



**Facultad
de Química**



**PEDECIBA
MEC-UDELAR**



**UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY**

Nuestros aliados naturales: búsqueda de nuevos antimicrobianos a partir de Productos Naturales

María Sofía Raffaelli Bertolotti
Tesis de Doctorado

Presentada como uno de los requisitos para el título de

Doctora en Química

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química,
Universidad de la República

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas

Noviembre 2025

Nuestros aliados naturales: búsqueda de nuevos antimicrobianos a partir de Productos Naturales

Tribunal:

Dra. Cristina Olivaro

Dra. Paula Rodríguez

Dra. Pilar Menéndez

Dr. Álvaro Vázquez, Director

Dra. Silvana Alborés, Directora

“La ciencia no es un destino, es un viaje”

Esther Lederberg

*“Quien viaja sin destino no es hombre
muerto, ha muerto quien no embarca más”*

Ernesto Tabárez

Agradecimientos

Esta es una tesis nómada. Fue escrita en cuatro departamentos, en muchas casas, en parques y plazas, arriba de árboles a veinte metros de altura, en incontables ómnibus y algunas terminales, a orillas del río Santa Lucía, al pie de algún cerro, al borde de un tajar, en tres centros hospitalarios, colgada en hamacas y telas, en soledad, acompañada de personas y animales, en miles de posiciones y ninguna anatómicamente correcta. Es el fiel reflejo del camino de muchos años: cambiante, divertido, interesante, agotador, reconfortante, impredecible, frustrante, y mucho más dulce cuando se llega al final y se mira atrás, como todas las buenas aventuras. Gracias a todas y todos quienes han sido parte de ella, aunque no lo sepan.

En primer lugar, agradecer a quienes la hicieron posible: a la Comisión Académica de Posgrado por las becas que me otorgaron, al Programa de Apoyo a las Ciencias Básicas por el apoyo, a INIA Las Brujas y muy especialmente al Dr. Eduardo Abreo por las decenas de caldos de cultivo hechos, a la ANII por el proyecto del Fondo Clemente Estable que dio inicio a este trabajo y a la Comisión Sectorial de Investigación Científica por el proyecto que permitió continuarlo, a la AUGM y el Programa Escala por la financiación de la Pasantía en la Universidad Nacional de Córdoba, a las Dras. Gabriela Paraje, Ivana Galera y Paulina Páez por recibirme en su laboratorio e introducirme al maravilloso mundo de los biofilms. Al laboratorio de Bioquímica y todos sus integrantes por el uso abusivo de su lector de placas. Al Centro Universitario de Tacuarembó y especialmente a la Dra. Cristina Olivaro por enseñarme y permitirme usar el equipo de UHPLC-MS. A Stephanie Hartmann, Ruby Valadez, Guilherme Sastre, Mariana Seveso, María Chanquet, Natalia Gómez, Faustina Bisio y Marina Guerra por su participación en diversas etapas de trabajo experimental de esta tesis.

Quiero agradecer especialmente a la Universidad de la República y a la Facultad de Química por ser casa, por enseñarme a creer y a crear el futuro que quiero para mí y para otros. ¡Viva la educación pública!

Gracias a mis tutores maravillosos por todas las enseñanzas. A Silvana por toda la dedicación, los audios de demasiados minutos, las correcciones infinitas sin importar el día ni la hora, por educarme en este camino, por todas las invitaciones a planes divertidos

y otros no tanto, por permitirme volar sola y enroscarte horas para entender después qué hice. Por el cariño, las risas, las fiestas compartidas (y los papelones que no mencionaremos). A Álvaro por ser un poco tutor y un poco padre. Por dejarme equivocarme y aprender en el camino, por enseñarme de independencia, por escuchar y dejarte convencer hasta de mis ideas más feministas. Por los días compartidos desenmarañando espectros, pero siempre con buena comida y café. Por preocuparte siempre, hasta cuando no querría que lo hagas.

Gracias a mis compañeros y compañeras de Farmacognosia, a los que estuvieron y a los que están. Por enseñarme, ayudarme, acompañarme, compartir almuerzos de charlas académicas y no tan académicas, y sobre todo postres, muchos postres. A Edu, Nacho, Santi y Nati por siempre estar, para la charla, para la pavana, y también para alguna lloradita.

Gracias a mis compañeras y compañeros de Micro y sobre todo del laboratorio 14, por siempre poder compartir un momento divertido, una placa “prestada” que nunca se devuelve o una buena charla sobre qué Pokémon sos. A Bel por aguantarme la cabeza y por todas las cositas divertidas que nos hizo en la impresora 3D.

Gracias a mis amigas y amigos, sobre quienes necesitaría escribir otra tesis completa para nombrar y resaltar su importancia en mi vida, por el privilegio de su amistad. A las Karens con toda su sabiduría, todo su amor y todos sus gatitos, por tantos planazos, cumpleaños y catarsis. A Caro, Isa, Pía y Coni por ser familia, por los años y las anécdotas repetidas mil veces, y todas las que vendrán. A Belu, Carla, Fita y Vale por recordarme siempre que todo es perfecto. A mis amigos que me regaló el patín y el poli, por animarme a jugar, a creer en mí misma y a ser valiente.

Gracias a Ale, por ayudarme a volar más alto de lo que creo posible. Por el impulso, el entendimiento, la ternura, el chocolate. Por ser un gran equipo.

Gracias al movimiento feminista, a todas las mujeres que por años han luchado y día a día buscan hacer de este mundo un lugar mejor, gracias por permitirme hacer esto.

Gracias a mi familia, en particular a mi abuela, que no me entiende del todo, pero se anota lo que hago en una libretita para poder contarle a sus amigas.

Gracias a Flora y Minerva por las horas y horas compartidas de sillón, y por aprender que no pueden caminar por arriba del teclado.

Gracias a mi hermana Luci y a mi mamá, por ser las dos mujeres más increíbles que existen, mi ejemplo a seguir y mi parámetro de humor. Por impulsarme siempre a hacer todo lo que quiero y un poco más también. Soy la persona que soy hoy gracias a ustedes.

Nuestros aliados naturales: búsqueda de nuevos antimicrobianos a partir de Productos Naturales

Q. F. María Sofía Raffaelli Bertolotti

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

2025

DIRECTORES:

Dr. Álvaro Vázquez

Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales,
Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química

Dra. Silvana Alborés

Área de Microbiología, Departamento de Biociencias, Facultad de
Química

Resumen

Las plantas y los microorganismos han sido históricamente una fuente clave de metabolitos secundarios con aplicaciones terapéuticas, alimenticias y tecnológicas. Muchos de estos compuestos poseen propiedades antimicrobianas, entre ellos polifenoles, alcaloides, terpenoides y péptidos, que actúan mediante diversos

mecanismos como la inhibición enzimática, la alteración de membranas o la interferencia en la síntesis de macromoléculas. Además, ciertos metabolitos potencian la acción de antimicrobianos conocidos o interfieren en factores de virulencia como la formación de biofilms y la comunicación celular por quorum-sensing. Debido a la creciente resistencia antimicrobiana, los extractos naturales, ricos en múltiples moléculas bioactivas, representan una alternativa prometedora, ya que su diversidad favorece efectos sinérgicos y reduce la probabilidad de aparición de resistencia. En este contexto, la presente tesis exploró microorganismos del suelo, del intestino de insectos y asociados a plantas, así como metabolitos de plantas, como fuentes de nuevos antimicrobianos. Se evaluó su efecto frente a patógenos clínicamente relevantes (incluyendo bacterias del grupo ESKAPE y levaduras del género *Candida*) y fitopatógenos de importancia agrícola, tanto en estado planctónico como en forma de biofilms. Los resultados obtenidos revelaron una destacada actividad frente a distintos microorganismos, reforzando el potencial de los metabolitos naturales, particularmente actuando en conjunto, como base para el desarrollo de nuevas estrategias antimicrobianas.

El manuscrito de esta tesis contiene 4 capítulos. El primer capítulo brinda una introducción general al tema y los objetivos. El segundo aborda la obtención de extractos a partir de cultivos microbianos y el relevamiento de la actividad antimicrobiana y antibiofilm. El capítulo tercero se centra en los estudios de compuestos antimicrobianos y antibiofilm a partir de plantas nativas, incluyendo el estudio de algunos mecanismos de acción y el estudio fitoquímico de los metabolitos responsables, así como su relación con la actividad antibiofilm. En el capítulo cuarto se desarrolla la discusión general de los resultados obtenidos en la tesis, sus conclusiones y perspectivas.

Our natural allies: searching for new antimicrobials from natural products

Q. F. María Sofía Raffaelli Bertolotti

Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química

Universidad de la República

2025

ADVISORS:

Dr. Álvaro Vázquez

Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales,
Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química,
Universidad de la República

Dra. Silvana Alborés

Área de Microbiología, Departamento de Biociencias, Facultad de
Química, Universidad de la República

Summary

Plants and microorganisms have historically been a key source of secondary metabolites with therapeutic, food, and technological applications. Many of these compounds possess antimicrobial properties, including polyphenols, alkaloids, terpenoids, and peptides, which act through various mechanisms such as enzyme inhibition, membrane disruption, or interference with macromolecule synthesis. Furthermore, certain metabolites potentiate

the action of known antimicrobials or interfere with virulence factors such as biofilm formation and quorum-sensing cell communication. Due to increasing antimicrobial resistance, natural extracts, rich in multiple bioactive molecules, represent a promising alternative, as their diversity promotes synergistic effects and reduces the likelihood of resistance development. In this context, this thesis explored microorganisms from soil, and insect guts, and plants as sources of novel antimicrobials. Its effect against clinically relevant pathogens (including bacteria of the ESKAPE group and yeasts of the genus *Candida*) and agriculturally important phytopathogens were evaluated, both in planktonic form and as biofilms. The results obtained revealed significant activity against various microorganisms, reinforcing the potential of natural metabolites, particularly when acting together, as a basis for the development of new antimicrobial strategies.

This thesis manuscript contains four chapters. The first chapter provides a general introduction to the topic and objectives. The second addresses the extraction of extracts from microbial cultures and the assessment of antimicrobial and antibiofilm activity. The third chapter focuses on the study of antimicrobial and antibiofilm compounds from native plants, including the study of some mechanisms of action and the phytochemical analysis of the responsible metabolites, as well as their relationship to antibiofilm activity. The fourth chapter presents the general discussion of the results obtained in the thesis, its conclusions, and future directions.

INDICE

Agradecimientos	iv
Resumen	vii
Summary	ix
Listado de abreviaturas	xiii
CAPITULO 1. Introducción	15
Antibióticos y resistencia	15
Mecanismos de resistencia a antimicrobianos	19
La problemática de las enfermedades infecciosas	26
La solución está en la naturaleza	29
Relevancia en Uruguay	32
Objetivo general	33
Objetivos específicos	34
Bibliografía	35
CAPITULO 2. Metabolitos de Caldos de Cultivo	44
Introducción	44
Materiales y métodos	49
Resultados y Discusión	57
Bibliografía	82
CAPITULO 3. Metabolitos de plantas	88
Introducción	88
Materiales y métodos	92
Resultados y discusión	98
Bibliografía	137
CAPÍTULO 4. Discusión general, conclusiones y perspectivas	144
Discusión general	144
Conclusiones	151
Perspectivas	153

Bibliografía.....	155
ANEXO I	158
Gráficas de inhibición y erradicación de biofilms por extractos de Senecio	158
ANEXO II	165
Espectros de masas de compuestos.....	165
ANEXO III. Artículo “Bioprospecting the antibiofilm and antimicrobial activity of soil and insect gut bacteria”	183

Listado de abreviaturas

5-CQA: ácido clorogénico

CA: Ácido cafeico

CC: Caldo de cultivo

CIM: Concentración Inhibitoria Mínima

CIMB: Concentración Inhibitoria Mínima de Biofilm

CLSM: Microscopía láser confocal

CN: Caldo nutriente

DMSO: Dimetilsulfóxido

DO: Densidad óptica

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo

EL: Extracto de levadura

EPS: Matriz polimérica extracelular

ESI: Ionización por electrospray

EtOH: Etanol

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

HPLC: Cromatografía líquida de alta performance

HSL: Homoserinlactona

INT: Iodonitrotetrazolio

LB: Luria Bertani

LBA: Agar Luria Bertani

LC: Cromatografía líquida

LPS: Lipopolisacárido

MeOH: Metanol

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina

MS: Espectrometría de masas

NPN: N-fenil-1-naftilamina

OMS: Organización Mundial de la Salud

OMSA: Organización Mundial de Sanidad Animal

PBS: Buffer fosfato salino

PDB: Caldo papa dextrosa

PNUMA: Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente

QA: Ácido quínico

QS: *Quorum-sensing*

RAM: Resistencia a Antimicrobianos

ROS: Especies reactivas del oxígeno

TLC: Cromatografía en capa fina

tR: Tiempo de retención

Trolox: 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

TTZ: Trifeniltetrazolio

UHPLC: Cromatografía líquida de ultra alta performance

CAPITULO 1. Introducción

Antibióticos y resistencia

El descubrimiento de los antibióticos a principios del siglo XX ha sido uno de los hitos más importantes en la historia de la medicina. El hallazgo de la penicilina por Sir Alexander Fleming en 1929 marcó el comienzo de lo que creímos sería el fin de la problemática de las infecciones. Sin embargo, en la placa de Petri que contenía una cepa de *Staphylococcus aureus*, contaminada con el hongo *Penicillium notatum*, Fleming sólo observaba una batalla de una guerra mucho más importante: la de los microorganismos para sobrevivir y competir por los ecosistemas y las fuentes de nutrientes. La carrera armamentística de la naturaleza es como cualquiera: hay que generar formas de ataque y también formas de defensa, por lo que a nadie debería sorprender que los microorganismos adquieran formas de defenderse, lo que al día de hoy llamamos resistencia.

En 1940, a partir de una cepa de *Escherichia coli* que no mostraba sensibilidad a la penicilina, científicos de la Universidad de Oxford pudieron aislar una enzima capaz de inactivar el antibiótico: la penicilinasa (Hunt & Kates, 2024). En 1948, Demerec publica un estudio de resistencia a penicilina y estreptomycin por dos cepas de *S. aureus* y *E. coli*, donde demuestra que la aparición de resistencia se da por mutaciones espontáneas de las bacterias, aunque la presencia de los antimicrobianos en el medio ejerce una presión selectiva sobre las mismas, lo cual se ha demostrado posteriormente en numerosos estudios (Demerec, 1948). En la Figura 1.1 se muestra una línea del tiempo de descubrimiento de diferentes antimicrobianos y aparición o reporte de resistencia a los mismos y se observa una correlación directa entre el uso de antimicrobianos y la promoción de resistencia. Los antimicrobianos se utilizan de forma indiscriminada y muchas veces sin prescripción médica (Estany-Gestal et al., 2024). La mayoría de los antimicrobianos en salud humana se prescriben para enfermedades respiratorias, a pesar de que muchas de ellas son provocadas por virus. Además, son ampliamente utilizados en otros ámbitos, como la ganadería y agricultura de forma preventiva o como promotores del crecimiento, representando un 80% del total de antimicrobianos en los

Estados Unidos (Llor & Bjerrum, 2014; Estany-Gestal et al., 2024). Todo esto ha provocado un aumento sostenido de la aparición de microorganismos resistentes a la antibioticoterapia conocida. Por ejemplo, la exposición crónica de *Mycobacterium smegmatis* a rifampicina incrementa su tasa de mutaciones y promueve nuevas rutas de resistencia, mientras que la exposición a concentraciones sub-CIM de eritromicina de *E. coli* y *Enterococcus faecalis* favorece la adquisición de genes de resistencia en las siguientes generaciones (Cebrián-Sastre et al., 2023; B. Wang et al., 2025).

La eficiencia de estas nuevas armas para combatir infecciones, sumada a la rápida aparición de resistencia promovió el afán por encontrar nuevas moléculas con estas capacidades. La búsqueda de nuevos antimicrobianos continuó con éxito, desde el aislamiento a partir de productos naturales, pasando por la semisíntesis hasta la síntesis de cero, pero la resistencia continuó reportándose, en algunos casos incluso previamente a que los mismos fueran utilizados a nivel de mercado. Estudios posteriores concluirían que la resistencia se da hasta en ambientes donde no se han introducido antimicrobianos, detectándose genes de resistencia, como los que codifican para β -lactamasas en material genético de tres millones de años (Iskandar et al., 2022).

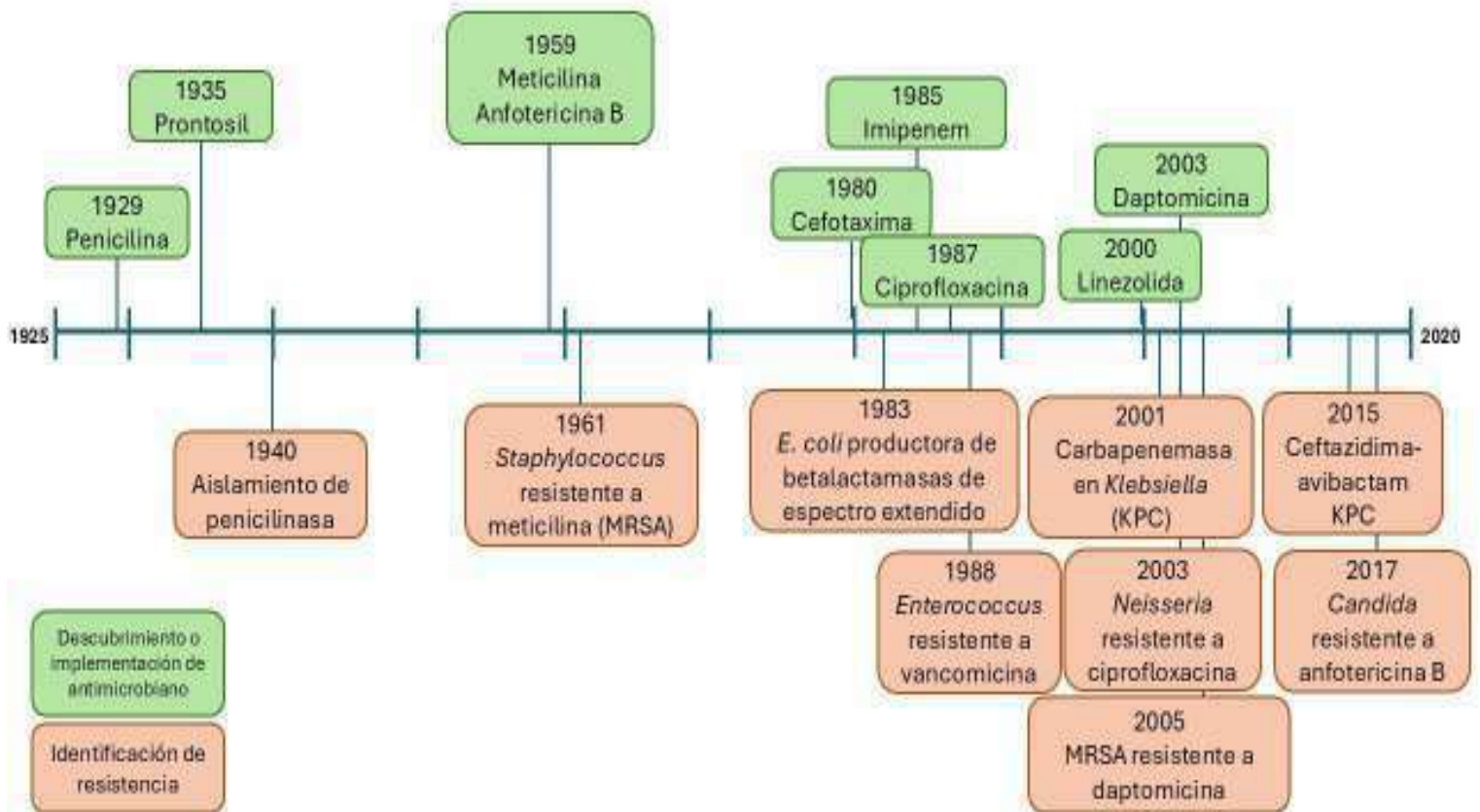


Figura 1.1. Línea de tiempo de descubrimiento e identificación de resistencia de diferentes antimicrobianos

La resistencia a antimicrobianos (RAM) es actualmente una de las mayores problemáticas a nivel mundial, ha sido declarada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las 10 amenazas a la salud pública global (Walsh et al., 2023). Los antimicrobianos existentes hoy en día son cada vez más ineficaces y, de los que se encuentran en fase de desarrollo, sólo unos pocos se consideran innovadores. Se necesitan de manera urgente nuevos antimicrobianos y nuevas estrategias para combatir los microorganismos contenidos en la lista de patógenos prioritarios de la OMS (WHO, 2021).

Desde hace años, la OMS, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) trabajan en conjunto para tomar medidas colectivas que minimicen el surgimiento y propagación de la RAM, incluyéndose a partir del 2021 al Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), en el entendido que este trabajo debe ser enfocado desde la perspectiva Una Salud, que incluye todas estas aristas (FAO et al., 2022). En el plan de acción, se define Una Salud como “un enfoque integrado y unificador que busca optimizar y balancear de forma sostenible la salud de humanos, animales, plantas y ecosistemas. Reconoce que la salud de humanos, animales domésticos y salvajes, plantas y el ambiente en general (incluyendo ecosistemas) están cercanamente relacionados y son interdependientes. El enfoque moviliza a diferentes sectores, disciplinas y comunidades en diferentes niveles de la sociedad que trabajan juntos para promover el bienestar y atacar amenazas a la salud y los ecosistemas, encargándose de la necesidad colectiva de agua, energía y aire limpios, alimentación segura y nutritiva, tomando acción sobre el cambio climático y contribuyendo al desarrollo sostenible”. En el contexto de ese plan, varias acciones se están tomando para detener el avance y mitigar los efectos de la RAM, incluyendo el uso racional de antimicrobianos, la investigación sobre nuevas moléculas, producción y difusión del conocimiento al respecto, cambios en políticas y legislación, entre otros. Uruguay, por su parte, integró el proyecto “Trabajando juntos para combatir la resistencia a antimicrobianos (RAM)”, y a partir de eso presentó un “Plan Nacional contra la Resistencia Antimicrobiana”, a ejecutarse en el período 2024-2028.

Mecanismos de resistencia a antimicrobianos

La resistencia antimicrobiana constituye un desafío creciente debido a la diversidad de mecanismos involucrados, que explican su aparición recurrente y la dificultad para controlarla. Esta resistencia puede ser intrínseca o adquirida: la primera está codificada en el genoma de los microorganismos y es independiente de la presión selectiva, mientras que la segunda se adquiere por mutaciones o mediante transferencia horizontal de genes (Cox & Wright, 2013).

Los principales mecanismos de resistencia incluyen la limitación en la captación de antimicrobianos, las modificaciones en sus blancos celulares, la inactivación de los compuestos y el eflujo activo, tal como se ilustra en la Figura 1.2. Entre ellos, la limitación de captación es menos utilizada por bacterias Gram positivas, ya que carecen de la membrana externa de lipopolisacárido (Iskandar et al., 2022). Otros mecanismos, menos frecuentes, comprenden la protección de los sitios activos y la generación de vías alternativas para cumplir la misma función bloqueada por el antimicrobiano (*target bypass*) (Gaurav et al., 2023).

La inactivación de los antimicrobianos ocurre mediante mecanismos enzimáticos que alteran la estructura química de los antimicrobianos, ya sea por la adición de grupos funcionales (acetilación, fosforilación, adenilación) que impiden su unión a los blancos, o por la destrucción de su integridad molecular. Ejemplos de este último caso incluyen la hidrólisis del anillo β -lactámico por β -lactamasas (Munita & Arias, 2016) o la inactivación

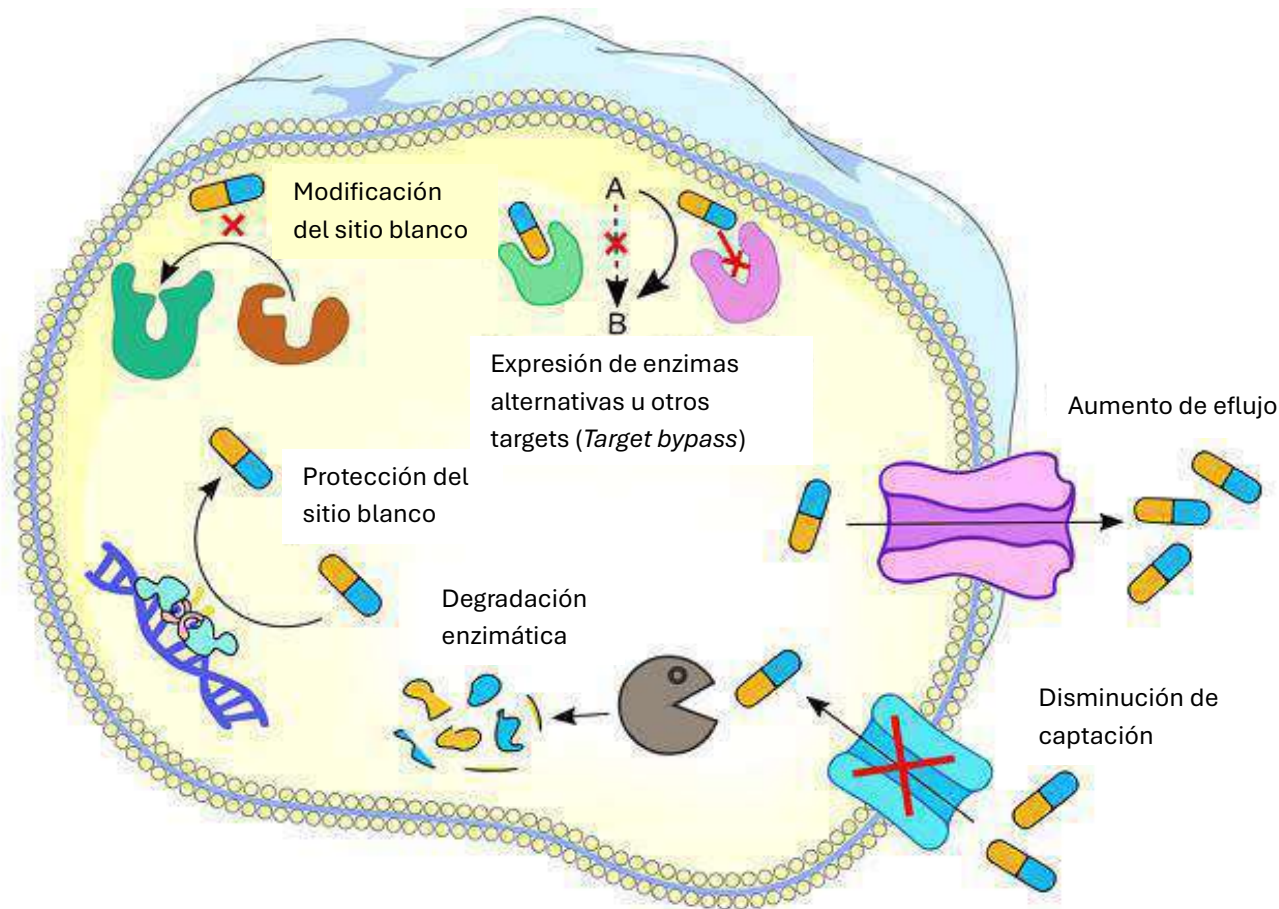


Figura 1.2. Adaptada de Gaurav et al., 2023. Mecanismos de resistencia a antimicrobianos de la azoxistrobina por la enzima citocromo P450 de *Botrytis cinerea* (T. Wang et al., 2024).

