

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



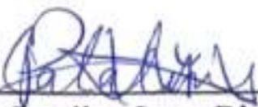
“ACTIVIDAD BACTERICIDA DE *POLIOMINTHA LONGIFLORA GRAY*  
(OREGANO MEXICANO) SOBRE *ACINETOBACTER BAUMANNII*”

POR ANDREA MARCELA CANTU HERNANDEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN  
MANEJO Y APROVECHAMIENTO INTEGRAL DE RECURSOS  
BIÓTICOS

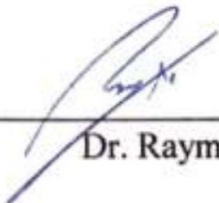
2025

“ACTIVIDAD BACTERICIDA DE *POLIOMINTHA LONGIFLORA* GRAY  
(OREGANO MEXICANO) SOBRE *ACINETOBACTER BAUMANNII*”



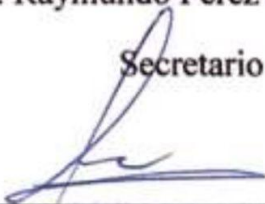
Dra. Catalina Leos Rivas

Presidente



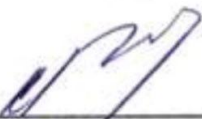
Dr. Raymundo Pérez Hernández

Secretario



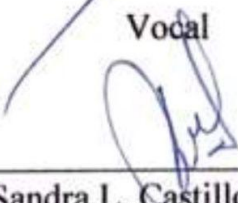
Dr. Sergio A. Galindo Rodríguez

Vocal



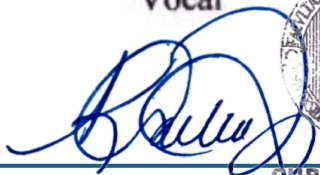
Dra. Catalina Rivas Morales

Vocal



Dra. Sandra L. Castillo Hernández

Vocal



SUBDIRECCIÓN  
DE POSGRADO

Dra. Katiushka Arévalo Niño

Subdirección de posgrado

“ACTIVIDAD BACTERICIDA DE POLIOMINTHA LONGIFLORA GRAY  
(OREGANO MEXICANO) SOBRE ACINETOBACTER BAUMANNII”

**DIRECCIÓN DE TESIS**



---

Dra. Catalina Leos Rivas

**Directora Interna**



---

Dr. José Rodríguez Rodríguez

**Director Externo**

## **AVISO DERECHOS DE AUTOR**

DERECHOS RESERVADOS© PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León por su nivel académico y apoyo a la investigación científica que me han permitido tener esta experiencia académica y de crecimiento profesional.

A la Facultad de Ciencias Biológicas y Posgrado por su apoyo en los recursos para que este proyecto pudiera ser llevado a cabo, por la formación recibida y la calidad de sus docentes brindando siempre apoyo académico y moral, clave en estos años de proceso.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONAHCyT por el apoyo otorgada con número de becario 1322020

## AGRADECIMIENTOS

A las Dras. Catalina Leos Rivas y Catalina Rivas Morales, por recibirme como parte de su equipo de trabajo, por el apoyo recibido tanto profesionalmente como de manera personal, siempre agradecida por la oportunidad de vivir esta enriquecedora experiencia.

A todo el personal que hacen funcionar el área de Posgrado, por siempre tener la disposición de apoyarnos y agilizar nuestros tramites.

A mi tutora Dra. Sandra Castillo por el apoyo recibido durante este proceso, siempre disponible para compartir su conocimiento y resolver mis dudas.

A mi comité de tesis por su apoyo en revisiones y comentarios que fueron enriqueciendo mi formación personal, así como mi proyecto y a los docentes que siempre estuvieron dispuestos a darme una mano, Dr. David Gilberto García Hernández y Dr. Eduardo Sánchez muchas gracias por todo su apoyo.

A mi familia dentro del laboratorio de química analítica, el cual se convirtió en mi segunda casa en este proceso, por sus palabras de aliento, compartir su conocimiento, su apoyo en los momentos difíciles, pero sobre todo gracias por su amistad Fer, Sebas, Ana, Santi, Ale, Prin, Cesar, Ana, Max, Isra, Alo, Sara y a todos los que se fueron integrando.

Sebas, por poner confianza en mi cuando no la tenía y por tu apoyo siempre, sigue compartiendo el conocimiento.

A mis compañeros de generación Nancy, Regina, Lumi, Erick y Fer, por el compañerismo y apoyo vivido.

A mis amigos que se han convertido en familia, Brenda, Sara, Fer Hdz, Roberto, Analú, Samy, Alma, Gustavo, por vivir conmigo este proceso y celebrar mis triunfos como suyos.

A mi hermana de la vida, Andy, por siempre estar ahí de la manera más incondicional y por ser inspiración para este proceso.

A mis tías del corazón Adi, Esthela, Gaby, Rosy, gracias por ser mi familia y soporte en este y todos mis procesos, son un abrazo al alma.

A mi familia, mamá, papá, Pau, José, por su fe en mí y apoyarme en cada meta que me propongo. Gracias por siempre estar ahí y amarme incondicionalmente. Son mi todo.

A mi ahora esposo, Diego, por vivir esto conmigo desde la preparación al examen de ingreso y acompañarme paso a paso desde licenciatura hasta ahora.

## **DEDICATORIAS**

A Dios, por darme vida para llevar a cabo este y todos mis planes.

A mi familia, son la base para que todo esto sea posible y la raíz de cada uno de mis logros.

A Diego nadie conoció mis crisis como tú, eres mi roca, esto también es tuyo.

A mi amada Tita Gilita hasta el cielo, siempre está presente, lo logramos.

A la vida, por todo lo que me ha regalado.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	1
ABSTRACT.....	2
2. INTRODUCCIÓN .....	3
3. ANTECEDENTES .....	5
3.1 La multirresistencia microbiana (MRM): un desafío creciente para la salud pública .....	5
3.2 <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	7
3.3 Formación de biofilms por <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	10
3.4 Metabolitos secundarios y aceites esenciales.....	11
3.5 El orégano .....	12
3.6 Descripción botánica.....	13
3.6 Potencial antimicrobiano y actividad del aceite esencial de orégano .....	14
3.7 Caracterización del aceite esencial de <i>Poliomintha longiflora gray</i> .....	15
4. JUSTIFICACIÓN .....	19
5. HIPÓTESIS .....	20
6. OBJETIVOS DEL TRABAJO .....	21
6.1 Objetivo general .....	21
6.2 Objetivos particulares .....	21
7. MATERIAL Y MÉTODOS .....	22
7.1 Cepa de bacteria y condiciones de crecimiento .....	22
7.2 Aceite esencial de <i>P. longiflora</i> y sus fracciones (1-IV).....	22
7.3 Prueba de sensibilidad a los antibióticos.....	22
7.4 Actividad antimicrobiana preliminar .....	22
7.5 Concentración mínima bactericida (CMB) .....	23

7.6 Inhibición en la formación de Biofilm.....	24
7.7 Determinación de toxicidad de <i>Poliminta longiflora gray</i> mediante ensayo de hemolisis .....	24
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	27
8.1 Resultados para prueba de sensibilidad a los antibióticos .....	27
8.2 Resultados actividad antimicrobiana preliminar .....	27
8.3 Resultados Concentración mínima bactericida (CMB) .....	28
8.4 Resultados inhibición en la formación de Biofilm.....	31
8.5 Resultados determinación de toxicidad de <i>Poliminta longiflora gray</i> mediante ensayo de hemolisis.....	35
9. CONCLUSIONES.....	38
10. PERSPECTIVAS .....	39
11. BIBLIOGRAFÍA .....	40

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
<b>No</b>	<b>Título</b>	<b>No</b>
1	Clasificación taxonómica de <i>A. baumannii</i>	20
2	Composición química de algunos aceites esenciales con base en los grupos funcionales mayoritarios (Duran, et al 2014)	24
3	Caracterización de diferentes especies de orégano (%):); Fracciones 3 y 4 de <i>P. longiflora</i> (Rostro- Alanís M., et al., 2019); <i>L. graveolens</i> (Medina- Romero et al., 2021); <i>O. onites</i> (Dogruyol H. et al., 2020)	28
4	Lista de compuestos presentes en el aceite esencial de <i>P. longiflora</i> , sus fracciones	30
5	Tratamientos dados al PG para el ensayo de hemolisis	38
6	Blancos dados al PG para el ensayo de hemolisis.	39
7	Composición de aceites esenciales obtenidos de diferentes especies de orégano	43
8	Inhibición de la formación de biopelículas (%) por efecto de las concentraciones de la CMB del AEO, F III y F IV.	45
9	Porcentaje de hemolisis según su concentración (ppm)	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
<b>No</b>	<b>Título</b>	<b>No</b>
1	<i>Acinetobacter Baumannii</i> . (Science Source, 2013)	20
2	Biofilms de <i>A. baumannii</i>	23
3	<i>Poliomintha longiflora</i> gray	26
4	Antibiograma sobre <i>A. baumannii</i>	40
5	Actividad antimicrobiana preliminar FI, FII y T80.	41
6	Actividad antimicrobiana preliminar AEO, FIII y FIV	41
7	CMB para aceite esencial de orégano sobre <i>A. baumannii</i>	42
8	CMB para fracción III sobre <i>A. baumannii</i>	42
9	CMB para fracción IV sobre <i>A. baumannii</i>	43
10	Actividad inhibitoria en la formación de biofilm de <i>P. longiflora</i>	45
11	Inhibición de la formación de biopelículas por efecto de las concentraciones sub-letales de las CMB's del AEO, FIII y FIV	46
12	Resultado obtenido ensayo de toxicidad mediante hemolisis FIV de <i>P. longiflora</i>	49

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados.
μL	Microlitros.
AE	Aceite Esencial.
AEO	Aceite Esencial de Orégano.



## RESUMEN

Este estudio evaluó la actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano (AEO) y sus fracciones (I-IV) contra *Acinetobacter baumannii*, una bacteria multifarmacorresistente asociada a altas tasas de mortalidad debido a su virulencia y capacidad de formar biofilm, lo que incrementa significativamente su resistencia a los tratamientos convencionales.

