por su naturaleza anfipática, que le otorga a la molécula cierta hidrofiliencia facilitando su penetración a través de la matriz exopolisacáridica del biofilm, mientras que su parte lipofílica le permitiría la interacción con las membranas bacterianas provocando alteraciones en su permeabilidad. Tal comportamiento no sólo ha sido observado en el 1,8-C, sino

que otros monoterpenos tales como el mentol y el timol también presentan dichas características al momento de interactuar con la matriz de los biofilms y las membranas bacterianas (Kifer *et al.*, 2016).

En relación al efecto bactericida del 1,8-C, previamente se reportó asociado con su capacidad de permeabilizar la membrana de células planctónicas de *E. coli*, utilizando la sonda fluorescente SYTOX™ Green (Ojeda-Sana *et al.*, 2013^a). También la exposición a 1,0% (v/v) de 1,8-C aumentó en un 35-55% la permeabilidad de la membrana de cultivos planctónicos de *K. pneumoniae* tanto sensibles como resistentes a antibióticos (Moreno *et al.*, 2015). En tal sentido, en esta tesis se observó, a concentraciones similares del fitoquímico, que el yoduro de propidio (que solamente atraviesa membranas celulares con permeabilidad comprometida y luego se intercala en el ADN y fluoresce) fue capaz de atravesar la membrana celular de las células embebidas en el biofilm. Otros autores reportaron un incremento en la permeabilidad celular en cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenemasas luego del tratamiento con 1,44% de 1,8-C, por medio de ensayos de eflujo con bromuro de etidio (Moo *et al.*, 2021). Por lo tanto, toda la evidencia demuestra que el monoterpeno produce la muerte celular de los microorganismos estudiados mediante un mecanismo asociado con la desorganización de la membrana bacteriana.

Es importante destacar que el 1,8-C ejerce efectos bactericidas sobre cultivos planctónicos y sobre biofilms en condiciones similares. Dicho resultado es muy relevante porque la mayoría de los antibióticos de uso clínico presentan una drástica reducción en su eficacia contra biofilms respecto a bacterias en estado planctónico (Ciofu *et al.*, 2022). Si bien la mayoría de los aislados estudiados mostraron una gran susceptibilidad al compuesto alcanzando efectos bactericidas tanto a nivel planctónico como en biofilms, en algunos casos (EC 07 y Kp AM7) la reducción de la viabilidad celular resultó levemente menor (reducción de 1-2 Log UFC). Posiblemente, la causa de este comportamiento podría deberse a diferentes características estructurales en la composición de la pared celular y/o de la matriz del biofilm de estos aislados.

La actividad antibiofilm del compuesto también se asoció con la disrupción del biofilm, dado que la biomasa determinada por cristal violeta disminuyó significativamente en *K. pneumoniae* y *E. coli* (38-62% y 50-65%, respectivamente). Además, se visualizaron alteraciones significativas en la integridad de la matriz de los biofilms y reducción en su densidad en las imágenes por CLSM luego de la tinción con calcofluor-white. Se sabe que la matriz es un componente fundamental para la estabilidad del biofilm (Flemming *et al.*, 2016). Debido a ello, se postuló que el fitoquímico podría inducir cambios en la estructura de la matriz del biofilm que provoquen su desestabilización y posterior desprendimiento (reducción de biomasa). Dichos cambios estarían mediados por enzimas hidrolíticas liberadas desde el interior de las bacterias hacia la matriz del biofilm luego de la permeabilización y muerte celular provocada por el 1,8-C. Para analizar dicha hipótesis, se tomó Ec ATCC 25922 como modelo de estudio porque se ha reportado una estructura más homogénea entre diferentes aislamientos de *E. coli*, en contraste con lo reportado para aislados clínicos de *K. pneumoniae* (Serra y Hengge, 2021; Li y Ni, 2023). Se evidenció que tanto la celulosa como las proteínas, y no así el ADN extracelular, son constituyentes fundamentales para la estabilidad estructural de los biofilms. Cuando se realizó el análisis *in silico* de enzimas hidrolíticas capaces de degradar polisacáridos y proteínas en diferentes cepas de *E. coli* uropatogénicas se encontró un alto nivel de identidad para las enzimas capaces de degradar celulosa (BcsZ), poli- β (1,6)-N-acetil-D-glucosamina (PgaB) y diversas proteasas (Dcp, PepD, SohB, DegP, BepA). Estas enzimas también se encuentran presentes en *K. pneumoniae* (Huang *et al.*, 2014; Cahill *et al.*, 2015; Römling y Galperin, 2015).

Considerando la participación de una actividad enzimática como parte del mecanismo de disgregación del biofilm mediada por el 1,8-C, se estudió el efecto de la temperatura. Los resultados mostraron reducción en la biomasa del biofilm solamente cuando el tratamiento con 1,8-C se realizó a 37°C; a temperaturas menores no se observaron efectos significativos. A su vez, la matriz de los biofilms tratados con el fitoquímico a 6°C no presentó alteraciones en su integridad ni disminución de densidad por CLSM luego de la tinción con calcofluor-white.

Además, se corroboró que las bajas temperaturas no afectan la capacidad del compuesto de permeabilizar la membrana.

Otro abordaje preliminar realizado consistió en inhibir posibles celulasas y proteasas liberadas hacia la matriz por el agregado exógeno de glucosa (500 mM) o de un cocktail comercial de inhibidores de proteasas durante la exposición del biofilm al 1,8-C. Sin embargo, no se observó un efecto inhibitorio sobre la disgregación del biofilm, posiblemente debido a un acceso limitado de los inhibidores a sus enzimas blanco en el interior de la matriz del biofilm.

En conjunto, los resultados obtenidos permiten proponer que la acción antibiofilm del 1,8-C se llevaría a cabo, al menos, mediante tres etapas (Figura 35):

Etapa 1: Difusión del compuesto dentro del biofilm, alcanzando incluso las células de las capas más profundas del mismo.

Etapa 2: Permeabilización de las membranas bacterianas provocando la muerte celular y la consiguiente liberación de enzimas hidrolíticas intracelulares hacia la matriz del biofilm.

Etapa 3: Degradación de componentes estructurales de la matriz (fundamentalmente polisacáridos y proteínas) por la acción de las enzimas hidrolíticas liberadas en el medio extracelular, con la consiguiente desestabilización del biofilm y la liberación de células no viables.