En cuanto a la limitación en la captación de antimicrobianos, existen diferencias entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas debido a su pared externa.

Las bacterias Gram negativas tienen una delgada pared de péptidoglicano y una membrana externa. Esta expresa numerosas porinas, proteínas que forman canales hidrofílicos. La subexpresión, modificación estructural o sustitución por porinas más estrechas reduce la entrada de antibióticos hidrosolubles como tetraciclinas, β -lactámicos o fluoroquinolonas (Delcour, 2009; Munita & Arias, 2016; Rajput et al., 2024). En antibióticos lipofílicos (por ejemplo, aminoglucósidos, macrólidos, rifamicinas), la barrera de ingreso depende del lipopolisacárido (LPS), por lo que cepas con LPS más

largos muestran resistencia intrínseca a estos compuestos. El uso de permeabilizadores de membrana como Tris/EDTA o polimixina B puede aumentar su eficacia (Delcour, 2009).

En bacterias Gram positivas, con una gruesa pared celular, la limitación de captación es menos común, aunque se ha descrito el engrosamiento de la pared celular o la limitada permeabilidad a moléculas polares en géneros como *Enterococcus*, lo que reduce la eficacia de aminoglucósidos. Por su parte, bacterias sin pared celular, como *Mycoplasma*, son intrínsecamente resistentes a antimicrobianos que actúan sobre esta estructura, como β -lactámicos y aminoglucósidos (Reygaert, 2018).

En los hongos, la resistencia puede deberse a cambios en la pared celular, como disminución del ergosterol, melanización —que atrapa antifúngicos— o aumento de la quitina, confiriendo resistencia a equinocandinas (Walker et al., 2018; Jacobson & Ikeda, 2005; Lenardon et al., 2010).

Algunos microorganismos presentan cambios en los blancos de acción que impiden la unión de los antimicrobianos. Ejemplo de resistencia intrínseca es la de las arqueas, carentes de peptidoglicano y, por tanto, resistentes a β -lactámicos y glicopéptidos (Khelaifia & Drancourt, 2012). Este mecanismo incluye mutaciones o modificaciones en la síntesis del peptidoglicano (en bacterias), ergosterol (hongos), unión a calcio (daptomicina), subunidades ribosomales, ADN girasa, topoisomerasa IV o enzimas metabólicas, dificultando la acción antimicrobiana (Reygaert, 2018; Czajka et al., 2023).

Por su parte, las bombas de eflujo son proteínas transportadoras en la membrana citoplasmática que expulsan activamente compuestos tóxicos, moléculas de *quorum-sensing* (señales químicas utilizadas para la comunicación bacteriana), factores de virulencia y antimicrobianos. Utilizan ATP o gradientes electroquímicos para su funcionamiento y confieren resistencia tanto intrínseca como adquirida a antibacterianos y antifúngicos (Gaurav et al., 2023; Czajka et al., 2023; Lee et al., 2023). Recientemente se ha demostrado que arqueas como *Halorubrum amylolyticum* también poseen estos sistemas (Fakhoury et al., 2024).

La protección de los sitios activos es un mecanismo reversible en el cual proteínas específicas se asocian al blanco para impedir la unión del antimicrobiano. Antes se creía exclusivo de la resistencia a tetraciclinas, pero actualmente se han identificado casos como la resistencia a ácido fusídico (FusB), fluoroquinolonas (Qnr) y la protección ribosomal mediada por proteínas ABC-F (Tomlinson et al., 2016; Wilson et al., 2020).

Finalmente, el *target bypass* permite la generación de vías alternativas para la función bloqueada. Por ejemplo, *S. aureus* sintetiza PBP2a, una proteína de unión a penicilina con baja afinidad por β -lactámicos, lo que mantiene la síntesis de la pared celular (Belay et al., 2024). Otro caso es la sobreexpresión de enzimas blanco, que satura su inhibición, como ocurre con trimetoprim-sulfametoxazol (Galgano et al., 2025).

Biofilms: un enfoque diferente al estudio de los microorganismos

Uno de los mecanismos más complejos de resistencia es la formación de biofilms. Los microorganismos pueden existir en dos formas: planctónica, donde flotan libremente, y sésil, en la cual se encuentran adheridos, en general a una superficie. Los microorganismos cambian sus características entre estos dos estados, ya que la adhesión a la superficie causa un cambio en la expresión de genes de maduración y producción de exopolisacárido, lo cual es necesario para la formación de biofilms (Sharma et al., 2023). Un biofilm es un agregado de microorganismos cuyas células están inmersas en una matriz polimérica extracelular (EPS), generalmente compuesta por ADN extracelular, proteínas y polisacáridos de forma que se adhieren unas a otras y/o a la superficie. Pueden formarse sobre superficies vivas o inertes y aparecen tanto en lugares naturales como artificiales (Flemming et al., 2016).

El primer reporte de la existencia de biofilms se dio en conjunto con las primeras aproximaciones a la invención del microscopio por el comerciante neerlandés van Leeuwenhoek, considerado el “padre de la microbiología”, alrededor de 1670. Movido por la curiosidad y ayudado por lentes de su propia confección, Antony van Leeuwenhoek observa y describe por primera vez lo que hoy conocemos como microorganismos, que él nombró “animáculos”. Posteriormente, describió hallazgos hechos sobre sus propios

dientes. En las cartas escritas, relata haber encontrado en sus dientes “una pequeña materia blanca espesa como harina mojada”. Al suspenderla en agua y observarla con los mencionados lentes, describe en ella varios “animáculos” de diversas formas y tamaños. Sin embargo, resulta aún más interesante su experimento posterior: Antony enjuagó su boca con vinagre y volvió a tomar una muestra de esta “materia blanca” y la observó, viendo resultados muy similares; sin embargo, al aplicar el vinagre directamente sobre la muestra suspendida, observó que los “animáculos” morían. Concluyó de esto que, aunque el vinagre pudiese matar a los pequeños seres, no podía penetrar la materia blanca que observaba en los dientes (Fred, 1932).

Los biofilms son la forma dominante de las bacterias y arqueas en casi todos los hábitats del planeta, incluso en ambientes marinos como fue recientemente reportado (Yu et al., 2025), y globalmente se estima que entre un 40 y 80% de las células reside en forma de biofilms (Flemming & Wuertz, 2019). Los hongos también son capaces de formar biofilms, aunque el estudio de estos se ha basado fuertemente en los biofilms de levaduras y poco en los de hongos filamentosos (Costa-Orlandi et al., 2017).

No existe un único tipo de biofilm, sus características son variables y dependen del tipo de microorganismos involucrados, los factores ambientales, posibles compuestos antimicrobianos o defensas del hospedero, material de la superficie, fuerzas mecánicas aplicadas sobre el mismo, entre otros. Sin embargo, los mecanismos de formación son comunes y constan de cinco etapas: 1. adsorción, 2. adhesión, 3. formación de microcolonias, 4. maduración y 5. dispersión (Figuras 1.3 y 1.4) (Perchikov et al., 2024).

Durante la primera etapa, la adsorción de las células bacterianas, esporas, fragmentos hifales o esporangios a la superficie se da mediante fuerzas de van der Waals, interacción electrostática y reacciones ácido-base, por lo que el material de la superficie juega un rol importante, y esta adsorción es reversible. Luego de esto, la etapa de adhesión varía según el microorganismo. Para los hongos es mediada por la secreción de adhesinas, mientras que en las bacterias depende fuertemente de la presencia de flagelos y pili en la superficie de la bacteria, que vuelven la adhesión irreversible. Algunas bacterias, incluso, cambian su expresión genética para producir más flagelos en esta etapa y lograr una mejor adhesión. Luego de esto, se genera la primera monocapa de

biofilm a partir de diferentes mecanismos: en bacterias se da la expresión de aglutininas y fimbrias y división celular con adhesión de las células a la capa ya formada o a superficies adyacentes, mientras que en los hongos se da la elongación y ramificación de hifas. En esta etapa, el *quorum-sensing* juega un rol muy importante, ya que permite la comunicación intercelular y promueve estos mecanismos, así como la síntesis de EPS (Costa-Orlandi et al., 2017; Perchikov et al., 2024; Saxena et al., 2019).

La síntesis de EPS acompaña la maduración del biofilm en las siguientes etapas, generándose una estructura en tres dimensiones, que cumple las funciones de protección contra antimicrobianos y células del sistema inmune, diseminación de agua, nutrientes, proteínas, ADN y moléculas de QS dentro del biofilm, captación de nutrientes externos, entre otros (Osungunna, 2022). En este punto, el biofilm maduro puede adquirir una complejidad mayor, observándose diferentes zonas; este fenómeno se da

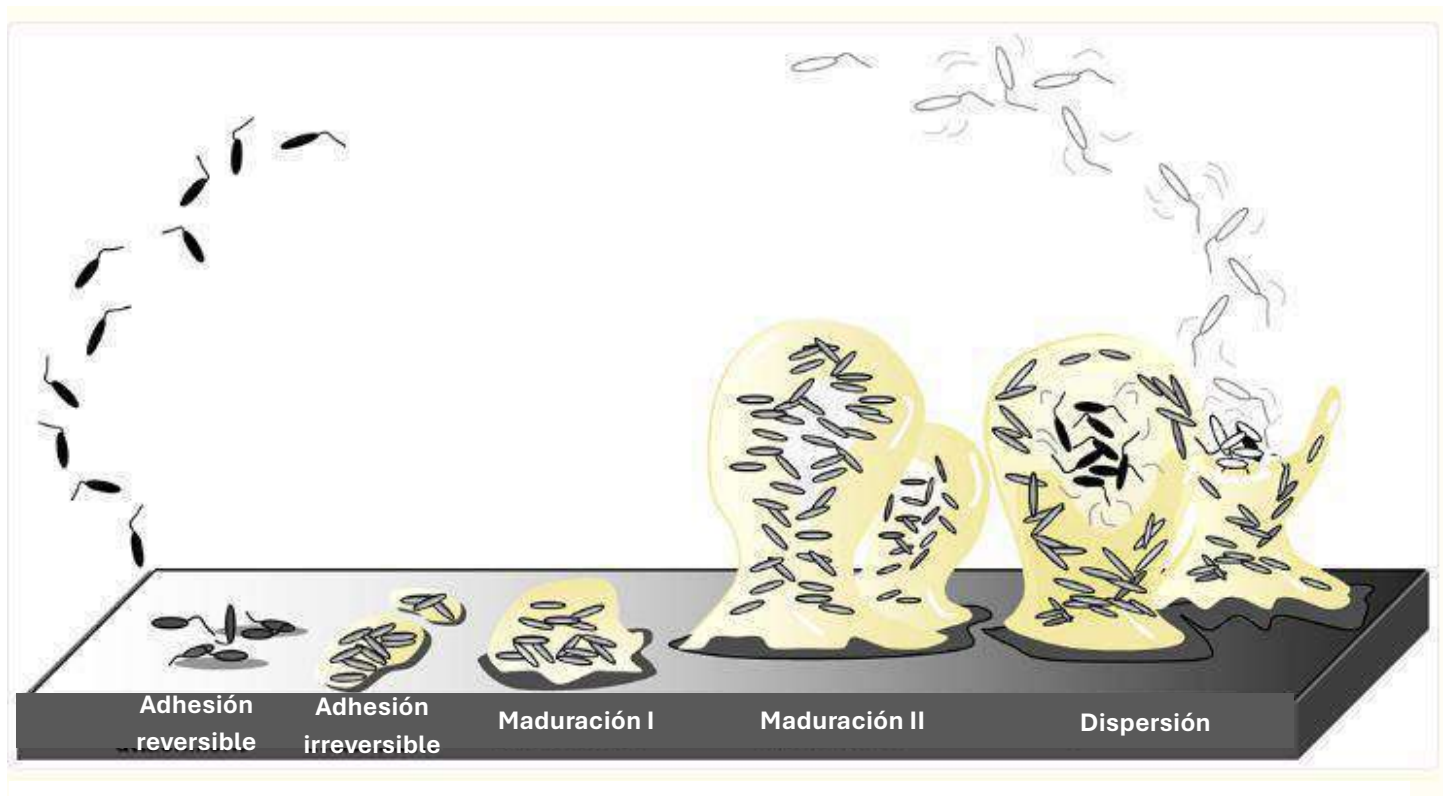


Figura 1.3. Adaptada de (Sauer et al., 2022). Etapas de formación de biofilms bacterianos

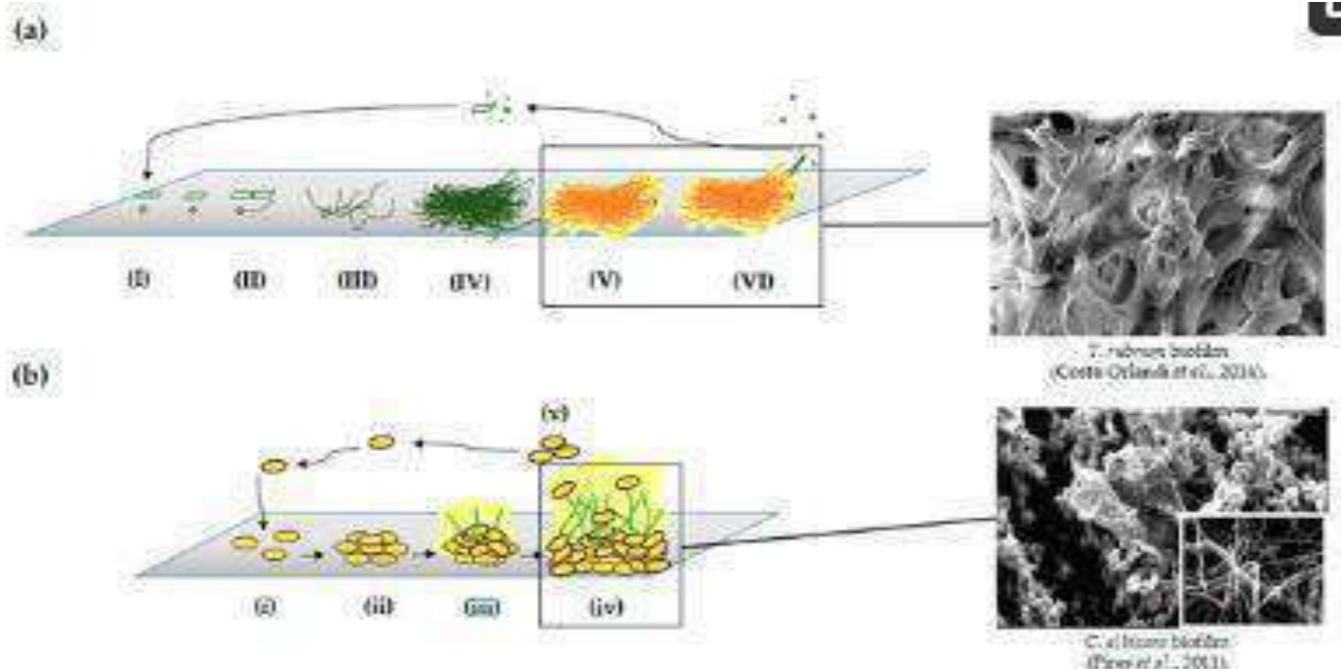


Figura 1.4. Tomada de (Costa-Orlandi et al., 2017). Modelos de desarrollo de biofilms de hongos filamentosos (a) y *C. albicans* (b). En el primer modelo, propuesto por Harding *et al.*: (I) adsorción, (II) adhesión activa, (III) formación de microcolonia, (IV) desarrollo micelial, (V) maduración, (VI) dispersión de conidias o arthroconidias. En el segundo modelo, las etapas son las mismas que en la formación de biofilms bacterianos: (i) adhesión reversible, (ii) adhesión irreversible, (iii) formación de microcolonias (maduración), (iv) maduración, (v) dispersión.

particularmente en situaciones de estrés como falta de nutrientes o presencia de antimicrobianos. En esos casos, en el biofilm se genera un núcleo donde se encuentran microorganismos persistentes y un recubrimiento externo donde se encuentran las células más susceptibles (Saxena et al., 2019). Una vez que el biofilm adquiere una madurez y mediado en parte por QS, se da la etapa de dispersión, donde las células que se encuentran en la superficie del mismo pueden desprenderse, en general en pequeñas colonias embebidas en EPS y colonizar otras superficies (Perchikov et al., 2024).

Aunque este modelo ha sido el aceptado durante décadas, y sigue siendo relevante y vigente, es de destacar que en los últimos años se ha definido la formación de biofilms que no se encuentran adheridos a las superficies. Actualmente las infecciones mediadas por biofilms se caracterizan en asociadas a superficies, prevalentes en pacientes con prótesis, catéteres o implantes, y los no asociados a superficies, como en los casos de

fibrosis quística o infecciones recurrentes de tejidos blandos. Sin embargo, no se observa una diferencia fenotípica entre los dos tipos de biofilms (Sauer et al., 2022).

Los microorganismos en forma de biofilms presentan un marcado aumento de la resistencia con respecto a su forma planctónica. Este hecho se debe a diversos factores, entre ellos la dificultad de los antibióticos de ingresar al biofilm y llegar a las células a través de la matriz polisacárida, la disminución de la concentración efectiva del antibiótico dentro del biofilm o la degradación por enzimas en la matriz, sobreexpresión de bombas de eflujo, transferencia de genes de resistencia entre los microorganismos dentro del biofilm y heterogeneidad de los microorganismos. Esto último es de los mecanismos más importantes de resistencia ya que, en las capas más internas del biofilm, donde se da una mayor privación de nutrientes y oxígeno a las células, estas entran en un estado de persistencia, donde su metabolismo se ve notoriamente desacelerado; esto provoca que todos los antimicrobianos que basan su acción en el bloqueo de algún camino metabólico sean incapaces de actuar sobre las mismas (Almatroudi, 2025; Grooters et al., 2024).

La problemática de las enfermedades infecciosas

La incidencia global de las enfermedades infecciosas es una preocupación creciente en la salud pública. Durante el 2019 se reportaron 13,7 millones de muertes debido a infecciones, identificándose a *S. aureus*, *E. coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* como las responsables de más de la mitad de ellas. *S. aureus* particularmente, fue la principal causante de muerte en 135 países (Murray et al., 2022). Ese mismo año se reportaron 6590 millones de casos de infecciones entéricas, causando más de 1,7 millones de muertes, siendo su mayor peligrosidad en niños menores a 5 años (B. Wang et al., 2025). Mientras tanto, en 2021 se registraron 344 millones de casos de infecciones del tracto respiratorio inferior (sin incluir infecciones por COVID), que causaron 2,18 millones de muertes (Bender et al., 2024). Se estima que globalmente se gastan unos 66 mil millones de dólares anuales en el tratamiento de enfermedades infecciosas resistentes y que, si esta problemática no se

ataca, este número podría ascender a 160 mil millones para 2050 (McDonnell et al., 2024).

Los patógenos ESKAPE son un grupo de bacterias llamadas así por el acrónimo de sus nombres: *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacter* sp. Revisten particular interés por ser las principales causantes de enfermedades nosocomiales y se caracterizan por la importante incidencia de resistencia a antimicrobianos (Santajit & Indrawattana, 2016). *E. coli*, por su parte, es una bacteria comensal del tracto intestinal humano, aunque existen varias cepas patógenas que pueden causar afecciones como diarrea, desde moderada a severa y enterohemorrágica, o actuar como patógenos oportunistas en infecciones cuando se encuentran fuera de su hábitat (Santos Braz, 2020). Su capacidad de formar biofilms es particularmente relevante en infecciones del tracto urinario y los riñones (Perry, 2023).

Aproximadamente 6,55 millones de pacientes con condiciones subyacentes desarrollan infecciones fúngicas graves al año, 3,75 millones de ellos no sobreviven a las mismas. No existen datos certeros sobre la incidencia de estas infecciones en población sin otras condiciones, ya que los programas de vigilancia son limitados (GAFFI, 2025). Se estima que en 2019 en Estados Unidos las enfermedades fúngicas causaron un costo económico de 11,5 mil millones de dólares entre gastos médicos, pérdidas de productividad y muertes prematuras (Benedict et al., 2022).

Los biofilms son responsables de muchas de las infecciones en humanos, particularmente aquellas recurrentes o crónicas, estimándose una incidencia del 80% según la NIH. Se ha reportado que un 78,2% de las heridas crónicas tienen biofilms asociados y representan una problemática importante y de difícil resolución en patologías como fibrosis quística, endocarditis, sinusitis crónica, entre otras (Cámara et al., 2022).

Sin embargo, su mayor impacto se da por la asociación a superficies inertes, como implantes, catéteres, prótesis y otros dispositivos médicos. Las infecciones del torrente sanguíneo debidas a la inserción de catéteres centrales o periféricos son una importante porción de las infecciones adquiridas en hospitales, aumentando la morbilidad, mortalidad y costos hospitalarios. Diversos estudios han relacionado estas infecciones a la formación de biofilms en los dispositivos médicos. De la misma forma, las infecciones

urinarias asociadas a catéteres son las infecciones intrahospitalarias más comunes, representando un 70% de este tipo de infecciones. (Bouhrour et al., 2024). También se observan infecciones debidas a biofilms en marcapasos y válvulas cardíacas artificiales, prótesis e implantes mamarios, entre otros (Cámara et al., 2022). Las infecciones por levaduras del género *Candida* a nivel hospitalario representan una problemática importante, con tasas de mortalidad de hasta 70%; se ha observado que las infecciones dadas por cepas capaces de formar biofilms tienen peores desenlaces que aquellas incapaces de formarlos (Treviño-Rangel et al., 2018). Entre los patógenos fúngicos, *Candida albicans* es reconocida como una prioridad crítica, mientras que *Candida tropicalis* se clasifica como una prioridad alta (Lopez Venditti et al., 2025)

Por otro lado, el impacto de microorganismos fitopatógenos en cultivos agrícolas es importante y comprende varias facetas. Económicamente, implica costos por pérdida de cultivos, costos aumentados por manejo de infecciones y descenso de la capacidad de venta de los productos. Además, significan un importante problema de seguridad alimentaria al disminuir los rendimientos y calidad de cultivos, siendo el trigo y el arroz particularmente vulnerables (Savary et al., 2019). Desde el punto de vista ecológico, las enfermedades fúngicas pueden destruir cultivos hasta prácticamente su desaparición, como es el caso de las castañas americanas, papas, bananas, entre otros (Xing, 2024). Entre algunos ejemplos de microorganismos que perjudican los cultivos en Uruguay se encuentran aquellos pertenecientes a los géneros *Fusarium* (Brancatti et al., 2022), *Xanthomonas* (Clavijo et al., 2022), *Alternaria* (Kaspary et al., 2019) y *Rhizopus* (Barneche et al., 2016).

Los biofilms también inciden en los sectores agropecuario e industrial. Afectan el crecimiento de cultivos, disminuyen la productividad ganadera y la industria láctea debido a las infecciones en animales, afectan los sistemas de distribución de agua, ya sea por persistencia de patógenos en sistemas que distribuyen agua potable, como por reducción en la transferencia de calor en sistemas de calentamiento y refrigeración a nivel industrial, contaminan alimentos empaquetados, etc. (Cámara et al., 2022).

En este contexto de resistencia descontrolada y cada vez menos soluciones innovadoras o nuevos descubrimientos de antimicrobianos, la Organización Mundial de la Salud advierte sobre un futuro “post-antimicrobianos”, donde se revertirán los avances en la medicina hechos en los últimos 100 años y las infecciones más sencillas se volverán imposibles de combatir (Llor & Bjerrum, 2014; OMS, 2025)

La solución está en la naturaleza

Los metabolitos secundarios son compuestos producidos por organismos que no suelen estar involucrados en su crecimiento y desarrollo. Se producen a partir de metabolitos primarios y se utilizan como mecanismos de defensa, comunicación, atracción de polinizadores, entre otras funciones (Agostini-Costa et al., 2012).

Las plantas son una invaluable fuente de metabolitos secundarios en respuesta a ataques de herbívoros, microorganismos, estrés abiótico, entre otros. Desde tiempos antiguos, los seres humanos han usado estos metabolitos como medicina, alimento, pigmentos o conservantes (Álvarez-Martínez et al., 2021). Los reportes de uso de plantas medicinales se remontan al antiguo Egipto. La primera farmacopea descubierta es el Papiro de Ebers, que data del año 1500 a.C; en él se describen remedios para variadas afecciones, la mayoría de ellos provenientes de plantas como azafrán, mirra, aloe, cáñamo, etc., así como otros compuestos obtenidos de insectos y arañas (Petrovska, 2012).

La mayoría de los compuestos antimicrobianos que se utilizan actualmente provienen de fuentes naturales, ya sea como tales o modificados para mejorar sus efectos (Guglielmi et al., 2020; Zouine et al., 2024). Existen reportes de diversos compuestos naturales con propiedades antimicrobianas, como polifenoles, terpenoides, cumarinas, saponinas, alcaloides, tiofenoles, azúcares, resinas, glicosinolatos, péptidos, entre otros (Yarmolinsky et al., 2024).

Los polifenoles, como flavonoides, estilbenos, ácidos fenólicos y taninos, son un grupo diverso de compuestos con una amplia gama de actividades. Poseen actividad antibacteriana y antifúngica debida a varios mecanismos, como la inhibición enzimática,

desestabilización y permeabilización de la membrana celular, generación de especies reactivas del oxígeno, entre otras (Mandal & Domb, 2024). El resveratrol, por ejemplo, posee actividad antimicrobiana contra *P. aeruginosa* y es capaz de inhibir el mecanismo de *quorum-sensing* en bacterias gram negativas (Zhou et al., 2018), mientras que el fenetiléster de ácido cafeico presenta marcada actividad contra patógenos orales, particularmente *Streptococcus mutans*, tanto en su forma planctónica como en forma de biofilm (Niu et al., 2020).

Los alcaloides son compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno, habitualmente aislados de plantas u hongos. Se ha demostrado ampliamente su actividad antimicrobiana, siendo los principales mecanismos de acción la inhibición metabólica, inhibición de la síntesis de pared celular, aumento de la permeabilidad, e inhibición de la síntesis proteica y de ácidos nucleicos (Yan et al., 2021). La sanguinarina, un alcaloide de la familia de las benzofenantridinas es capaz de inhibir el crecimiento de *S. aureus* al aumentar la permeabilidad de su pared celular e inducir la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Gu et al., 2023).

Por su parte, se ha determinado que los terpenos y terpenoides poseen actividad antimicrobiana mayormente debido a alteraciones en la estructura celular y alteraciones en la función respiratoria y enzimática, así como potenciamiento de actividad antimicrobiana de otros compuestos por bloqueo de bombas de eflujo (Angane et al., 2022; Guimarães et al., 2019).