El AEO es rico en metabolitos secundarios como carvacrol y timol, compuestos con propiedades antimicrobianas bien documentadas. Mediante el fraccionamiento del AEO a diferentes temperaturas, se obtuvieron fracciones con variaciones en la concentración de estos compuestos, lo que permitió evaluar su efecto diferencial sobre *A. baumannii*. Se determinaron la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la toxicidad mediante pruebas de hemólisis, además de analizar el efecto del tratamiento con el AEO y sus fracciones en la formación de biofilm.

En este estudio se observó que la fracción IV presentó una mejor actividad bactericida e inhibición de biofilm lo que proporciona información relevante sobre el potencial terapéutico del AEO y sus componentes en la inhibición del crecimiento bacteriano y la prevención de la formación de biofilm. Esta información contribuirá al desarrollo de nuevas estrategias para combatir infecciones causadas por *A. baumannii*.

### **Palabras clave:**

Nosocomial, *Poliomintha longiflora*, biopelículas, aceites esenciales

## ABSTRACT

This study evaluated the antimicrobial activity of oregano essential oil (OEO) and its fractions against *Acinetobacter baumannii*, a multidrug-resistant bacterium associated with high mortality rates due to its virulence and ability to form biofilms, which significantly increases its resistance to conventional treatments.

OEO is rich in secondary metabolites such as carvacrol and thymol, compounds with well-documented antimicrobial properties. By fractionating OEO at different 2mpacto f2as, fractions with varying concentrations of these compounds were obtained, allowing the evaluation of their differential effects on *A. baumannii*. The 2 mpacto inhibitory concentration (MIC) and toxicity were determined through hemolysis assays, in addition to assessing the 2mpacto f OEO and its fractions on biofilm formation.

The results of this study provide relevant insights into the therapeutic potential of OEO and its components in inhibiting bacterial growth and preventing biofilm formation, contributing to the development of new strategies to combat infections caused by *A. baumannii*.

### Key words:

Nosocomial, *Poliomintha longiflora*, biofilms, esencial oils

## 2. INTRODUCCIÓN

Las infecciones bacterianas representan un problema significativo de salud pública, no solo por el impacto en la morbilidad y mortalidad de los pacientes, sino también por la carga económica que generan en los sistemas de salud. En particular, las infecciones causadas por bacterias multirresistentes constituyen una amenaza global debido a la eficacia reducida de los tratamientos antimicrobianos convencionales.

A lo largo de los años, las enfermedades infecciosas han ocasionado una de las principales causas de pérdida de salud a nivel mundial. Estudios recientes estiman que en 2017 se registraron más de 10 millones de muertes relacionadas con sepsis, lo que representa aproximadamente el 20 % de las muertes globales de ese período. Frente a esto, la Organización Mundial de la Salud ha identificado a *Acinetobacter baumannii* como un “patógeno de prioridad 1 o crítica” dentro de una lista de 12 bacterias altamente peligrosas para la salud humana. Junto con *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenémicos, *A. baumannii* ha desarrollado mecanismos de resistencia que dificultan su tratamiento, convirtiéndola en un desafío terapéutico (OMS, 2017).

Esta bacteria Gram negativa presenta una notable capacidad para adquirir y transmitir genes de resistencia, lo que la hace particularmente difícil de erradicar. Su alta prevalencia en infecciones nosocomiales la ha convertido en un problema clínico de gran relevancia, con reportes que indican su presencia en hasta el 90 % de las infecciones intrahospitalarias y en el 92 % de los casos de bacteriemia nosocomial. Además, se ha documentado resistencia a múltiples clases de antibióticos, incluyendo carbapenémicos, aminoglucósidos, quinolonas y polimixinas, lo que limita aún más las opciones terapéuticas disponibles. La elevada tasa de mortalidad asociada a infecciones por *A. baumannii* oscila entre el 23 % y el 73 %, dependiendo del tipo de infección y la resistencia del patógeno.

Dado la resistencia antimicrobiana, en los últimos años ha incrementado el interés por el uso de compuestos naturales con actividad bactericida como alternativas terapéuticas. En este contexto, las plantas medicinales han sido ampliamente utilizadas en diversas culturas para el tratamiento de enfermedades crónicas y de origen infeccioso. En México,

*Poliomintha longiflora* (orégano mexicano) ha sido empleada tradicionalmente por sus propiedades biológicas, atribuidas a la presencia de compuestos como fenoles, terpenos y terpenoides, particularmente el carvacrol y el timol, reconocidos por su acción antimicrobiana (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2016).

El aceite esencial obtenido de esta planta ha demostrado capacidad para inhibir el crecimiento de diversos microorganismos patógenos. Sin embargo, su aplicación frente a bacterias multirresistentes como *A. baumannii* aún requiere mayor exploración. En este sentido, el fraccionamiento térmico del aceite esencial puede permitir identificar aquellas fracciones con mayor efectividad antimicrobiana, reduciendo las concentraciones necesarias para eliminarlos, así como la toxicidad sobre células humanas.

En el presente estudio se evaluó la actividad bactericida de las fracciones del aceite esencial de orégano mexicano (Fracciones I - IV), obtenidas mediante fraccionamiento térmico, contra *A. baumannii*. Para ello, se llevaron a cabo diferentes ensayos microbiológicos. Los resultados obtenidos no solo permitirán comprender mejor el potencial antimicrobiano del orégano mexicano, sino que podrían aportar al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas más seguras y eficaces para combatir infecciones intrahospitalarias causadas por patógenos multirresistentes.

En este trabajo contribuye a la validación científica del conocimiento tradicional, uniendo la medicina ancestral con metodologías modernas en la búsqueda de soluciones frente a problemas emergentes en salud pública.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 La multirresistencia microbiana (MRM): un desafío creciente para la salud pública

La multirresistencia microbiana (MRM) hace referencia a la capacidad de ciertos microorganismos para resistir el efecto de diversas clases de antibióticos, lo cual complica significativamente el tratamiento de las infecciones y se ha convertido en una amenaza creciente para la salud pública a nivel mundial. Esta resistencia se desarrolla principalmente por la adquisición de genes de resistencia, ya sea a través de mutaciones espontáneas o mediante mecanismos de transferencia horizontal de genes, como los plásmidos, transposones o integrones. Dichos mecanismos les permiten a las bacterias adaptarse y sobrevivir incluso en presencia de fármacos diseñados para eliminarlas (Camacho-Silvas, 2020).

Este fenómeno puede entenderse como una estrategia de defensa evolutiva de las bacterias frente a las presiones selectivas que imponen los agentes antimicrobianos. Sin embargo, la velocidad con la que se propaga la resistencia bacteriana supera actualmente el ritmo del desarrollo de nuevos fármacos, terapias o estrategias preventivas. Esta situación ha favorecido que, en numerosos casos clínicos, las bacterias resulten “victoriosas” frente a los tratamientos disponibles, lo que se traduce en un aumento de la morbilidad, así como en un considerable incremento de los costos asociados a la atención médica.

Ante este panorama, se vuelve urgente no solo diseñar nuevas moléculas antimicrobianas, sino también proteger y conservar aquellos medicamentos que todavía conservan su efectividad. De ahí que la resistencia a los antimicrobianos se haya posicionado como uno de los principales problemas de salud pública global, requiriendo atención prioritaria por parte de todos los actores del sector salud: desde autoridades sanitarias y organismos internacionales, hasta investigadores, profesionales clínicos y la industria farmacéutica.

La resistencia bacteriana puede clasificarse en dos grandes categorías:

**Resistencia intrínseca:** Se refiere a la capacidad natural que poseen ciertas bacterias para resistir la acción de determinados antibióticos. Por ejemplo, la estructura de la membrana externa de las bacterias Gram negativas actúa como una barrera física que impide la entrada de diversos fármacos. También puede deberse a la ausencia de dianas moleculares

específicas (targets) dentro del microorganismo o a la producción de enzimas que inactivan el antibiótico antes de que este ejerza su efecto. Este tipo de resistencia forma parte del perfil biológico innato del microorganismo.

**Resistencia adquirida:** Se desarrolla a lo largo del tiempo como consecuencia de presiones selectivas impuestas por el uso desmedido de antimicrobianos. Puede surgir mediante mutaciones genéticas o por la incorporación de genes de resistencia provenientes de otras bacterias, a través de la transferencia horizontal. En muchos casos, aunque un antibiótico muestre actividad *in vitro*, no resulta eficaz *in vivo*, ya que puede no alcanzar concentraciones terapéuticas en sitios específicos del cuerpo, como el líquido cefalorraquídeo, o bien puede verse inactivado por factores ambientales como el pH, la temperatura o la presencia de otras sustancias.

En ambos casos, la resistencia representa una respuesta adaptativa del microorganismo, producto de su plasticidad genética. Esto resalta la necesidad urgente de comprender mejor estos mecanismos, así como de explorar nuevas fuentes de compuestos antimicrobianos, especialmente aquellos derivados de productos naturales con potencial terapéutico.

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) informó en 2021 que, a nivel mundial, más de 700 mil muertes cada año están relacionadas con infecciones causadas por bacterias resistentes a los antimicrobianos. Además, se estima que, de no tomarse medidas urgentes, esta cifra podría aumentar hasta alcanzar los 10 millones de decesos anuales en los próximos 25 años. Este escenario no solo representa una grave amenaza para los sistemas de salud, sino que también implica consecuencias económicas alarmantes, con proyecciones que calculan pérdidas superiores a los 100 billones de dólares para el año 2050.

En el caso particular de México, las autoridades sanitarias reportaron que, solo en el año 2021, se registraron más de tres millones de casos de infecciones asociadas a microorganismos resistentes, los cuales provocaron aproximadamente 48 mil muertes. Ese mismo año, se contabilizaron alrededor de 3.8 millones de atenciones en servicios de urgencias y más de 39.5 millones de consultas externas relacionadas con enfermedades infecciosas y parasitarias. Estos datos reflejan la magnitud del problema y subrayan la

urgente necesidad de fortalecer la capacidad de diagnóstico, prevención y uso racional de los antimicrobianos en todos los niveles del sistema de salud.