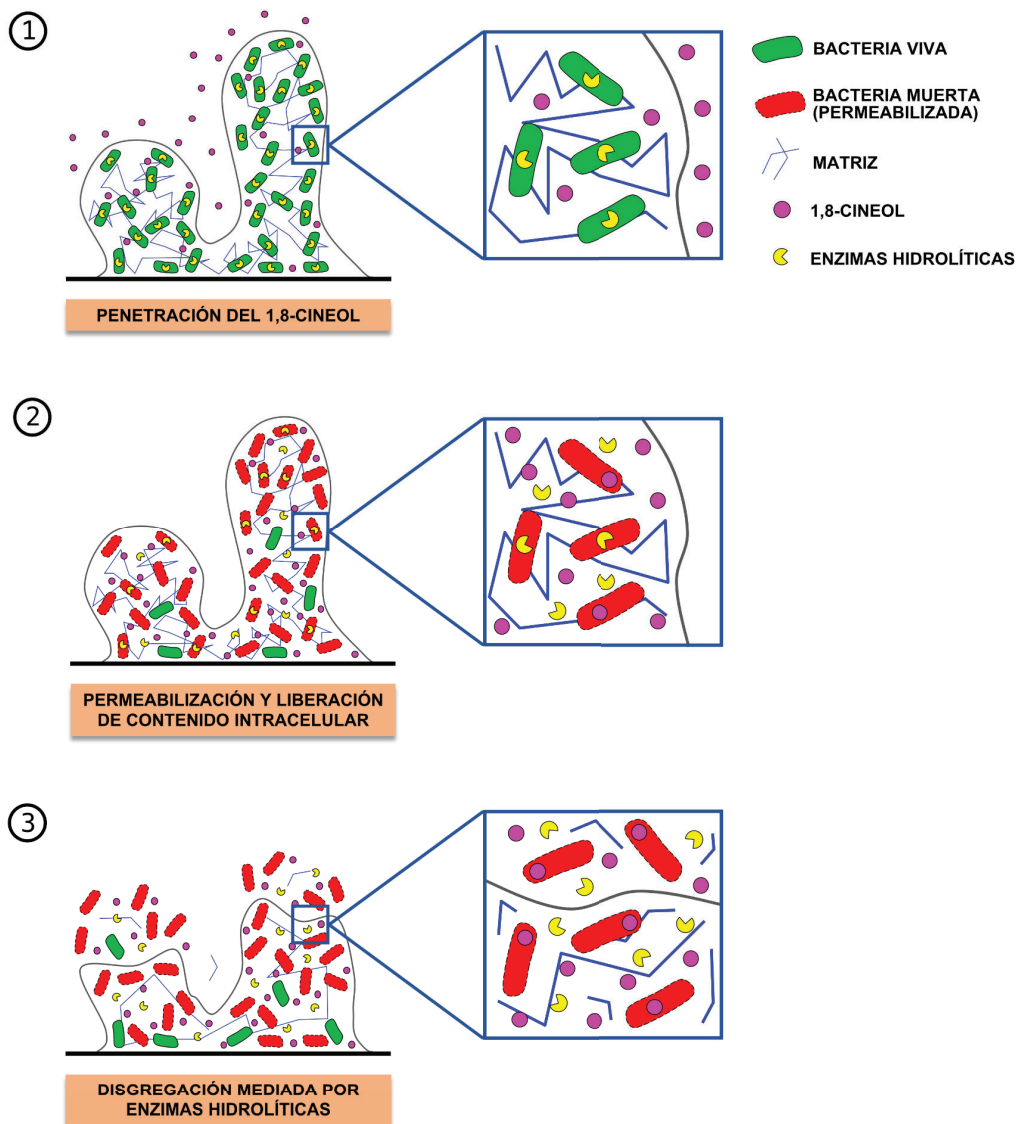


Figura 35. Mecanismo antibiofilm propuesto para el 1,8-C sobre biofilms preformados de *E. coli*. Se esquematizan las tres principales etapas de acción antibiofilm del 1,8-C sobre *E. coli*. Etapa 1: Difusión del compuesto dentro del biofilm. Etapa 2: Permeabilización y muerte celular seguida de liberación de enzimas hidrolíticas. Etapa 3: Degradación de la matriz.

Otro resultado importante sobre la actividad antibiofilm del 1,8-C radica en el hecho que más del 98% de las células desprendidas de los biofilms se encontraban muertas, según se observó mediante recuento de UFC y citometría de flujo. Por lo tanto, se evitaría la liberación masiva de células viables del biofilm

posterior a su disgregación mediada por el fitoquímico, disminuyendo el riesgo de nuevos focos de infección en los pacientes (Silva *et al.*, 2023).

Con respecto al mecanismo antibiofilm de extractos vegetales y fitoquímicos aislados, se encontró asociado con distintas etapas del desarrollo del biofilm (inhibición de la adhesión, inhibición de la producción de EPS, disgregación/disrupción del biofilm) (Silva *et al.*, 2023). Previamente se reportó que el 1,8-C inhibe la expresión del QS en *E. coli* O101, afectando la maduración de los biofilms, genes de virulencia y motilidad celular (Wang *et al.*, 2022). Además, inhibió la formación del biofilm y sus factores de virulencia en aislados de *S. pyogenes* y *P. aeruginosa* (Vijayakumar *et al.*, 2020; Karuppiyah *et al.*, 2021). También, el compuesto redujo la formación de biofilms de *S. aureus*, una de las bacterias más prevalentes en la rinosinusitis crónica (Schürmann *et al.*, 2019). Por otro lado, aceites esenciales donde el 1,8-C es el componente mayoritario mostraron capacidad para inhibir la adhesión y detener el desarrollo de los biofilms de aislados de *A. baumannii*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* (Polito *et al.*, 2022). En esta tesis, se mostró un claro efecto antibiofilm del 1,8-C sobre biofilms preformados durante 3 días, y un similar efecto sobre biofilms más jóvenes (de 1 y 2 d) con menor cantidad de biomasa. Por el contrario, no se observó efecto sobre la etapa de adhesión inicial a concentraciones que no afectan la viabilidad celular.

Se reportó que metabolitos secundarios, como el diterpeno fitol, es capaz de inhibir la adhesión celular inicial y alterar la arquitectura de la matriz extracelular de aislados de *K. pneumoniae* MDR-BLEE y resistentes a carbapenémicos (Adeosun *et al.*, 2022). Los terpenos eugenol y paeoniflorina disminuyeron la viabilidad celular en biofilms de *K. pneumoniae* resistentes a los carbapenems (Qian *et al.*, 2020^a; Qian *et al.*, 2020^b). Por otro lado, el cinamaldehído del aceite de canela, el carvacrol del aceite de orégano y el timol del aceite de tomillo rojo redujeron la formación de biofilm en aislados de *E. coli* (Amalaradjou *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2017; Maheshwari *et al.*, 2019).

Los resultados obtenidos en esta tesis sobre la actividad antibiofilm de 1,8-C lo señalan como un posible agente terapéutico eficaz contra infecciones causadas

por *K. pneumoniae* y *E. coli* uropaténicos MDR-BLEE. En este contexto, se deberían considerar los siguientes aspectos: 1) incrementar su solubilidad en agua, 2) favorecer su estabilidad a temperatura ambiente y 3) determinar dosis seguras de uso. Se ha resaltado el uso de nanopartículas como plataforma para la generación de nuevos enfoques de aplicación de compuestos con actividad antibiofilm (Fulaz *et al.*, 2019). Estas nanopartículas funcionales (emulsiones, liposomas, partículas poliméricas y micelas) pueden aumentar la eficacia del antimicrobiano transportado, su liberación controlada y posible reducción en la toxicidad (Makabenta *et al.*, 2021). En este sentido se ha informado que nanocompuestos generados a partir de fitoquímicos con un Log P similar al 1,8-C aumentaron considerablemente su solubilidad (Li *et al.*, 2019^b). Por otro lado, los nanomateriales sintéticos pueden presentar efectos tóxicos agudos dependiendo de su origen y utilización, mientras los naturales presentan pocos efectos perjudiciales. sobre organismos vivos (Jeevanandam *et al.*, 2018).

En relación a la toxicidad del 1,8-C, en ratones se encontró una baja toxicidad aguda del compuesto con un valor de DL₅₀ de 3,8 g/kg (Xu *et al.*, 2014). Los estudios en diferentes líneas celulares tumorales revelaron valores de citotoxicidad DL₅₀ que oscilan entre 0,11 y 0,35% (v/v) siendo estos valores los más bajos observados en comparación al aceite esencial de *R. officinalis* L. y sus principales metabolitos secundarios (Wang *et al.*, 2012). Además, no se reportaron efectos crónicos o genotóxicos atribuidos al 1,8-C (De Vincenzi *et al.*, 2002).

También se podría evaluar el uso potencial de este fitoquímico para desinfectar dispositivos médicos (catéteres urinarios, válvulas cardíacas protésicas, catéteres venosos centrales, prótesis vasculares, catéteres intravenosos y marcapasos cardíacos), los cuales frecuentemente permiten el desarrollo de biofilms de cepas MDR de *K. pneumoniae* y *E. coli* extra-intestinales .

Además de la actividad antibiofilm de metabolitos secundarios aislados, también se ha reportado su uso en combinación con antibióticos. Compuestos de aceites esenciales como el timol, eugenol y el cinamaldehído potenciaron la actividad antibiofilm de la estreptomycin frente a aislados de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhimurium* facilitando su penetración a través del biofilm (Liu *et al.*,

2015). De manera similar, el aceite de tomillo aumentó la actividad de la ciprofloxacina en biofilms de *K. pneumoniae* reduciendo la viabilidad de las células del biofilm (Mohamed *et al.*, 2018).

En resumen, toda la evidencia presentada en esta tesis amplía las propiedades antimicrobianas del 1,8-C conocidas hasta el momento, demostrando su claro efecto antibiofilm contra cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* uropatógenicas MDR-BLEE y dilucidando en parte su mecanismo de acción sobre dichos patógenos.