Los péptidos antimicrobianos son pequeñas moléculas polipeptídicas, anfifílicas y catiónicas, que interactúan con las membranas celulares de los microorganismos y deben a eso su actividad antimicrobiana (Roque-Borda et al., 2024). Se caracterizan por su rápida acción. Por ejemplo, el péptido mBjAMP1 es capaz de eliminar totalmente a *S. aureus* y *E. coli* en períodos de pocas horas, mientras que PaDBS1R1 puede hacerlo en sólo minutos (Luong et al., 2020). El péptido PdSN1 muestra actividad contra varios hongos como *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *C. albicans* entre otros (Rodríguez-Decuadro et al., 2018).

Algunos compuestos no tienen actividad antimicrobiana *per-se*, sin embargo, funcionan en combinación con antimicrobianos conocidos, o interviniendo en mecanismos de

resistencia, como previamente se mencionó, como es el caso de los ácidos elágico o tánico, que actúan inhibiendo bombas de eflujo y así aumentando la actividad antimicrobiana de otros compuestos (Cheesman et al., 2017; Yarmolinsky et al., 2024). También existen productos naturales que interfieren con mecanismos de virulencia de los microorganismos, como *quorum-sensing* o formación de biofilms (Guglielmi et al., 2020). Por ejemplo, los extractos etanólicos de *Passiflora edulis* reducen la formación de biofilms, la motilidad y la comunicación por *quorum-sensing* de *Chromobacterium violaceum* (Venkatramanan et al., 2020).

Teniendo en cuenta la creciente y rápida aparición de resistencia, los extractos de plantas son una promisoría alternativa a los antimicrobianos convencionales (Zouine et al., 2024). Los mismos pueden contener de cientos a miles de compuestos individuales. Tradicionalmente, se ha buscado atribuir la actividad de los mismos a los compuestos de mayor abundancia, sin embargo, se ha visto que, en muchos casos, al aislarlos, la actividad disminuye significativamente o hasta aparece toxicidad (Rajčević et al., 2022), debido a los efectos sinérgicos de los compuestos. Además, se ha demostrado que la aparición de resistencia tiene menos probabilidades de ocurrir en presencia de varios compuestos bioactivos con diferentes mecanismos de acción, ya que depende de la aparición simultánea y selección de diversos mecanismos de resistencia (Ahmed et al., 2023; Suganya et al., 2022; Vaou et al., 2022).

Dada la complejidad de los mecanismos de formación de biofilms, los extractos naturales podrían ser una promisoría forma de combatirlos, considerando la posibilidad de tener, en el mismo extracto, varias moléculas que interfieran en diferentes etapas de la formación (Ghosh et al., 2021). La actividad antibiofilm de productos naturales se basa mayormente en inhibición de la formación de la matriz, supresión de la adhesión celular y regulación de *quorum-sensing* (Lu et al., 2019). Varios ejemplos de inhibición de mecanismos de formación de biofilms se presentan en la Figura 1.5. Los extractos de algas marinas, por ejemplo, presentan actividad antibiofilm, donde se observa acción sobre diferentes mecanismos de formación de biofilms como la adhesión y la producción de proteínas de la matriz (Rima et al., 2022).

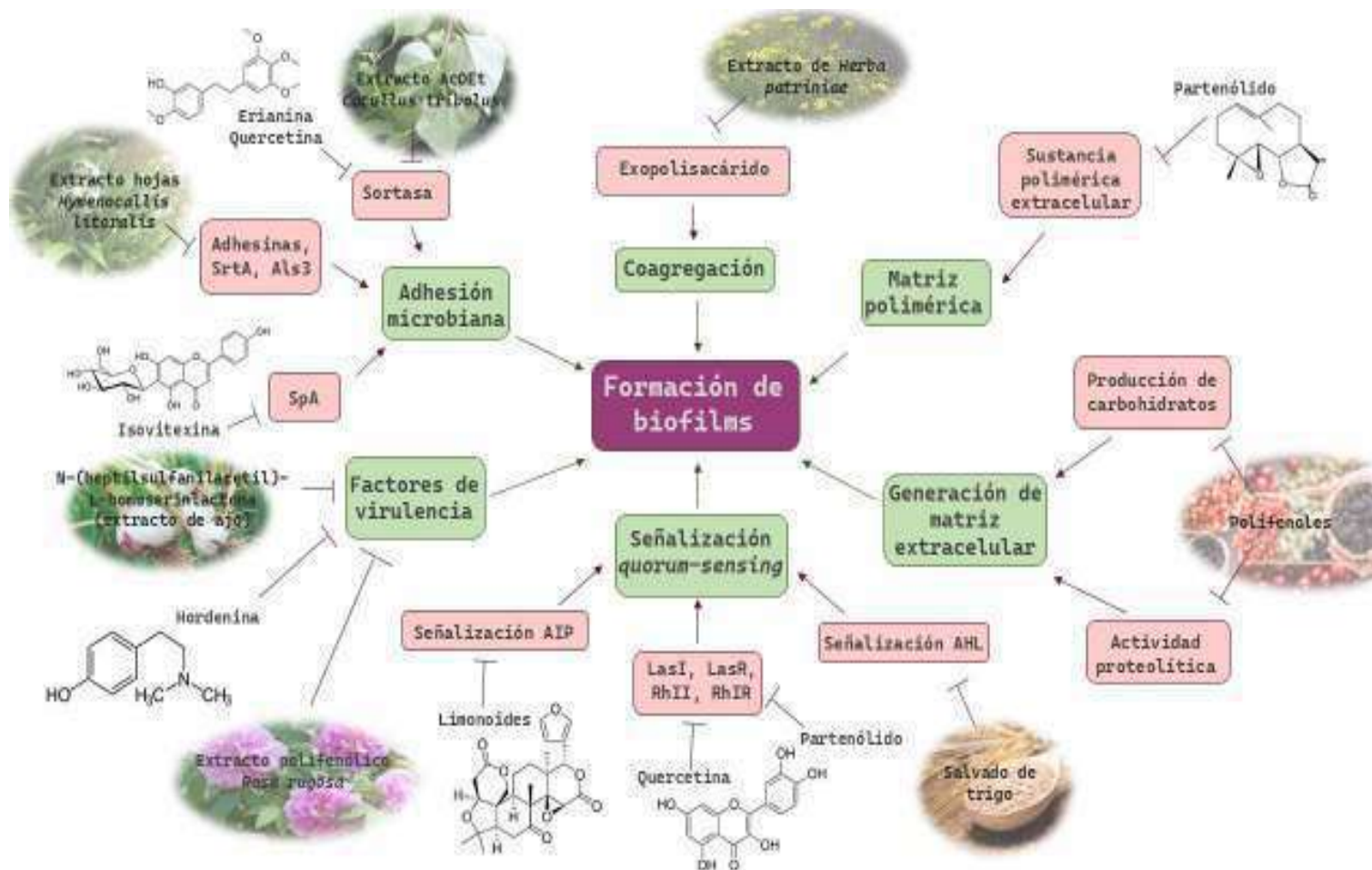


Figura 1.5. Imagen adaptada de (Ghosh et al., 2021). Inhibición de mecanismos de formación de biofilms por diferentes productos naturales.

Relevancia en Uruguay

En Uruguay, el estudio de los biofilms y la búsqueda de nuevas estrategias antimicrobianas ha cobrado creciente relevancia ante el incremento de aislamientos resistentes a múltiples drogas reportados en hospitales y en el ámbito agropecuario. Diversos grupos de investigación nacionales, dentro de los cuales se encuentra el grupo

interdisciplinario de Facultad de Química en el cual se enmarca esta tesis, han comenzado a abordar esta problemática desde distintas perspectivas, incluyendo la caracterización de microorganismos y biofilms microbianos, así como la búsqueda de estrategias para su control. Estos antecedentes ponen de manifiesto el potencial de la biodiversidad microbiana y vegetal nacional como fuente de metabolitos con valor biotecnológico, y refuerzan la necesidad de profundizar en la investigación de productos naturales que puedan contribuir al desarrollo de alternativas sostenibles frente al avance de la resistencia antimicrobiana.

Es así que en esta tesis se retoma una de las estrategias más fructíferas en la historia de la microbiología y la biotecnología: la exploración de compuestos naturales producidos por microorganismos y plantas. A partir de caldos de cultivo de microorganismos del suelo y del intestino de insectos, así como de extractos vegetales, provenientes de Uruguay, se buscó identificar metabolitos con capacidad para inhibir el crecimiento de patógenos o interferir en la formación y persistencia de biofilms.

El trabajo se enfocó en microorganismos de relevancia clínica y agrícola, incluyendo bacterias del grupo ESKAPE, levaduras del género *Candida* y microorganismos fitopatógenos, tanto en su estado planctónico como en su organización en biofilms. Los resultados obtenidos revelaron extractos con notoria actividad inhibitoria y erradicatoria, abriendo perspectivas para el desarrollo de nuevas estrategias antimicrobianas basadas en productos naturales. De este modo, esta tesis contribuye al conocimiento sobre la diversidad química y biológica de metabolitos naturales, su potencial biotecnológico y su posible papel en la mitigación de uno de los problemas más urgentes de la actualidad: la resistencia microbiana y la persistencia asociada a la formación de biofilms.

Objetivo general

El objetivo de esta tesis es explorar y caracterizar compuestos naturales y sus mezclas, obtenidos a partir de microorganismos y plantas, con capacidad para inhibir el crecimiento, la formación y/o la persistencia de biofilms de microorganismos patógenos

de relevancia clínica y agrícola, a fin de contribuir al desarrollo de alternativas naturales para el control microbiano y la mitigación de la resistencia antimicrobiana.

Objetivos específicos

- ❖ Extraer compuestos naturales a partir de caldos de cultivo de microorganismos
- ❖ Extraer compuestos naturales a partir de plantas
- ❖ Determinar la actividad inhibitoria del crecimiento microbiano de los extractos contra patógenos humanos y vegetales
- ❖ Determinar la actividad inhibitoria y erradicatoria de biofilms de los extractos contra patógenos humanos
- ❖ Evaluar posibles mecanismos de acción de extractos con actividad antibiofilm
- ❖ Determinar la estructura de los compuestos más relevantes presentes en los extractos
- ❖ Correlacionar la presencia de compuestos con la actividad antibiofilm de los extractos

Bibliografía

- Agostini-Costa, T. da S., Vieira, R. F., Bizzo, H. R., Silveira, D., & Gimenes, M. A. (2012). Secondary Metabolites. *Chromatography and Its Applications*. <https://doi.org/10.5772/35705>
- Ahmed, S., Ahmed, M. Z., Rafique, S., Almasoudi, S. E., Shah, M., Jalil, N. A. C., & Ojha, S. C. (2023). Recent Approaches for Downplaying Antibiotic Resistance: Molecular Mechanisms. *BioMed Research International* (Vol. 2023). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2023/5250040>
- Almatroudi, A. (2025). Biofilm Resilience: Molecular Mechanisms Driving Antibiotic Resistance in Clinical Contexts. In *Biology* (Vol. 14, Issue 2). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/biology14020165>
- Álvarez-Martínez, F. J., Barrajón-Catalán, E., Herranz-López, M., & Micol, V. (2021). Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. *Phytomedicine* (Vol. 90). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153626>
- Angane, M., Swift, S., Huang, K., Butts, C. A., & Quek, S. Y. (2022). Essential Oils and Their Major Components: An Updated Review on Antimicrobial Activities, Mechanism of Action and Their Potential Application in the Food Industry. *Foods* (Vol. 11, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/foods11030464>
- Barneche, S., Jorcin, G., Cecchetto, G., Cerdeiras, M. P., Vázquez, A., & Alborés, S. (2016). Screening for Antimicrobial Activity of Wood Rotting Higher Basidiomycetes Mushrooms from Uruguay against Phytopathogens. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 18(3), 261–267. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.v18.i3.90>
- Belay, W. Y., Getachew, M., Tegegne, B. A., Teffera, Z. H., Dagne, A., Zeleke, T. K., Abebe, R. B., Gedif, A. A., Fenta, A., Yirdaw, G., Tilahun, A., & Aschale, Y. (2024). Mechanism of antibacterial resistance, strategies and next-generation antimicrobials to contain antimicrobial resistance: a review. *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 15). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1444781>
- Bender, R. G., Sirota, S. B., Swetschinski, L. R., Dominguez, R.-M. V., Novotney, A., Wool, E. E., Ikuta, K. S., Vongpradith, A., Rogowski, E. L. B., Doxey, M., Troeger, C. E., Albertson, S. B., Ma, J., He, J., Maass, K. L., A.F.Simões, E., Abdoun, M., Abdul Aziz, J. M., Abdullah, D. M., Kyu, H. H. (2024). Global, regional, and national incidence and mortality burden of non-COVID-19 lower respiratory infections and aetiologies, 1990–

- 2021: A Systematic Analysis from the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet Infectious Diseases*, 24(9), 974–1002. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(24\)00176-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(24)00176-2)
- Benedict, K., Whitham, H. K., & Jackson, B. R. (2022). Economic Burden of Fungal Diseases in the United States. *Open Forum Infectious Diseases*, 9(4). <https://doi.org/10.1093/ofid/ofac097>
- Bouhrour, N., Nibbering, P. H., & Bendali, F. (2024). Medical Device-Associated Biofilm Infections and Multidrug-Resistant Pathogens. *Pathogens* (Vol. 13, Issue 5). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/pathogens13050393>
- Brancatti, G., Garmendia, G., Pereyra, S., & Vero, S. (2022). Current species composition of *Fusarium* population affecting the main wheat-growing regions in Uruguay and evolution of their sensitivity to triazoles after long-term application. *International Journal of Pest Management*, 68(4), 349–358. <https://doi.org/10.1080/09670874.2022.2129509>
- Cámara, M., Green, W., MacPhee, C. E., Rakowska, P. D., Raval, R., Richardson, M. C., Slater-Jefferies, J., Steventon, K., & Webb, J. S. (2022). Economic significance of biofilms: a multidisciplinary and cross-sectoral challenge. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41522-022-00306-y>
- Cebrián-Sastre, E., Chiner-Oms, A., Torres-Pérez, R., Comas, I., Oliveros, J. C., Blázquez, J., & Castañeda-García, A. (2023). Selective Pressure by Rifampicin Modulates Mutation Rates and Evolutionary Trajectories of Mycobacterial Genomes. *Microbiology Spectrum*, 11(4). <https://doi.org/10.1128/spectrum.01017-23>
- Cheesman, M. J., Ilanko, A., Blonk, B., & Cock, I. E. (2017). Developing new antimicrobial therapies: Are synergistic combinations of plant extracts/compounds with conventional antibiotics the solution? *Pharmacognosy Reviews* (Vol. 11, Issue 22, pp. 57–72). Medknow Publications. https://doi.org/10.4103/phrev.phrev_21_17
- Clavijo, F., Curland, R. D., Croce, V., Lapaz, M. I., Dill-Macky, R., Pereyra, S., & Siri, M. I. (2022). Genetic and Phenotypic Characterization of *Xanthomonas* Species Pathogenic in Wheat in Uruguay. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-21-0231-R>, 112(3), 511–520. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-21-0231-R>
- Costa-Orlandi, C. B., Sardi, J. C. O., Pitangui, N. S., de Oliveira, H. C., Scorzoni, L., Galeane, M. C., Medina-Alarcón, K. P., Melo, W. C. M. A., Marcelino, M. Y., Braz, J. D., Fusco-Almeida, A. M., & Mendes-Giannini, M. J. S. (2017). Fungal biofilms and polymicrobial diseases. *Journal of Fungi* (Vol. 3, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/jof3020022>

- Cox, G., & Wright, G. D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology* (Vol. 303, Issues 6–7, pp. 287–292). <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.009>
- Czajka, K. M., Venkataraman, K., Brabant-Kirwan, D., Santi, S. A., Verschoor, C., Appanna, V. D., Singh, R., Saunders, D. P., & Tharmalingam, S. (2023). Molecular Mechanisms Associated with Antifungal Resistance in Pathogenic *Candida* Species. In *Cells* (Vol. 12, Issue 22). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/cells12222655>
- Delcour, A. H. (2009). Outer membrane permeability and antibiotic resistance. In *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* (Vol. 1794, Issue 5, pp. 808–816). <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005>
- Demerec M. Origin of Bacterial Resistance to Antibiotics. *Journal of Bacteriology*. 1948 Jul;56(1):63-74. doi: 10.1128/jb.56.1.63-74.1948. PMID: 16561548; PMCID: PMC518544.
- Estany-Gestal, A., Salgado-Barreira, A., & Vazquez-Lago, J. M. (2024). Antibiotic Use and Antimicrobial Resistance: A Global Public Health Crisis. *Antibiotics* (Vol. 13, Issue 9). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/antibiotics13090900>
- Fakhoury, A. A., Thompson, T. P., Rahman, K. M., Megaw, J., McAteer, M. I., Skvortsov, T., Kelly, S. A., & Gilmore, B. F. (2024). Identification and characterisation of two functional antibiotic MATE efflux pumps in the archaeon *Halorubrum amylolyticum*. *Npj Antimicrobials and Resistance*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/s44259-024-00036-5>
- FAO, UNEP, WHO, & WHOA. (2022). One health joint plan of action (2022–2026): working together for the health of humans, animals, plants and the environment. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240059139>
- 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., & Wuertz, S. (2019). Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 17(4), 247–260. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0158-9>
- Fred, E. B. (1932). Antony Van Leeuwenhoek: On the three-hundredth anniversary of his birth. *Journal of Bacteriology*, XXV(1), 1–18.
- GAFFI. (2025). Fungal Disease Frequency - Gaffi. <https://gaffi.org/why/fungal-disease-frequency/>

- Galgano, M., Pellegrini, F., Catalano, E., Capozzi, L., Del Sambro, L., Sposato, A., Lucente, M. S., Vasinioti, V. I., Catella, C., Odigie, A. E., Tempesta, M., Pratelli, A., & Capozza, P. (2025). Acquired Bacterial Resistance to Antibiotics and Resistance Genes: From Past to Future. *Antibiotics* (Vol. 14, Issue 3). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/antibiotics14030222>
- Gaurav, A., Bakht, P., Saini, M., Pandey, S., & Pathania, R. (2023). Role of bacterial efflux pumps in antibiotic resistance, virulence, and strategies to discover novel efflux pump inhibitors. *Microbiology (United Kingdom)* (Vol. 169, Issue 5). Microbiology Society. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001333>
- Ghosh, S., Turner, R. J., Bhagwat, T., & Webster, T. J. (2021). Novel and Future Treatment Strategies for Biofilm-Associated Infections. *Biofilm-Mediated Diseases: Causes and Controls* (pp. 239–276). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-0745-5_10
- Grooters, K. E., Ku, J. C., Richter, D. M., Krinock, M. J., Minor, A., Li, P., Kim, A., Sawyer, R., & Li, Y. (2024). Strategies for combating antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 14). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1352273>
- Gu, Y., Dong, J., Li, J., Luo, Q., Dong, X., Tang, G., Zhang, J., Du, X., Pi, Q., He, L., Zhao, K., Han, D., & Xin, J. (2023). Antibacterial activity and mechanism of sanguinarine against *Staphylococcus aureus* by interfering with the permeability of the cell wall and membrane and inducing bacterial ROS production.
- Guglielmi, P., Pontecorvi, V., & Rotondi, G. (2020). Natural compounds and extracts as novel antimicrobial agents. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* (Vol. 30, Issue 12, pp. 949–962). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/13543776.2020.1853101>
- Guimarães, A. C., Meireles, L. M., Lemos, M. F., Guimarães, M. C. C., Endringer, D. C., Fronza, M., & Scherer, R. (2019). Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils. *Molecules*, 24(13). <https://doi.org/10.3390/molecules24132471>
- Hunt D, Kates OS. A Brief History of Antimicrobial Resistance. *AMA J Ethics*. 2024 May 1;26(5):E408-417. doi: 10.1001/amajethics.2024.408. PMID: 38700525.O. S. (2024). E408-417 history of medicine: peer-reviewed article A Brief History of Antimicrobial Resistance. In *AMA Journal of Ethics* (Vol. 26, Issue 5).
- Iskandar, K., Murugaiyan, J., Halat, D. H., Hage, S. El, Chibabhai, V., Adukkadukkam, S., Roques, C., Molinier, L., Salameh, P., & Van Dongen, M. (2022). Antibiotic Discovery and Resistance: The Chase and the Race. *Antibiotics* (Vol. 11, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020182>

- Jacobson, E. S., & Ikeda, R. (2005). Effect of melanization upon porosity of the cryptococcal cell wall. *Medical Mycology*, 43(4), 327–333.
<https://doi.org/10.1080/13693780412331271081>
- Kaspary, T. E., García, M. A., Stewart, S., Casaroto, G., Ramos, R. F., & Bellé, C. (2019). First Report of *Alternaria alternata* Causing Leaf Spot on *Rumex crispus* in Uruguay. *Plant Disease*, 103(8), 2139. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-19-0590-PDN>
- Khelaifia, S., & Drancourt, M. (2012). Susceptibility of archaea to antimicrobial agents: Applications to clinical microbiology. *Clinical Microbiology and Infection* (Vol. 18, Issue 9, pp. 841–848). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03913.x>
- Lee, Y., Robbins, N., & Cowen, L. E. (2023). Molecular mechanisms governing antifungal drug resistance. *Npj Antimicrobials and Resistance*, 1(1). <https://doi.org/10.1038/s44259-023-00007-2>
- Lenardon, M. D., Munro, C. A., & Gow, N. A. R. (2010). Chitin synthesis and fungal pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 13, Issue 4, pp. 416–423). <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.05.002>
- Llor, C., & Bjerrum, L. (2014). Antimicrobial resistance: Risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem. *Therapeutic Advances in Drug Safety* (Vol. 5, Issue 6, pp. 229–241). <https://doi.org/10.1177/2042098614554919>
- Lopez Venditti, E. D., Crespo Andrada, K. F., Bustos, P. S., Maldonado Torales, M., Manrique Hughes, I., Paraje, M. G., & Guiñazú, N. (2025). Antibacterial, antifungal, and antibiofilm activities of biogenic zinc nanoparticles against pathogenic microorganisms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 15, 1545119.
<https://doi.org/10.3389/FCIMB.2025.1545119/BIBTEX>
- Lu, L., Hu, W., Tian, Z., Yuan, D., Yi, G., Zhou, Y., Cheng, Q., Zhu, J., & Li, M. (2019). Developing natural products as potential anti-biofilm agents. *Chinese Medicine (United Kingdom)* (Vol. 14, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13020-019-0232-2>
- Luong, H. X., Thanh, T. T., & Tran, T. H. (2020). Antimicrobial peptides – Advances in development of therapeutic applications. *Life Sciences* (Vol. 260). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118407>
- Mandal, M. K., & Domb, A. J. (2024). Antimicrobial Activities of Natural Bioactive Polyphenols. In *Pharmaceutics* (Vol. 16, Issue 6). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16060718>

- McDonnell, A., Countryman, A., Laurence, T., Gulliver, S., Drake, T., Edwards, S., Kenny, C., Lamberti, O., Morton, A., Shafira, A., Smith, R., & Guzman, J. (2024). Forecasting the Fallout from AMR: Economic Impacts of Antimicrobial Resistance in Humans. A report from the EcoAMR series. <https://doi.org/10.20506/ecoAMR.3539>
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Niu Y, Wang K, Zheng S, Wang Y, Ren Q, Li H, Ding L, Li W, Zhang L. Antibacterial Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester on Cariogenic Bacteria and Streptococcus mutans Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapics*. 2020 Aug 20;64(9):e00251-20. doi: 10.1128/AAC.00251-20. PMID: 32540977; PMCID: PMC7449213.
- Osungunna, M. O. (2022). Biofilm: formation and natural products' approach to control – a review. *African Journal of Infectious Diseases*, 16(2S), 59–71.
- Perchikov, R., Cheliukanov, M., Plekhanova, Y., Tarasov, S., Kharkova, A., Butusov, D., Arlyapov, V., Nakamura, H., & Reshetilov, A. (2024). Microbial Biofilms: Features of Formation and Potential for Use in Bioelectrochemical Devices. *Biosensors* (Vol. 14, Issue 6). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/bios14060302>
- Petrovska, B. B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Reviews* (Vol. 6, Issue 11, pp. 1–5). <https://doi.org/10.4103/0973-7847.95849>
- Rajčević, N., Bukvički, D., Dodoš, T., & Marin, P. D. (2022). Interactions between Natural Products—A Review. *Metabolites* (Vol. 12, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/metabo12121256>
- Rajput, P., Nahar, K. S., & Rahman, K. M. (2024). Evaluation of Antibiotic Resistance Mechanisms in Gram-Positive Bacteria. *Antibiotics* (Vol. 13, Issue 12). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/antibiotics13121197>
- Reygaert, W. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>

- Rima, M., Chbani, A., Roques, C., & El Garah, F. (2022). Seaweed Extracts as an Effective Gateway in the Search for Novel Antibiofilm Agents against *Staphylococcus aureus*. *Plants*, 11(17). <https://doi.org/10.3390/plants11172285>
- Rodríguez-Decuadro, S., Barraco-Vega, M., Dans, P. D., Pandolfi, V., Benko-Iseppon, A. M., & Cecchetto, G. (2018). Antimicrobial and structural insights of a new snakin-like peptide isolated from *Peltophorum dubium* (Fabaceae). *Amino Acids* 2018 50:9, 50(9), 1245–1259. <https://doi.org/10.1007/s00726-018-2598-3>
- Roque-Borda, C. A., Primo, L. M. D. G., Franzyk, H., Hansen, P. R., & Pavan, F. R. (2024). Recent advances in the development of antimicrobial peptides against ESKAPE pathogens. *Heliyon* (Vol. 10, Issue 11). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e31958>
- Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Research International* (Vol. 2016). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>
- Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., McRoberts, N., & Nelson, A. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology & Evolution* 2019 3:3, 3(3), 430–439. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>
- Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., & Bjarnsholt, T. (2022). The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 20, Issue 10, pp. 608–620). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>
- Saxena, P., Joshi, Y., Rawat, K., & Bisht, R. (2019). Biofilms: Architecture, Resistance, Quorum Sensing and Control Mechanisms. *Indian Journal of Microbiology* (Vol. 59, Issue 1, pp. 3–12). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12088-018-0757-6>
- 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* (Vol. 11, Issue 6). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061614>
- Suganya, T., Packiavathy, I. A. S. V., Aseervatham, G. S. B., Carmona, A., Rashmi, V., Mariappan, S., Devi, N. R., & Ananth, D. A. (2022). Tackling Multiple-Drug-Resistant Bacteria With Conventional and Complex Phytochemicals. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.883839>
- Tomlinson, J. H., Thompson, G. S., Kalverda, A. P., Zhuravleva, A., & O'Neill, A. J. (2016). A target-protection mechanism of antibiotic resistance at atomic resolution: Insights into