### 3.2 *Acinetobacter baumannii*

*Acinetobacter baumannii* es un bacilo Gram negativo, aeróbico estricto, polimórfico y no móvil. Se trata de un patógeno oportunista con alta incidencia en pacientes inmunocomprometidos, especialmente en aquellos que permanecen hospitalizados por periodos prolongados (generalmente más de 90 días). Esta bacteria se asocia comúnmente a ambientes húmedos y ha demostrado una sorprendente capacidad para multiplicarse tanto en la piel de los pacientes como en superficies y equipos hospitalarios, lo que facilita su diseminación dentro de los centros de salud (Howard et al., 2012 (Hao, G., Duan, J., & Yang, H. et al. 2021)).

Debido a su creciente resistencia a múltiples fármacos antimicrobianos, *A. baumannii* ha sido clasificado como un patógeno humano de “alerta roja”, lo que ha generado gran preocupación dentro de la comunidad médica y científica. La OMS lo ha incluido dentro de su lista de prioridad crítica para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos, dada su capacidad de adquirir y transmitir genes de resistencia con gran rapidez (OMS, 2017).



**Figura 1 *Acinetobacter Baumannii*. (Science Source, 2013)**

**Tabla 1. Clasificación taxonómica de *A. baumannii***

Categoría	Clasificación
-----------	---------------

<b>Phylum</b>	Proteobacteria
<b>Clase</b>	Gammaproteobacteria
<b>Orden</b>	Pseudomonadales
<b>Familia</b>	Moraxellaceae
<b>Género</b>	<i>Acinetobacter</i>

Durante la última década, *A. baumannii* ha sido reconocido como uno de los patógenos más difíciles de tratar debido a su resistencia antimicrobiana múltiple (multidrug-resistant, MDR). En particular, su presencia en unidades de cuidados intensivos (UCI) representa un serio desafío, ya que puede causar diversas infecciones nosocomiales como neumonía asociada a ventilación mecánica (VAP), bacteriemias, infecciones de heridas quirúrgicas y meningitis (Buckle et al., 2012).

Este patógeno forma parte del grupo conocido como “ESKAPE” engloba a seis de las bacterias más peligrosas y resistentes a nivel hospitalario: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp. (Howard et al., 2012). Estas bacterias no solo son responsables de un alto número de infecciones intrahospitalarias, sino que también son capaces de evadir los efectos de múltiples tratamientos antimicrobianos disponibles.

La capacidad de *A. baumannii* para sobrevivir en condiciones adversas es notable: puede persistir en superficies secas por largos periodos, como en barandales de camas hospitalarias, e incluso colonizar la piel humana. Esta resistencia ambiental, sumada a su habilidad para adquirir genes de resistencia, facilita brotes nosocomiales en diferentes entornos, desde las UCIs hasta clínicas de fisioterapia, afectando a múltiples instituciones de manera simultánea (Rodríguez et al. 2023).

Frente a este panorama, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) ha advertido sobre el incremento global de infecciones causadas por *A. baumannii*, lo cual exige una respuesta coordinada por parte de las autoridades sanitarias, investigadores y profesionales de la salud.

Como señaló la Dra. Marie-Paule Kieny, subdirectora general de la OMS para Sistemas de Salud e Innovación, es fundamental desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para frenar la propagación de estos patógenos. Si se deja exclusivamente en manos de la industria farmacéutica, es posible que los nuevos antibióticos requeridos no lleguen con la urgencia que demanda la situación actual (OMS, 2017). Afortunadamente, se ha demostrado que la implementación de medidas estrictas de control, como el aislamiento por contacto y la desinfección rigurosa del entorno, puede reducir significativamente la diseminación de este patógeno en hospitales.

Esta bacteria ha presentado resistencia intrínseca desde siempre a diversos antimicrobianos. Dentro de las diferentes cepas de *A. baumannii*, que se denominan multirresistentes, son aquellas que presentan resistentes a  $\geq 3$  clases de antibióticos. Incluso, existen cepas que presentan resistencia a todos ellos.

En los pacientes que presentan infección por *A. baumannii*, se solicitan pruebas de susceptibilidad, antes de obtener estos resultados existen algunas opciones que pueden emplearse como tratamientos iniciales, entre ellas están un carbapenem (meropenem, imipenem), colistina, o una fluoroquinolona más un aminoglucósido, rifampicina, o ambos.

Sulbactam es un antibiótico inhibidor de las beta-lactamasas, el cual presenta actividad bactericida intrínseca contra muchas de las cepas multirresistentes de *A. baumannii*.

Las infecciones que entran en el rango de leves hasta moderadas han demostrado mejorar con el uso de monoterapia. Las infecciones que son ocasionadas a causa de una herida de gravedad o traumática con alguna cepa susceptible suelen tratarse con minociclina.

En el caso de las infecciones de gravedad causadas por esta bacteria, se emplean tratamientos de terapia combinada con diferentes antibióticos, como carbapenémicos (imipenem o meropenem) o ampicilina/sulbactam más un aminoglucósido. En los casos que *A. baumannii* llega a casos de resistencia extrema a los fármacos las opciones de tratamiento suelen ser la tigeciclina, cefiderocol, o la combinación de colistina más minociclina.

Para evitar la propagación de la bacteria, los trabajadores sanitarios tienen el deber de acatar todas las medidas indicadas de precaución ante el contacto, como es el lavado correcto de manos y las precauciones de barrera, así como también cuidar la meticulosidad de los respiradores, así como la higiene de los pacientes infectados por *A. baumannii* (Munier, et al 2017).

### **3.3 Formación de biofilms por *Acinetobacter baumannii***

Uno de los mecanismos más relevantes mediante los cuales *A. baumannii* incrementa su resistencia y virulencia es a través de la formación de biofilms. Los biofilms son comunidades microbianas organizadas, que se encuentran dentro de una matriz extracelular que ellas mismas secretan, compuesta principalmente por exopolisacáridos, proteínas y ADN extracelular. Estas estructuras se desarrollan sobre superficies sólidas, tanto inertes como vivas, incluyendo tejidos humanos y diversos dispositivos médicos como catéteres, válvulas cardíacas, prótesis articulares y ventiladores mecánicos (Sánchez et al., 2016).

La capacidad de formar biofilm es considerada un importante factor de virulencia, ya que proporciona a las bacterias una notable protección frente a las respuestas del sistema inmunológico del huésped y a los tratamientos antimicrobianos convencionales. Las bacterias en estado de biofilm pueden presentar una resistencia hasta 1,000 veces mayor en comparación con sus formas planctónicas (aquellas que flotan libremente), lo que representa un obstáculo considerable para la terapia clínica y complica las estrategias de erradicación (Figura 2).

Se estima que hasta el 75 % de las infecciones bacterianas en humanos involucran biofilms, lo que evidencia su relevancia en el ámbito clínico. La elevada resistencia asociada a estas estructuras se ha atribuido a múltiples factores, entre los que destacan: la limitada penetración de antibióticos a través de la matriz extracelular, la activación de bombas de eflujo multidrogas, la disminución de la permeabilidad de la membrana externa, la expresión de sistemas de secreción tipo IV y la producción de enzimas capaces de modificar o degradar los antibióticos.

La persistencia de las infecciones asociadas a biofilms y su creciente resistencia a los tratamientos disponibles han impulsado la búsqueda de alternativas terapéuticas innovadoras. Por ello, el desarrollo de estrategias dirigidas específicamente a inhibir la formación de biofilms o a desestabilizar su estructura es actualmente una prioridad en el estudio de bacterias multirresistentes como *A. baumannii*.



**Figura 2 Biofilms de *A. baumannii***

### **3.4 Metabolitos secundarios y aceites esenciales**

Las plantas producen una amplia variedad de metabolitos para llevar a cabo sus funciones vitales. Los metabolitos primarios son aquellos responsables del crecimiento, desarrollo y supervivencia de la planta, mientras que los metabolitos secundarios están relacionados principalmente con su interacción con el entorno. Entre sus funciones destacan la defensa contra herbívoros y patógenos, la atracción de polinizadores y la comunicación con otros organismos de su ecosistema.

Dentro de los metabolitos secundarios se encuentran los aceites esenciales (AE), compuestos volátiles que confieren a las plantas sus aromas característicos y que poseen diversas propiedades biológicas. Los AE están compuestos principalmente por terpenos, que son moléculas formadas por la unión de dos o más unidades de isopreno (Paduch et al., 2007).

La extracción de los aceites esenciales puede realizarse a partir de distintas partes de la planta, como hojas, frutos, flores o corteza (Cerutti, 2004). Estos compuestos, además de

su aroma distintivo, presentan una diversidad de propiedades biológicas que varían dependiendo de la planta de origen. Se ha documentado que los AE contienen una gran variedad de metabolitos secundarios (Tabla 2), los cuales han demostrado actividades bactericidas, antifúngicas, antioxidantes, entre otras.

Actualmente, los aceites esenciales constituyen la base de prácticas como la aromaterapia y tienen un uso amplio en las industrias cosmética, alimentaria y farmacéutica (Vallejo et al., 2023).

**Tabla 2.- Composición química de algunos aceites esenciales con base en los grupos funcionales mayoritarios (Duran, et al 2014). de**

<b>Grupo funcional</b>	<b>Naturaleza química</b>
<b>Hidrocarburos</b>	Terpenos Aromáticos Sesquiterpenos
<b>Aldehídos</b>	Monoterpenicos Alifáticos Aromáticos
<b>Alcoholes</b>	Monoterpenicos Alifáticos Sesquiterpenos Aromáticos
<b>Fenoles</b>	Aromáticos

### 3.5 El orégano

El orégano es una planta perteneciente a la familia Lamiaceae, ampliamente distribuida en diversas regiones del mundo (Hao et al., 2022). Entre las especies más conocidas se encuentran *Origanum vulgare* (proveniente de Europa) (Lukas et al., 2015), así como *Lippia graveolens* y *Poliomintha longiflora*, que crecen de manera natural en México.