6. CONCLUSIONES

- El monoterpeno 1,8-C mostró actividad antibiofilm contra biofilms preformados de *K. pneumoniae* y *E. coli* MDR-BLEE.
- El compuesto redujo la viabilidad de las células en los biofilms de ambos patógenos investigados, según se observó a través del recuento de UFC y análisis por CLSM luego de la tinción con SYTO[®]9 y yoduro de propidio.
- Los resultados por CLSM revelaron que el compuesto es capaz de matar las bacterias embebidas en el biofilm desde las capas superiores hasta las cercanas al sustrato.
- La actividad antibiofilm del compuesto también se asoció con la disgregación del biofilm en ambas especies estudiadas observada mediante la disminución de su biomasa por tinción con cristal violeta y alteraciones en la estructura de la matriz a través de CLSM luego de la tinción con calcofluor-white.
- Luego de la disrupción y posterior desprendimiento de las células del biofilm se observó que las células desprendidas no estaban viables, mediante recuento de UFC y citometría de flujo .
- Se encontraron dos etapas diferenciales de la actividad antibiofilm, mediante ensayos realizados a diferentes temperaturas. Una etapa de permeabilización celular que puede tener lugar tanto a 37°C como a temperaturas inferiores y otra etapa de disgregación de la matriz del biofilm que ocurre con mayor eficiencia a 37°C, la cual se propuso que la acción de enzimas hidrolíticas sobre componentes de la matriz.

- Los ensayos *in silico* determinaron la presencia de una alta homología en enzimas hidrolíticas con capacidad de degradación de la matriz en diversos aislados uropatógenicos de *E. coli*.
- Se encontró evidencia de al menos tres etapas involucradas en el mecanismo de acción antibiofilm del 1,8-C: 1) penetración del fitoquímico a través del biofilm, 2) permeabilización de las bacterias y liberación de su contenido intracelular, y 3) disgregación de la matriz mediada por las enzimas hidrolíticas liberadas.

7. PERSPECTIVAS

- Ampliar el estudio sobre los mecanismos moleculares subyacentes en la actividad antibiofilm del 1,8-C en los biofilms de *K. pneumoniae* y *E. coli* MDR-BLEE.
- Estudiar el efecto antibiofilm del 1,8-C sobre biofilms polimicrobianos.
- Investigar combinaciones con antibióticos en búsqueda de efectos sinérgicos sobre biofilms de *K. pneumoniae* y *E. coli* MDR-BLEE.
- Diseñar y ensayar nuevas estrategias para la implementación efectiva del 1,8-C como agente antibiofilm a través del uso de nanomateriales.
- Testear el uso potencial del 1,8-C como agente desinfectante sobre dispositivos de uso médico y superficies hospitalarias.

8. BIBLIOGRAFÍA

Adeosun, I. J., Baloyi, I. T., & Cosa, S. (2022). Anti-Biofilm and Associated Anti-Virulence Activities of Selected Phytochemical Compounds against *Klebsiella pneumoniae*. *Plants*, 11(11), 1429. <https://doi.org/10.3390/plants11111429>

Alfurajji, N., Al-Hamami, A., Ibrahim, M., Rajab, H. K., & Hussain, B. W. (2022). Uropathogenic *Escherichia coli* virulence characteristics and antimicrobial resistance amongst pediatric urinary tract infections. *Journal of Medicine and Life*, 15(5), 650–654. <https://doi.org/10.25122/jml-2021-0148>

Álvarez-Martínez, F. J., Barrajón-Catalán, E., & Micol, V. (2020). Tackling Antibiotic Resistance with Compounds of Natural Origin: A Comprehensive Review. *Biomedicines*, 8(10), 405. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8100405>

Amalaradjou, M. A. R., Narayanan, A., Baskaran, S. A., & Venkitanarayanan, K. (2010). Antibiofilm Effect of Trans-Cinnamaldehyde on Uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Urology*, 184(1), 358–363. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2010.03.006>

An, F., Bai, Y., Xuan, X., Bian, M., Zhang, G., & Wei, C. (2022). 1,8-Cineole Ameliorates Advanced Glycation End Products-Induced Alzheimer's Disease-like Pathology In Vitro and In Vivo. *Molecules*, 27(12), 3913. <https://doi.org/10.3390/molecules27123913>

Anand, U., Jacobo-Herrera, N., Altemimi, A., & Lakhssassi, N. (2019). A Comprehensive Review on Medicinal Plants as Antimicrobial Therapeutics: Potential Avenues of Biocompatible Drug Discovery. *Metabolites*, 9(11), 258. <https://doi.org/10.3390/metabo9110258>

Andrade, J. M., Faustino, C., Garcia, C., Ladeiras, D., Reis, C. P., & Rijo, P. (2018). *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. *Future Science OA*, 4(4), FSO283. <https://doi.org/10.4155/fsoa-2017-0124>

Baidamshina, D. R., Trizna, E. Y., Holyavka, M. G., Bogachev, M. I., Artyukhov, V. G., Akhatova, F. S., Rozhina, E. V., Fakhrullin, R. F., & Kayumov, A. R. (2017).

Targeting microbial biofilms using Ficin, a nonspecific plant protease. *Scientific Reports*, 7(1), 46068. <https://doi.org/10.1038/srep46068>

Baird, L., Lipinska, B., Raina, S., & Georgopoulos, C. (1991). Identification of the *Escherichia coli* sohB gene, a multicopy suppressor of the HtrA (DegP) null phenotype. *Journal of Bacteriology*, 173(18), 5763–5770. <https://doi.org/10.1128/jb.173.18.5763-5770.1991>

Balasubramanian, S., Yu, K., Cardenas, D. V., Aubin-Tam, M.-E., & Meyer, A. S. (2021). Emergent Biological Endurance Depends on Extracellular Matrix Composition of Three-Dimensionally Printed *Escherichia coli* Biofilms. *ACS Synthetic Biology*, 10(11), 2997–3008. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00290>

Barni, M. V., Carlini, M. J., Cafferata, E. G., Puricelli, L., & Moreno, S. (2012). Carnosic acid inhibits the proliferation and migration capacity of human colorectal cancer cells. *Oncology Reports*, 27(4), 1041–1048. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1630>

Bar-On, Y. M., Phillips, R., & Milo, R. (2018). The biomass distribution on Earth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(25), 6506–6511. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711842115>

Borges, R. S., Ortiz, B. L. S., Pereira, A. C. M., Keita, H., & Carvalho, J. C. T. (2019). *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *Journal of Ethnopharmacology*, 229, 29–45. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.09.038>

Boyle, R., McLean, S., & Davies, N. W. (2000). Biotransformation of 1,8-cineole in the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Xenobiotica*, 30(9), 915–932. <https://doi.org/10.1080/004982500433336>

Bradley, P. H. (2006). *British herbal compendium. A handbook of scientific information on widely used plant drugs.* Bournemouth: British Herbal Medicine Association.

Bryant, J. A., Cadby, I. T., Chong, Z.-S., Boelter, G., Sevastyanovich, Y. R., Morris, F. C., Cunningham, A. F., Kritikos, G., Meek, R. W., Banzhaf, M., Chng, S.-S., Lovering, A. L., & Henderson, I. R. (2020). Structure-Function Characterization of the Conserved Regulatory Mechanism of the *Escherichia coli* M48 Metalloprotease BepA. *Journal of Bacteriology*, 203(2). <https://doi.org/10.1128/JB.00434-20>

Burt, S. A., Ojo-Fakunle, V. T. A., Woertman, J., & Veldhuizen, E. J. A. (2014). The Natural Antimicrobial Carvacrol Inhibits Quorum Sensing in *Chromobacterium violaceum* and Reduces Bacterial Biofilm Formation at Sub-Lethal Concentrations. *PLoS ONE*, 9(4), e93414. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093414>

Cahill, B. K., Seeley, K. W., Gutel, D., & Ellis, T. N. (2015). *Klebsiella pneumoniae* O antigen loss alters the outer membrane protein composition and the selective packaging of proteins into secreted outer membrane vesicles. *Microbiological Research*, 180, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.06.012>