- FusB-type fusidic acid resistance. *Scientific Reports*, 6.
<https://doi.org/10.1038/srep19524>
- Treviño-Rangel, R. de J., Peña-López, C. D., Hernández-Rodríguez, P. A., Beltrán-Santiago, D., & González, G. M. (2018). Association between *Candida* biofilm-forming bloodstream isolates and the clinical evolution in patients with candidemia: An observational nine-year single center study in Mexico. *Revista Iberoamericana de Micología*, 35(1), 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2017.01.005>
- Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C., Tsakris, Z., Rozos, G., Tsigalou, C., & Bezirtzoglou, E. (2022). Interactions between Medical Plant-Derived Bioactive Compounds: Focus on Antimicrobial Combination Effects. In *Antibiotics* (Vol. 11, Issue 8). MDPI.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics11081014>
- Venkatramanan, M., Sankar Ganesh, P., Senthil, R., Akshay, J., Veera Ravi, A., Langeswaran, K., Vadivelu, J., Nagarajan, S., Rajendran, K., & Shankar, E. M. (2020). Inhibition of Quorum Sensing and Biofilm Formation in *Chromobacterium violaceum* by Fruit Extracts of *Passiflora edulis*. *ACS Omega*, 5(40), 25605–25616.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02483>
- Walker, L., Sood, P., Lenardon, M. D., Milne, G., Olson, J., Jensen, G., Wolf, J., Casadevall, A., Adler-Moore, J., R Gow, N. A., & Joseph Heitman, E. (2018). The Viscoelastic Properties of the Fungal Cell Wall Allow Traffic of AmBisome as Intact Liposome Vesicles. <https://doi.org/10.1128/mBio>
- Walsh, T. R., Gales, A. C., Laxminarayan, R., & Dodd, P. C. (2023). Antimicrobial Resistance: Addressing a Global Threat to Humanity. In *PLoS Medicine* (Vol. 20, Issue 7 July). Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1004264>
- Wang, B., Chen, D., Chen, H., Wu, W., Cheng, K., Tao, Y., Zhang, L., Liu, C., Ou, D., Zhang, M., Tang, X., Wang, S., Wang, G., & Luo, B. (2025). Global, regional, and national incidence and mortality for enteric infections from 1990 to 2019. *BMC Public Health*, 25(1). <https://doi.org/10.1186/s12889-024-21270-6>
- Wang, T., Shi, X., Wu, Z., Zhang, J., Hao, J., Liu, P., & Liu, X. (2024). Carboxylesterase and Cytochrome P450 Confer Metabolic Resistance Simultaneously to Azoxystrobin and Some Other Fungicides in *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72(17), 9680–9690. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c02409>
- WHO. (2021). Resistencia a los antimicrobianos. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Wilson, D. N., Hauryliuk, V., Atkinson, G. C., & O'Neill, A. J. (2020). Target protection as a key antibiotic resistance mechanism. *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 18, Issue 11, pp. 637–648). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0386-z>

- Xing, Q. (2024). Plant Fungal Diseases: Threats, Impacts, and Sustainable Management Strategies. *J Plant Pathol Microbiol*, 15(2), 1000717. <https://doi.org/10.35248/2157-7471.24.15.717>
- Yan Y, Li X, Zhang C, Lv L, Gao B, Li M. Research Progress on Antibacterial Activities and Mechanisms of Natural Alkaloids: A Review. *Antibiotics* (Basel). 2021 Mar 19;10(3):318. doi: 10.3390/antibiotics10030318. PMID: 33808601; PMCID: PMC800352
- Yarmolinsky, L., Nakonechny, F., Haddis, T., Khalfin, B., Dahan, A., & Ben-Shabat, S. (2024). Natural Antimicrobial Compounds as Promising Preservatives: A Look at an Old Problem from New Perspectives. *Molecules* (Vol. 29, Issue 24). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/molecules29245830>
- Yu, S., Lu, X., & Lu, H. (2025). Marine microbial biofilms on diverse abiotic surfaces. In *Frontiers in Marine Science* (Vol. 12). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fmars.2025.1482946>
- Zhou, J. W., Chen, T. T., Tan, X. J., Sheng, J. Y., & Jia, A. Q. (2018). Can the quorum sensing inhibitor resveratrol function as an aminoglycoside antibiotic accelerant against *Pseudomonas aeruginosa*? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52(1), 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.03.002>
- Zouine, N., Ghachtouli, N. El, Abed, S. El, & Koraichi, S. I. (2024). A comprehensive review on medicinal plant extracts as antibacterial agents: Factors, mechanism insights and future prospects. *Scientific African* (Vol. 26). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2024.e02395>

CAPITULO 2. Metabolitos de Caldos de Cultivo

Introducción

Los metabolitos secundarios son moléculas producidas por los organismos que no necesariamente sostienen la vida, pero regulan la interacción de los organismos entre ellos y con su entorno (Bano et al., 2023). En los microorganismos, se producen principalmente durante la fase estacionaria del crecimiento, pudiendo ser utilizados como mecanismos de defensa, comunicación, eliminación de agentes tóxicos, entre otros (Abdel-Aziz et al., 2017; Shah et al., 2024). Su capacidad de producir metabolitos secundarios les permite vivir en ambientes muy variados. Estos metabolitos son conocidos, además, por sus diversos usos farmacológicos, entre ellos su actividad antimicrobiana.

Desde el descubrimiento de la penicilina en 1928, a partir del hongo *Penicillium notatum*, el uso de metabolitos de microorganismos con actividad antimicrobiana fue aumentando considerablemente, dándose entre 1940 y 1960 la llamada “Era dorada de los antibióticos”. El género más prolífico de bacterias productoras de antimicrobianos hasta ahora ha sido *Actinomycetes*, produciendo grupos como aminoglicosidos, tetraciclinas, amfenicoles, macrólidos, tuberactinomicinas, glicopéptidos, lincosamidas, ansamisinias, cicloserinas, estreptograminas, fosfonatos, carbapenems, lipopéptidos y lipiarmicinas. De otros géneros de bacterias se aislaron polipéptidos, bacitracina, polimixinas, mupirocina y monobactamas, mientras que de los hongos se aislaron las penicilinas, eniantinas, ácido fusídico, cefalosporinas y pleuromutilinas. (Hutchings et al., 2019)

Los péptidos antimicrobianos son un grupo de péptidos pequeños ampliamente distribuidos en la naturaleza, que forman parte de las defensas de diversos organismos, como plantas, hongos y bacterias (Huan et al., 2020). Entre aquellos derivados de bacterias, podemos encontrar a las bacteriocinas, que son pequeños péptidos ribosomales, estables al calor y que pueden ser producidos tanto por bacterias Gram positivas como Gram negativas. Particularmente interesantes son aquellas producidas por bacterias lácticas, ya que presentan importantes propiedades antimicrobianas por diversos mecanismos, como permeabilización de la membrana, inhibición de la síntesis

de la pared celular y disrupción de varias vías metabólicas (Darbandi et al., 2022). Otros péptidos, en este caso péptidos cíclicos, como mathiapéptido A, destotamida B y marfomicinas A, B y E fueron aislados de *Marinactinospora thermotolerans*, *Streptomyces scopuliridis* y *Streptomyces drozdowiczii* y presentan actividad contra *S. aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis* (Danquah et al., 2022).

Los policétidos de espirotetratonato abisomicina C, loboforina F y H fueron aislados de distintas especies de *Streptomyces* y *Verrucosisspora*, presentando actividad contra *S. aureus* sensible y resistente a meticilina y vancomicina, así como *Enterococcus faecalis* y *B. subtilis*. También de *Streptomyces* sp. fueron aislados derivados de sesquiterpenos como marfuraquinocina A y D y alcaloides como la caboxamicina, activos contra *S. aureus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus epidermis* y *Staphylococcus lentus* (Danquah et al., 2022)

Los productos naturales no sólo han sido utilizados *per se* sino que han representado una plataforma para la producción de nuevos quimioterápicos sintéticos o semisintéticos. Por ejemplo, la tigegiclina es un derivado semisintético de la clortetraciclina, producida por *Streptomyces aurofaciens*; las penicilinas semisintéticas como ampicilina, amoxicilina, oxacilina derivan de la penicilina G, aislada de *P. notatum*; las cefalosporinas como cefazolina, ceftazidima son derivadas del hongo *Cephalosporium acremonium*; a partir de la thienamicina, aislada de *Streptomyces cattleya* se sintetizaron imipenem, meropenem y ertapenem; entre otros numerosos ejemplos. (Abdel-Razek et al., 2020; Rajeev, 2018; Yook et al., 2025)

Nuestro grupo ha trabajado en la bioprospección de compuestos antimicrobianos a partir de microorganismos, particularmente hongos basidiomicetes provenientes de colectas realizadas en nuestro país (Alborés, Bustamante, et al., 2014; Alborés, Mora, et al., 2014; Barneche et al., 2017). Además, el grupo trabajó en la bioprospección de hongos filamentosos de la Antártida productores de metabolitos antimicrobianos (Albores et al., 2018).

En este capítulo se describe el relevamiento de actividad antimicrobiana y antibiofilm de extractos provenientes de caldos de cultivo de diferentes cepas bacterianas provenientes de la colección del Laboratorio de Producción de INIA Las Brujas. Dichas cepas fueron previamente aisladas de muestras de suelo rizosférico y del tracto digestivo de insectos y también identificadas, disponiéndose de los genomas de algunas de ellas (Genebank, BioProject PRJNA745340, accesión JAIQVG000000000: (Abreo et al., 2021; Abreo & Altier, 2019). Los cultivos puros fueron depositados en la Colección de Cultivos Bacterianos de INIA Las Brujas (ILBB) (Tabla 2.1). Dichas cepas se estudian por sus usos agrícolas como promotores del crecimiento vegetal, donde el interés se centra en la biomasa celular. A partir de su cultivo, se obtiene el medio extracelular como subproducto y este capítulo se centra en el estudio de sus metabolitos como una forma de aportar más valor a esta producción. El esquema de trabajo se representa en la Figura 2.1.

Algunos resultados de este capítulo se publicaron en el artículo “Bioprospecting the Antibiofilm and Antimicrobial Activity of Soil and Insect Gut Bacteria”, por los autores Sofía Raffaelli, Eduardo Abreo, Nora Altier, Álvaro Vázquez y Silvana Alborés en la revista *Molecules* en 2022 (Anexo III).

Este trabajo continúa mostrando la relevancia de la biodiversidad de nuestro país, ampliando las posibilidades de estudio de fuentes naturales para atacar problemáticas tan complejas como las de las enfermedades infecciosas.

Tabla 2.1. Cepas bacterianas relevadas en la producción de extractos antimicrobianos.

Código	Cepa bacteriana
ILBB15	<i>Peribacillus butanolivorans</i>
ILBB63	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>
ILBB68	<i>Paenibacillus durus</i>
ILBB44	<i>Bacillus pumilus</i>
ILBB55	<i>Bacillus cereus</i>
ILBB7	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>
ILBB19	<i>Bacillus thuringiensis</i>

ILBB139	<i>Bacillus wiedmannii</i>
ILBB172	<i>Priestia megaterium</i>
ILBB95	<i>Priestia megaterium</i>
ILBB 162	<i>Serratia bockelmannii</i>
ILBB 145	<i>Serratia ureilytica</i>
ILBB 219	<i>Serratia nevei</i>

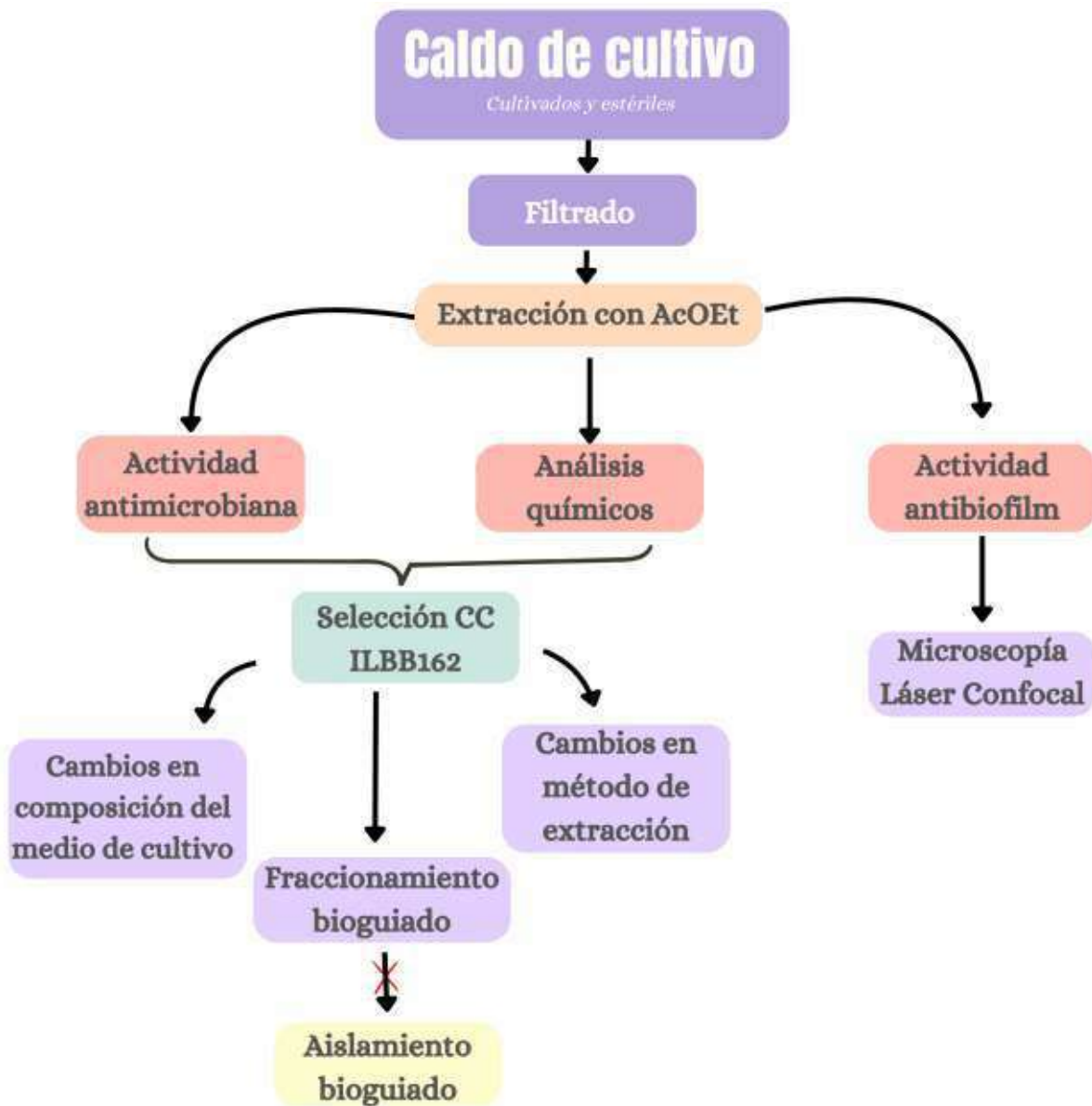


Figura 2.1. Representación esquemática del trabajo realizado.

Materiales y métodos

Reactivos y Solventes

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica. Los solventes fueron de calidad analítica, HPLC o HPLC/MS según el caso.

Los estándares fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (St. Louis, EE. UU.), los caldos de cultivo a Thermo Fisher Scientific (CA, EE. UU.)

Material biológico y cultivos

Para este trabajo, las bacterias se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 500 ml con 200 ml de medio Luria-Bertani (LB) líquido modificado, incubados en un agitador rotatorio a 180 rpm, a 25 °C durante 48 horas. Como control se utilizó caldo estéril sin inocular (denominado "CC Blanco" en esta tesis), con el objetivo de evaluar la posible influencia de los componentes del medio en la actividad antimicrobiana y antibiofilm observada.

Adicionalmente, se realizaron cultivos en medio LB líquido modificado, preparado con 10 g/L de peptona y 10 g/L de NaCl, variando la concentración de extracto de levadura (EL). En lugar de la concentración estándar de 0,5 %, se emplearon concentraciones reducidas de 0,1 %, 0,05 % y una condición sin EL (0 %), siguiendo el mismo protocolo de incubación descrito anteriormente.

Los caldos de cultivo fermentados y estériles fueron suministrados para esta tesis por el Laboratorio de Bioproducción de INIA Las Brujas. Para los ensayos de actividad antimicrobiana se utilizaron microorganismos depositados en la Colección de la Cátedra de Microbiología, provenientes de distintas colecciones (ATCC: American Type Culture Collection; CCMG: Colección de la Cátedra de Microbiología General). Las cepas de bacterias y hongos utilizadas para los ensayos de Concentración Inhibitoria Mínima y bioautografía fueron los siguientes: *A. baumannii* CCMGb1, *E. cloacae* CCMGb3, *E. faecalis* CCMGb2, *K. pneumoniae* CCMG12716, *P. aeruginosa* ATCC15442, *S. aureus* ATCC6538, *Xanthomonas vesicatoria* CCMG28m, *Candida albicans* ATCC 101231, *Fusarium graminearum* CCMG31084, *Alternaria alternata* CCMG54027, *Rhizopus stolonifer* ATCC6227B, *Candida tropicalis* ATCC 66029.

Preparación de extractos

Extracción por partición líquido-líquido

Todos los caldos de cultivo (CC), nombrados en esta tesis con el código de cepa de la cual se realizó el cultivo, se saturaron con NaCl (*salting-out*) y se filtraron a través de algodón. Luego se realizó una extracción líquido-líquido utilizando tres porciones de acetato de etilo (AcOEt). Las tres porciones se combinaron y el solvente se evaporó al vacío a 50°C hasta sequedad. Los extractos secos se pesaron y se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) para los ensayos biológicos.

Además, para el CC ILBB162, se realizó la comparación entre tres métodos de extracción: partición líquido-líquido descrita anteriormente, extracción con resina y liofilización y posterior reconstitución. A pesar de que el método de partición líquido-líquido usado inicialmente es adecuado para extraer metabolitos de interés, se evaluaron otros métodos de forma de poder escalar el método y obtener mayores rendimientos.

Extracción con resina

Se realizaron extracciones con resinas Amberlite® XAD-2 20-60 mesh (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE. UU.), para la adsorción de compuestos orgánicos de polaridad media a baja, utilizando una adaptación del método de Istasse et al. (2016). Para esto, se realizó un lavado de 100 g de resina con 500 ml de NaOH 1M:Isopropanol (1:1) durante 30 min con agitación magnética, y luego dos lavados con 250 ml de MeOH, agitándose durante 15 minutos a 150rpm. Se enjuagó la resina dos veces con 250 ml de agua destilada y se puso en contacto con un litro de caldo de cultivo durante 24hs a 25°C, en agitador orbital. Una vez transcurrido el tiempo, se lavó la resina con 500 ml de agua destilada, agitando durante 15 minutos a 150 rpm, y luego con 250 ml de MeOH, que se retiró de inmediato. Luego se procedió a realizar la desorción con 250 ml de MeOH y agitación durante 30 minutos a 150 rpm, y posteriormente dos veces con 250 ml de AcOEt, agitando durante 60 minutos a 150 rpm cada vez. La desorción con MeOH y AcOEt fueron evaluadas individualmente.

Liofilización y posterior reconstitución en AcOEt y filtración

Se liofilizaron 200 ml de CC ILBB162. Se resuspendieron en 40 ml de AcOEt y se sonicaron durante 7 minutos, repitiendo el procedimiento tres veces. Finalmente, se juntaron las tres porciones, se filtraron y se evaporaron a vacío.

Cromatografía en capa fina

Se realizaron cromatografías en capa fina para todas las muestras con fase estacionaria sílica gel (SIL G-50 UV254, Macherey-Nagel®, Düren, DE) y diferentes fases móviles constituidas por distintas combinaciones de solventes (CH_2Cl_2 :MeOH). Se sembraron 20 μl de muestra a una concentración de 10 mg/ml.

Se reveló con CuSO_4 como revelador general, Fast Blue Salt para detectar compuestos fenólicos, reactivo de Draggendorf para detectar alcaloides, azul de bromofenol para detectar compuestos ácidos (Sarpong Group, 1962)

Además, para el extracto de CC ILBB162 en AcOEt, se realizó cromatografía preparativa en capa fina. Para ello en una placa de cromatografía en capa fina de 8x10 cm con fase estacionaria sílica gel (SIL G-50 UV254, Macherey-Nagel®, Düren, DE) se sembraron 0,5 ml de una solución de extracto de CC ILBB162 en AcOEt (20 mg/ml) y se desarrolló con una fase móvil CH_2Cl_2 :MeOH (90:10). Se dejó secar 24hs y se cortó aproximadamente 1 cm de placa de uno de los extremos. Esto se usó para realizar una bioautografía según el método que se describe en la sección de evaluación de actividad antimicrobiana en esta Tesis.

Purificación por Cromatografía Líquida Flash

Se utilizó cromatografía flash para el fraccionamiento del extracto CC ILBB162. 130 mg del extracto fueron disueltos en CH_2Cl_2 y aplicados en una columna de 4x10 cm rellena con 15 g de SilicaGel 0.04-0.063 mm (Macherey-Nagel, Düren, DE). Se utilizó un gradiente de CH_2Cl_2 /MeOH de 100:0 a 50:50. Se recogieron 11 fracciones de 15 mL que fueron subsiguientemente analizadas por TLC.

Purificación por extracción en fase sólida (SPE)

A partir de la extracción de CC ILBB162 en AcOEt, se resuspendieron 50 mg de extracto seco a 100 mg/ml en H₂O:MeOH (1:1). La columna SPE Bakerbond® Octadecyl C18 (J. T. Baker®, Fisher Scientific, CA, EE. UU.) fue activada con 5 ml de H₂O:MeOH (1:1). Se sembró 0,5 ml de la muestra y posteriormente se eluyó con 2ml de MeOH, 2 ml de acetona, 2 ml de acetona:hexano (1:1) y 2 ml de hexano.

Evaluación de actividad antimicrobiana

Determinación de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

La concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos se determinó mediante la técnica de microdilución de acuerdo con el Clinical and Laboratory Standards Institute (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020). Los análisis de CIM se llevaron a cabo en una placa de microdilución con 96 pocillos que contenían caldo Mueller-Hinton (NUNC® MicroWell, capacidad 300 µl, estéril, Thermo Fisher Scientific, NY, US). Los extractos se disolvieron en DMSO. Se prepararon las soluciones iniciales de los extractos y se realizaron diluciones seriadas adicionales de los extractos y DMSO. Realizadas las diluciones, en los pocillos de la microplaca se sembraron además suspensiones de los microorganismos a evaluar: bacterias: 3×10^8 células/ml (escala McFarland N°1) en suero fisiológico, levaduras: 3×10^6 células/ml (escala McFarland N°1) en suero fisiológico, hongos filamentosos: 1×10^6 esporas/ml en suero fisiológico con Tween 20 (conteo en cámara de Neubauer). Se prepararon controles positivos (control de crecimiento) que contenían inóculo y caldo estéril (sin extractos). También se prepararon controles negativos con soluciones antimicrobianas y caldo estéril para asegurar que no hubiera crecimiento (contaminación). La CIM se determinó como la menor concentración de extracto (agente antimicrobiano) que inhibía el crecimiento visible del microorganismo después de la incubación (24 horas a 37 °C para las bacterias y levaduras y 96 horas a 28 °C para los hongos filamentosos).

Bioautografía

Esta técnica se realizó como una adaptación del método planteado por Rahalison et al. (1991). Se realizó una cromatografía preparativa en capa fina de extracto de CC ILBB162 en AcOEt según la técnica explicada anteriormente, y se dejó secar la placa durante 24h. Se inocularon en agar nutriente fundido suspensiones de los microorganismos a evaluar: bacterias: 3×10^8 células/ml (escala McFarland N°1) en suero fisiológico, levaduras: 3×10^6 células/ml (escala McFarland N°1) en suero fisiológico, hongos filamentosos: 1×10^6 esporas/ml en suero fisiológico con Tween 20 (conteo en cámara de Neubauer). Se colocó la placa de TLC desarrollada sobre una placa de Petri estéril. Sobre la placa de TLC se colocó agar nutriente incorporado con el microorganismo a evaluar. Se incubó 24 horas a 37 °C para las bacterias y levaduras y 96 horas a 28 °C para los hongos filamentosos. Se reveló adicionando trifeniltetrazolio (TTZ) o iodonitrotetrazolio (INT) y se observó la aparición de halos de inhibición en las distintas fracciones de la placa de TLC. En otra placa de TLC se agregaron gentamicina o propiconazol como control positivo y los solventes de vehiculización y de fase móvil como controles negativos.

Evaluación de actividad antibiofilm

Ensayo de formación de biofilm

Se determinó la capacidad de las cepas microbianas para formar biofilms sobre superficies sólidas, teñidas con cristal violeta. El ensayo se ajustó a placas de microtitulación de 96 pocillos (NUNC® MicroWell, capacidad 300 µl, estéril, Thermo Fisher Scientific, NY, US) de acuerdo con el procedimiento publicado previamente (Marioni et al., 2016).

Las cepas utilizadas en estos ensayos fueron *Acinetobacter baumannii* CCMGb1, *Enterobacter cloacae* CCMGb3, *Enterococcus faecalis* CCMGb2, *Klebsiella pneumoniae* CCMG12716, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15442, *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Xanthomonas vesicatoria* CCMG28m, *Candida albicans* ATCC 101231, *Candida tropicalis* ATCC 66029.

Para ello se inoculó una suspensión de células bacterianas (1×10^7 células/ml) en caldo nutritivo estéril (Oxoid®, ThermoFischer Scientific, NY, US) y las placas se incubaron a 37°C durante 24 h sin agitación para permitir la fijación de las células en la superficie. Los pocillos de control contenían solo caldo nutritivo estéril. Después de la incubación, las células no adheridas se eliminaron lavando los pocillos con agua destilada. Luego, las placas se secaron durante 40 minutos a 50 °C antes de la tinción con cristal violeta (1% p/v). Los biofilms adheridos se lavaron con agua para eliminar el colorante no unido. Finalmente, el cristal violeta se extrajo con la solución blanqueadora (0,2 ml): etanol-acetona glacial (70:30). La densidad óptica (DO) se determinó a 590 nm utilizando un lector de microplacas. La DO promedio de la cepa se comparó con la DO promedio de los pocillos de control (DOc), ambas informadas como medias $\pm$ desviaciones estándar. Las cepas se clasificaron según su capacidad para formar biofilm siguiendo estos criterios: $DO \leq DOc$ = no productor de biofilm; $DOc < DO \leq (2 \times DOc)$ = productor débil de biofilm, $(2 \times DOc) < DO (4 \times DOc)$ = productor moderado de biofilm y $(4 \times DOc) < DO$ = productor fuerte de biofilm.

Para *C. albicans* y *C. tropicalis*, se incubó una suspensión de células de levadura (1×10^6 células/ml) en caldo papa dextrosa (PDB, Oxoid®, ThermoFischer Scientific, NY, US) durante 30 min en cada pocillo de la placa (excepto en el control estéril) a 37°C. Se eliminó el sobrenadante y se lavaron los pocillos con PBS 1x. Luego, se colocó PDB fresco en los pocillos. Se incluyeron pocillos de control que contenían PDB estéril. La placa se incubó 24 h a 37°C. Luego, se realizó el procedimiento como se describe para el ensayo de bacterias.

Además, se evaluó la tolerancia de los biofilms a diferentes concentraciones de solvente DMSO, por ser el solvente utilizado para los ensayos biológicos como se describió en los ensayos de actividad antimicrobiana con células planctónicas. Para esto, se realizó la formación de biofilms en las condiciones determinadas y con el agregado de DMSO a concentraciones de 5%, 2,5%, 1,25%, 0,6% y 0,3% en microplaca de 96 pocillos. Se evaluó la diferencia entre la formación del biofilm en estas condiciones y se determinó la tolerancia como la concentración máxima de DMSO que no presenta diferencias

significativas con el biofilm formado en condiciones basales (sin la adición de solvente, como se describió previamente en el ensayo de formación de biofilms).