Los principales componentes de las distintas especies de orégano incluyen limoneno,  $\beta$ -cariofileno,  $\gamma$ -terpineno, canfeno, linalol,  $\alpha$ -pineno, carvacrol y timol (Biosci et al., 2021).

El nombre “Origanum” proviene del griego, derivado de las palabras “oros” (montaña) y “ganos” (alegría), haciendo referencia a la belleza de las regiones montañosas donde la

planta prospera. Aunque su origen se sitúa en Asia y Europa, hoy en día el orégano se cultiva en diversas partes del mundo, particularmente en climas templados.

Tradicionalmente, el orégano ha sido utilizado principalmente como condimento culinario, aunque también se le atribuyen propiedades terapéuticas, farmacológicas y herbolarias. Su uso popular incluye aplicaciones como tónico, digestivo, estomacal y antiasmático (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2016).

### 3.6 Descripción botánica

El orégano comprende múltiples variedades de plantas herbáceas perennes, que adoptan la forma de arbustos pequeños y compactos. Generalmente, alcanzan alturas de entre 45 y 60 centímetros. Todas las partes de la planta presentan en su superficie pelos glandulares, que desempeñan un papel importante en la producción y almacenamiento de aceites esenciales.

El tallo muestra una coloración rojiza, especialmente notable en la parte superior donde se ramifica, mientras que en la base tiende a deshojarse. Las hojas situadas en la parte superior son generalmente más pequeñas en comparación con las de la base. Estas hojas, dispuestas de manera opuesta, presentan glándulas ciliadas responsables de la secreción de aceites esenciales.

Las distintas especies de orégano producen flores en tonos que varían entre el rosa, el púrpura y el violeta. Los frutos que desarrollan son tetraquenos y por lo general, de tipo seco (Vera et al. 2015).



Figura 3. *Poliomintha longiflora* Gray

### 3.6 Potencial antimicrobiano y actividad del aceite esencial de orégano

Las infecciones causadas por *A. baumannii*, particularmente aquellas asociadas a la formación de biopelículas representan un desafío terapéutico considerable debido a su elevada resistencia a múltiples antibióticos convencionales. Esta problemática se agrava por la notable capacidad de *A. baumannii* para formar biopelículas, las cuales son estructuras que actúan como barreras físicas y químicas que protegen a las bacterias de los agentes antimicrobianos, dificultando aún más su eliminación. Ante la creciente ineffectividad de las estrategias terapéuticas tradicionales, el interés en compuestos naturales con potencial antimicrobiano ha aumentado significativamente en la última década.

Entre las alternativas naturales, destaca el aceite esencial de orégano (AEO), reconocido por su composición rica en metabolitos secundarios, especialmente terpenos como carvacrol, timol, *p*-cimeno,  $\gamma$ -terpineno, terpinen-4-ol y linalol. Dentro de estos, el carvacrol y el timol son particularmente relevantes debido a su potente actividad antimicrobiana, la cual se ha atribuido a la presencia de grupos hidroxilo que les permiten interactuar de manera efectiva con las membranas celulares bacterianas, provocando alteraciones estructurales, desestabilización de la bicapa lipídica y, finalmente, la muerte celular.

Estudios previos han evidenciado que los terpenos presentes en los aceites esenciales de orégano no son solo capaces de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas, sino también de afectar directamente la formación de biopelículas. Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., & Chinou, I. B. (2001) han documentado la actividad antimicrobiana de aceites esenciales derivados de diferentes especies de orégano, atribuyendo esta eficacia al contenido de carvacrol y timol.

Además, investigaciones recientes en especies como *Poliomintha longiflora* han reforzado esta evidencia. Rostro-Alanís et al. (2019) demostraron que fracciones obtenidas de *P. longiflora* exhiben actividad antimicrobiana significativa contra bacterias como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi* y el hongo *Candida albicans*. Esta actividad ha sido

vinculada al carácter hidrofóbico de los monoterpenos fenólicos, que les permite penetrar las membranas celulares microbianas, alterando su permeabilidad y funcionalidad.

En el caso de *A. baumannii*, los terpenos del AEO representan una opción terapéutica de particular interés, no solo por su efecto bactericida directo, sino también por su capacidad para inhibir la formación de biofilm. Tapia (2023) reportó que el carvacrol reduce significativamente la formación de biopelículas en *Pseudomonas aeruginosa*, un patógeno que comparte mecanismos de resistencia similares a los de *A. baumannii*. Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que el AEO no solo inhibe el crecimiento bacteriano, sino también afecta las primeras fases de formación de biopelículas. Esta doble acción es de particular interés, ya que la mayoría de los tratamientos actuales fracasan al atacar bacterias ya protegidas por biofilms maduros.

Por tanto, el aceite esencial de orégano y sus fracciones representan una estrategia prometedora en el desarrollo de tratamientos naturales alternativos contra bacterias multirresistentes. El aprovechamiento de su perfil fitoquímico, y de sus compuestos fenólicos, brinda nuevas posibilidades para combatir infecciones complicadas y mortales, donde los tratamientos convencionales han demostrado ser limitados.

### **3.7 Caracterización del aceite esencial de *Poliomintha longiflora* gray**

La composición química del aceite esencial de orégano está influenciada por diversos factores, los cuales impactan directamente en la concentración y el perfil de los metabolitos de interés. Entre estos factores destacan la especie de orégano empleada, el método de extracción, la zona de cultivo, la altitud, así como condiciones ambientales específicas como la temperatura, la humedad y la composición del suelo (Hao et al., 2022).

A pesar de esta variabilidad, existen compuestos que son característicos del orégano, independientemente de la especie a la que pertenezca. Entre estos destacan los monoterpenos fenólicos, en particular el carvacrol y el timol, junto con otros terpenos como el *p*-cimeno,  $\gamma$ -terpineno y linalol (Ortega-Nieblas et al., 2011). De acuerdo con múltiples estudios, los monoterpenos fenólicos constituyen el grupo de compuestos con mayor concentración en los aceites esenciales de especies como *Lippia graveolens* (Ortega-Nieblas et al., 2011) y *Poliomintha longiflora* (Rostro-Alanís et al., 2019).

El carvacrol y el timol han sido ampliamente reconocidos por su potente actividad antimicrobiana, efectiva tanto contra bacterias Gram positivas como Gram negativas. Estos compuestos alteran la permeabilidad de la membrana celular bacteriana y afectan procesos críticos como la síntesis de ADN y proteínas, contribuyendo a la muerte celular. En la Tabla 3 se presentan datos comparativos sobre la composición de aceites esenciales de distintas especies de orégano mexicano, donde se evidencian las variaciones en los principales compuestos de interés.

**Tabla 3. Caracterización de diferentes especies de orégano (%)**

<b>Compuesto (%)</b>	<b><i>P. longiflora</i></b>	<b><i>L. graveolens</i></b>	<b><i>O. onites</i></b>
<b>Carvacrol</b>	4.58/60.03	25.19	41.09
<b>Timol</b>	0.0/5.08	11.27	0.41
<b>Linanol</b>	N.D.	0.97	3.93
<b>o-cimeno</b>	38.14/1.31	0.28	N.D.
<b>p-cimeno</b>	N.D.	13.78	1.03
<b><math>\alpha</math>- Terpineno</b>	N.D.	11.95	0.17
<b><math>\beta</math>-pineno</b>	N.D.	3.37	N.D.
<b><math>\beta</math>-mirceno</b>	1.08/0.0	N.D.	0.22

. Caracterización *P. longiflora* (Rostro-Alanís M., et al., 2019); *L. graveolens* (Medina-Romero et al., 2023); *O. onites* (Dogruyol H. et al., 2020).

Estos resultados demuestran que la especie, así como el procesamiento posterior de los aceites, juega un papel crucial en la concentración de compuestos activos. Particularmente en *P. longiflora*, el proceso de fraccionamiento térmico permitió obtener una fracción (FIV) altamente enriquecida en carvacrol.

Adicionalmente, en un estudio reciente, Pimentel (2024) realizó la caracterización detallada del aceite esencial de *Poliomintha longiflora* y sus fracciones (FI a FIV), sus resultados se presentan en la Tabla 4.

**Tabla 4. Lista de compuestos presentes en el aceite esencial de *P. longiflora*, sus fracciones**

COMPOSICIÓN (%)	FI	FII	FIII	FIV	AEO
<b>o-Cimeno</b>	41.95	41.88	24.34	ND	21.51
<b>a-Mirceno</b>	7.52	6.48	1.95	ND	2.27
<b>a-Felandreno</b>	1.40	ND	ND	ND	ND
<b>Terpinoleno</b>	5.52	5.32	2.35	ND	ND
<b>D-Limoneno</b>	1.66	1.60	0.80	ND	ND
<b>Eucaliptol</b>	2.74	3.84	6.54	1.13	4.57
<b>ç-Terpineno</b>	26.77	27.32	19.35	ND	12.75
<b>Terpinen-4-ol</b>	ND	ND	1.28	1.55	ND
<b>Timol</b>	1.59	1.92	9.86	21.17	13.53
<b>Carvacrol</b>	3.48	4.36	22.37	60.23	34.09
<b>Thymyl methyl ether</b>	ND	ND	1.48	0.69	ND
<b>Caryophylleno</b>	ND	ND	4.74	8.33	6.31
<b>Humuleno</b>	ND	ND	1.78	4.70	2.90
Monoterpenos Hidrocarbonados (MH)	79.1	75.68	45.64	0.000	38.60
Monoterpenos Oxigenados (MO)	7.801	10.12	41.53	84.77	52.19
Sesquiterpenos Hidrocarbonados (SeH)	13.03	8.23	9.67	13.03	9.21
Total de compuestos identificados	99.92	94.03	96.85	97.79	97.79

Fracciones I, II, III y IV: FI-IV, Aceite esencial de orégano: AEO (Pimentel, 2024),

A partir de estos datos, es evidente que el aceite esencial de *Poliomintha longiflora* contiene una alta proporción de terpenos, compuestos directamente relacionados con las

propiedades antimicrobianas observadas. Particularmente, la fracción FIV mostró una concentración sobresaliente de carvacrol (60.23%) y de timol (21.17%), en contraste con el aceite esencial sin fraccionar, que presentó concentraciones de 34.09% y 13.53%, respectivamente.