Cai, Z.-M., Peng, J.-Q., Chen, Y., Tao, L., Zhang, Y.-Y., Fu, L.-Y., Long, Q.-D., & Shen, X.-C. (2021). 1,8-Cineole: a review of source, biological activities, and application. *Journal of Asian Natural Products Research*, 23(10), 938–954. <https://doi.org/10.1080/10286020.2020.1839432>

Cepas, V., López, Y., Muñoz, E., Rolo, D., Ardanuy, C., Martí, S., Xercavins, M., Horcajada, J. P., Bosch, J., & Soto, S. M. (2019). Relationship Between Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 25(1), 72–79. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0027>

Chandorkar, N., Tambe, S., Amin, P., & Madankar, C. (2021). A systematic and comprehensive review on current understanding of the pharmacological actions, molecular mechanisms, and clinical implications of the genus *Eucalyptus*. *Phytomedicine Plus*, 1(4), 100089. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2021.100089>

Chang, D., Sharma, L., Dela Cruz, C. S., & Zhang, D. (2021). Clinical Epidemiology, Risk Factors, and Control Strategies of *Klebsiella pneumoniae* Infection. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.750662>

Ciofu, O., Moser, C., Jensen, P. Ø., & Høiby, N. (2022). Tolerance and resistance of microbial biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 20(10), 621–635. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00682-4>

Cižman, M., & Plankar Srovin, T. (2018). Antibiotic consumption and resistance of gram-negative pathogens (collateral damage). *GMS Infectious Diseases*, 6, Doc05. <https://doi.org/10.3205/id000040>

CLSI (2018). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 29th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute.

Compean, K. L., & Ynalvez, R. A. (2014). Antimicrobial Activity of Plant Secondary Metabolites: A Review. *Research Journal of Medicinal Plant*, 8(5), 204–213. <https://doi.org/10.3923/rjmp.2014.204.213>

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49(1), 711–745. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431>

Daubin, V., & Szöllősi, G. J. (2016). Horizontal Gene Transfer and the History of Life. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(4), a018036. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018036>

de Chaumont, F., Dallongeville, S., Chenouard, N., Hervé, N., Pop, S., Provoost, T., Meas-Yedid, V., Pankajakshan, P., Lecomte, T., Le Montagner, Y., Lagache, T., Dufour, A., & Olivo-Marin, J.-C. (2012). Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nature Methods*, 9(7), 690–696. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2075>

de Oliveira, J. R., de Jesus, D., Figueira, L. W., de Oliveira, F. E., Pacheco Soares, C., Camargo, S. E. A., Jorge, A. O. C., & de Oliveira, L. D. (2017). Biological activities of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) extract as analyzed in microorganisms and cells. *Experimental Biology and Medicine*, 242(6), 625–634. <https://doi.org/10.1177/1535370216688571>

De Vincenzi, M., Silano, M., De Vincenzi, A., Maialetti, F., & Scazzocchio, B. (2002). Constituents of aromatic plants: eucalyptol. *Fitoterapia*, 73(3), 269–275. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(02\)00062-X](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00062-X)

Dhakad, A. K., Pandey, V. V, Beg, S., Rawat, J. M., & Singh, A. (2018). Biological, medicinal and toxicological significance of Eucalyptus leaf essential oil: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(3), 833–848. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8600>

Evans, M. L., & Chapman, M. R. (2014). Curli biogenesis: Order out of disorder. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843(8), 1551–1558. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.09.010>

Farhanghi, A., Aliakbarlu, J., Tajik, H., Mortazavi, N., Manafi, L., & Jalilzadeh-Amin, G. (2022). Antibacterial interactions of pulegone and 1,8-cineole with monolaurin ornisin against *Staphylococcus aureus*. *Food Science & Nutrition*, 10(8), 2659–2666. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2870>

Ferrières, L., Hancock, V., & Klemm, P. (2007). Specific selection for virulent urinary tract infectious *Escherichia coli* strains during catheter-associated biofilm formation. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 51(1), 212–219. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00296.x>

Fleming, D., Chahin, L., & Rumbaugh, K. (2017). Glycoside Hydrolases Degrade Polymicrobial Bacterial Biofilms in Wounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(2). <https://doi.org/10.1128/AAC.01998-16>

Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>

Flemming, H.-C., Wingender, J., & Szewzyk, U. (Eds.). (2011). *Biofilm Highlights* (Vol. 5). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-19940-0>

Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>

Flemming, H.-C. (2016). EPS—Then and Now. *Microorganisms*, 4(4), 41. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4040041>

Flemming, H.-C., Baveye, P., Neu, T. R., Stoodley, P., Szewzyk, U., Wingender, J., & Wuertz, S. (2021). Who put the film in biofilm? The migration of a term from wastewater engineering to medicine and beyond. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 7(1), 10. <https://doi.org/10.1038/s41522-020-00183-3>

Fulaz, S., Vitale, S., Quinn, L., & Casey, E. (2019). Nanoparticle–Biofilm Interactions: The Role of the EPS Matrix. *Trends in Microbiology*, 27(11), 915–926. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.07.004>

Galván, E. M., Mateyca, C., & Ielpi, L. (2016). Role of interspecies interactions in dual-species biofilms developed in vitro by uropathogens isolated from polymicrobial urinary catheter-associated bacteriuria. *Biofouling*, 32(9), 1067–1077. <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1231300>

Gaya, M., Repetto, V., Toneatto, J., Anesini, C., Piwien-Pilipuk, G., & Moreno, S. (2013). Antiadipogenic effect of carnosic acid, a natural compound present in *Rosmarinus officinalis*, is exerted through the C/EBPs and PPAR γ pathways at the onset of the differentiation program. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(6), 3796–3806. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.03.021>

Gottesman, S. (1996). PROTEASES AND THEIR TARGETS IN ESCHERICHIA COLI. *Annual Review of Genetics*, 30(1), 465–506. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.30.1.465>

GRAM (2022). GRAM visualization tool tracks country-level AMR and related metrics. <https://www.tropicalmedicine.ox.ac.uk/gram/news/tool>

Guerra, M. E. S., Destro, G., Vieira, B., Lima, A. S., Ferraz, L. F. C., Hakansson, A. P., Darrieux, M., & Converso, T. R. (2022). *Klebsiella pneumoniae* Biofilms and Their Role in Disease Pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.877995>

Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S., & Tribedi, P. (2016). Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. *Archives of Microbiology*, 198(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1148-6>

Habtemariam, S. (2016). The Therapeutic Potential of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) Diterpenes for Alzheimer's Disease. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2016/2680409>

Hąc-Wydro, K., & Szydło, K. (2016). The influence of environmentally friendly pesticide - Eucalyptol - alone and in combination with terpinen-4-ol - on model bacterial membranes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 146, 918–923. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.07.044>

Hatfull, G. F., Dedrick, R. M., & Schooley, R. T. (2022). Phage Therapy for Antibiotic-Resistant Bacterial Infections. *Annual Review of Medicine*, 73(1), 197–211. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-080219-122208>

Henrich, B., Becker, S., Schroeder, U., & Plapp, R. (1993). dcp gene of *Escherichia coli*: cloning, sequencing, transcript mapping, and characterization of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 175(22), 7290–7300. <https://doi.org/10.1128/jb.175.22.7290-7300.1993>

Heydorn, A., Nielsen, A. T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersbøll, B. K., & Molin, S. (2000). Quantification of biofilm structures by the novel computer program comstat. *Microbiology*, 146(10), 2395–2407. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-10-2395>

Hoch, C. C., Petry, J., Griesbaum, L., Weiser, T., Werner, K., Ploch, M., Verschoor, A., Multhoff, G., Bashiri Dezfouli, A., & Wollenberg, B. (2023). 1,8-cineole (eucalyptol): A versatile phytochemical with therapeutic applications across

multiple diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 167, 115467. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115467>

Horst, K., & Rychlik, M. (2010). Quantification of 1,8-cineole and of its metabolites in humans using stable isotope dilution assays. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(10), 1515–1529. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900528>

Hriouech, S., Akhmouch, A. A., Mzabi, A., Chefchaou, H., Tanghort, M., Oumokhtar, B., Chami, N., & Remmal, A. (2020). The Antistaphylococcal Activity of Amoxicillin/Clavulanic Acid, Gentamicin, and 1,8-Cineole Alone or in Combination and Their Efficacy through a Rabbit Model of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Osteomyelitis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2020/4271017>