Determinación de la actividad inhibitoria de biofilms

Frente a las cepas que mostraron ser formadoras de biofilm (moderadas o fuertes) se examinó el efecto de los extractos de CC en la formación de biofilms mediante el método de microdilución modificado (Teanpaisan et al., 2016). Brevemente, se llevaron a cabo ensayos contra biofilms bacterianos en una placa de 96 pocillos (NUNC® MicroWell, capacidad 300 µl, estéril, Thermo Fisher Scientific, NY, US), con cuatro réplicas. Se depositaron diluciones seriadas de los extractos y DMSO en caldo nutritivo y se añadió una suspensión bacteriana (1×10^8 células ml^{-1}). Se incluyeron pocillos de control que contenían caldo nutritivo estéril y caldo nutritivo + DMSO + suspensión bacteriana (basal). La placa se incubó 24 h a 37 °C. Se eliminó el sobrenadante, los pocillos se lavaron con agua destilada y se secaron a 50 °C durante 40 min. Luego, las células adheridas se tiñeron con una solución de cristal violeta al 1%. El cristal violeta se resuspendió en etanol:acetona (70:30) y se midió la absorbancia de la solución a 590 nm. Se compararon las absorbancias de cada muestra, extractos, basal y caldo nutritivo estéril y se calculó el porcentaje de inhibición como $(\text{Abs}_{\text{muestra}} - \text{Abs}_{\text{control}}) / (\text{Abs}_{\text{basal}} - \text{Abs}_{\text{control}}) * 100$ para cada una de las concentraciones. Se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima de Biofilm (CIMB) como la menor concentración capaz de inhibir el 90% de la biomasa de biofilm.

Para *Candida albicans* y *Candida tropicalis*, se incubó una suspensión de células de levadura (1×10^6 células/mL) en PDB durante 30 min en cada pocillo de la placa (excepto el control estéril) a 37°C. Se eliminó el sobrenadante y se lavaron los pocillos con PBS 1x. Luego, se depositaron diluciones seriadas de los extractos y DMSO en PDB. Se incluyeron pocillos de control que contenían PDB estéril y suspensión de PDB+DMSO+levadura (basal). La placa se incubó 24 h a 37°C. Luego, se continuó con el procedimiento como se describe para el ensayo de bacterias.

Microscopía Láser Confocal

El estudio por Microscopía Láser Confocal se realizó para las muestras CC ILBB15 e ILBB55, que presentaron capacidad para inhibir biofilms de levaduras.

Para estudiar la inhibición de formación de biofilms de levaduras se incubó una suspensión estandarizada (300 µl) de células en cámaras del tipo Nunc Lab Tek Chamber Slide (capacidad 600 µl, estéril, Thermo Fisher Scientific, NY, US) durante 30 minutos a 37 °C para formar el biofilm. El sobrenadante fue retirado y se agregaron 290 µl de caldo de cultivo con 10 µl de la muestra a analizar a 50 mg/ml. La muestra fue incubada y el sobrenadante fue retirado. Los biofilms se tiñeron con Calcofluor-White 15 µl en una mezcla 1:1 de Calcofluor-White (0,5 g/L) y KOH al 10% (p/v) y se incubó durante 5 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.

La medición final se realizó en un Microscopio Láser Confocal Leica modelo TCS SP5 II disponible en la Facultad de Medicina, UdelaR.

Determinación de la capacidad de erradicación de biofilms

Para los extractos de CC ILBB162 se realizó la evaluación de la capacidad de erradicar los biofilms de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*. En una microplaca de 96 pocillos (NUNC® MicroWell, capacidad 300 µl, estéril, Thermo Fisher Scientific, NY, US) se llevó a cabo la formación del biofilm de la misma forma que en el ensayo de determinación de capacidad formadora de biofilm. A las 24 h se retiró el sobrenadante y se agregaron los extractos en solución a concentración conocida, disueltos en DMSO y caldo de cultivo apropiado (CN para bacterias y PDB para levaduras). Para el biofilm basal, se agregó caldo de cultivo estéril sobre el biofilm formado. También se agregó caldo de cultivo estéril en pocillos que no habían recibido inóculo (control). Todas las muestras, basal y control se replicaron al menos 4 veces. La placa se incubó por 24 h a 37°C. Posteriormente, se removió el sobrenadante, se lavó la placa con agua destilada y se secó a 50°C por 40 minutos. Luego las células adheridas fueron teñidas con una solución de cristal violeta 1% durante 3 min, se enjuagó la placa con agua corriente, se resuspendió el colorante con EtOH:acetona (70:30) y se midió la absorbancia de cada pocillo a 590 nm. Las absorbancias de cada muestra, biofilm basal y blanco fueron comparadas y se calculó el porcentaje de erradicación de forma análoga al cálculo del porcentaje de inhibición.

Análisis estadístico

Todos los experimentos descritos se realizaron al menos por cuadruplicado, y se calcularon los promedios y las desviaciones estándar para todos los experimentos. Los resultados se graficaron como valores medios con barras de error que representan las desviaciones estándar. Los datos se analizaron estadísticamente utilizando ANOVA y una prueba post-hoc de Tukey para comparaciones múltiples (valor $p < 0,05$).

Resultados y Discusión

Relevamiento de extractos de CC con actividad antimicrobiana

Se analizaron trece extractos para determinar su actividad antimicrobiana contra siete microorganismos de relevancia clínica (células planctónicas). Los resultados de la CIM se enumeran en la Tabla 2.2.

Todos los extractos, excepto el de caldo estéril (CC Blanco), fueron capaces de inhibir el crecimiento de, al menos, un microorganismo en las condiciones de ensayo. Además, varios extractos de CC mostraron una CIM inferior a 500 µg/ml. Teniendo en cuenta este valor, tres de los extractos de CC tuvieron una actividad prometedora contra *S. aureus*, seis contra *P. aeruginosa*, uno contra *E. cloacae* y uno contra *C. albicans*. CC ILBB162 tuvo una CIM inferior a 200 µg/ml contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. cloacae*, mientras que CC ILBB55 contra *C. albicans*. La CIM contra *E. faecalis*, *K. pneumoniae* y *A. baumannii* fue superior a 500 µg/ml para todos los extractos. Las células planctónicas de *P. aeruginosa* fueron susceptibles a 6 de los 13 extractos de CC analizados (Tabla 2.2).

Tabla 2.2. Determinación de Concentración Inhibitoria Mínima de extractos contra patógenos de relevancia clínica

Extracto CC	Concentración Inhibitoria Mínima (µg/ml)						
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>C. albicans</i>
Blanco	>2500	1250	>2500	2500	>2500	>2500	>2500
ILBB15	312	76	2500	ND	NI	NI	NI
ILBB63	625	NI	2500	625	2500	NI	NI
ILBB68	1250	NI	2500	2500	2500	NI	NI
ILBB44	312	156	2500	NI	NI	NI	NI
ILBB55	1250	312	2500	NI	NI	NI	125
ILBB7	625	625	NI	ND	NI	NI	NI
ILBB19	625	2500	2500	NI	NI	2500	NI
ILBB139	1250	NI	2500	2500	2500	NI	NI
ILBB172	625	312	2500	1250	2500	2500	NI
ILBB95	1250	1250	NI	2500	NI	2500	2500
ILBB162	156	63	76	NI	NI	1250	NI
ILBB145	1250	250	1250	NI	NI	1250	NI
ILBB219	1250	2500	2500	NI	NI	NI	NI

NI: No inhibe

ND: No determinado

Otros estudios con extractos de metabolitos de microorganismos muestran actividades inhibitorias similares, como el estudio de endófitos contra bacterias patógenas, que mostró actividades de entre 1000 y 312,5 µg/ml (Makuwa & Serepa-Dlamini, 2021) y 4000 y 125 µg/ml (Fanoro & Oluwafemi, 2025), de extractos de *Streptomyces* cepa M10-77 que presenta actividades entre 1,9 y 250 µg/ml contra cepas clínicas y de referencia de bacterias patógenas (Ubillus et al., 2015), y de bacterias del suelo, que presentan valores de CIM entre 125 y 31,25 µg/ml (Demisie et al., 2024). Estos resultados son coherentes con los obtenidos en esta tesis, mostrando que varios de los extractos tienen actividades superiores a las de extractos de similares características, aunque no alcanzan las actividades más bajas observadas en los trabajos mencionados.

P. butanolivorans es una bacteria del suelo, usada para la biorremediación de butanol. Si bien el estudio de la actividad antimicrobiana de sus metabolitos es muy limitado, se determinó su capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias del género *Neisseria* (Reilly et al., 2022). De acuerdo con los resultados obtenidos, los metabolitos presentes en el CC de *P. butanolivorans* ILBB15 inhiben el crecimiento de *S. aureus* y *P. aeruginosa* a concentraciones de 312 y 76 µg/ml, respectivamente.

Existe mucha evidencia de actividad antimicrobiana de *B. pumilis*, particularmente contra *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Una cepa marina demostró actividad contra varias cepas de *S. aureus*, incluyendo cepas resistentes, aunque con una CIM de 1550 µg/ml, significativamente mayor a la demostrada en esta tesis con CC de *B. pumilis* ILBB44 (Freitas-Silva et al., 2024). Otro estudio determinó una importante actividad antimicrobiana contra *P. aeruginosa* mediante ensayo de difusión, presentando halos de inhibición de hasta 30mm (Beyari et al., 2024).

Prieta megaterium, anteriormente clasificada como *B. megaterium*, presenta actividad antimicrobiana contra bacterias y hongos como *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. (Liu et al., 2023; Malanicheva et al., 2012). En estos estudios, a diferencia de los resultados presentados para CC ILBB95, no determinaron una concentración inhibitoria mínima frente a los microorganismos evaluados.

Además, en los casos que se disponía de extractos de CC en exceso, se decidió complementar la evaluación de actividad antimicrobiana frente a algunas bacterias y

hongos fitopatógenos: *X. vesicatoria* CCMG28m *F. graminearum* CCMG31084, *A. alternata* CCMG54027, *R. stolonifer* ATCC6227B. Los resultados se muestran en la Tabla 2.3, donde se observa que, a diferencia de los resultados obtenidos frente a bacterias y levaduras, el extracto CC Blanco presenta actividad antimicrobiana frente a los tres hongos filamentosos evaluados; esta actividad podría atribuirse al extracto de levadura presente en el medio complejo, como fue reportado previamente (Tao et al., 2023). Se consideró actividad antifúngica de los CC cuando la CIM fue inferior al CC Blanco. Para 11 de los extractos, las Concentraciones Inhibitorias Mínimas determinadas fueron mayores a 600 µg/ml, lo cual se considera una actividad antimicrobiana moderada o débil para extractos naturales. De acuerdo con Aligiannis et al. (2001), se pueden clasificar los extractos según su Concentración Inhibitoria Mínima como inhibidores fuertes: CIM menor a 500µg/ml, inhibidores moderados: CIM entre 600 y 1500 µg/ml e inhibidores débiles: CIM mayor a 1600 µg/ml.

Tabla 2.3. Determinación de Concentración Inhibitoria Mínima de extractos contra fitopatógenos

Extracto CC	Concentración Inhibitoria Mínima (µg/ml)			
	<i>X. vesicatoria</i>	<i>R. stolonifer</i>	<i>A. alternata</i>	<i>F. graminearum</i>
Blanco	>2500	2500	625	1250
ILBB 15	>2500	2500	ND	≥1250
ILBB 63	1250	2500	≥625	ND
ILBB 68	ND	2500	ND	ND
ILBB 44	ND	2500	ND	≥1250
ILBB 55	ND	ND	ND	≥1250
ILBB 7	156	312	312	156
ILBB 19	ND	ND	ND	≥1250
ILBB 139	ND	ND	ND	≥1250
ILBB 172	>2500	2500	≥625	≥1250
ILBB 95	>2500	2500	≥625	≥1250
ILBB 162	78	1250	≥625	156
ILBB 145	625	1250	≥625	ND
ILBB 219	1250	2500	312	312

NI: No inhibe

ND: No determinado

Además, el extracto de CC ILBB 162 presenta actividad alta contra *X. vesicatoria* y *F. graminearum*, mientras que el de CC ILBB 219 presenta actividad media contra *F. graminearum* y *A. alternata*. Para el extracto de CC ILBB7 se observó una actividad media a alta ante los cuatro patógenos evaluados.

Esta actividad mostrada va en consonancia con datos reportados en literatura, donde extractos de caldos de cultivo de bacterias, sobre todo de *Actinomicetes* han mostrado actividad contra los patógenos evaluados. Los extractos de *S. huiliensis* presentaron alta actividad (6.25 µg/ml) contra *F. oxysporum* (Qi et al., 2021).

Un estudio genómico de *L. fusiformis* destaca la presencia de clusters biosintéticos de compuestos antimicrobianos como betalactonas, sideróforos, terpenos y poliquétidos

(Aguilar et al., 2025). Se ha reportado actividad antifúngica de *L. fusiformis* contra varios hongos (Akhter et al., 2022; Khadka et al., 2020). No se encontraron datos de actividad antifúngica de *L. fusiformis* contra *A. alternata* ni otras especies de *Alternaria*. Sin embargo, otras especies, como *L. sphaericus*, sí presentan actividad antifúngica contra *A. alternata*, aunque no se determinó una concentración inhibitoria mínima para comparar (Naureen et al., 2017). Lo mismo sucede para *R. stolonifer* ni otras especies de *Rhizopus* y para *Xanthomonas*. Sin embargo, se ha reportado la actividad de otras especies de *Lysinibacillus*, como *L. xylanilyticus* con actividad contra *X. oryzae*, lo que podría indicar que mecanismos similares se presentan en esta interacción (Suvega & Arunkumar, 2019). En el caso de *Fusarium* existen reportes de actividad antifúngica de *L. fusiformis* contra *F. oxysporum*, sin determinar concentración inhibitoria mínima (Masri et al., 2022). Por todo lo mencionado la actividad antimicrobiana de CC ILBB7 es el primer reporte de este tipo de actividad antifúngica por metabolitos de una bacteria de esta especie.

S. bockelmanii no está normalmente reportada como productora de antimicrobianos, aunque sí se ha reportado la actividad de la cepa ILBB162 como controladora de *Pythium cryptoirregulare*, un oomiceto que afecta las plantas de tomate. Estudios de minería genómica (Abreo et al., 2021) mostraron que posee el cluster biosintético para altiomicina, la cual posee actividad inhibitoria contra *S. aureus*, y tiene el gen *swrA* que codifica para serrawettin sintetasa no ribosomal, por lo que puede producir serrawettina W2, un biosurfactante con actividad antimicrobiana contra cepas de *P. aeruginosa* como PA3 (Clements et al., 2019). Para *S. nevei*, por su parte, no se encontró reporte de estudios de actividad antifúngica en general, por lo que la actividad del CC ILBB219, aunque limitada, es novedosa en el estudio de actividad antimicrobiana de este tipo de microorganismos.

Sin embargo, existen reportes de otras especies de *Serratia* con actividad contra patógenos humanos y fitopatógenos. *S. marcesens* es la más estudiada de ellas, y se ha determinado su habilidad de producir prodigiosina y serrawettina W1 y W2, capaces de inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) (Clements et al., 2019). Un estudio sobre enfermedades de tomate determinó

una eficacia limitada de los extractos de *S. marcesens* contra varias especies de *Xanthomonas* y *Pseudomonas* (Akila et al., 2024). También se ha reportado su efecto antifúngico contra *F. graminearum*. Los consorcios entre *S. marcesens* y *Pseudomonas* demostraron capacidad de reducir el crecimiento de varias especies de *Fusarium*, entre ellas *F. graminearum* (Thuraga et al., 2024). *Serratia plymuthica* fue eficiente en el control de *Alternaria tenuissima* (Campos et al., 2024) y otros estudios reportaron la producción de prodigiosina, pirrolnitrina, quinasas, sideróforos, y glucanas como moléculas antimicrobianas (Kalbe et al., 1996).

Evaluación del efecto del cambio en la composición del medio de cultivo sobre la actividad antimicrobiana

En el análisis preliminar del extracto de caldo de cultivo estéril (CC Blanco), se observó una alta complejidad de este (Figura 2.2), además de la actividad antifúngica mencionada anteriormente.

Con el objetivo de simplificar el medio de cultivo sin comprometer la actividad antimicrobiana de los extractos, se evaluaron extractos obtenidos a partir de caldos de cultivo preparados con concentraciones inferiores (0,1%, 0,05 %) o sin EL (0%), como se describió en Materiales y Métodos. Esta comparación se realizó utilizando los CC de las cepas *S. bockelmanii* ILBB162 y *L. fusiformis* ILBB7, seleccionadas por presentar mayor actividad frente a un mayor número de patógenos. Se realizaron las comparaciones tanto de los perfiles fitoquímicos como microbiológicos, mediante cromatografía en capa fina revelada con revelador de CuSO₄, bioautografía (Figura 2.3) y determinación de Concentración Inhibitoria Mínima (Tabla 2.4).

Los resultados de la bioautografía muestran que las fracciones de los tres extractos provenientes de CC ILBB162 obtenidas en la TLC, presentan halos de inhibición del crecimiento de *S. aureus* que no se observan en los extractos provenientes de CC Blanco (Figura 2.4).

Asimismo, los resultados de actividad antimicrobiana por determinación de CIM mostraron, por un lado, que los caldos control (CC Blanco) no mostraron actividad

inhibitoria (CIM > 2500 µg/ml), mientras que los extractos CC ILB162 obtenidos a partir de medios suplementados con 0,05 % de extracto de levadura, presentaron CIM iguales o inferiores a las observadas con concentraciones mayores. Por otro lado, la eliminación total del EL provocó un aumento significativo en las CIM. Por lo tanto, aunque no sería necesario utilizar concentraciones elevadas de EL, ya que aumentan la complejidad de los estudios, su presencia en el medio es indispensable.



Figura 2.2 Cromatografía en capa fina de CC Blanco, revelada con revelador $\text{CuSO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$

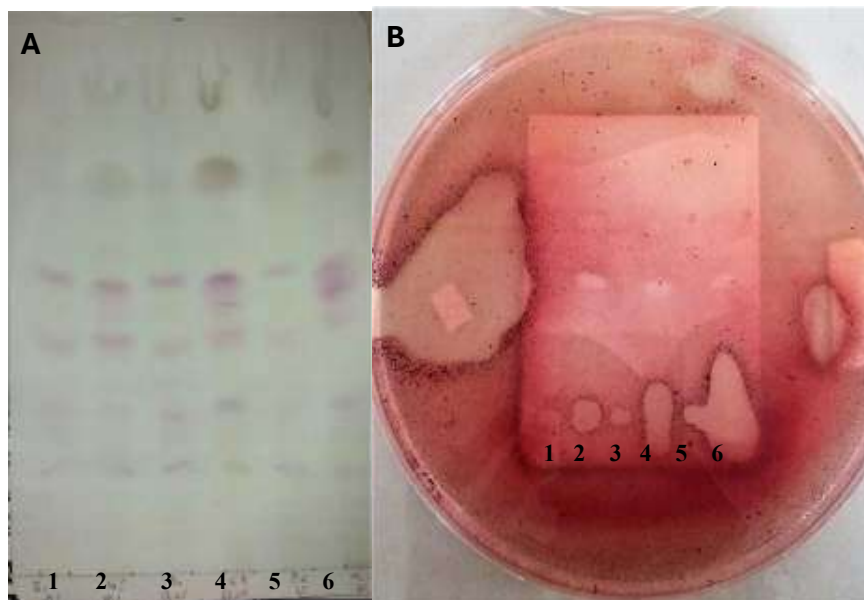


Figura 2.3. **A:** Cromatografía en capa fina de extractos de CC, revelado $\text{CuSO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$. **B:** bioautografía de extractos de CC **1:** Blanco 0,1% EL, **2:** ILBB 162 0,1% EL, **3:** blanco 0,05% EL, **4:** ILBB 162 0,05% EL, **5:** blanco 0% EL, **6:** ILBB 162 0% EL. A la izquierda: control positivo (gentamicina 1mg/ml). A la derecha: controles negativos (CH_2Cl_2 , MeOH, AcOEt)

Tabla 2.4. Concentración Inhibitoria Mínima de extractos de CC ILBB162 obtenidos con distinta concentración de EL

Extracto de CC	Concentración Inhibitoria Mínima ($\mu\text{g/ml}$)		
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>X. vesicatoria</i>	<i>F. graminearum</i>
ILBB 162 0,1% EL	39	78	39
ILBB 162 0,05% EL	<20	78	39
ILBB 162 0% EL	156	625	625

De la misma forma, se obtuvieron los extractos de los caldos de cultivo con diferentes concentraciones de EL inoculados con ILBB7. Se determinó su CIM contra *P. aeruginosa* y los resultados de CIM mostraron que no había diferencias entre ellas (125 $\mu\text{g/ml}$), por lo que sería más conveniente en ensayos futuros trabajar con la menor concentración de EL considerando, además, que a 0,5 % de EL mostró valores superiores de CIM de 625 $\mu\text{g/ml}$.

Selección de método de extracción

Como se describió en Materiales y Métodos, para el CC de ILBB162 se evaluaron distintos métodos de extracción, a fin de seleccionar el que genere resultados similares con una técnica sencilla y escalable. Para esto se compararon tres métodos: extracción líquido-líquido, adsorción sobre resinas y desorción con distintos solventes, y liofilización y posterior reconstitución. Las comparaciones fueron realizadas mediante cromatografía en capa fina y Concentración Inhibitoria Mínima (Tabla 2.5) contra *S. aureus*. Como la fracción eluida con MeOH presentó una CIM mayor a las de las fracciones obtenidas por otras técnicas, se realizó un ensayo de bioautografía, a fin de determinar si alguna molécula activa frente a *S. aureus* no estaba siendo extraída mediante este método. No se observaron halos de inhibición adicionales en esta fracción por lo que se determinó que este no sería el caso (Figura. 2.4)

A partir de los resultados similares obtenidos con las tres técnicas ensayadas, se seleccionó la técnica de extracción con resinas de adsorción, dado que se evaluó como la más sencilla y fácil de escalar, obteniéndose el extracto activo a partir de la desorción con acetato de etilo.

Tabla 2.5. Concentración Inhibitoria Mínima de extractos de CC ILBB 162 contra *S. aureus* según diferentes métodos de extracción

Muestra	Concentración Inhibitoria Mínima (µg/ml)
CC ILBB162 extracción líquido-líquido	156
CC ILBB162 liofilizado-reconstituido	156
CC ILBB162 AcOEt resina	312
CC ILBB162 MeOH resina	2500

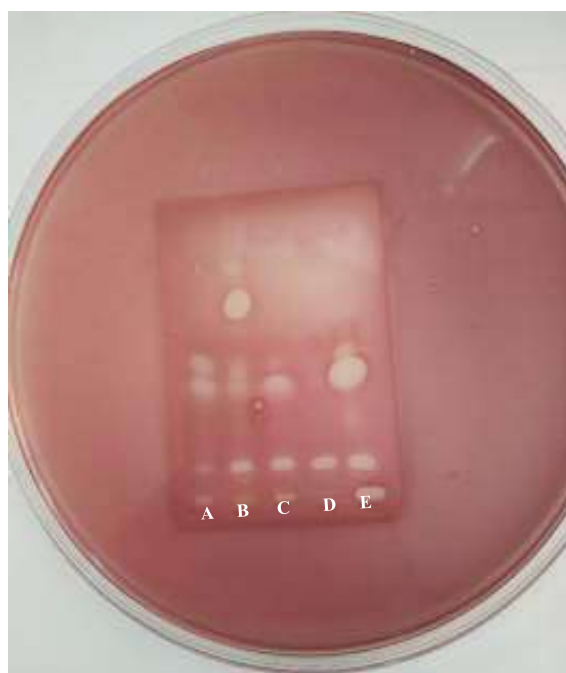


Figura 2.4. Bioautografía de extractos de CC ILBB162 obtenidos por distintas técnicas contra *S. aureus*. Los extractos A, B y E provienen de la desorción con acetato de etilo de resinas de adsorción, el extracto D proviene de la desorción con MeOH, el extracto D fue obtenido por extracción líquido-líquido.

Aislamiento bioguiado de los compuestos

Una vez seleccionadas las condiciones de cultivo y extracción, se procedió al aislamiento bioguiado del o los compuestos bioactivos dentro del extracto CC ILBB162. Para este proceso, se utilizó *S. aureus* como cepa de referencia.

Se empleó Cromatografía Líquida Flash para la separación de fracciones. De 11 fracciones obtenidas 3 presentaron valores de CIM inferiores a 250 µg/ml frente a *S. aureus*. Sin embargo, el método arrojó muy bajos rendimientos y mostró problemas en la manipulación. Dado que las fracciones que presentaron actividad fueron las menos polares, se optó por realizar separaciones por extracción en fase sólida (SPE) con una fase reversa. Se obtuvieron 4 fracciones, que se estudiaron mediante cromatografía en capa fina (Figura 2.5). Se evaluó la presencia de metabolitos activos en las distintas fracciones utilizando la técnica de bioautografía (Figura 2.6). De esto se concluyó que la mayoría de los metabolitos activos eran eluidos en la fracción metanólica.

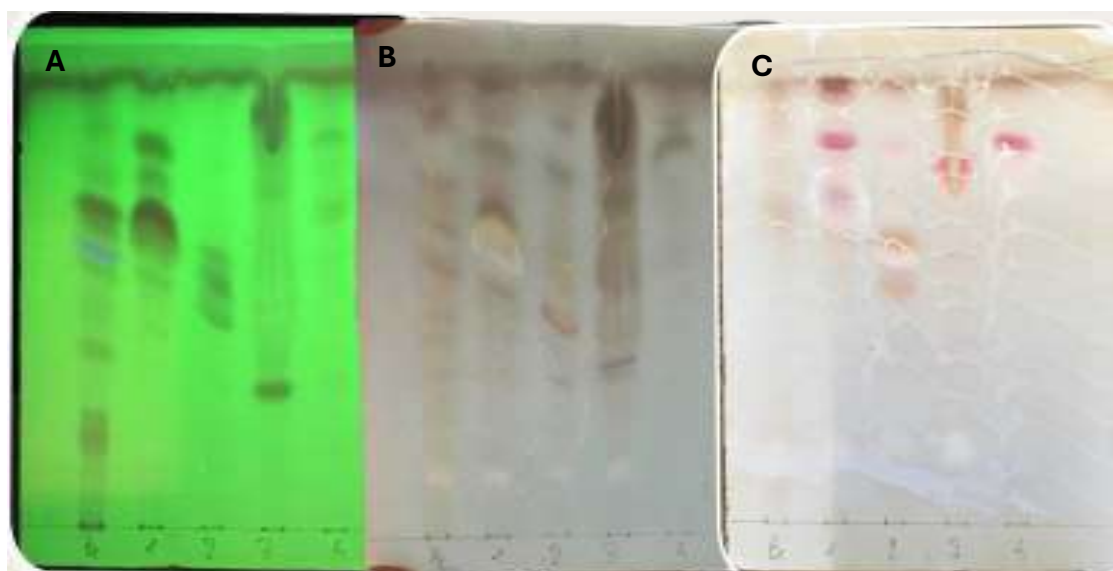


Figura 2.5. Cromatografía en capa fina de cuatro fracciones de SPE de la muestra ILBB162. Revelado con A. UV. B. CuSO₄/H₂SO₄. C. Fast Blue Salt

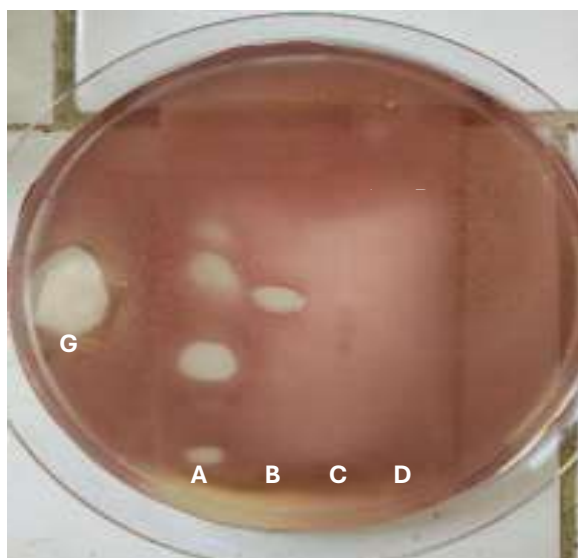


Figura 2.6. Bioautografía de fracciones eluidas de SPE contra *S. aureus*. Las fracciones están sembradas según A: Metanol, B: Acetona, C: Acetona:Hexano, D: Hexano, G: control positivo (gentamicina)

A pesar de haber realizado diversas técnicas subsiguientes de fraccionamiento con el objetivo de aislar los compuestos activos, no se logró un aislamiento con un rendimiento y nivel de pureza suficiente para someterlo a sucesivos ensayos antimicrobianos y de elucidación estructural.