Estos resultados refuerzan la hipótesis de que la actividad antimicrobiana observada, especialmente contra bacterias resistentes como *Acinetobacter baumannii*, se encuentra estrechamente relacionada con la elevada concentración de monoterpenos fenólicos en las fracciones enriquecidas, posicionando al fraccionamiento térmico como una estrategia efectiva para potenciar el perfil bioactivo de los aceites esenciales.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

La resistencia antimicrobiana es uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, siendo *Acinetobacter baumannii* un patógeno crítico por su alta capacidad de multirresistencia. Debido a la urgencia de encontrar nuevas alternativas terapéuticas, los aceites esenciales, como el de *Poliomintha longiflora* (orégano mexicano), se han destacado por su actividad antimicrobiana y de inhibición de biopelículas. Por ello, este estudio tiene como objetivo evaluar la actividad del orégano mexicano y de diferentes fracciones de su aceite esencial contra *A. baumannii*, buscando contribuir al desarrollo de nuevas estrategias para el control de infecciones por bacterias multirresistentes.

## **5. HIPÓTESIS**

El aceite esencial de orégano mexicano (*P. longiflora*) y sus fracciones (I-IV) presenta un efecto antimicrobiano e inhibición del biofilm de *Acinetobacter baumannii*.

## 6. OBJETIVOS DEL TRABAJO

### 6.1 Objetivo general

Determinar la actividad bactericida e inhibición del biofilm de las fracciones (I -IV) del aceite esencial del *Poliomintha longiflora* (orégano mexicano) sobre *Acinetobacter baumannii*.

### 6.2 Objetivos particulares

1. Evaluar la actividad antimicrobiana de las diferentes fracciones del aceite esencial de *P. longiflora* frente a *A. baumannii*.
2. Determinar la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de las fracciones del aceite esencial de *P. longiflora*.
3. Evaluar la fracción de mayor bioactividad de *P. longiflora* sobre la capacidad para inhibir la formación de biofilm de *A. baumannii*.
4. Evaluar la toxicidad del aceite esencial y de la fracción de mayor bioactividad mediante el ensayo de hemólisis.

## **7. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **7.1 Cepa de bacteria y condiciones de crecimiento**

*Acinetobacter baumannii*

Incubada a 37°C por 24 h en caldo Mueller-Hinton (M-H).

### **7.2 Aceite esencial de *P. longiflora* y sus fracciones (I-IV).**

El aceite esencial de *Poliomintha longiflora* (AEO) y sus fracciones fueron proporcionados por la Escuela de Ingeniería y Ciencias del Tecnológico de Monterrey. La obtención del aceite esencial de orégano mexicano (AEO) y sus fracciones se realizó según la metodología descrita por Rostro-Alanís et al. (2019), mediante arrastre por vapor, seguido de una destilación fraccionada. A partir del AEO se obtuvieron cuatro fracciones, identificadas como FI, FII, FIII y FIV, recolectadas a temperaturas de 80 °C, 100 °C, 120 °C y 140 °C, respectivamente. Además, se obtuvo una fracción denominada "residuo", correspondiente al aceite que no fue destilado a ninguna de las temperaturas mencionadas. Para su uso experimental, tanto el aceite esencial como sus fracciones fueron solubilizados en polisorbato 80 (Tween 80) al 1 % v/v en agua destilada estéril, en una proporción 60:40 (aceite:Tween 80).

### **7.3 Prueba de sensibilidad a los antibióticos**

Se realizó una prueba de sensibilidad a antibióticos con el fin de establecer el control positivo/negativo del estudio. Para ello, se utilizó un antibiograma comercial Multibac ID, específico para bacterias Gram negativas, siguiendo las instrucciones del fabricante

### **7.4 Actividad antimicrobiana preliminar**

Se utilizó la cepa multirresistente *Acinetobacter baumannii* para realizar la técnica de difusión por disco, basada en el método descrito por Pimentel (2024), con algunas modificaciones. Se prepararon discos de papel filtro de 5 mm, los cuales fueron previamente esterilizados. Posteriormente, se impregnaron con 10 µL del aceite esencial (formulación 60:40 con Tween 80 al 1%), aplicando 5 µL por cada lado del disco, y se dejaron secar bajo condiciones estériles.

La cepa de *A. baumannii* se activó a partir del raspado de una colonia y se resuspendió en caldo Mueller-Hinton (MH). La suspensión se incubó a 37 °C durante 18 h para alcanzar la fase logarítmica. Luego, se transfirieron 100 µL a un nuevo tubo con caldo MH y se ajustó la turbidez a 0.100 de la escala de McFarland ( $\sim 1 \times 10^8$  UFC/mL), utilizando espectrofotometría a 630 nm. A continuación, se tomaron 100 µL de esta suspensión y se inocularon en placas de agar MH, distribuyéndolos uniformemente con un asa de Digrafsky estéril. Las placas se dejaron reposar por 20 min antes de colocar los discos impregnados con el aceite esencial y sus fracciones (I–IV), utilizando pinzas previamente esterilizadas por flameado. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h.

### **7.5 Concentración mínima bactericida (CMB)**

Para la determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) se emplearon placas de 96 pocillos. En la fila correspondiente (A1–H1), se realizó una dilución seriada del aceite esencial y fracción en estudio, comenzando con una concentración inicial de 400 ppm en el pocillo A1. A cada pocillo se le añadió posteriormente caldo Mueller-Hinton previamente inoculado con la cepa *A. baumannii*. Se incluyeron controles correspondientes: solvente (Tween 80), fracción sin inocular, antibiótico de referencia y control de crecimiento bacteriano, de acuerdo con el método descrito por Pimentel (2024).

Las placas se incubaron durante 18 h a 37 °C. Posteriormente, se transfirieron 10 µL de cada dilución a placas Petri con agar Mueller-Hinton, aplicando por goteo. Las placas fueron incubadas nuevamente bajo las mismas condiciones, y se evaluó la presencia o ausencia de colonias bacterianas. La CMB se definió como la última dilución en la que no

se observó crecimiento bacteriano. El ensayo se realizó por triplicado para asegurar la reproducibilidad de los resultados.

## **7.6 Inhibición en la formación de Biofilm**

El efecto de los extractos sobre la formación de biopelículas se evaluó en placas de fondo plano de poliestireno de 96 pocillos. Brevemente, 300  $\mu\text{L}$  de caldo de levadura de soja tripticasa fresco inoculado (TSY) (concentración final  $10^6$  UFC/mL) Se repartieron alícuotas de en cada pocillo de la microplaca y se cultivaron en presencia de concentraciones subletales (75, 50, 25% y 12.5% de MBC) determinadas previamente. Como controles se utilizaron los pocillos que contenían medio y los que no tenían aceite o fracción y sólo con tween 80. Las placas se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 48 h. Después de la incubación, se eliminó el sobrenadante y cada pocillo se lavó de forma cuidadosa con agua destilada estéril para lograr eliminar las células que se encontraban de manera libre; una vez lavadas las placas se secaron al aire durante 30 min y la biopelícula formada se tiñó durante 15 min a temperatura ambiente con una solución acuosa de cristal violeta al 0,1%. Posteriormente, se eliminó el exceso de colorante lavando la placa tres veces con agua destilada estéril y se llevaron al horno de secado para eliminar restos de humedad y fijar el colorante a la biopelícula. Finalmente, el tinte impregnado a las células del biofilm se solubilizó añadiendo 250  $\mu\text{L}$  de etanol al 95% en cada pocillo y después de 15 min, se midió la absorbancia con un lector de microplacas a una longitud de onda de 550 nm. La determinación de biopelícula se realizó usando la fórmula  $\text{SBF} = (\text{AB} - \text{CW})/\text{G}$ , donde SBF es la formación de biopelícula específica, AB es la DO 570 nm de las bacterias adheridas y teñidas, CW es la DO570 nm de los pocillos de control teñidos que contienen solo bacterias. -medio libre, y G es la DO 630 nm de crecimiento celular en caldo (Sánchez, 2016).

## **7.7 Determinación de toxicidad de *Poliminta longiflora gray* mediante ensayo de hemólisis**

Se determinó la toxicidad mediante al ensayo de hemólisis probando la FIV que resultó el tratamiento con mejor bioactividad en los ensayos previos.

Para la preparación del paquete globular (PG), se recolectó una muestra de sangre mediante venopunción, siguiendo la NOM-253-SSA1-2012 (Secretaría de Salud, 2012), se depositó en tubos con anticoagulante (EDTA) para prevenir la coagulación. La muestra fue sometida a centrifugación a 5,000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se eliminó cuidadosamente el sobrenadante (plasma) y el sedimento eritrocitario fue resuspendido en solución buffer fosfato salino (PBS) a pH 7.4 hasta alcanzar el volumen original, seguido de una homogenización suave. Este procedimiento se repitió en tres ocasiones consecutivas para asegurar la remoción completa del plasma y de sus componentes solubles. Al finalizar el tercer lavado, se transfirieron 5 mL del paquete globular a un matraz aforado de 100 mL, completando el volumen con PBS para obtener una suspensión final de eritrocitos al 5% (Hernández Iglesias, 2020).

**Tabla 5: Tratamientos aplicados al PG para el ensayo de hemolisis ( $V_t = 325 \mu\text{L}$ )**

Volúmenes ( $\mu\text{L}$ )	Concentración (ppm)				
	200	100	50	25	12.5
Aceite o fracción	28.2	14	7	3.5	1.75
<b>PBS</b>	196.8	211	218	221.5	223.25
<b>PG</b>	100	100	100	100	100

Como control positivo se prepararon 6 tubos cónicos que contenían agua destilada y paquete globular. Los 6 tratamientos fueron similares, con 1000  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 200  $\mu\text{L}$  de PG.