Huang, T.-W., Lam, I., Chang, H.-Y., Tsai, S.-F., Palsson, B. O., & Charusanti, P. (2014). Capsule deletion via a λ -Red knockout system perturbs biofilm formation and fimbriae expression in *Klebsiella pneumoniae* MGH 78578. *BMC Research Notes*, 7(1), 13. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-13>

Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>

Indrajith, S., Mukhopadhyay, A. K., Chowdhury, G., Farraj, D. A. Al, Alkufeidy, R. M., Natesan, S., Meghanathan, V., Gopal, S., & Muthupandian, S. (2021). Molecular insights of Carbapenem resistance *Klebsiella pneumoniae* isolates with focus on multidrug resistance from clinical samples. *Journal of Infection and Public Health*, 14(1), 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.09.018>

Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A., & Danquah, M. K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 9, 1050–1074. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98>

Jenkins, C., Rentenaar, R. J., Landraud, L., & Brisse, S. (2017). Enterobacteriaceae. In *Infectious Diseases* (pp. 1565-1578.e2). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00180-5>

Jiang, C.-H., Gan, M.-L., An, T.-T., & Yang, Z.-C. (2019). Bioassay-guided isolation of a *Mycobacterium tuberculosis* biofilm inhibitor from *Arisaema sinii* Krause. *Microbial Pathogenesis*, 126, 351–356. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.11.022>

Kaplan, J. B. (2010). Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses. *Journal of Dental Research*, 89(3), 205–218. <https://doi.org/10.1177/0022034509359403>

Karunanidhi, A., Ghaznavi-Rad, E., Hamat, R. A., Pichika, M. R., Lung, L. T. T., Mohd Fauzi, F., Chigurupati, S., van Belkum, A., & Neela, V. (2018). Antibacterial and Antibiofilm Activities of Nonpolar Extracts of *Allium stipitatum* Regel. against Multidrug Resistant Bacteria. *BioMed Research International*, 2018, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2018/9845075>

Karuppiyah, V., Thirunanasambandham, R., & Thangaraj, G. (2021). Anti-quorum sensing and antibiofilm potential of 1,8-cineole derived from *Musa paradisiaca* against *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(4), 66. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03029-y>

Karygianni, L., Ren, Z., Koo, H., & Thurnheer, T. (2020). Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends in Microbiology*, 28(8), 668–681. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.03.016>

Khadraoui, N., Essid, R., Jallouli, S., Damergi, B., Ben Takfa, I., Abid, G., Jedidi, I., Bachali, A., Ayed, A., Limam, F., & Tabbene, O. (2022). Antibacterial and antibiofilm activity of *Peganum harmala* seed extract against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* pathogenic isolates and molecular mechanism of action. *Archives of Microbiology*, 204(2), 133. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02747-z>

Khan, J., Tarar, S. M., Gul, I., Nawaz, U., & Arshad, M. (2021). Challenges of antibiotic resistance biofilms and potential combating strategies: a review. *3 Biotech*, 11(4), 169. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02707-w>

Kifer, D., Mužinić, V., & Klarić, M. Š. (2016). Antimicrobial potency of single and combined mupirocin and monoterpenes, thymol, menthol and 1,8-cineole against *Staphylococcus aureus* planktonic and biofilm growth. *The Journal of Antibiotics*, 69(9), 689–696. <https://doi.org/10.1038/ja.2016.10>

Kolmar, H., Waller, P. R., & Sauer, R. T. (1996). The DegP and DegQ periplasmic endoproteases of *Escherichia coli*: specificity for cleavage sites and substrate conformation. *Journal of Bacteriology*, 178(20), 5925–5929. <https://doi.org/10.1128/jb.178.20.5925-5929.1996>

Krasteva, P. V., Bernal-Bayard, J., Travier, L., Martin, F. A., Kaminski, P.-A., Karimova, G., Fronzes, R., & Ghigo, J.-M. (2017a). Insights into the structure and assembly of a bacterial cellulose secretion system. *Nature Communications*, 8(1), 2065. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01523-2>

Kumar, J. S., Umesha, S., Prasad, K. S., & Niranjana, P. (2015). Detection of Quorum Sensing Molecules and Biofilm Formation in *Ralstonia solanacearum*. *Current Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0953-0>

Kumar, P., & Libchaber, A. (2013). Pressure and Temperature Dependence of Growth and Morphology of *Escherichia coli*: Experiments and Stochastic Model. *Biophysical Journal*, 105(3), 783–793. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.06.029>

Kwiatkowski, P., Łopusiewicz, Ł., Pruss, A., Kostek, M., Sienkiewicz, M., Bonikowski, R., Wojciechowska-Koszko, I., & Dołęgowska, B. (2020). Antibacterial Activity of Selected Essential Oil Compounds Alone and in Combination with β -Lactam Antibiotics Against MRSA Strains. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 7106. <https://doi.org/10.3390/ijms21197106>

Lagha, R., Ben Abdallah, F., AL-Sarhan, B., & Al-Sodany, Y. (2019). Antibacterial and Biofilm Inhibitory Activity of Medicinal Plant Essential Oils Against *Escherichia*

coli Isolated from UTI Patients. *Molecules*, 24(6), 1161.
<https://doi.org/10.3390/molecules24061161>

Lebeaux, D., Ghigo, J.-M., & Beloin, C. (2014). Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(3), 510–543.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00013-14>

Lee, J. -H., Kim, Y. -G., & Lee, J. (2017). Carvacrol-rich oregano oil and thymol-rich thyme red oil inhibit biofilm formation and the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*, 123(6), 1420–1428. <https://doi.org/10.1111/jam.13602>

Lee, J., Sunny, S., Nazarian, E., Fornek, M., Abdallah, M., Episcopia, B., Rowlinson, M.-C., & Quale, J. (2023). Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Large Public Acute-Care Healthcare System, New York, New York, USA, 2016–2022. *Emerging Infectious Diseases*, 29(10), 1973–1978.
<https://doi.org/10.3201/eid2910.230153>

Lewis, K. (2020). The Science of Antibiotic Discovery. *Cell*, 181(1), 29–45.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.056>

Li, F., Wang, Y., Li, D., Chen, Y., & Dou, Q. P. (2019). Are we seeing a resurgence in the use of natural products for new drug discovery? *Expert Opinion on Drug Discovery*, 14(5), 417–420. <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1582639> (a)

Li, C.-H., Chen, X., Landis, R. F., Geng, Y., Makabenta, J. M., Lemnios, W., Gupta, A., & Rotello, V. M. (2019). Phytochemical-Based Nanocomposites for the Treatment of Bacterial Biofilms. *ACS Infectious Diseases*, 5(9), 1590–1596.
<https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00134> (b)

Li, L., Li, Z.-W., Yin, Z.-Q., Wei, Q., Jia, R.-Y., Zhou, L.-J., Xu, J., Song, X., Zhou, Y., Du, Y.-H., Peng, L.-C., Kang, S., & Yu, W. (2014). Antibacterial activity of leaf essential oil and its constituents from *Cinnamomum longepaniculatum*. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 7(7), 1721–1727.