Actividad antibiofilm

Formación de biofilm

Se determinó la capacidad de formación de biofilms para cepas de bacterias y levaduras. Los resultados se muestran en la Figura 2.7 y en la Tabla 2.6. Aunque para todas las bacterias y *C. albicans* se probaron condiciones de preincubado, no se observaron diferencias importantes entre los métodos para *P. aeruginosa* y *X. vesicatoria*, mientras que *S. aureus* no formó biofilm con dicho protocolo. Por este motivo, como se describió en la sección materiales y métodos, para estas tres bacterias no se realizó preincubado. Para *C. albicans* sólo se observó formación al realizar el protocolo con preincubado y, dado el uso de este método para otras especies de *Candida* (Quinteros et al., 2021), se continuó con este protocolo para esta cepa y para *C. tropicalis*. Por otro lado, las cepas

de *A. baumannii*, *E. faecalis* y *K. pneumoniae* no mostraron formación de biofilm en las condiciones evaluadas.

Para las cepas que formaron biofilm se determinó también la tolerancia máxima de los biofilms a DMSO, dado que es el solvente de elección para vehicular los extractos, por su alta capacidad de solubilizar moléculas orgánicas de polaridades intermedias y muy baja volatilidad, además de demostrada tolerancia de microorganismos para ensayos *in vitro*. Para *X. vesicatoria* la tolerancia máxima determinada fue de 5%. Para las demás cepas, esta tolerancia máxima fue 2.5% (Figura 2.8).

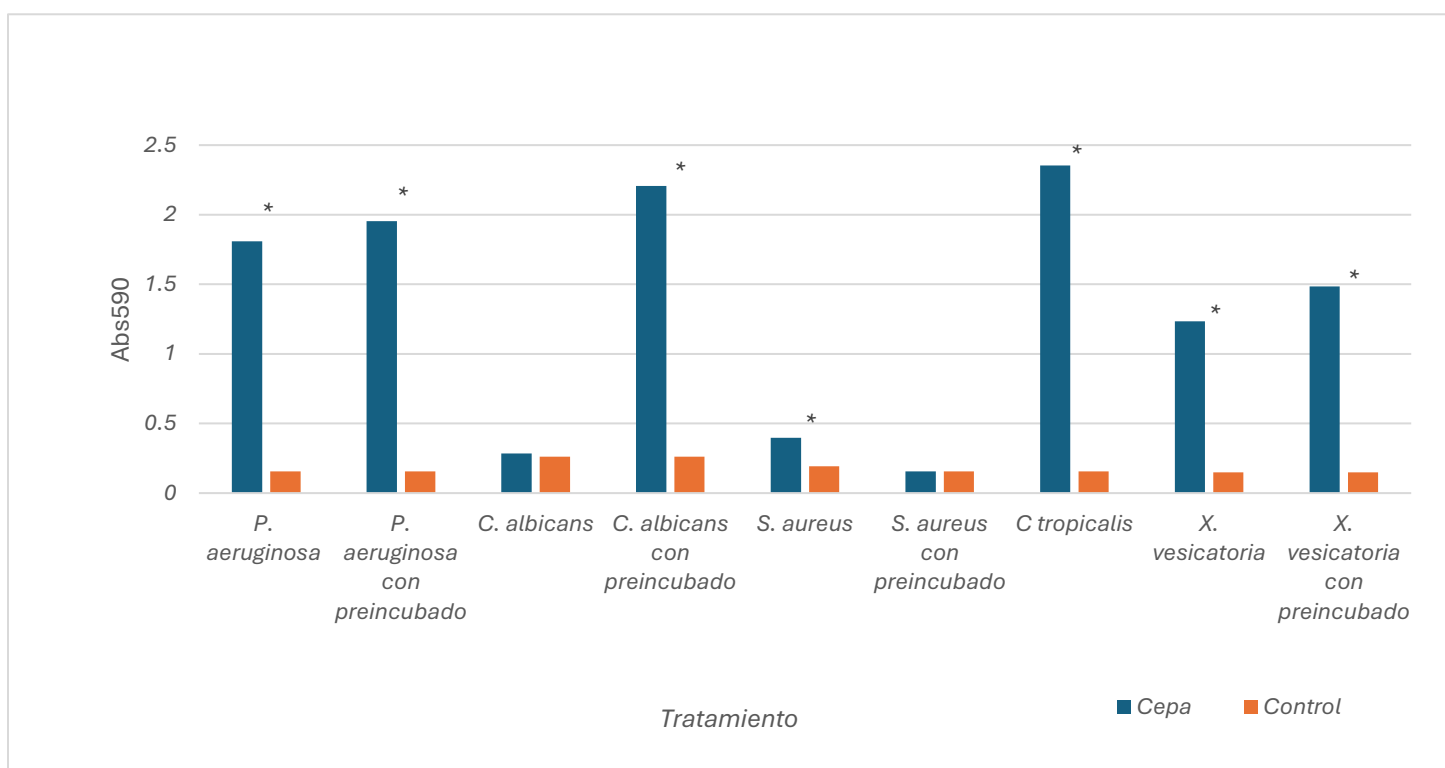


Figura. 2.7. Formación de biofilm de distintos microorganismos en dos condiciones. Los asteriscos determinan diferencia significativa con el control estéril ($p < 0.05$).

Tabla 2.6 Capacidad de formación de biofilms de distintas cepas

Microorganismo	Clasificación
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	Formador moderado
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC15442	Formador fuerte
<i>Candida albicans</i> ATCC 101231	Formador fuerte
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 66029	Formador fuerte
<i>Acinetobacter baumannii</i> CCMGb1	No forma biofilms
<i>Enterococcus faecalis</i> CCMGb2	No forma biofilms
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CCMG12716	No forma biofilms
<i>Xanthomonas vesicatoria</i> CCMG28m	Formador fuerte

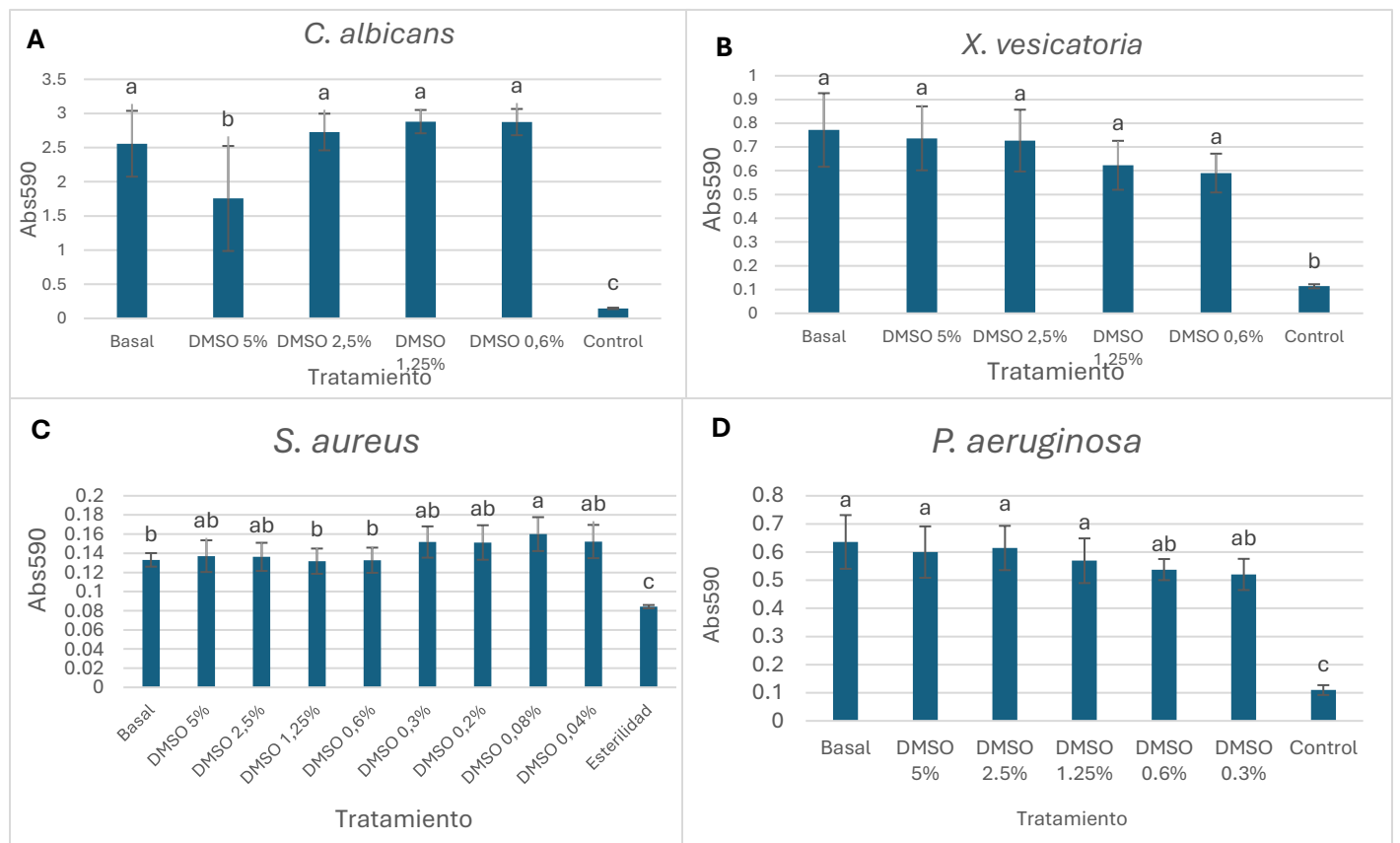


Figura 2.8. Tolerancia a dimetilsulfóxido por A. *C. albicans*, B. *X. vesicatoria*, C. *S. aureus*, D. *P. aeruginosa*

Capacidad de inhibición de biofilms

Se analizaron los trece extractos en cuanto a su capacidad para inhibir el crecimiento de biofilms. La Tabla 2.7 muestra la concentración más baja capaz de inhibir los biofilms de cada microorganismo y el porcentaje de inhibición observado a esa concentración. Las concentraciones inhibidoras variaron de 4 a 500 µg/ml.

Tabla 2.7. Inhibición de la formación de biofilms por extractos de CC

CC	<i>C. albicans</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>X. vesicatoria</i>	
	Conc. (µg/ml)	Inhib. (%)	Conc. (µg/ml)	Inhib. (%)	Conc. (µg/ml)	Inhib. (%)	Conc. (µg/ml)	Inhib. (%)	Conc. (µg/ml)	Inhib. (%)
ILBB7	16	79	NI		NI		NI		ND	
ILBB15	16	30	NI		NI		3.9	65	ND	
ILBB19	125	55	NI		32	42	NI		ND	
ILBB44	16	60	NI		NI		125	44	ND	
ILBB55	16	71	125	62	16	99	3.9	74	NI	
ILBB63	16	64	500	68	NI		NI		ND	
ILBB68	250	68	63	13	NI		125	29	ND	
ILBB95	500	93	NI		NI		NI		ND	
ILBB139	250	40	63	9	NI		16	30	ND	
ILBB145	32	46	NI		125	94	NI		NI	
ILBB162	63	54	NI		250	77	7.8	34	NI	
ILBB172	125	71	NI		NI		ND		NI	
ILBB219	32	49	NI		500	78	NI		ND	

NI: no inhibe

ND: no determinado

En el caso de los biofilms de *P. aeruginosa*, cuatro de los extractos pudieron inhibir parcialmente el crecimiento del biofilm, mostrando diferencias estadísticamente significativas con respecto al control no tratado (Tabla 2.7). En todos los casos, las concentraciones más altas analizadas no arrojaron diferencias importantes en el porcentaje de inhibición. Sólo el extracto CC ILBB55 mostró un porcentaje de inhibición relativamente alto (62%) con una CIM baja 125 µg/ml.

En el caso de *S. aureus*, cinco extractos mostraron una inhibición significativa del biofilm (Tabla 2.7). Como se describe en Métodos, la Concentración Mínima Inhibitoria de la Biofilm (CIMB) se determinó como la concentración mínima capaz de inhibir al menos el

90% de la formación de la biofilm. Cuatro de los extractos (ILBB19, ILBB55, ILBB145 e ILBB162) pudieron inhibir al menos el 90% del crecimiento de la biomasa de biofilm de *S. aureus* en algunas de las concentraciones analizadas. Las CIMB fueron 500, 16, 125 y 500 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Para el extracto de ILBB55, la inhibición fue significativa a dosis tan bajas como 16 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 2.9). Para ILBB19, la capacidad de inhibición disminuye progresivamente a concentraciones más bajas, estimulando el crecimiento del biofilm a concentraciones subinhibitorias (Figura 2.10).

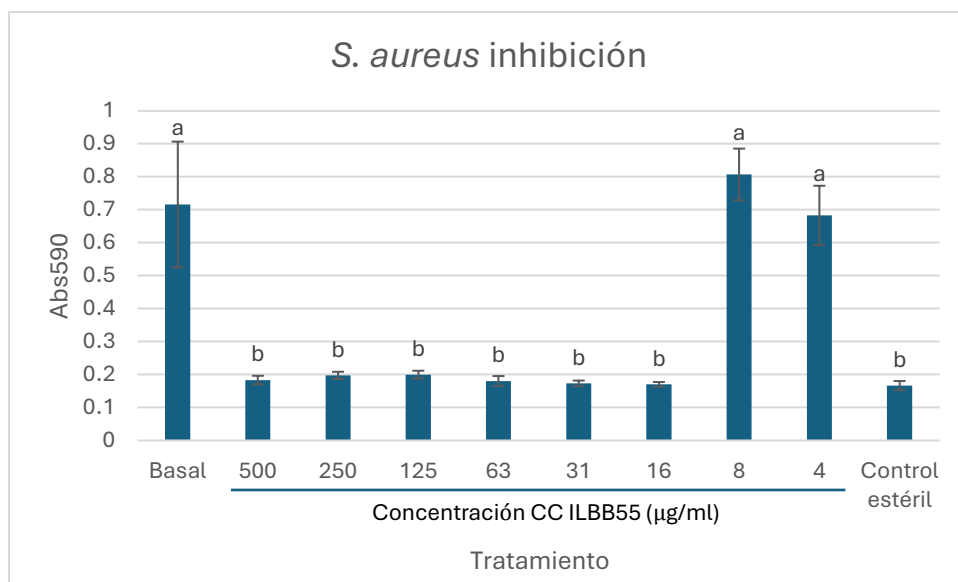


Figura 2.9 Inhibición de biofilm de *S. aureus* por CC ILBB55

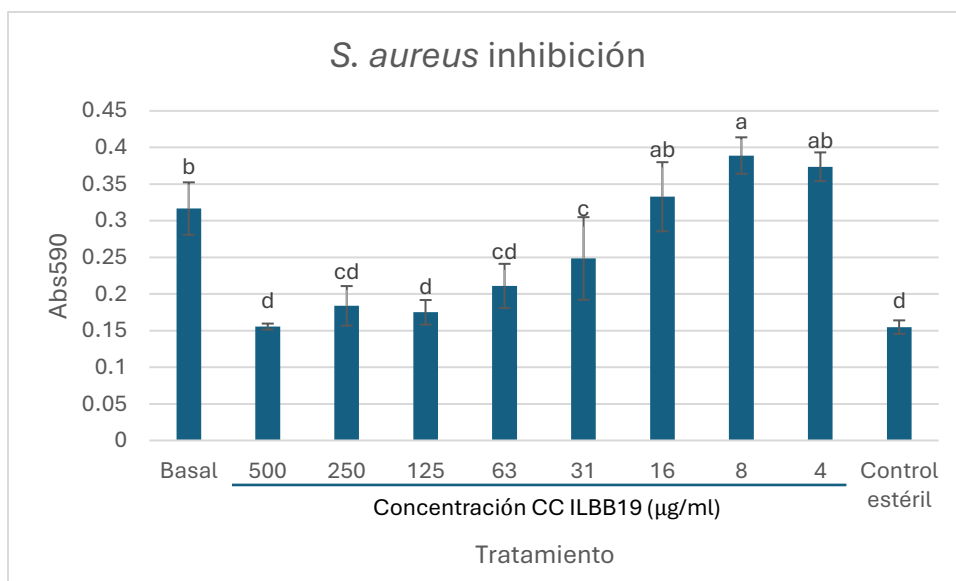


Figura 2.10 Inhibición de biofilm de *S. aureus* por CC ILBB19

Al analizar los biofilms de *C. albicans*, los extractos de CC ILBB7, ILBB55, ILBB44 e ILBB63 a 16 µg/ml muestran un porcentaje de inhibición mayor que el caldo estéril. Sin embargo, no se detectó inhibición del crecimiento planctónico de *C. albicans* a esta concentración de los extractos (Tabla 2.7). La Figura 2.11 muestra que todas las concentraciones de extracto de ILBB7 probadas fueron capaces de inhibir el crecimiento del biofilm de *C. albicans* en cierta medida. Se observó una ligera disminución de la inhibición a concentraciones más bajas, sin embargo, esta diferencia no es estadísticamente significativa.

Para los biofilms de *C. tropicalis*, se determinó que los extractos de las cepas ILBB15, ILBB44, ILBB55, ILBB68, ILBB139 e ILBB162 fueron capaces de inhibir su formación. Para todas estas muestras con excepción de ILBB55, el porcentaje de inhibición a concentraciones mayores presenta muy poca variación. En el caso de CC ILBB55, se observa un porcentaje de inhibición alrededor del 90% a concentraciones mayores o iguales que 31µg/ml (Figura 2.12).

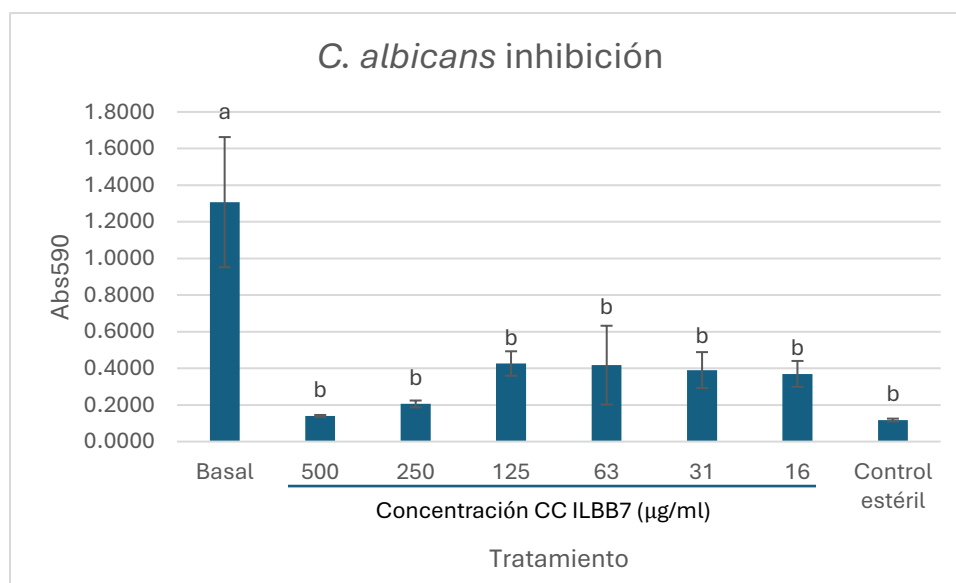


Figura 2.11 Inhibición de biofilm de *C. albicans* por CC ILBB7

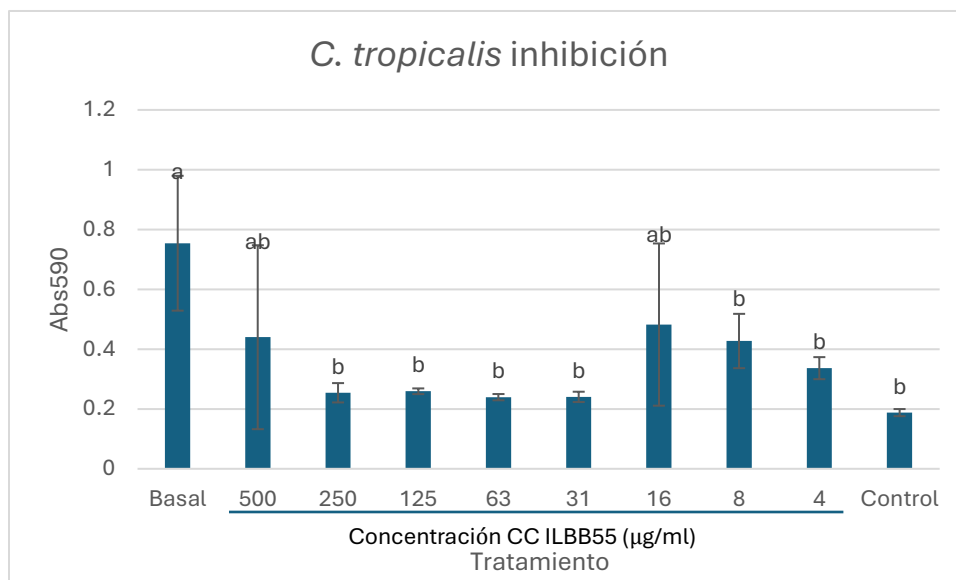


Figura 2.12. Inhibición de biofilm de *C. tropicalis* por CC ILBB55

Entre los 13 extractos evaluados para la inhibición de biofilms, sólo CC ILBB55 fue capaz de inhibir los biofilms de *C. albicans* (71%), *C. tropicalis* (74%) *S. aureus* (99%) y *P. aeruginosa* (62%). Sin embargo, no fue capaz de inhibir biofilms de *X. vesicatoria*. Por su parte, las cepas seleccionadas a partir de sus resultados de inhibición de células planctónicas, CC ILBB7 y CC ILBB162, fueron capaces de inhibir los biofilms de *C. albicans* (Figura 2.11) y *C. albicans*, *S. aureus* y *C. tropicalis* (Figuras 2.13 y 2.14), respectivamente.

No se encontraron reportes de actividad antibiofilm de *L. xylanilyticus*. Sin embargo, un estudio muestra buena actividad antibiofilm de rhamnolípidos obtenidos de una cepa de *Lysinibacillus* sp. contra *P. aeruginosa* (Aleksic et al., 2017).

Para *P. durus* tampoco existen reportes de actividad antibiofilm, aunque esta está reportada para especies de *Paenibacillus* contra bacterias gram positivas y gram negativas (Alasil et al., 2014).

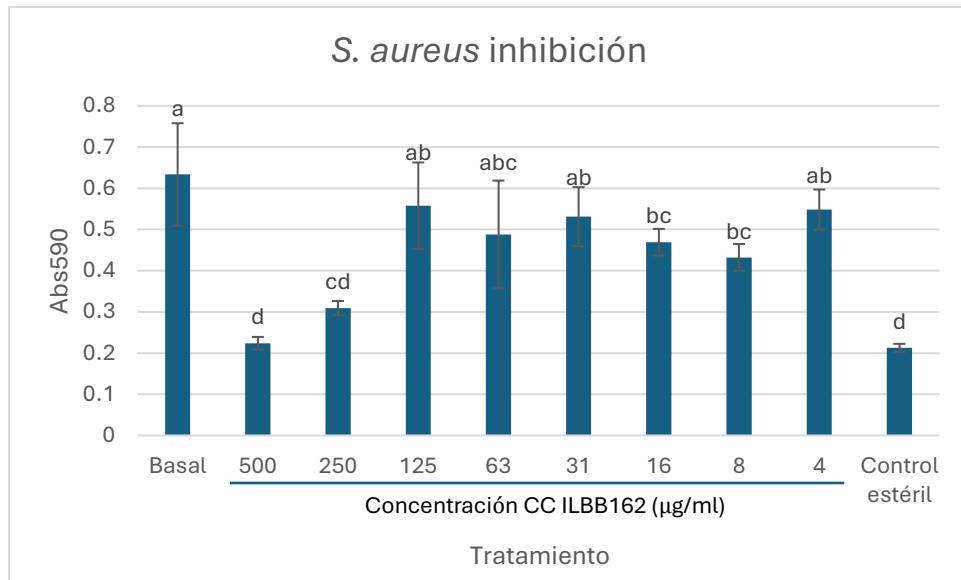


Figura 2.13. Inhibición de biofilm de *S. aureus* por CC ILBB162

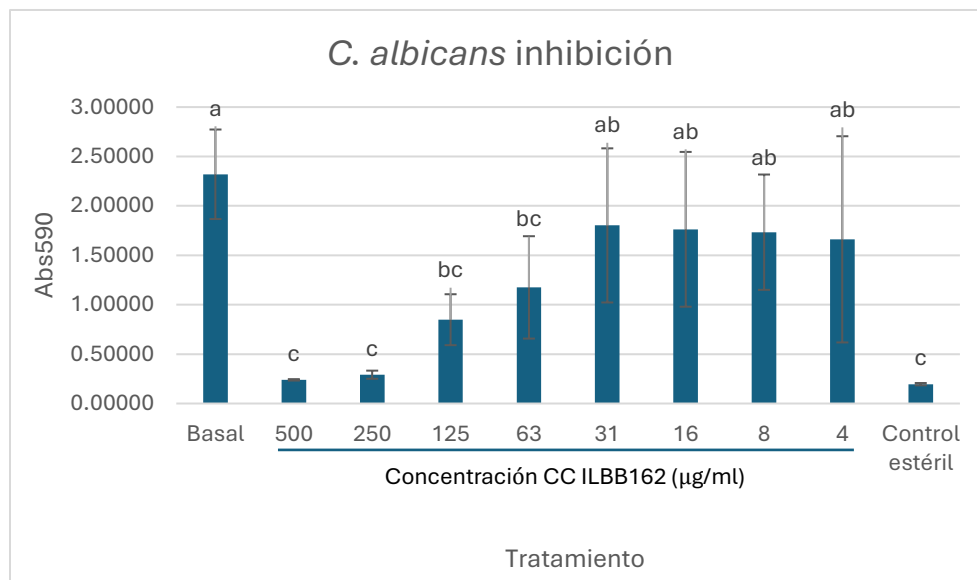


Figura 2.14. Inhibición de biofilm de *C. albicans* por CC ILBB162

Un estudio de tres cepas de *Bacillus*, entre ellas *B. cereus*, determinó que son capaces de reducir la formación de biofilms de *Alteromonas sp.*, mostrando como característica particularmente interesante la reducción de la síntesis de exopolisacárido, lo cual podría ser un mecanismo que permita la inhibición de formación de biofilm de varios microorganismos. Las fracciones bioactivas de estos extractos presentaron mayormente ácidos aromáticos, grasos y carboxílicos (Viju et al., 2020). También lipopéptidos provenientes de *B. subtilis* fueron capaces de inhibir y erradicar biofilms de bacterias uropatógenicas (Moryl et al., 2015). Por otro lado, los metabolitos de *B. thuringensis*, extraídos con acetato de etilo, demostraron capacidad de inhibir el crecimiento de biofilms de *S. aureus* hasta un 93% y erradicar hasta un 83% de los mismos. Los autores del estudio atribuyen esta actividad a moléculas de estructura similar a compuestos antibiofilm conocidos, como escualeno, derivados del ácido cinámico y eicosapentaeno, que se teoriza actúan de forma sinérgica (Ray et al., 2023). Otro estudio de esta especie mostró actividad antibiofilm contra *P. mirabilis*, *S. pyogenes* y *E. faecalis* (Karuppusamy et al., 2024). Por su parte, los metabolitos de *B. pumilis* también han demostrado actividad antibiofilm. Por ejemplo, los lipopéptidos de una cepa aislada de suelo fueron capaces de inhibir biofilms de *A. baumannii* (Gharaie et al., 2023), mientras que el ácido 4-fenilbutanoico aislado de otra cepa fue capaz de inhibir entre un 80 y un 90% de los biofilms de *E. coli*, *Shigella flexneri* y *P. mirabilis* en concentraciones de entre 10 y 15 µg/ml (Nithya et al., 2011), y la cepa SW9 fue capaz de reducir la adhesión y producción de exopolisacárido de *Brevundimonas sp.* SW1, *Acidovorax sp.* DB3, *Acinetobacter sp.* GS1, y *S. aureus* (Z. Wu et al., 2013).