Para el blanco se colocó PBS y aceite/fracción en 6 tubos cónicos de la siguiente manera:

**Tabla 6: Blancos para el ensayo de hemolisis ( $V_t = 325 \mu\text{L}$ )**

<b>Volúmenes (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Concentración (ppm)</b>				
	<b>Extracto</b>				
	28.2	14	7	3.5	1.75
<b>PBS</b>	296.8	311	318	321.5	323.25

Cada tratamiento se incubó de manera simultánea durante 30 min a 37 °C. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 13,000 rpm durante 5 min a 4 °C en una microcentrífuga. Tras la centrifugación, se recolectaron 50  $\mu\text{L}$  del sobrenadante, los cuales se transfirieron a una placa de 96 pocillos para su posterior lectura en un lector de microplacas (ELX 800, BioTek, USA). El proceso fue realizado por triplicado.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Resultados para prueba de sensibilidad a los antibióticos

Primeramente se evaluó la actividad de la cepa de *A. baumannii*, los resultados mostraron resistencia a los antibióticos evaluados a excepción sobre amikacina , presentando sensibilidad moderada con un halo de inhibición de 13 mm a una concentración de 30 mg/mL., según el manual de usuario de los sensidiscos indica que:

**Resistente** igual o menor 14 mm

**Intermedio** entre 15-16 mm

**Sensible** igual o mayor 17 mm



**Figura 4.- Antibiograma sobre *A. baumannii***

### 8.2 Resultados actividad antimicrobiana preliminar

Los resultados mostraron actividad antibacteriana favorable para el aceite esencial de orégano (AEO), así como para las fracciones III (FIII) y IV (FIV), con halos de inhibición superiores a 20 mm. En contraste, la fracción I (FI) no mostró actividad antibacteriana, mientras que la fracción II (FII) presentó un halo reducido de 7 mm. Debido a su baja o nula actividad, FI y FII fueron descartadas del estudio, quedando AEO, FIII y FIV como

tratamientos seleccionados para las siguientes etapas. El control con Tween 80 al 1% no presentó actividad inhibitoria contra *A. baumannii*.



**Figura 5.- Actividad antimicrobiana preliminar FI, FII y T80.**



**Figura 6.- Actividad antimicrobiana preliminar AEO, FIII y FIV**

### **8.3 Resultados Concentración mínima bactericida (CMB)**

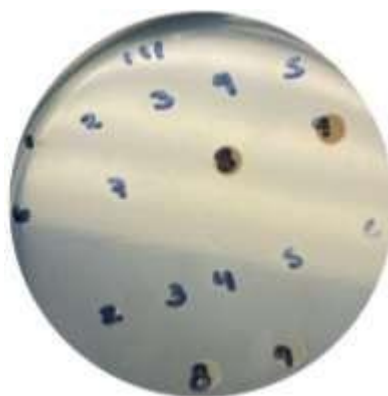
Los resultados obtenidos del AEO y las fracciones III y IV fueron analizados con el software estadístico GraphPad prism 10, se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) unifactorial paramétrico con una variable dependiente con 3 niveles (tabla 5) seleccionando un nivel de significancia del 95%. Posteriormente, se aplicó una prueba post-hoc de Tukey, lo que permitió identificar con precisión cuáles tratamientos presentaban diferencias significativas entre sí, encontrándose diferencia significativa entre uno o más tratamientos, resultando el valor de P menor a 0.05.

Los tratamientos evaluados mostraron actividad bactericida contra *A. baumannii*, siendo el orden de efectividad: FIV > AEO > FIII.

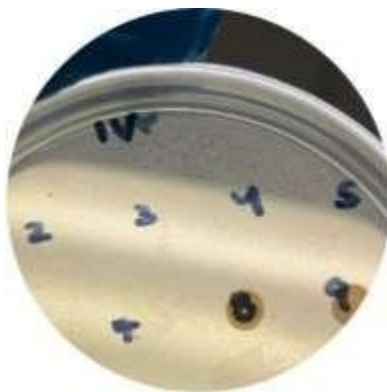
El análisis estadístico reveló diferencias altamente significativas ( $F=18.77$ ,  $p=0.0212$ ) entre los tratamientos evaluados. La fracción FIV (obtenida a 140 °C) mostró la mayor actividad bactericida, con una CMB de 0.7856 ppm, seguida por la fracción FIII (120 °C) con una CMB de 1.060 ppm, y finalmente el aceite esencial no fraccionado (AEO) con una CMB de 2.415 ppm. Estos datos sugieren que el proceso de fraccionamiento térmico no solo modifica la concentración del perfil fitoquímico del aceite esencial, sino que también incrementa su potencia antimicrobiana contra *A. baumannii*.



**Figura 7.-CMB para aceite esencial de orégano sobre *A. baumannii***



**Figura 8.- CMB para fracción III sobre *A. baumannii***



**Figura 9.- CMB para fracción IV sobre *A. baumannii***

La mayor actividad bactericida observada puede atribuirse a la concentración selectiva de metabolitos bioactivos, principalmente carvacrol y timol, durante el proceso de fraccionamiento. Como se muestra en la Tabla 3, la fracción FIV presentó los mayores porcentajes de carvacrol (60.23%) y timol (21.17%) (Pimentel, 2024), compuestos conocidos por su fuerte actividad antimicrobiana, debido a su capacidad para alterar la permeabilidad de la membrana bacteriana, desestabilizar lípidos y proteínas, e inducir la muerte celular (Burt, 2004; Ultee et al., 2002). El aceite esencial de orégano mostro un contenido significativo de timol (13.53%), carvacrol (34.09%) monoterpenos hidrocarbonados (38.6%), monoterpenos oxigenados (52.19%) que las fracciones III y IV, mas sin embargo presento menor actividad que la fracción IV. (Pimentel 2024, Cazares 2023)

**Tabla 7 Composición de aceites esenciales obtenidos de diferentes especies de orégano.**

<b>Composición de diferentes especies de orégano (%)</b>							
<b>Compuesto</b>	<i>L. graveolens</i>  AEO	<i>P. longiflora</i>					
		(Rostro-Alanis, 2019)			(Pimentel, 2024).		
		AEO	F III	F IV	AEO	F III	F IV
Carvacrol	25.19	12.60	4.58	60.03	34.09	22.37	60.23
Timol	11.27	1.71	ND	5.08	13.53	9.86	21.17

AEO: Aceite esencial *L. graveoleins* (Romero, 2021); *P. longiflora*, FIII y FIV (Rostro-Alanis, 2019), *P. longiflora*, FIII y FIV (Pimentel, 2024).

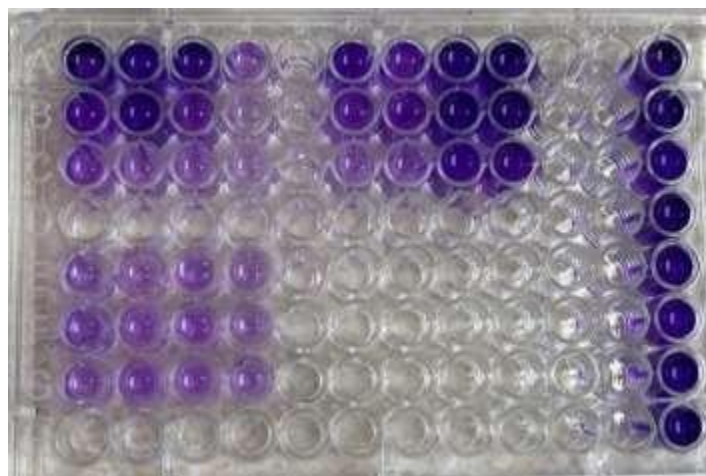
Estos resultados son consistentes con investigaciones previas donde aceites esenciales ricos en carvacrol y timol mostraron una CMB baja contra patógenos multirresistentes. Por ejemplo, Nostro et al. (2004) reportaron que aceites esenciales de *Origanum vulgare* con alta concentración de carvacrol presentaban CMBs similares o incluso inferiores a 1 mg/mL frente a cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA).

Comparativamente, los resultados del presente estudio destacan una mayor eficacia del aceite de *P. longiflora* fraccionado respecto a otros estudios con aceites esenciales no fraccionados, donde generalmente se requieren concentraciones más elevadas para lograr actividad bactericida contra *A. baumannii* (Božik et al., 2017). Esto sugiere que el fraccionamiento térmico puede ser una estrategia efectiva para concentrar los componentes y potenciar el efecto antimicrobiano de aceites esenciales.

Además, el hecho de que el AEO sin fraccionar presentó una CMB significativamente mayor (2.415 ppm) podría deberse a la presencia de otros compuestos menos activos o incluso a compuestos antagonistas que reducen la eficacia del carvacrol y timol cuando se encuentran en mezclas más complejas (Bassolé & Juliani, 2012). El fraccionamiento a 140 °C parece, entonces, no solo concentrar compuestos activos, sino también eliminar aquellos que pudieran inhibir su acción.

Finalmente, estos hallazgos respaldan la hipótesis de que la optimización de extractos naturales mediante técnicas de fraccionamiento puede ser una estrategia prometedora en la búsqueda de agentes antimicrobianos alternativos contra bacterias multirresistentes como *A. baumannii*. Sin embargo, será necesario validar estos resultados en modelos más cercanos al entorno clínico, como ensayos en cultivos celulares o modelos animales, antes de considerar aplicaciones terapéuticas.