- Li, Y., & Ni, M. (2023). Regulation of biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1238482>
- Little, B. J., & Lee, J. S. (2014). Microbiologically influenced corrosion: an update. *International Materials Reviews*, 59(7), 384–393. <https://doi.org/10.1179/1743280414Y.0000000035>
- Little, D. J., Pfoh, R., Le Mauff, F., Bamford, N. C., Notte, C., Baker, P., Guragain, M., Robinson, H., Pier, G. B., Nitz, M., Deora, R., Sheppard, D. C., & Howell, P. L. (2018). PgaB orthologues contain a glycoside hydrolase domain that cleaves deacetylated poly- β (1,6)-N-acetylglucosamine and can disrupt bacterial biofilms. *PLOS Pathogens*, 14(4), e1006998. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006998>
- Liu, Q., Niu, H., Zhang, W., Mu, H., Sun, C., & Duan, J. (2015). Synergy among thymol, eugenol, berberine, cinnamaldehyde and streptomycin against planktonic and biofilm-associated food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 60(5), 421–430. <https://doi.org/10.1111/lam.12401>
- Mączka, W., Duda-Madej, A., Górny, A., Grabarczyk, M., & Wińska, K. (2021). Can Eucalyptol Replace Antibiotics? *Molecules*, 26(16), 4933. <https://doi.org/10.3390/molecules26164933>
- Mah, T.-F. (2012). Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiology*, 7(9), 1061–1072. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.76>
- Maheshwari, M., Abul Qais, F., Althubiani, A. S., Abulreesh, H. H., & Ahmad, I. (2019). Bioactive extracts of *Carum copticum* and thymol inhibit biofilm development by multidrug-resistant extended spectrum β -lactamase producing enteric bacteria. *Biofouling*, 35(9), 1026–1039. <https://doi.org/10.1080/08927014.2019.1688305>
- Maikranz, E., Spengler, C., Thewes, N., Thewes, A., Nolle, F., Jung, P., Bischoff, M., Santen, L., & Jacobs, K. (2020). Different binding mechanisms of *Staphylococcus aureus* to hydrophobic and hydrophilic surfaces. *Nanoscale*, 12(37), 19267–19275. <https://doi.org/10.1039/D0NR03134H>

Makabenta, J. M. V., Nabawy, A., Li, C.-H., Schmidt-Malan, S., Patel, R., & Rotello, V. M. (2021). Nanomaterial-based therapeutics for antibiotic-resistant bacterial infections. *Nature Reviews Microbiology*, 19(1), 23–36.

<https://doi.org/10.1038/s41579-020-0420-1>

Manges, A. R., Geum, H. M., Guo, A., Edens, T. J., Fibke, C. D., & Pitout, J. D. D. (2019). Global Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) Lineages. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(3). <https://doi.org/10.1128/CMR.00135-18>

Martinez, A. (2018). Estudio microbiológico de bacterias Gram-negativas multirresistentes en orina y sangre en pacientes internados: producción de biofilm y actividad antibiofilm de fitoquímicos en aislados clínicos de alta prevalencia. (Tesis Bioquímica). Buenos Aires: Universidad Maimonides.

Mazur, O., & Zimmer, J. (2011). Apo- and Cellopentaose-bound Structures of the Bacterial Cellulose Synthase Subunit BcsZ. *Journal of Biological Chemistry*, 286(20), 17601–17606. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.227660>

McCrate, O. A., Zhou, X., Reichhardt, C., & Cegelski, L. (2013). Sum of the Parts: Composition and Architecture of the Bacterial Extracellular Matrix. *Journal of Molecular Biology*, 425(22), 4286–4294. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.06.022>

Mengoni, E. S., Vichera, G., Rigano, L. A., Rodriguez-Puebla, M. L., Galliano, S. R., Cafferata, E. E., Pivetta, O. H., Moreno, S., & Vojnov, A. A. (2011). Suppression of COX-2, IL-1 β and TNF- α expression and leukocyte infiltration in inflamed skin by bioactive compounds from *Rosmarinus officinalis* L. *Fitoterapia*, 82(3), 414–421. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.11.023>

Mironova, A. V., Karimova, A. V., Bogachev, M. I., Kayumov, A. R., & Trizna, E. Y. (2023). Alterations in Antibiotic Susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* in Dual Species Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10), 8475. <https://doi.org/10.3390/ijms24108475>

Miyazawa, M., Kameoka, H., Morinaga, K., Negoro, K., & Mura, N. (1989). Hydroxycineole: four new metabolites of 1,8-cineole in rabbits. *Journal of*

Agricultural and Food Chemistry, 37(1), 222–226.
<https://doi.org/10.1021/jf00085a051>

Mohamed, S. H., Mohamed, M. S. M., Khalil, M. S., Azmy, M., & Mabrouk, M. I. (2018). Combination of essential oil and ciprofloxacin to inhibit/eradicate biofilms in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Applied Microbiology*, 125(1), 84–95. <https://doi.org/10.1111/jam.13755>

Mohammadi, M., Masoumipour, F., Hassanshahian, M., & Jafarinasab, T. (2019). Study the antibacterial and antibiofilm activity of *Carum copticum* against antibiotic-resistant bacteria in planktonic and biofilm forms. *Microbial Pathogenesis*, 129, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.02.002>

Moo, C.-L., Osman, M. A., Yang, S.-K., Yap, W.-S., Ismail, S., Lim, S.-H.-E., Chong, C.-M., & Lai, K.-S. (2021). Antimicrobial activity and mode of action of 1,8-cineol against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Scientific Reports*, 11(1), 20824. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00249-y>

Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C. S., & Vojnov, A. A. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research*, 40(2), 223–231. <https://doi.org/10.1080/10715760500473834>

Moreno, S., Galvan, E. M., Vazquez, N. M., Fiorilli, G., Caceres Guido, P. A. (2015). Antibacterial efficacy of *Rosmarinus officinalis* phytochemicals against nosocomial multidrug-resistant bacteria grown in planktonic culture and biofilm. In: Mendez-Vilas A, editor. *The battle against microbial pathogens: basic science, technological adv. And educational programs*; p. 3–8.

Naves, P., del Prado, G., Huelves, L., Gracia, M., Ruiz, V., Blanco, J., Rodriguez-Cerrato, V., Ponte, M. C., & Soriano, F. (2008). Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent. *Journal of Applied Microbiology*, 105(2), 585–590. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03791.x>

Naziri, Z., Kilegolan, J. A., Moezzi, M. S., & Derakhshandeh, A. (2021). Biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli*: a complicating factor for treatment and recurrence of urinary tract infections. *Journal of Hospital Infection*, 117, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2021.08.017>

Ojeda-Sana, A. M., Repetto, V., & Moreno, S. (2013). Carnosic acid is an efflux pumps modulator by dissipation of the membrane potential in *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(1), 137–144. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1166-3>

Ojeda-Sana, A. M., van Baren, C. M., Elechosa, M. A., Juárez, M. A., & Moreno, S. (2013). New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control*, 31(1), 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.022>

OMS (2017). WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

OMS (2019). 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>

OMS (2023). Antimicrobial resistance. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

Parsek, M. R., & Singh, P. K. (2003). Bacterial Biofilms: An Emerging Link to Disease Pathogenesis. *Annual Review of Microbiology*, 57(1), 677–701. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090720>

Pederson, D. B., Dong, Y., Blue, L. B., Smith, S. V., & Cao, M. (2018). Water-soluble cranberry extract inhibits *Vibrio cholerae* biofilm formation possibly through modulating the second messenger 3', 5' - Cyclic diguanylate level. *PLOS ONE*, 13(11), e0207056. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207056>

Pinto, R. M., Soares, F. A., Reis, S., Nunes, C., & Van Dijck, P. (2020). Innovative Strategies Toward the Disassembly of the EPS Matrix in Bacterial Biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00952>

Polito, F., Kouki, H., Khedhri, S., Hamrouni, L., Mabrouk, Y., Amri, I., Nazzaro, F., Fratianni, F., & De Feo, V. (2022). Chemical Composition and Phytotoxic and Antibiofilm Activity of the Essential Oils of *Eucalyptus bicostata*, *E. gigantea*, *E. intertexta*, *E. obliqua*, *E. pauciflora* and *E. tereticornis*. *Plants*, 11(22), 3017. <https://doi.org/10.3390/plants11223017>

Prasanthi, D., & Lakshmi, P. (2012). Terpenes: Effect of lipophilicity in enhancing transdermal delivery of alfuzosin hydrochloride. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 3(4), 216. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.104712>

Pye, C. R., Bertin, M. J., Lokey, R. S., Gerwick, W. H., & Linington, R. G. (2017). Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(22), 5601–5606. <https://doi.org/10.1073/pnas.1614680114>

Qian, W., Zhang, J., Wang, W., Wang, T., Liu, M., Yang, M., Sun, Z., Li, X., & Li, Y. (2020). Antimicrobial and antibiofilm activities of paeoniflorin against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Applied Microbiology*, 128(2), 401–413. <https://doi.org/10.1111/jam.14480> (a)

Qian, W., Sun, Z., Wang, T., Yang, M., Liu, M., Zhang, J., & Li, Y. (2020). Antimicrobial activity of eugenol against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and its effect on biofilms. *Microbial Pathogenesis*, 139, 103924. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103924> (b)