Para el caso de *L. fusiformis*, existen algunos reportes de metabolitos con actividad antibiofilm, como glicolípicos con actividad contra *E. coli* y *S. mutans* (Pradhan et al., 2014) e hipoxantina, que produce cambios arquitectónicos en la estructura del biofilm de *B. subtilis* (Gallegos-Monterrosa et al., 2017)

De toda esta información podemos concluir que, aunque existen varios estudios de los metabolitos de los microorganismos estudiados y su actividad antibiofilm, muchos de ellos reportan en esta tesis actividad antibiofilm en general y contra los microorganismos estudiados en particular por primera vez. Las especies del género *Bacillus* y géneros

cercanos como *Lysinibacillus* y *Paenibacillus* son las más estudiadas, aunque en muchos casos se determina la actividad de compuestos aislados, perdiéndose quizás los efectos sinérgicos que pueden verse en los extractos enteros o purificados. A pesar de que se ha recabado poca información de actividad antibiofilm contra los microorganismos de interés en esta sección del trabajo, sí se puede teorizar que los metabolitos estudiados pueden actuar por mecanismos similares a los vistos para otras especies, como inhibición de la adhesión, reducción de la síntesis de exopolisacárido, inhibición de *quorum-sensing*, entre otros, ya que muchos de estos mecanismos se encuentran altamente conservados entre microorganismos.

Microscopía láser confocal

Se realizó el estudio de biofilms de *C. tropicalis* y su inhibición por los extractos de CC ILBB15 y CC ILBB55 utilizando Microscopía Láser Confocal. Las imágenes en dos dimensiones y su respectiva reconstrucción en 3 dimensiones de los biofilms utilizando el programa ImageJ se pueden observar en la Figura 2.15.

Se aprecia que ambos extractos fueron capaces de reducir la biomasa de biofilm de *C. tropicalis* en comparación con el biofilm basal, lo cual se corresponde con el ensayo en microplaca. Es importante destacar que estas diferencias se observan principalmente en las reconstrucciones en tres dimensiones, lo cual muestra que la inhibición de la formación se da sobre todo a nivel de la estructura 3D del biofilm.

Se realizaron pruebas para *C. albicans*, pero no se observó formación del biofilm en las condiciones ensayadas para su observación en microscopio confocal.

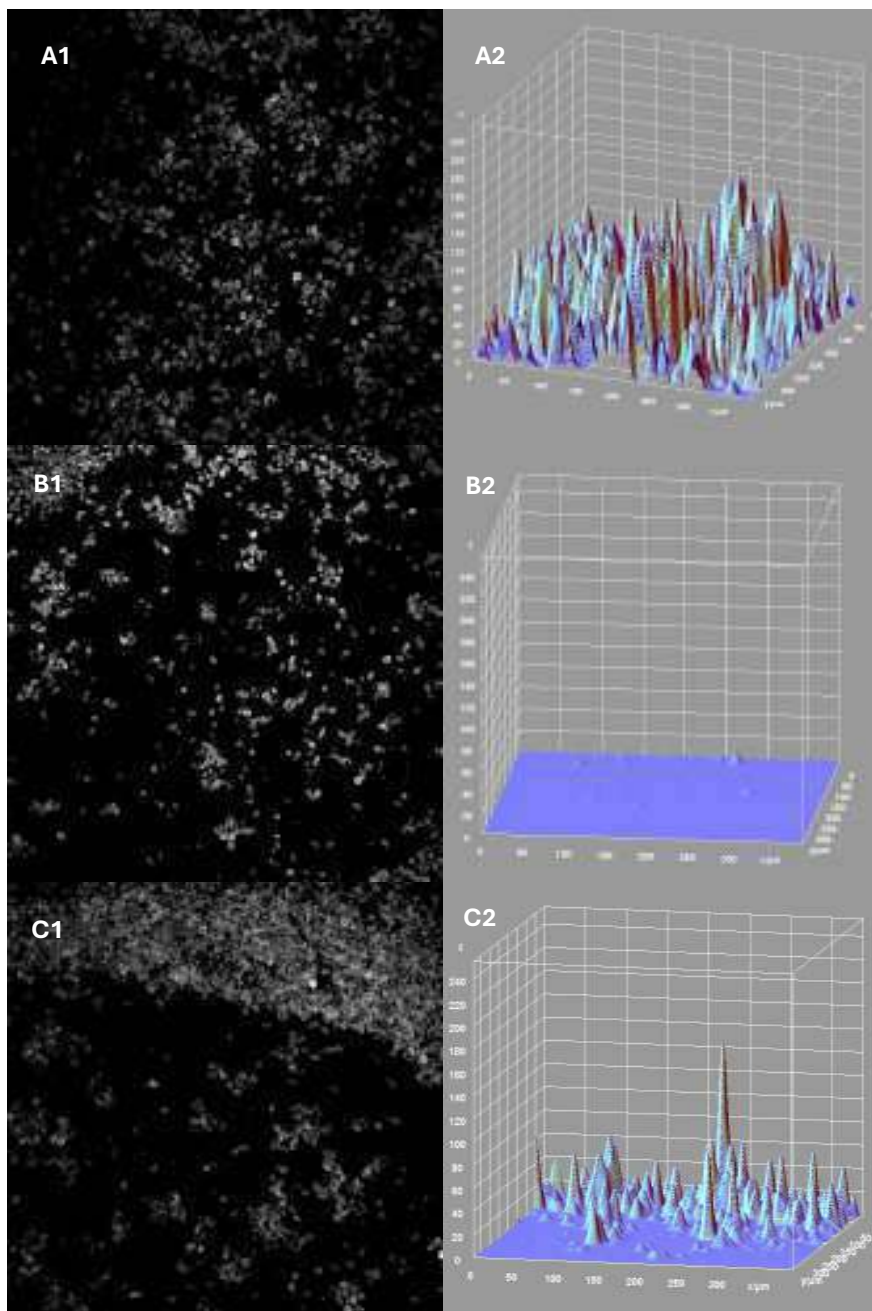


Figura 2.15. Imágenes de biofilms de *C. tropicalis* en Microscopio Láser Confocal. 2. Reconstrucciones en 3D de las imágenes. A. Basal B. ILBB15. C. ILBB55

Erradicación de biofilms

En el sucesivo trabajo con el extracto de CC ILBB162 se evaluó la capacidad de erradicar biofilms microbianos. Dada la alta cantidad de muestra necesaria para estos ensayos, se seleccionó el extracto de CC ILBB162 obtenido anteriormente de la extracción con resina y frente a tres microorganismos representativos, una bacteria Gram positiva, una bacteria Gram negativa y una levadura: *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*. Los resultados se muestran en la Tabla 2.8. Para *C. albicans*, el extracto fue capaz de erradicar hasta el 64% del biofilm formado a concentraciones levemente mayores a las concentraciones de inhibición de formación, mientras que fue capaz de erradicar hasta el 51% del biofilm formado de *S. aureus* a una concentración cinco veces menor a la de inhibición. El extracto no fue capaz de erradicar biofilms de *P. aeruginosa* a las concentraciones evaluadas.

El extracto no fue capaz de erradicar la totalidad de los biofilms de *S. aureus* y *C. albicans*. Esto implica que la utilización del extracto no sería una solución eficiente para la eliminación de biofilms. Sin embargo, esta erradicación parcial demuestra una capacidad de una o más moléculas contenidas en el extracto de penetrar la barrera del biofilm y desalojar células y matriz del mismo, por lo cual podría ser un buen coadyuvante para otro tipo de compuestos que tengan una actividad más importante sobre los microorganismos, como ha sido reportado. Por ejemplo, la combinación entre berberina y fluconazol fue capaz de eliminar efectivamente biofilms de *C. albicans* y entre berberina y ácido fusídico los biofilms de *S. aureus* (Chi et al., 2022)

Tabla 2.8. Erradicación de biofilms por extracto de CC ILBB162

CC	<i>C. albicans</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>	
	Conc. (µg/ml)	Errad. (%)	Conc. (µg/ml)	Errad. (%)	Conc. (µg/ml)	Errad. (%)
ILBB162	100	64	NE		50	51

A pesar de haberse visto buenos resultados de actividad antimicrobiana y antibiofilm a partir de los extractos de CC, las dificultades en el procesamiento para purificar e identificar compuestos activos, sumado a los bajos rendimientos, demostraron ser un

importante desafío para los objetivos de la tesis. Se buscó otro enfoque a partir de plantas que se discute en el siguiente capítulo.

Bibliografía

- Abdel-Razek, A. S., El-Naggar, M. E., Allam, A., Morsy, O. M., & Othman, S. I. (2020). Microbial natural products in drug discovery. *Processes* (Vol. 8, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/PR8040470>
- Abreo, E., & Altier, N. (2019). Pangenome of *Serratia marcescens* strains from nosocomial and environmental origins reveals different populations and the links between them. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37118-0>
- Abreo, E., Valle, D., González, A., & Altier, N. (2021). Control of damping-off in tomato seedlings exerted by *Serratia* spp. strains and identification of inhibitory bacterial volatiles in vitro. *Systematic and Applied Microbiology*, 44(2), 126177. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126177>
- Aguilar, C., Herrera, R., Causadías, J. L., Bernal, B., Chavarria, O., González, C., Gondola, J., Moreno, A., & Martínez, A. A. (2025). Genomic Insights into Plant Growth-Promoting Traits of *Lysinibacillus fusiformis* and *Bacillus cereus* from Rice Fields in Panama. *Microbiology Research*, 16(5). <https://doi.org/10.3390/microbiolres16050095>
- Akhter, A., Waqas Bin Nisar, Muhammad Taqqi Abbas, Hafiz Azhar Ali Khan, Khurshid, M., Tehmina Anjum, & Aqib Saeed. (2022). Characterization and evaluation of antifungal potential of bacterial endophytes of rice against *Fusarium moniliforme* and *Rhizoctonia solani*. *Agricultural Sciences Journal*, 4(2), 13–27. <https://doi.org/10.56520/asj.v4i2.149>
- Akila, A. H., Ali, M. A. S., Khairy, A. M., Elnahal, A. S. M., Alfassam, H. E., Rudayni, H. A., Jaber, F. A., & Tohamy, M. R. A. (2024). Biological Control of Tomato Bacterial Leaf Spots and Its Impact on Some Antioxidant Enzymes, Phenolic Compounds, and Pigment Content. *Biology*, 13(6). <https://doi.org/10.3390/biology13060369>
- Alasil, S. M., Omar, R., Ismail, S., & Yusof, M. Y. (2014). Antibiofilm activity, compound characterization, and acute toxicity of extract from a novel bacterial species of *Paenibacillus*. *International Journal of Microbiology*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/649420>
- Alborés, S., Bustamante, M. J., Fraguas, L. F., & Cerdeiras, M. P. (2014). Proteins from *Punctularia atropurpurascens* with Biotechnological Applications. *Natural Resources*, 5, 915–925.
- Alborés, S., Mora, P., Cerdeiras, M. P., & Franco Fraguas, L. (2014). Screening for lectins from basidiomycetes and isolation of *Punctularia atropurpurascens* lectin. *Journal of Basic Microbiology*, 54(2), 89–96. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200229>
- Albores, S., Sanguinedo, P., Held, B. H., Cerdeiras, M. P., & Blanchette, R. A. (2018). Biodiversity and antimicrobial activity of antarctic fungi from the Fildes peninsula, King

George island. *Sydowia*, 70, 185–192. <https://doi.org/10.12905/0380.SYDOWIA70-2018-0185>

- Aleksic, I., Petkovic, M., Jovanovic, M., Milivojevic, D., Vasiljevic, B., Nikodinovic-Runic, J., & Senerovic, L. (2017). Anti-biofilm properties of bacterial di-rhamnolipids and their semi-synthetic amide derivatives. *Frontiers in Microbiology*, 8(DEC). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02454>
- 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>
- Bano, A., Qadri, T. A., Mahnoor, & Khan, N. (2023). Bioactive metabolites of plants and microbes and their role in agricultural sustainability and mitigation of plant stress. *South African Journal of Botany*, 159(11), 98–109. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.05.049>
- Barneche, S., Alborés, S., Borthagaray, G., Cerdeiras, M. P., & Vázquez, A. (2017). Anti-MRSA Activity of Fruiting Body Extracts of Spectacular Rustgill Mushroom, *Gymnopilus junonius* (Agaricomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 19(3), 243–248. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.v19.i3.60>
- Beyari, E. A., Alshammari, N. M., Alamoudi, S. A., Mohamed, A. S., Altarjami, L. R., Baty, R. S., Alqadri, N., Al-Nazawi, A. M., Saad, A. M., Taha, T. F., El-Saadony, M. T., El-Tarabily, K. A., & Mostafa, N. G. (2024). Influences of *Bacillus pumilus* SA388 as an environmentally friendly antibiotic alternative on growth performance, blood biochemistry, immunology, cecal microbiota, and meat quality in broiler chickens. *Poultry Science*, 103(11). <https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.104115>
- Campos, D., Cottet, L., Santos, C., & Castillo, A. (2024). Antifungal activity of *Serratia plymuthica* against the phytopathogenic fungus *Alternaria tenuissima*. *Microbial Pathogenesis*, 193, 106750. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.106750>
- Chi, Y., Wang, Y., Ji, M., Li, Y., Zhu, H., Yan, Y., Fu, D., Zou, L., & Ren, B. (2022). Natural products from traditional medicine as promising agents targeting at different stages of oral biofilm development. *Frontiers in Microbiology* (Vol. 13). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.955459>
- Clements, T., Ndlovu, T., & Khan, W. (2019). Broad-spectrum antimicrobial activity of secondary metabolites produced by *Serratia marcescens* strains. *Microbiological Research*, 229(August), 126329. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126329>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2020). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. *CLSI Supplement M100*, 282.

- Danquah, C. A., Minkah, P. A. B., Junior, I. O. D., Amankwah, K. B., & Somuah, S. O. (2022). Antimicrobial Compounds from Microorganisms. In *Antibiotics* (Vol. 11, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030285>
- Darbandi, A., Asadi, A., Mahdizade Ari, M., Ohadi, E., Talebi, M., Halaj Zadeh, M., Darb Emamie, A., Ghanavati, R., & Kakanj, M. (2022). Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* (Vol. 36, Issue 1). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jcla.24093>
- Demisie, S., Oh, D. C., Abera, A., Tasew, G., Satessa, G. D., Fufa, F., Shenkutie, A. M., Wolday, D., & Tafess, K. (2024). Bioprospecting secondary metabolites with antimicrobial properties from soil bacteria in high-temperature ecosystems. *Microbial Cell Factories*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02589-6>
- Fanoro, O. T., & Oluwafemi, O. S. (2025). Metabolic profiling and antibacterial activity of secondary metabolites extracted from the endophytic bacteria of *Combretum erythrophyllum*. *Scientific Reports*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-025-99709-y>
- Freitas-Silva, J., Martins, R. C. C., Leal, C. M., Mendonça, S. C., Cypriano, J. B. S., Oelemann, W. M. R., Abreu, F. de A., Andrade-Oliveira, A. L., Giambiagi-Demarval, M., & Laport, M. S. (2024). Marine *Bacillus pumilus* substances exhibit antimicrobial effect on multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*, 135(10). <https://doi.org/10.1093/JAMBIO/LXAE260>
- Gallegos-Monterrosa, R., Kankel, S., Götze, S., Barnett, R., Stallforth, P., & Kovács, Á. T. (2017). *Lysinibacillus fusiformis* M5 induces increased complexity in *Bacillus subtilis* 168 colony biofilms via hypoxanthine. *Journal of Bacteriology*, 199(22). <https://doi.org/10.1128/JB.00204-17>
- Gharaie, S., Ohadi, M., Hassanshahian, M., Shakibaie, M., Shahriary, P., & Forootanfar, H. (2023). Glycolipopeptide biosurfactant from *Bacillus pumilus* SG: physicochemical characterization, optimization, antibiofilm and antimicrobial activity evaluation. 3 *Biotech*, 13(10). <https://doi.org/10.1007/S13205-023-03728-3>
- Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., & Yi, H. (2020). Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Frontiers in Microbiology* (Vol. 11). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>
- Hutchings, M., Truman, A., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 51, pp. 72–80). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
- Istasse, T., Jacquet, N., Berchem, T., Haubruge, E., Nguyen, B. K., & Richel, A. (2016). Extraction of honey polyphenols: Method development and evidence of cis

isomerization. *Analytical Chemistry Insights*, 2016(11), 49–57.
<https://doi.org/10.4137/ACI.S39739>.

- Kalbe, C., Marten, P., & Berg, G. (1996). Strains of the genus *Serratia* as beneficial rhizobacteria of oilseed rape with antifungal properties. *Microbiological Research*, 151(4), 433–439. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(96\)80014-0](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(96)80014-0)
- Karuppusamy, M., Kumar, S. S., Selvam, H., Sangapillai, K., Kamachisundaram, K. K., & Rama, B. K. (2024). Anti-quorum Sensing Activity and Bioactive Components of Marine-derived Bacteria. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 18(3), 2047–2056.
<https://doi.org/10.22207/JPAM.18.3.55>
- Khadka, S., Adhikari, S., Thapa, A., Panday, R., Adhikari, M., Sapkota, S., Regmi, R. S., Adhikari, N. P., Proshad, R., & Koirala, N. (2020). Screening and Optimization of Newly Isolated Thermotolerant *Lysinibacillus fusiformis* Strain SK for Protease and Antifungal Activity. *Current Microbiology*, 77(8), 1558–1568. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-01976-7>
- Liu, J. M., Liang, Y. T., Wang, S. S., Jin, N., Sun, J., Lu, C., Sun, Y. F., Li, S. Y., Fan, B., & Wang, F. Z. (2023). Antimicrobial activity and comparative metabolomic analysis of *Priestia megaterium* strains derived from potato and dendrobium. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32337-6>
- Makuwa, S. C., & Serepa-Dlamini, M. H. (2021). The Antibacterial Activity of Crude Extracts of Secondary Metabolites from Bacterial Endophytes Associated with *Dicoma anomala*. *International Journal of Microbiology*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/8812043>
- Malanicheva, I. A., Kozlov, D. G., Sumarukova, I. G., Efremenkova, O. V., Zenkova, V. A., Katrukha, G. S., Reznikova, M. I., Tarasova, O. D., Sineokii, S. P., & El'-Registan, G. I. (2012). Antimicrobial activity of *Bacillus megaterium* strains. *Microbiology* 2012 81:2, 81(2), 178–185. <https://doi.org/10.1134/S0026261712020063>
- Marioni, J., da Silva, M. A., Cabrera, J. L., Montoya, S. C. N., & Paraje, M. G. (2016). The anthraquinones rubiadin and its 1-methyl ether isolated from *Heterophyllaea pustulata* reduces *Candida tropicalis* biofilms formation. *Phytomedicine*, 23(12), 1321–1328.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.07.008>
- Masri, M., Sukmawaty, E., & Awalia Amir, A. (2022). Anti Fungal Activity of Chitinolytic Bacteria *Lysinibacillus fusiformis* and *Brevibacillus reuszeri* Against The Fungal Pathogens *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*. *Microbiology Indonesia*, 15(4), 3. <https://doi.org/10.5454/mi.15.4.3>
- Moryl, M., Spetana, M., Dziubek, K., Paraszkiwicz, K., Rózalska, S., Płaza, G. A., & Rózalski, A. (2015). Antimicrobial, antiadhesive and antibiofilm potential of lipopeptides

synthesised by *Bacillus subtilis*, on uropathogenic bacteria. *Acta Biochimica Polonica*, 62(4), 725–732. https://doi.org/10.18388/abp.2015_1120

- Naureen, Z., Ur Rehman, N., Hussain, H., Hussain, J., Gilani, S. A., Al Housni, S. K., Mabood, F., Khan, A. L., Farooq, S., Abbas, G., & Harrasi, A. A. (2017). Exploring the potentials of *Lysinibacillus sphaericus* ZA9 for plant growth promotion and biocontrol activities against phytopathogenic fungi. *Frontiers in Microbiology*, 8(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01477>
- Nithya, C., Devi, M. G., & Karutha Pandian, S. (2011). A novel compound from the marine bacterium *Bacillus pumilus* S6-15 inhibits biofilm formation in gram-positive and gram-negative species. *Biofouling*, 27(5), 519–528. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.586127>
- Pradhan, A. K., Pradhan, N., Sukla, L. B., Panda, P. K., & Mishra, B. K. (2014). Inhibition of pathogenic bacterial biofilm by biosurfactant produced by *Lysinibacillus fusiformis* S9. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(2), 139–149. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-0976-5>
- Qi, D., Zou, L., Zhou, D., Zhang, M., Wei, Y., Zhang, L., Xie, J., & Wang, W. (2021). Identification and Antifungal Mechanism of a Novel Actinobacterium *Streptomyces huiliensis* sp. nov. Against *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Tropical Race 4 of Banana. *Frontiers in Microbiology*, 12, 722661. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.722661/FULL>
- Quinteros, M. A., Galera, I. L. D., Tolosa, J., García-Martínez, J. C., Páez, P. L., & Paraje, M. G. (2021). Novel antifungal activity of oligostyrylbenzenes compounds on *Candida tropicalis* biofilms. *Medical Mycology*, 59(3), 244–252. <https://doi.org/10.1093/mmy/myaa046>
- Rahalison, L., Hamburger, M., Hostettmann, K., Monod, M., & Frenk, E. (1991). A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. *Phytochemical Analysis*, 2(5), 199–203. <https://doi.org/10.1002/pca.2800020503>
- Ray, S., Jin, J. O., Choi, I., & Kim, M. (2023). Cell-Free Supernatant of *Bacillus thuringiensis* Displays Anti-Biofilm Activity Against *Staphylococcus aureus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 195(9), 5379–5393. <https://doi.org/10.1007/S12010-022-03971-Z>
- Reilly, E., Alfaro, J. A., Borzelleri, A. R., Branco, E. G., Conklin, D. C., Held, E. S., Kulee, F. Z., Kuzma, A. J., Langdon, N., Lasko, A. M., Neri, S. T., Nichols, J. A., Olawuyi, T. R., Park, E., Rugullies, K., Wilkie, C. D., Krebs, L. R., Carter, D., Hudson, A. O., & Wadsworth, C. B. (2022). Draft Genome Sequences of Three Antibiotic-Producing Soil Bacteria, *Staphylococcus pasteurii* WAM01, *Peribacillus butanolivorans* WAM04, and

Micrococcus yunnanensis WAM06, with Growth-Inhibiting Effects against Commensal Neisseria Strains . *Microbiology Resource Announcements*, 11(10).
<https://doi.org/10.1128/mra.00627-22>

Sarpong Group. (1962). *Dyeing Reagents for Thin-Layer and Paper Chromatography* (F. Cramer, Ed.; 5th ed.). Weinheim.

Suvega, T., & Arunkumar, K. (2019). Probiotic bacteria promote the growth of associating host (red seaweed, *Gracilaria edulis*) also synthesize antibacterial protein. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 19. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101136>

Tao, Z., Yuan, H., Liu, M., Liu, Q., Zhang, S., Liu, H., Jiang, Y., Huang, D., & Wang, T. (2023). Yeast Extract: Characteristics, Production, Applications and Future Perspectives. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(2), 151–166.
<https://doi.org/10.4014/jmb.2207.07057>

Teanpaisan, R., Kawsud, P., Pahumunto, N., & Puripattanavong, J. (2016). Screening for antibacterial and antibiofilm activity in Thai medicinal plant extracts against oral microorganisms. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 7(2), 172–177.
<https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.06.007>

Thuraga, V., Ghadamgahi, F., Dadi, F. A., Vetukuri, R. R., & Chawade, A. (2024). A new bacterial consortia for management of Fusarium head blight in wheat. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-60356-4>

Ubillus, J. A., León Quispe, J., Rojas Durán, R., Trujillo, S. M., & Salazar, L. L. (2015). Actividad antimicrobiana y sinérgica de metabolitos producidos por *Streptomyces erythrogriseus* M10-77 de origen marino. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* (35) (1)

Viju, N., Punitha, S. M. J., & Satheesh, S. (2020). Antibiofilm activity of symbiotic *Bacillus species* associated with marine gastropods. *Annals of Microbiology*, 70(1).
<https://doi.org/10.1186/s13213-020-01554-z>

Wu, Z., Ye, C., Guo, F., Zhang, S., & Yu, X. (2013). Evidence for broad-spectrum biofilm inhibition by the bacterium *Bacillus* sp. strain SW9. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(5), 1735–1738. <https://doi.org/10.1128/AEM.02796-12>

Yook, G., Nam, J., Jo, Y., Yoon, H., & Yang, D. (2025). Metabolic engineering approaches for the biosynthesis of antibiotics. *Microbial Cell Factories* (Vol. 24, Issue 1).
<https://doi.org/10.1186/s12934-024-02628-2>

CAPITULO 3. Metabolitos de plantas

Introducción

Las plantas han sido utilizadas para tratamientos medicinales por milenios. Desde los comienzos en sus formulaciones más primitivas, como tinturas, polvos, infusiones, entre otras, hasta el aislamiento de compuestos activos puros, los vegetales superiores han dado origen a la farmacéutica que conocemos hoy en día (Chaachouay & Zidane, 2024). Existen diversidad de moléculas activas provenientes de plantas con actividad antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana, anticancerígena, antialérgica, antimutagénica, entre otras (Dincheva et al., 2023). La diversidad estructural de compuestos, sumado a la variedad de fuentes, acceso sencillo, bajo costo y eficiencia comprobada hacen de la búsqueda de metabolitos bioactivos a partir de plantas un camino digno de continuar explorando (Chaachouay & Zidane, 2024). Además, en el caso de los productos naturales resulta particularmente interesante la interacción entre diferentes compuestos contenidos en la misma planta, que pueden ser extraídos de forma concomitante. Los efectos sinérgicos entre diferentes componentes de un mismo extracto resultan en la mejora de la bioactividad de compuestos (Wagner & Ulrich-Merzenich, 2009), mientras que los efectos antagónicos implican la disminución de la actividad global del extracto (Caesar & Cech, 2019a).