#### **8.4 Resultados inhibición en la formación de Biofilm.**



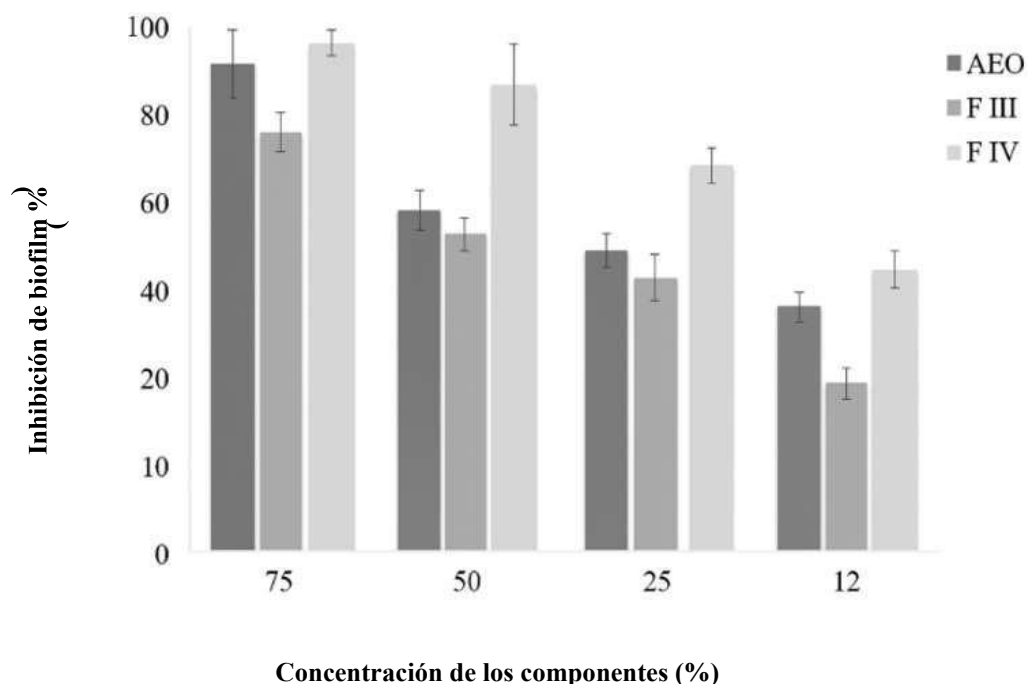
**Figura 10.- Actividad inhibitoria en la formación de biofilm de *P. longliflora***

**Tabla 8. Inhibición de la formación de biopelículas (%) por efecto de las concentraciones de los componentes de *P. longliflora* sobre la CMB**

Componente	Concentración del componente (%)			
	75%	50%	25%	12.5%
<b>AEO</b>	96.42 ± .0713	61.69 ± .044	52.79 ± .0435	43.09 ± .0415
<b>F III</b>	82.21 ± .0329	57.24 ± .067	46.62 ± .0190	27.11 ± .059
<b>F IV</b>	99.96 ± .009	90.20 ± .070	71.41 ± .026	51.74 ± .029

\*Valores más altos representan mayor porcentaje de inhibición del Biofilm

El orden de efectividad en la inhibición del biofilm es: F IV > AEO > F III.



**Figura 11 Inhibición de la formación de biopelículas por efecto de las concentraciones sub-letales de las CMB's del AEO, FIII y FIV**

Los resultados obtenidos en el presente estudio revelaron diferencias significativas en la inhibición del biofilm de *A. baumannii* entre los tratamientos evaluados ( $p < 0.01$ ). La fracción F IV (obtenida a 140°C) logró la mayor inhibición del biofilm (78.33%), seguida del aceite esencial sin fraccionar (AEO) con 63.50% y la fracción F III (120°C) con 53.30%. El análisis estadístico post-hoc confirmó que la diferencia entre F IV y F III fue estadísticamente significativa, indicando una clara ventaja de la fracción obtenida a mayor temperatura.

Estos resultados concuerdan parcialmente con los reportados por Nostro et al. (2007) 2004, quienes documentaron que aceites esenciales ricos en carvacrol y timol podían reducir la formación de biofilm de *S. aureus* hasta en un 70%, aunque señalaron que la efectividad dependía de la concentración y la composición química específica del aceite. En nuestro caso, la mayor efectividad de la fracción F IV puede explicarse por su contenido significativamente elevado de carvacrol y timol, en comparación con F III y el AEO, como reportó Pimentel (2024). Esto sugiere que, más allá de la presencia de estos

compuestos, su concentración y proporción son factores críticos en la inhibición de la formación de biofilm.

Rodríguez (2023) también reportó que carvacrol posee un efecto multifactorial sobre las bacterias formadoras de biofilm: interfiere en la integridad de la membrana, altera la síntesis de ADN y proteínas, y desestabiliza las bombas de eflujo, todas funciones esenciales para el mantenimiento del biofilm. Nuestros resultados refuerzan esta hipótesis, ya que la mayor concentración de carvacrol en F IV correlacionó directamente con el mayor porcentaje de inhibición. Además, estudios como los de Kerekes et al. (2013) han indicado que los compuestos fenólicos, al penetrar las matrices del biofilm, pueden también inducir la dispersión celular, debilitando aún más su estructura protectora.

Sin embargo, es importante destacar que la fracción F III, a pesar de contener carvacrol y timol en menor proporción, mostró una actividad anti-biofilm moderada (53.30%), inferior a la reportada por algunos aceites esenciales de otras especies, como *Origanum vulgare*, que alcanzan inhibiciones superiores al 70% a concentraciones similares (Burt, 2004). Esto podría deberse a la presencia en F III de compuestos secundarios con actividad neutra o antagonista que interfieren en la acción de los principales fenoles, una situación ya mencionada por Soković et al. (2010), quienes señalaron que los componentes minoritarios pueden modular la actividad de los aceites esenciales de manera positiva o negativa.

Por otra parte, el aceite esencial completo (AEO) presentó una inhibición del biofilm superior a F III, pero inferior a F IV, lo que plantea una reflexión sobre el balance entre la acción sinérgica y antagónica de los distintos componentes presentes en el extracto completo. Este fenómeno de sinergismo o antagonismo en mezclas complejas ha sido ampliamente documentado (Bassolé & Juliani, 2012), subrayando la necesidad de fraccionar o estandarizar extractos naturales para optimizar su actividad biológica.

Finalmente, el hecho de que el tratamiento térmico a 140°C generara una fracción (F IV) con actividad significativamente mayor sugiere que procesos de fraccionamiento controlados pueden ser estratégicos para aumentar la concentración y por lo tanto la eficacia terapéutica de aceites esenciales frente a patógenos multirresistentes como *A.*

*baumannii*. No obstante, futuras investigaciones deberán confirmar estos resultados en modelos *in vivo* y evaluar la estabilidad y seguridad de estas fracciones enriquecidas, dado que la actividad observada *in vitro* no siempre se traduce en la misma magnitud de efecto en sistemas biológicos más complejos.

En conjunto, nuestros hallazgos destacan la importancia de optimizar tanto la composición química como la estrategia de obtención de aceites esenciales para maximizar su concentración, así como su potencial como agentes anti-biofilm en la lucha contra infecciones causadas por bacterias resistentes.

### 8.5 Resultados determinación de toxicidad de *Polimntha longiflora gray* mediante ensayo de hemólisis

La evaluación de la hemólisis es fundamental para determinar la seguridad de compuestos naturales con aplicación. La fracción IV del aceite esencial de *P. longiflora* mostro una actividad hemolítica dosis dependiente, los resultados fueron analizados mediante análisis probit y se resumen en la Tabla 9.

**Tabla 9.- Porcentaje de hemólisis según su concentración (ppm)**

<b>Concentración (ppm)</b>	<b>Hemólisis (%)</b>
<b>400</b>	86.3194
<b>200</b>	50.4753
<b>100</b>	5.163



**Figura 12.- Ensayo de toxicidad mediante hemólisis FIV de *P. longiflora*.**

A una concentración de 400 ppm, se observó un elevado porcentaje de hemólisis con un 86.31%, lo que indica un efecto citotóxico importante sobre los eritrocitos. Esta alta actividad hemolítica a concentraciones mayores sugiere que el uso de FIV en aplicaciones clínicas debe manejarse cuidadosamente para evitar efectos adversos en tejidos sanguíneos.

A 200 ppm, la hemólisis mostro un porcentaje hemolítico menor de 50.47%, aunque este valor se considera un valor relativamente alto en términos de seguridad biológica. Sin embargo, es a 100 ppm donde se presentó un perfil hemolítico más favorable, con un 5.16% de hemólisis. Este nivel se encuentra dentro del rango considerado bajo según criterios aceptados en ensayos de compatibilidad hemática (dos Santos et al., 2019), por lo cual, en esta concentración, la FIV podría ser potencialmente segura desde el punto de vista hemolítico.

Estos resultados nos mostraron similitud a otros estudios que reportan aceites esenciales ricos en compuestos fenólicos, como son el cavacrol y el timol. Estos pueden presentar efectos hemolíticos a altas concentraciones, pero si son empleados a dosis bajas, mantienen su efectividad sin comprometer la integridad de las células (Bassolé y Juliani, 2012).

Rivero-Cruz en el 2011 realizaron estudios con aceite esencial de *P. longiflora* sobre toxicidad en ratones, reportando que no fue tóxico en las dosis evaluadas ( $DL_{50} > 5000$  mg/kg), lo que nos indica que existe un amplio margen de seguridad en modelos animales.

Aunque la concentración de 100 ppm muestra un nivel de toxicidad dentro de lo aceptable, es importante mencionar que deben llevarse a cabo estudios adicionales para confirmar que el uso sea seguro en modelos *in vivo*, ya que existen diversos factores tales como la biodisponibilidad, el metabolismo y la interacción con otros componentes fisiológicos podrían alterar el comportamiento hemolítico observado *in vitro*.

Finalmente, la relación entre eficacia antimicrobiana y toxicidad hemolítica observada en este estudio resalta la importancia de definir ventanas terapéuticas óptimas y seguras para el uso de extractos naturales, como es la FIV, en el tratamiento de infecciones por *A. baumannii* la cual muestra también un efecto positivo sobre la inhibición en la formación de su biopelícula.

## 9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en los ensayos realizados en este estudio indican que la fracción IV (F IV) del aceite esencial de *P. longiflora*, obtenida a 140 °C, presentó la mayor capacidad de inhibición de biofilm con un 78.33%, seguida por el aceite esencial sin fraccionar (AEO) con un 63.50% y la fracción III siendo la menor con un 53.30%, debida a la diferencia en la composición química de cada tratamiento.

Los datos de toxicidad (DL<sub>50</sub>) muestran una relación directamente proporcional entre concentración y efecto tóxico, subrayando la necesidad de optimizar las dosis para alcanzar un equilibrio entre eficacia antimicrobiana y seguridad.