Rama Devi, K., Srinivasan, R., Kannappan, A., Santhakumari, S., Bhuvaneshwari, M., Rajasekar, P., Prabhu, N. M., & Veera Ravi, A. (2016). In vitro and in vivo efficacy of rosmarinic acid on quorum sensing mediated biofilm formation and

virulence factor production in *Aeromonas hydrophila*. *Biofouling*, 32(10), 1171–1183. <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1237220>

Ramírez-Larrota, J. S., & Eckhard, U. (2022). An Introduction to Bacterial Biofilms and Their Proteases, and Their Roles in Host Infection and Immune Evasion. *Biomolecules*, 12(2), 306. <https://doi.org/10.3390/biom12020306>

Reshi, Z. A., Ahmad, W., Lukatkin, A. S., & Javed, S. Bin. (2023). From Nature to Lab: A Review of Secondary Metabolite Biosynthetic Pathways, Environmental Influences, and In Vitro Approaches. *Metabolites*, 13(8), 895. <https://doi.org/10.3390/metabo13080895>

Robertson, J., McGoverin, C., Vanholsbeeck, F., & Swift, S. (2019). Optimisation of the Protocol for the LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit for Rapid Determination of Bacterial Load. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00801>

Rodenak-Kladniew, B., Castro, M. A., Crespo, R., Galle, M., & García de Bravo, M. (2020). Anti-cancer mechanisms of linalool and 1,8-cineole in non-small cell lung cancer A549 cells. *Heliyon*, 6(12), e05639. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05639>

Romano, C. S., Abadi, K., Repetto, V., Vojnov, A. A., & Moreno, S. (2009). Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. *Food Chemistry*, 115(2), 456–461. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.029>

Römling, U., & Galperin, M. Y. (2015). Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products, and functions. *Trends in Microbiology*, 23(9), 545–557. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.05.005>

Rončević, T., Puizina, J., & Tossi, A. (2019). Antimicrobial Peptides as Anti-Infective Agents in Pre-Post-Antibiotic Era? *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5713. <https://doi.org/10.3390/ijms20225713>

Rumbaugh, K. P., & Sauer, K. (2020). Biofilm dispersion. *Nature Reviews Microbiology*, 18(10), 571–586. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0385-0>

Schroeder, U., Henrich, B., Fink, J., & Plapp, R. (1994). Peptidase D of *Escherichia coli* K-12, a metallopeptidase of low substrate specificity. *FEMS Microbiology Letters*, 123(1–2), 153–159. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb07215.x>

Schürmann, M., Ooppel, F., Gottschalk, M., Büker, B., Jantos, C. A., Knabbe, C., Hütten, A., Kaltschmidt, B., Kaltschmidt, C., & Sudhoff, H. (2019a). The Therapeutic Effect of 1,8-Cineol on Pathogenic Bacteria Species Present in Chronic Rhinosinusitis. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02325>

Sen, T., & Samanta, S. K. (2014). Medicinal Plants, Human Health and Biodiversity: A Broad Review (pp. 59–110). https://doi.org/10.1007/10_2014_273

Serra, D. O., & Hengge, R. (2021). Bacterial Multicellularity: The Biology of *Escherichia coli* Building Large-Scale Biofilm Communities. *Annual Review of Microbiology*, 75(1), 269–290. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-031921-055801>

Shadkam, S., Goli, H. R., Mirzaei, B., Gholami, M., & Ahanjan, M. (2021). Correlation between antimicrobial resistance and biofilm formation capability among *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from hospitalized patients in Iran. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 20(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s12941-021-00418-x>

Sharma, G., Sharma, S., Sharma, P., Chandola, D., Dang, S., Gupta, S., & Gabrani, R. (2016). *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *Journal of Applied Microbiology*, 121(2), 309–319. <https://doi.org/10.1111/jam.13078>

Sharma, S., Mohler, J., Mahajan, S. D., Schwartz, S. A., Bruggemann, L., & Aalinkeel, R. (2023). Microbial Biofilm: A Review on Formation, Infection, Antibiotic

Resistance, Control Measures, and Innovative Treatment. *Microorganisms*, 11(6), 1614. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061614>

Shree, P., Singh, C. K., Sodhi, K. K., Surya, J. N., & Singh, D. K. (2023). Biofilms: Understanding the structure and contribution towards bacterial resistance in antibiotics. *Medicine in Microecology*, 16, 100084. <https://doi.org/10.1016/j.medmic.2023.100084>

Shrestha, R., Khanal, S., Poudel, P., Khadayat, K., Ghaju, S., Bhandari, A., Lekhak, S., Pant, N. D., Sharma, M., & Marasini, B. P. (2019). Extended spectrum β -lactamase producing uropathogenic *Escherichia coli* and the correlation of biofilm with antibiotics resistance in Nepal. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 18(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s12941-019-0340-y>

Silva, E., Teixeira, J. A., Pereira, M. O., Rocha, C. M. R., & Sousa, A. M. (2023). Evolving biofilm inhibition and eradication in clinical settings through plant-based antibiofilm agents. *Phytomedicine*, 119, 154973. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2023.154973>

Simpson, K., Fuentes, P., Quiroz-Iturra, L. F., Flores-Ortiz, C., Contreras, R., Handford, M., & Stange, C. (2018). Unraveling the induction of phytoene synthase 2 expression by salt stress and abscisic acid in *Daucus carota*. *Journal of Experimental Botany*, 69(16), 4113–4126. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery207>

Şimşek, M., & Duman, R. (2017). Investigation of Effect of 1,8-cineole on Antimicrobial Activity of Chlorhexidine Gluconate. *Pharmacognosy Research*, 9(3), 234–237. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.210329>

Singh, A. K., Yadav, S., Chauhan, B. S., Nandy, N., Singh, R., Neogi, K., Roy, J. K., Srikrishna, S., Singh, R. K., & Prakash, P. (2019). Classification of Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* Based on Their in vitro Biofilm Forming Capabilities and Elucidation of the Biofilm Matrix Chemistry With Special Reference to the Protein Content. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00669>

Snarr, B. D., Howell, P. L., & Sheppard, D. C. (2018). Hoisted by their own petard: do microbial enzymes hold the solution to treating and preventing biofilm infections? *Future Microbiology*, 13(4), 395–398.

<https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0243>

Soković, M., Glamočlija, J., Marin, P. D., Brkić, D., & Griensven, L. J. L. D. van. (2010). Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly Consumed Medicinal Herbs Using an In Vitro Model. *Molecules*, 15(11), 7532–7546.

<https://doi.org/10.3390/molecules15117532>

Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outterson, K., Patel, J., Cavaleri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., ... Zorzet, A. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis.

The Lancet Infectious Diseases, 18(3), 318–327.

[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)

Teoh, E. S. (2016). Secondary Metabolites of Plants. In *Medicinal Orchids of Asia* (pp. 59–73). Springer International Publishing.

https://doi.org/10.1007/978-3-319-24274-3_5

Trentin, D. S., Silva, D. B., Frasson, A. P., Rzhepishevskaya, O., da Silva, M. V., de L. Pulcini, E., James, G., Soares, G. V., Tasca, T., Ramstedt, M., Giordani, R. B., Lopes, N. P., & Macedo, A. J. (2015). Natural Green Coating Inhibits Adhesion of Clinically Important Bacteria. *Scientific Reports*, 5(1), 8287.

<https://doi.org/10.1038/srep08287>

van Duin, D., & Paterson, D. L. (2016). Multidrug-Resistant Bacteria in the Community. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(2), 377–390.