La fracción IV destacó de manera importante como el tratamiento más prometedor, combinando alta actividad antibacteriana e inhibición del biofilm, siempre que se utilice dentro de un rango de concentración que minimice la toxicidad.

Este estudio se evidencia que el fraccionamiento térmico del aceite esencial de orégano potencia su actividad antimicrobiana frente a *A. baumannii*, con F IV mostrando superioridad frente a F III y AEO. Así, se respalda el potencial del aceite esencial de orégano y sus fracciones como alternativas naturales viables para combatir infecciones bacterianas ocasionadas por *A. baumannii*, particularmente aquellas asociadas a la formación de biopelículas.

## 10. PERSPECTIVAS

Los resultados de este estudio resaltan el potencial del aceite esencial de *P. longiflora* y sus fracciones como agentes antimicrobianos contra *A. baumannii*. Para fortalecer su aplicación a futuro, se sugieren varias líneas de investigación:

1. Evaluación *in vivo*: Para validar la eficacia y seguridad en modelos animales para lograr aproximarse a escenarios clínicos reales.
2. Estudios de mecanismos moleculares: Investigar los procesos celulares y genéticos afectados por carvacrol, timol y otros compuestos activos, mediante análisis transcriptómicos y proteómicos.
3. Optimización de la ventana terapéutica: Definir el rango de concentración efectivo y seguro a través de estudios de farmacocinética.
4. Desarrollo de nuevas formulaciones: Explorar sistemas de liberación controlada, como nanopartículas o encapsulaciones, para mejorar la eficacia y estabilidad de los compuestos.
5. Evaluación de sinergias con antibióticos: Investigar combinaciones que potencien los tratamientos actuales y disminuyan la resistencia bacteriana.
6. Ensayos en cepas clínicas multirresistentes: Probar la efectividad en cepas hospitalarias recientes para validar su aplicación práctica.

Estas estrategias permitirán avanzar en el desarrollo de alternativas terapéuticas innovadoras para combatir infecciones por bacterias multirresistentes.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Arcila-Lozano, C. C., Loarca-Piña, G., Lecona-Urbe, S., & González de Mejía, E. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(1), 100-111. [https://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S000406222004000100015&script=sci\\_abstract](https://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S000406222004000100015&script=sci_abstract)
- Bassolé, I. H. N., & Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17(4), 3989–4006. <https://doi.org/10.3390/molecules17043989>
- Božik, M., Klouček, P., Pulkrábek, J., & Kokoska, L. (2017). Antibacterial and anti-biofilm activity of essential oils and plant extracts against *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Microbiology and Infection*, 23(11), 758–763. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.03.012>
- Buckle, J., Walker, J., & Howden, M. (2012). Antimicrobial stewardship: Systems and processes for effective antimicrobial medicine use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(Suppl 1), i51–i63. <https://doi.org/10.1093/jac/dks202>
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Cazares-Rodríguez, A. G., Rodríguez-Rodríguez, J., Sánchez-García, E., De Lara-Novella, J., García-Alanís, K., Leos-Rivas, C., & Castillo-Hernández, S. (2023). Efecto del aceite esencial de orégano y sus fracciones concentradas en el crecimiento de *Aspergillus brasiliensis* (niger). *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 8, 132–139.
- Cerutti, Mariano; Neumayer, Fernando Introducción a la obtención de aceite esencial de limón Invenio, vol. 7, núm. 12, junio, 2004, pp. 149-155 Universidad del Centro Educativo Latinoamericano Rosario, Argentina <https://www.redalyc.org/pdf/877/87701214.pdf>

- de Oliveira, J. R., Camargo, S. E. A., & de Oliveira, L. D. (2019). Clinical potential of essential oils and their isolated constituents against biofilm-forming microorganisms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2019/2109431>
- dos Santos, Y. Q., Veras, B., de Oliveira, M. B. M., de Oliveira, F. G., Queiroz, Y., de Souza, A. A., ... & de Oliveira, R. A. G. (2019). Chemical composition and evaluation of the antinociceptive, antioxidant and antimicrobial effects of essential oil from *Hymenaea cangaceira* (Pinto, Mansano & Azevedo) native to Brazil: A natural medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 247, 112265. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378874119331927?via%3Dihub>
- GBD 2019 Antimicrobial Resistance Collaborators. (2019). Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, 400(10369), 2221-2248. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)02185-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)02185-7)
- Hao, G., Duan, J., & Yang, H. (2021). *Antimicrobial and Antioxidant Activities of Oregano Essential Oil and Its Components*. *Pathogens*, 10(3), 373. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030373>
- Hernández Iglesias, C. S. (2020). Actividad antimicrobiana y antihemolítica del extracto metanólico de *Cymbopogon citratus* sobre bacterias de importancia clínica. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Química, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.
- Howard, A., O'Donoghue, M., Feeney, A., & Sleator, R. D. (2012). *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence*, 3(3), 243-250. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22546906/>
- Kerekes, E.-B., Deák, É., Takó, M., Tserennadmid, R., Petkovits, T., Vágvölgyi, C., & Krisch, J. (2013). Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related micro-

- organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 115(4), 933–942. <https://doi.org/10.1111/jam.12289>  
Camacho-Silvas, L. A., Portillo-Gallo, J. H., Rivera-Cisneros, A. E., Sánchez-González, J. M., Franco-Santillán, R., Duque-Rodríguez, J., Velo-Méndez, G., & Ishida-Gutiérrez, C. (2020). Multirresistencia, resistencia extendida y panresistencia a antibacterianos en el norte de México. *Cirugía y Cirujanos*, 88(4), 399-407. [https://www.cirugiaycirujanos.com/frame\\_esp.php?id=501](https://www.cirugiaycirujanos.com/frame_esp.php?id=501)
- Lukas, B. (2015). Essential oil diversity of European *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae). *Phytochemistry*, 119, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.09.008>
- Medina Romero, M. Á., Hurtado Tiza, D. R., Muñoz Murillo, J. P., Ochoa Cervantez, D. O., & Izundegui Ordóñez, G. (2023). Método mixto de investigación: Cuantitativo y cualitativo. *Inudi*. <https://doi.org/10.35622/inudi.b.105>
- Nostro, A., Blanco, A. R., Cannatelli, M. A., Enea, V., Flamini, G., Morelli, I., & Alonzo, V. (2004) Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiology Letters*, 230(2), 191–195. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14757239/>
- Organización Mundial de la Salud. (27 de febrero de 2017). La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos [Comunicado de prensa]. Recuperado de <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- Organización Panamericana de la Salud. (2023, 21 de noviembre). *Resistencia antimicrobiana: una amenaza real*. OPS/OMS. Recuperado el 7 de julio de 2025, de <https://www.paho.org/es/noticias/21-11-2023-resistencia-antimicrobiana-amenaza-real>

- 
- Ortega-Nieblas, M. M., Robles-Burgueño, M. R., Acedo-Félix, E., González-León, A., Morales-Trejo, A., & Vázquez-Moreno, L. (año). Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano (*Lippia palmeri* S. WATS). *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 34 (1): 11 – 17, 2011
- Pachay Solórzano, J. W. (2018). Las infecciones bacterianas y su resistencia a los antibióticos. Caso de estudio: Hospital Oncológico “Dr. Julio Villacreses Colmont Solca”, Portoviejo. \*Universidad y Sociedad, 10\*(5), 219-223. Recuperado de <http://rus.ucf.edu.cu/index.php/rus> Consultado 11 de octubre 2023
- Paduch, R., Kandefer-Szerszeń, M., Trytek, M., & Fiedurek, J. (2007). Terpenes: Substances useful in human healthcare. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 55(5), 315–327. <https://doi.org/10.1007/s00005-007-0039-1>
- Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., & Chinou, I. B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), 4168–4170. <https://doi.org/10.1021/jf001494m>
- Pimentel González, M. F. (2024). Efecto de aceite esencial de orégano mexicano fraccionado (*Poliomintha longiflora* Gray) sobre la inactivación térmica de *Listeria innocua*/*Monocytogenes* (Tesis de maestría en Manejo y Aprovechamiento Integral de Recursos Bióticos). Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.
- Rivero-Cruz, J. F., Montiel-Silva, J. C., Choi, S. H., Krueger, D. A., & Smith, M. L. (2011). Evaluation of the antimicrobial and cytotoxic activities of *Poliomintha longiflora* essential oil and its major constituents. *Phytotherapy Research*, 25(5), 710–715. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21535751/>
- Sánchez, E., Rivas Morales, C., Castillo, S., Leos-Rivas, C., García-Becerra, L., & Ortiz Martínez, D. M. (2016). Antibacterial and Antibiofilm Activity of Methanolic Plant Extracts against Nosocomial Microorganisms. *Volume 2016, Article ID 1572697*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27429633/>
- Science Source. (2013, 7 de marzo). *Acinetobacter baumannii*, SEM [Fotografía de microscopía electrónica de barrido]. Fine Art America / Pixels. Recuperado el

- 7 de julio de 2025, de <https://fineartamerica.com/featured/2-acinetobacter-baumannii-sem-science-source.html?product=poster>.
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2016, 3 de junio). Orégano, realmente útil y benéfico. Recuperado de <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/oregano-realmente-util-y-beneficioso>
- Secretaría de Salud. (2012, 26 de octubre). *Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos* [Norma oficial]. *Diario Oficial de la Federación*. Recuperado de <https://sidof.segob.gob.mx/notas/docFuente/5275587>
- Soković, M., Glamočlija, J., Marin, P. D., Brkić, D., & van Griensven, L. J. L. D. (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>
- Tapia-Rodriguez M, (2023). Inhibition of *Acinetobacter baumannii* Biofilm Formation by Terpenes from Oregano (*Lippia graveolens*) Essential Oil Antibiotics (Basel). 2023 Oct 14;12(10):1539. Doi 10.3390/antibiotics12101539.
- Ultee, A., Bennik, M. H. J., & Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1561–1568. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC123826/>
- Vera Marín, B., & Sánchez Sáenz, M. (2015). Registro de algunas plantas medicinales cultivadas en San Cristóbal, municipio de Medellín (Antioquia - Colombia). *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín*, 68(2). <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179939267005>