<https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.004>

Vani, S., Vadakkan, K., & Mani, B. (2023). A narrative review on bacterial biofilm: its formation, clinical aspects and inhibition strategies. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s43094-023-00499-9>

Vázquez, N. M., Fiorilli, G., Cáceres Guido, P. A., & Moreno, S. (2016). Carnosic acid acts synergistically with gentamicin in killing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Phytomedicine*, 23(12), 1337–1343. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.07.010>

Vazquez, N. M., Mariani, F., Torres, P. S., Moreno, S., & Galván, E. M. (2020). Cell death and biomass reduction in biofilms of multidrug resistant extended spectrum β -lactamase-producing uropathogenic *Escherichia coli* isolates by 1,8-cineole. *PLOS ONE*, 15(11), e0241978. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241978>

Vazquez, N. M., Moreno, S., & Galván, E. M. (2022). Exposure of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* biofilms to 1,8-cineole leads to bacterial cell death and biomass disruption. *Biofilm*, 4, 100085. <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2022.100085>

Veerachamy, S., Yarlagadda, T., Manivasagam, G., & Yarlagadda, P. K. (2014). Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: A review. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, 228(10), 1083–1099. <https://doi.org/10.1177/0954411914556137>

Vijayakumar, K., Manigandan, V., Jeyapragash, D., Bharathidasan, V., Anandharaj, B., & Sathya, M. (2020). Eucalyptol inhibits biofilm formation of *Streptococcus pyogenes* and its mediated virulence factors. *Journal of Medical Microbiology*, 69(11), 1308–1318. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001253>

Vorregaard, M. (2008). Comstat2 - a modern 3D image analysis environment for biofilms. In: *Informatics and mathematical modelling*. Technical University of Denmark, Kongens Lyngby, Denmark.

Vuotto, C., Longo, F., Balice, M., Donelli, G., & Varaldo, P. (2014). Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Pathogens*, 3(3), 743–758. <https://doi.org/10.3390/pathogens3030743>

Wang, G., Zhao, G., Chao, X., Xie, L., & Wang, H. (2020). The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(17), 6278. <https://doi.org/10.3390/ijerph17176278>

Wang, W., Li, N., Luo, M., Zu, Y., & Efferth, T. (2012). Antibacterial Activity and Anticancer Activity of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil Compared to That of Its Main Components. *Molecules*, 17(3), 2704–2713. <https://doi.org/10.3390/molecules17032704>

Wang, W., Huang, X., Yang, H., Niu, X., Li, D., Yang, C., Li, L., Zou, L., Qiu, Z., Wu, S., & Li, Y. (2019). Antibacterial Activity and Anti-Quorum Sensing Mediated Phenotype in Response to Essential Oil from *Melaleuca bracteata* Leaves. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5696. <https://doi.org/10.3390/ijms20225696>

Wang, Y., Zhang, Y., Song, X., Fang, C., Xing, R., Liu, L., Zhao, X., Zou, Y., Li, L., Jia, R., Ye, G., Shi, F., Zhou, X., Zhang, Y., Wan, H., Wei, Q., & Yin, Z. (2022). 1,8-Cineole inhibits biofilm formation and bacterial pathogenicity by suppressing luxS gene expression in *Escherichia coli*. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.988245>

Whelan, S., Lucey, B., & Finn, K. (2023). Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC)-Associated Urinary Tract Infections: The Molecular Basis for Challenges to Effective Treatment. *Microorganisms*, 11(9), 2169. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092169>

Wingender, J., & Flemming, H.-C. (2011). Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214(6), 417–423. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.05.009>

Wood, T. K., Knabel, S. J., & Kwan, B. W. (2013). Bacterial Persister Cell Formation and Dormancy. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(23), 7116–7121. <https://doi.org/10.1128/AEM.02636-13>

Xu, J., Hu, Z.-Q., Wang, C., Yin, Z.-Q., Wei, Q., Zhou, L.-J., Li, L., Du, Y.-H., Jia, R.-Y., Li, M., Fan, Q.-J., Liang, X.-X., He, C.-L., & Yin, L.-Z. (2014). Acute and subacute toxicity study of 1,8-cineole in mice. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(4), 1495–1501.

Yang, X., Chen, H., Zheng, Y., Qu, S., Wang, H., & Yi, F. (2022). Disease burden and long-term trends of urinary tract infections: A worldwide report. *Frontiers in Public Health*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.888205>

Zheng, X., Zhang, Y., Li, Q., Liu, Y., Wang, X., Yang, B., Zhu, G., Zhou, C., Gao, Y., & Liu, Z. (2019). Effects of 1,8-cineole on neuropathic pain mediated by P2X2 receptor in the spinal cord dorsal horn. *Scientific Reports*, 9(1), 7909. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44282-4>

9. ANEXO

Tablas Anexo. Matrices de identidad porcentual obtenidas por alineamiento de secuencias a través de Clustal Omega.

BcsZ

	Ec K12 (P37651)	Ec ATCC 25922 (QJP25960.1)	Ec UTI89 (QOI18934.1)	Ec CFT073 (UJM00995.1)	Ec PF5 (QKY54014.1)
Ec K12	100	98,91	98,91	98,91	98,91
Ec ATCC 25922	100	100	100	100	100
Ec UTI89	100	100	100	100	100
Ec CFT073	100	100	100	100	100
Ec PF5	100	100	100	100	100

PgaB

	Ec K12 (P75906)	Ec ATCC 25922 (OOC72849.1)	Ec UTI89 (QOI20824.1)	Ec CFT073 (UJM03639.1)	Ec PF5 (QKY56817.1)
Ec K12	100	98,07	97,92	98,07	98,07
Ec ATCC 25922	98,07	100	99,85	100	100
Ec UTI89	97,92	99,85	100	99,85	99,85
Ec CFT073	98,07	100	99,85	100	100
Ec PF5	98,07	100	99,85	100	100

Dcp

	Ec K12 (P24171)	Ec ATCC 25922 (WCT49607.1)	Ec UTI89 (QOI21396.1)	Ec CFT073 (UJM02999.1)	Ec PF5 (QKY56209.1)
Ec K12	100	97,80	97,80	97,80	97,80
Ec ATCC 25922	97,80	100	98,83	100	100
Ec UTI89	97,80	98,83	100	98,83	98,83
Ec CFT073	97,80	100	98,83	100	100
Ec PF5	97,80	100	98,83	100	100

PepD

	Ec K12 (P15288)	Ec ATCC 25922 (WCT46421.1)	Ec UTI89 (QOI20133.1)	Ec CFT073 (UJM04300.1)	Ec PF5 (QKY57498.1)
Ec K12	100	98,97	99,38	98,97	98,97
Ec ATCC 25922	98,97	100	99,59	100	100
Ec UTI89	99,38	99,59	100	99,59	99,59
Ec CFT073	98,97	100	99,59	100	100
Ec PF5	98,97	100	99,59	100	100

SohB

	Ec K12 (POAG14)	Ec ATCC 25922 (QJP28156.1)	Ec UTI89 (QOI21197.1)	Ec CFT073 (UJM03189.1)	Ec PF5 (QKY56396.1)
Ec K12	100	99,43	99,43	99,43	99,43
Ec ATCC 25922	99,43	100	99,43	100	100
Ec UTI89	99,43	99,43	100	99,43	99,43
Ec CFT073	99,43	100	99,43	100	100
Ec PF5	99,43	100	99,43	100	100

DegP

	Ec K12 (POC0V0)	Ec ATCC 25922 (QSZ64730.1)	Ec UTI89 (QOI20046.1)	Ec CFT073 (UJM04429.1)	Ec PF5 (QKY55036.1)
Ec K12	100	99,37	99,37	99,37	99,37
Ec ATCC 25922	99,37	100	100	100	100
Ec UTI89	99,37	100	100	100	100
Ec CFT073	99,37	100	100	100	100
Ec PF5	99,37	100	100	100	100

BepA

	Ec K12 (P66948)	Ec ATCC 25922 (WCT48652.1)	Ec UTI89 (QOI17860.1)	Ec CFT073 (UJM02108.1)	Ec PF5 (QKY55312.1)
Ec K12	100	99,18	98,97	99,18	99,18
Ec ATCC 25922	99,18	100	99,79	100	100
Ec UTI89	98,97	99,79	100	99,79	99,79
Ec CFT073	99,18	100	99,79	100	100
Ec PF5	99,18	100	99,79	100	100

Buenos Aires, 11 de Abril de 2024

Estimada Comisión Doctoral,

Nos dirigimos a ustedes para informar que el manuscrito presentado es el que corresponde a la última versión de la tesis y que incluye las correcciones sugeridas por los jurados.

Los saludamos atentamente,

Auto



Dr. Nicolás Vázquez

Directora



Dra. Estela Galván

Co-Directora



Dra. SILVIA MORENO

Dra. Silvia Moreno