Dentro de este marco, el género *Senecio*, de la familia *Asteraceae* resulta particularmente interesante. Con más de 1400 especies (Wong et al., 2022), su nombre se debe a la tendencia a producir frutos “senecientes”, que recuerdan a cabezas con pelo blanco. Habitualmente son herbáceas, pero también pueden aparecer en forma de enredaderas, arbustos, suculentas, plantas epífitas y árboles pequeños (Walter et al., 2020). Muchas de sus especies se han usado con fines medicinales, particularmente en la medicina china, donde se utilizan raíces, tallos, flores y hojas (M. Wu et al., 2025). El género posee diversidad de compuestos, incluyendo sesquiterpenos, flavonoides, ácidos fenólicos y alcaloides, entre otros. Entre ellos los alcaloides pirrolizidínicos destacan por su hepatotoxicidad, que afecta al ganado y ha limitado su uso medicinal (García et al., 2018). Sin embargo, diversos extractos y compuestos aislados de *Senecio* presentan actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, antitumoral, antioxidante, hepatoprotectora y

analgésica (M. Wu et al., 2025). En Sudamérica, especies nativas como *Senecio crassiflorus*, *Senecio heterotrichus* y *Senecio brasiliensis* se distribuyen principalmente en Brasil, Argentina y Uruguay ((Confortin et al., 2021; Instituto de Botánica Darwinion, URL:<http://www.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/DetalleEspecie.asp?forma=&variedad=maritimus&subespecie=&especie=crassiflorus&genero=Senecio&espcod=175094> consultado 18/10/2025; Senecio Crassiflorus Information , 2025 URL: consultado 18/10/2025).

Existen varios reportes de actividad antimicrobiana de extractos de *Senecio*. Por ejemplo, el extracto etanólico de *Senecio nutans* presenta actividad antibacteriana contra *E. coli* y antifúngica contra *Aspergillus niger* (Surco-Laos et al., 2022). Asimismo, los extractos metanólicos de *S. fluvialis* y *S. racemosus* fueron activos contra *P. aeruginosa* y *S. aureus*, mientras que los de *S. nemorensis* y *S. pseudo-orientalis* mostraron inhibición sobre *P. aeruginosa* y todos ellos presentaron actividad contra al menos uno de otros seis microorganismos (Albayrak et al., 2015). El único reporte de actividad antibiofilm de este género corresponde a un extracto en acetato de etilo de *S. hoggariensis*, que presentó buena actividad inhibitoria de biofilms de *C. albicans* (Arab et al., 2022).

Entre los metabolitos secundarios vegetales bioactivos, los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos más abundantes y relevantes. Además de su participación en la defensa frente a patógenos, presentan un amplio potencial para su utilización como antimicrobianos y antibiofilm. Sus mecanismos de acción incluyen interacción con proteínas, membranas, pared celular, inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y de varias vías metabólicas, así como la interferencia en procesos que regulan la formación de biofilms (Slobodníková et al., 2016).

A su vez, la inhibición de biofilms microbianos puede darse a través de varios mecanismos. Los compuestos fenólicos, por ejemplo, son conocidos por afectar la permeabilidad de paredes y membranas celulares (Lobiuc et al., 2023). También se ha relacionado la actividad antioxidante con la inhibición de la formación de biofilms, ya que las especies reactivas de oxígeno (ROS) actúan como señales en la adhesión y producción de matriz extracelular en bacterias como *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* (Ong et al., 2018). Otro mecanismo clave es la interferencia con la comunicación entre

microorganismos, conocida como quorum sensing (QS), que regula múltiples procesos implicados en la formación de biofilms. Este sistema de señalización, conservado entre bacterias gram positivas y gram negativas, y también descrito en hongos como *C. albicans*, puede ser bloqueado por moléculas que interfieren con la síntesis o detección de sus señales (Albuquerque & Casadevall, 2012; Zhao et al., 2020). Finalmente, la inhibición de la autoagregación celular también representa una estrategia de interés, dado que microorganismos como *C. albicans*, *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* son capaces de autoagregar, lo que constituye un paso temprano en la formación de biofilms (Kumar et al., 2017; Melaugh et al., 2023).

Los extractos de compuestos naturales, con su complejidad, pueden presentar una ventaja sobre los compuestos aislados, ya que en los mismos pueden encontrarse moléculas con acción sobre diferentes mecanismos de formación y mantenimiento de los biofilms, haciéndolos más eficaces y disminuyendo la probabilidad de generar resistencia. En este contexto, el presente trabajo se orientó a la extracción de los compuestos fenólicos presentes en flores de *S. crassiflorus*, *S. heterotrichus* y *S. brasiliensis*, evitando la presencia de alcaloides pirrolizidínicos, con el fin de obtener extractos potencialmente activos, pero no tóxicos. Los extractos en etanol y metanol fueron evaluados frente a cuatro microorganismos de interés clínico: *S. aureus*, *C. albicans*, *P. aeruginosa* y *E. coli*. Aquellos con actividad relevante fueron analizados para explorar sus posibles mecanismos de acción y caracterizar su composición química, con el objetivo de establecer correlaciones entre los compuestos presentes y la actividad antibiofilm observada (Figura 3.1).

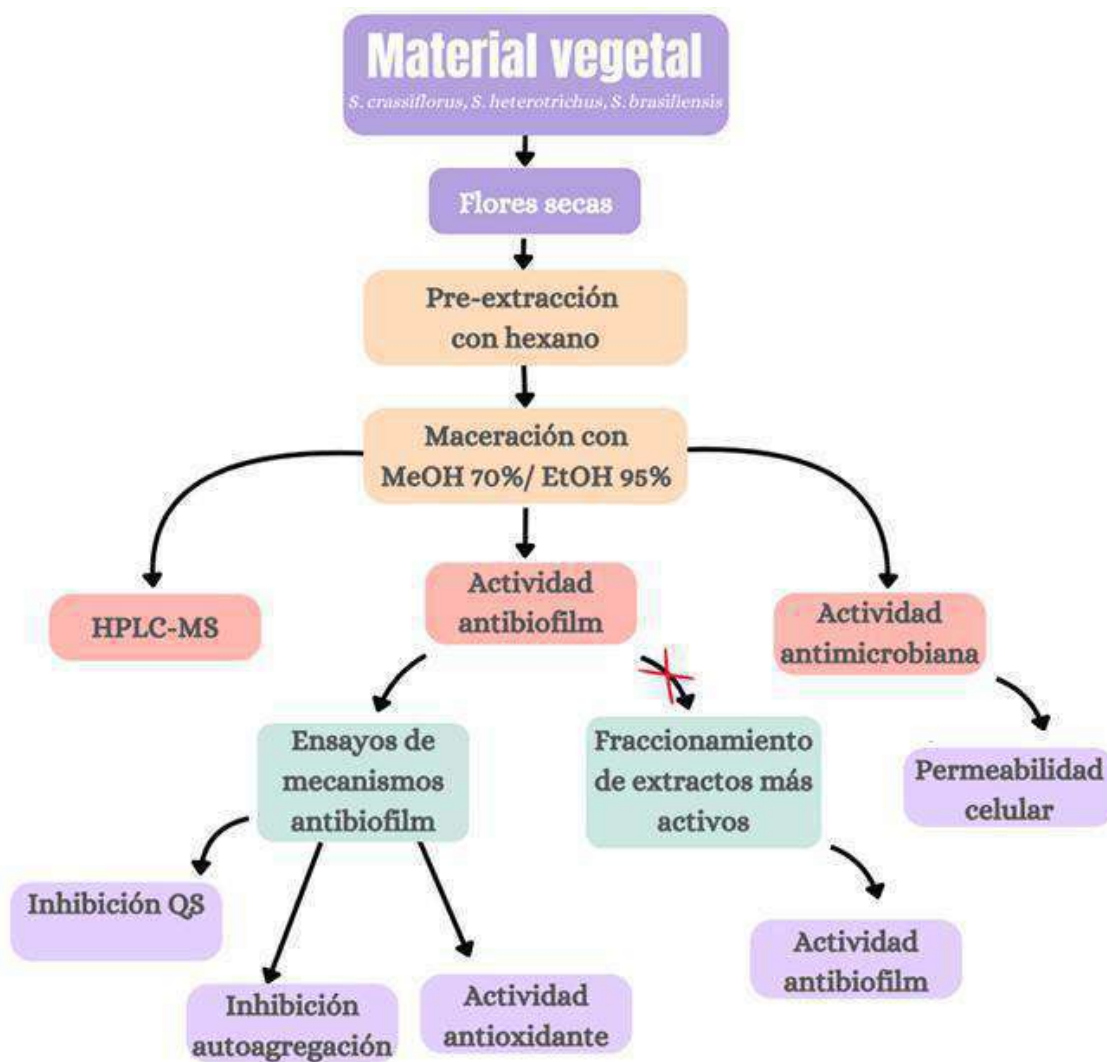


Figura 3.1. Representación esquemática del trabajo realizado.

Materiales y métodos

Reactivos y Solventes

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica. Los solventes fueron de calidad analítica, HPLC o HPLC/MS según el caso.

Los estándares fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (St. Louis, EE. UU.), los caldos de cultivo a Thermo Fisher Scientific (CA, EE. UU.)

Colección e identificación del material vegetal

El material vegetal fue colectado en el departamento de Maldonado en enero y febrero de 2021 e identificado como *Senecio crassiflorus*, *Senecio heterotrichus* y *Senecio brasiliensis* Laboratorio de Bótanica Farmaceutica, FQ.

Extracción

Las flores secas de las tres especies de *Senecio* fueron pre-extraídas con hexano por 4 h para minimizar la presencia de compuestos lipofílicos y luego se realizaron extractos en EtOH 95% y MeOH 70% durante 24 h. Cada extracto fue filtrado, evaporado a vacío y liofilizado. Para ensayos de actividad antimicrobiana y antibiofilm, se retomaron en DMSO.

Fraccionamiento de extractos

Para cada especie de *Senecio* se seleccionó el extracto con mayor actividad antibiofilm y se realizó una purificación por cromatografía en columna de poliamida, dada su afinidad por los compuestos fenólicos.

Se seleccionaron las muestras *S. crassiflorus* EtOH, *S. heterotrichus* EtOH y *S. brasiliensis* MeOH. Aproximadamente 500mg de extracto se adsorbieron sobre 0,3g de poliamida y se sembraron en una columna de 4x20cm empacada con 3,5 g de poliamida (Machery-Nagel 815600.5, diam.0.1-0.3 mm). Posteriormente, se realizaron eluciones con sucesivas fracciones de 20 ml de agua, EtOH 30%, EtOH 50%, EtOH 70% y EtOH 100%. Todas las fracciones eluidas fueron evaporadas a vacío y liofilizadas.

Análisis por HPLC-MS

La caracterización primaria de los extractos se realizó por cromatografía líquida (LC) acoplada a espectrometría de masas (incluyendo tándem MS/MS) por medio de un instrumento UHPLC (Ultimate 3000 Rapid Separation Liquid Chromatography systems, Dionex, Germany) acoplado a un espectrómetro de masas equipado con un analizador de trampa de iones lineal (LTQ-XL™ Thermo-Fisher Scientific). Las muestras fueron analizadas utilizando una columna analítica de fase reversa Hypersil Gold RP C18 (50 mm × 2.1 mm ID, 1.9 µm, Thermo Scientific, USA). Se inyectó en el sistema UHPLC-MS 10 µl de cada extracto en solución (10 mg/mL en MeOH). Se empleó como sistema de elución un gradiente de MeOH y agua, ambos con 0.1% de HCOOH. La composición inicial de la fase móvil fue de 5% de MeOH variando a lo largo de 25 minutos hasta 95% de MeOH, permaneciendo en esa concentración por dos minutos, volviendo a condiciones iniciales en el lapso de 5 minutos y permaneciendo a 95% de MeOH durante 3 minutos. El flujo fue seteado en 0.25 mL/min y la temperatura de la columna fijada en 35 °C. El equipo LTQ-XL™ se operó en modo negativo y se programó la adquisición MS² data-dependent™ para la identificación completa de metabolitos.

DI-ESI-IT-MSⁿ

Se realizó la infusión directa en la fuente ESI de los extractos etanólicos de *S. crassiflorus*, *S. heterotrichus* y *S. brasiliensis* a una concentración 0.1 mg/ml en MeOH. Los parámetros de ESI fueron los siguientes: voltaje de spray: 4,0 kV, voltaje capilar: -45 V, offset de la lente del tubo: -245 V, flujo de gas de recubrimiento (N₂): 20 u.a., flujo de gas auxiliar (N₂): 20 u.a. y temperatura capilar: 300 °C. El espectrómetro de masas LTQ se operó en modo negativo, con un barrido de m/z 100 a 2000. La muestra se introdujo en la fuente ESI mediante una bomba de jeringa (caudal de 10 µl/min). La identificación estructural de los iones producidos por ESI se realizó mediante múltiples experimentos de espectrometría de masas.

Ensayos microbiológicos

Las cepas utilizadas para los ensayos microbiológicos fueron: *P. aeruginosa* ATCC15442, *S. aureus* ATCC6538, *E. coli* ATCC25922, *C. albicans* ATCC 101231.

Determinación de Concentración Inhibitoria Mínima

La determinación de Concentración Inhibitoria Mínima de crecimiento de células planctónicas fue determinada utilizando la técnica descrita en el Capítulo 2 de esta tesis. Se realizó sobre los seis extractos sin purificar.

Actividad antibiofilm

La capacidad de las cepas *P. aeruginosa* ATCC15442, *S. aureus* ATCC6538 y *C. albicans* ATCC101231 para formar biofilms fue evaluada en el Capítulo 2 de esta tesis. En este Capítulo se incluyó además la cepa de *E. coli* ATCC25922, por lo cual fue necesario evaluar su capacidad de formación de biofilms, procediendo a realizar el mismo protocolo descrito previamente. Brevemente, se inoculó una suspensión bacteriana (1×10^7 células/ml) en caldo nutritivo y se incubó a 37 °C durante 24 h para permitir la fijación celular. Los pocillos de control contenían sólo caldo. Tras la incubación, se eliminaron las células no adheridas mediante lavados con agua destilada, se secaron las placas y se tiñeron con una solución 1% de cristal violeta. Luego, se eliminaron los excedentes del colorante y se extrajo con etanol-acetona. La densidad óptica (DO) a 590 nm se midió en un lector de microplacas. Según la DO promedio frente al control (DOc), las cepas se clasificaron en: no productoras ($DO \leq DOc$), productoras débiles ($DOc < DO \leq 2 \times DOc$), moderadas ($2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$) o fuertes ($DO > 4 \times DOc$).

La determinación de concentración inhibitoria mínima y capacidad de erradicación de biofilms se determinó según el método descrito en el Capítulo 2 utilizando los microorganismos *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* y *E. coli*.

Se evaluó la actividad antibiofilm para los 6 extractos de *Senecio*, ácido cafeico, ácido quínico, ácido clorogénico, rhamnetina, quercetina y rutina.

Evaluación de integridad estructural de biofilms

El estudio se realizó por Microscopía Láser Confocal se realizó como se describió en el Capítulo 2, para las muestras de extracto de *Senecio* que presentaron capacidad para inhibir biofilms de bacterias (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E.coli*). En este caso los biofilms bacterianos se tiñeron con yoduro de propidio. La medición final se realizó en un Microscopio Láser Confocal Leica modelo TCS SP5 II disponible en la Facultad de Medicina, Udelar.

Estudios de mecanismos antimicrobianos y antibiofilm

Determinación de permeabilidad celular

Se utilizó la técnica de Li et al. (2020) para el extracto etanólico de *S. heterotrichus* contra *S. aureus* en estado planctónico. Se cultivó la bacteria en caldo nutriente y se ajustó la densidad óptica a 600 nm a aproximadamente 1. Se mezcló con una solución 100 μ M de N-fenil-1-naftilamina (NPN) en acetona hasta una concentración final de 20 μ M. En una placa de microtitulación se colocó 5 μ l de muestra, 95 μ l de PBS 1x y 100 μ l de la suspensión de células microbianas con la sonda fluorescente. Como control negativo se usó PBS 1x y como control positivo *E. coli* previamente tratado con ácido cítrico (1mg/ml) en agua. Se tomaron las medidas en un espectrofluorímetro (Thermo Scientific Varioskan LUX Multimode Microplate Reader), con una longitud de onda de excitación de 350 nm y de emisión de 420 nm, a 0, 15, 30, 60, 120 y 240 min. Las medidas se realizaron por triplicado. El aumento de permeabilidad celular se relaciona directamente con el aumento de la fluorescencia en la longitud de onda de emisión.

Determinación de contenido de fenoles totales y actividad antioxidante

El contenido de fenoles de cada uno de los extractos sin purificar fue determinado usando el método de Folin-Ciocalteu (Magalhães et al., 2010). En una microplaca de 96 pocillos (Thermo Scientific™ Nunc™ MicroWell™, fondo plano) se colocaron 20 μ l de cada muestra y 100 μ l de reactivo de Folin-Ciocalteu en cada pocillo, se mezcló y se dejó reposar por 5 minutos. Posteriormente, se agregaron 80 μ l de carbonato de sodio 7,5 % y la placa se incubó por 2 horas protegida de la luz. Se midió absorbancia a 750 nm utilizando un lector de microplacas (Thermo Scientific Varioskan LUX Multimode

Microplate Reader). Se realizó una curva de calibración usando diferentes concentraciones de ácido gálico (0,050-1,000 mg/ml). Cada muestra y punto de la curva se realizó por cuadruplicado.

Para evaluar la actividad antioxidante, la inhibición de radicales de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) fue determinado por una modificación del método de Bobo-García (2015) para cada uno de los extractos sin purificar. Para la curva de calibración, se utilizaron soluciones de 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) en MeOH en concentraciones de 100 a 500 μ M y se utilizó MeOH como blanco. Brevemente, se colocaron 180 μ l de una solución de DPPH a 162 μ M en MeOH en cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos (Thermo Scientific™ Nunc™ MicroWell™, fondo plano). Se midió la absorbancia a t=0min a 515nm. Posteriormente se agregaron 20 μ l de muestra, blanco o soluciones estándar de Trolox y se incubó la placa en la oscuridad por 40min. Se determinó la absorbancia a 515 nm (t=40min). Todas las muestras, blancos y puntos de la curva de calibración fueron hechas por triplicado. La actividad inhibitoria fue determinada como: $Ab_{t=0} - Ab_{t=40} - Ab_{Blanco}$

Inhibición de autoagregación de microorganismos

La capacidad de inhibición de autoagregación microbiana por los extractos con actividad antibiofilm fue determinada usando una adaptación del método de Li et al. (2020), evaluada frente a *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* y *C. albicans*. Las bacterias fueron cultivadas en CN y *C. albicans* en PDB durante la noche. Luego, se centrifugaron y se lavaron dos veces con PBS 1x (7000 RPM, 4 °C, 10 min). Se resuspendió el pellet en PBS 1x y se ajustó la $DO_{600nm} \approx 1$, agregándose la muestra en DMSO para obtener una concentración final de 250 μ g/ml. Al control se agregó sólo DMSO. Se midió la DO_{600nm} a tiempos 0 h, 2 h, 4 h y 6 h. El coeficiente de autoagregación se determinó como $\%AA = 1 - (DO_{600nm, tf} / DO_{600nm, ti}) * 100$, donde $DO_{600nm, tf}$ es la medida tomada a los diferentes tiempos y $DO_{600nm, ti}$ es la medida tomada a tiempo=0 h. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Determinación de capacidad inhibitoria de *quorum-sensing*

El ensayo se realizó utilizando el método de Kalia et al. (2018) con modificaciones, sobre los extractos que presentaron actividad contra *P. aeruginosa* y *E. coli*. Para este ensayo, se utilizó la cepa reportera *Chromobacterium violaceum* CV026. La bacteria *C. violaceum* es capaz de producir un pigmento violeta llamado violaceína en respuesta al mecanismo de *quorum-sensing*. Dada la conservación entre los mecanismos de quorum-sensing en bacterias gram negativas explicado en la introducción, la inhibición de producción de violaceína en contacto con extractos o moléculas de interés se atribuye a una inhibición en este mecanismo, lo cual puede extrapolarse a la inhibición del quorum-sensing en otras bacterias gram negativas. La cepa CV026 es una mutante mini-Tn5 incapaz de producir homoserinlactona (HSL), pero sí de detectarla. Por este motivo, la HSL es suplementada de forma exógena.

Para el ensayo, 15 µl de N-Hexanoil-L-homoserinlactona 1mg/ml en DMSO:H₂O (1:1) se agregaron a 15 ml de agar de Luria Bertani (LBA) fundido en una placa de petri. Una vez solidificado, se sembró una suspensión de *C. violaceum* en superficie y se colocaron discos de papel embebidos con la muestra. Se utilizaron 20 µl de catequina (0.5 mg/ml) como control positivo y los solventes de vehiculización como control negativo. Se incubó la placa por 24 h a 28 °C. En estas condiciones, la bacteria produjo una coloración violeta. Aquellas muestras que fueron capaces de inhibir el *quorum-sensing* de *C. violaceum* presentaron un halo de inhibición alrededor del disco.

Correlación entre compuestos y actividad inhibitoria de biofilms

Se buscó la correlación entre la presencia de compuestos en los extractos y la actividad inhibitoria y erradicatoria de biofilms utilizando correlaciones de Pearson con base en lo reportado por Touzani et al. (2021). Para esto, se determinó el área debajo de la curva de porcentaje de inhibición o erradicación en función de log[Concentración] para cada microorganismo y se correlacionó con la abundancia relativa (obtenida a partir de los cromatogramas HPLC-MS) de los compuestos en cada extracto. Se clasificaron las correlaciones entre la actividad antibiofilm y la presencia de los diferentes compuestos

según Dahlin et al. (2019). Se consideraron valores absolutos entre 0 y 0,3 correlaciones despreciables, entre 0,3 y 0,5 correlaciones débiles, entre 0,5 y 0,7 correlaciones moderadas, entre 0,7 y 0,9 correlaciones fuertes y entre 0,9 y 1 correlaciones muy fuertes. Además, por encima del valor absoluto 0,811, la correlación es estadísticamente significativa con un $p < 0.05$.

Resultados y discusión

Actividad antimicrobiana

Se determinó la capacidad de los extractos de inhibir el crecimiento planctónico de los cuatro microorganismos estudiados. En la medicina tradicional, los extractos de plantas con CIM menores a 8 mg/ml se consideran activos (Zouine et al., 2024). Sin embargo, en esta sección la mayor concentración evaluada fue 0,5 mg/ml de manera de seleccionar compuestos más eficaces que los reportados en la literatura. Para todos los extractos, con excepción del extracto etanólico de *S. heterotrichus*, la actividad fue mayor a 500 µg/ml. El extracto etanólico de *S. heterotrichus*, por su parte, presentó una CIM de 125 µg/ml contra *S. aureus*, lo cual se considera una actividad alta (Tabla 3.1).

Existen varios reportes de extractos de diferentes especies de *Senecio* con actividad antimicrobiana. Por ejemplo, el extracto metanólico de *S. abyssinicus* presentó actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *Salmonella typhi* en concentraciones entre 200 y 6,25 mg/ml, en ensayos de difusión en agar (Egharevba et al., 2023). Por otra parte, a partir del extracto metanólico de *S. tenuifolius* se aislaron compuestos activos contra *S. aureus*, tanto sensibles como resistentes a la meticilina. Algunos de estos compuestos fueron identificados como 3-[metil-6,7-dihidrobencofuran-4 (5H)-ona], ácido 1,2-benzendicarboxílico, hidroquinona y metil éster (Manubolu et al., 2013). Para el caso de las especies de *Senecio* estudiadas en esta tesis, se reportó previamente actividad antimicrobiana de un extracto de CH₂Cl₂ de *S. heterotrichus* contra *Candida krusei* y *S. aureus* con CIM de 250 y 2500 µg/ml, respectivamente; sin embargo, el extracto etanólico de esta misma especie no presentó actividad (Francescato et al., 2007). Para *S. crassiflorus* y *S. brasiliensis*, se estudió la

actividad antimicrobiana de sus aceites esenciales, aunque ninguna presentó actividad significativa. La primera mostró actividad baja contra *S. aureus* y *B. cereus* (CIM: 4100 y 1025 µg/ml, respectivamente) y la segunda actividad baja contra *Enterococcus hirae* y *Rhodococcus equi*, mientras que no presentó actividad contra *B. subtilis*, *C. albicans*, *Enterococcus faecium*, *E. coli*, *Micrococcus luteus*, *P. aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *S. aureus* ni *Staphylococcus epidermidis* (Heep, 2007; Murari et al., 2008).

Tabla 3.1. Actividad antimicrobiana de los extractos de *Senecio*

Especie de <i>Senecio</i>	Solvente de extracción	Concentración Inhibitoria Mínima (µg/ml)			
		<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
<i>S. crassiflorus</i>	EtOH 95%	>500	>500	>500	>500
	MeOH 70%	>500	>500	>500	>500
<i>S. heterotrichus</i>	EtOH 95%	125	>500	>500	>500
	MeOH 70%	>500	>500	>500	>500
<i>S. brasiliensis</i>	EtOH 95%	>500	>500	>500	>500
	MeOH 70%	>500	>500	>500	>500

Actividad antibiofilm

Teniendo en cuenta que la bioactividad de los compuestos presentes en los extractos puede ser diferente si el microorganismo crece en forma planctónica o en biofilms (ver Introducción-Capítulo 1), a continuación, se presentan los resultados obtenidos para la actividad antibiofilm de los extractos.

Como se explicó en Materiales y Métodos, en este Capítulo se incluyó en el estudio la cepa de *E. coli* ATCC25922, motivo por el cual se evaluó su capacidad de formación de biofilms, probando condiciones de preincubado. Al no observarse diferencias importantes entre los métodos (Figura 3.2), se continuó trabajando con el protocolo sin preincubado. Los resultados permiten clasificar a *E. coli* ATCC25922 como formador moderado de biofilms.

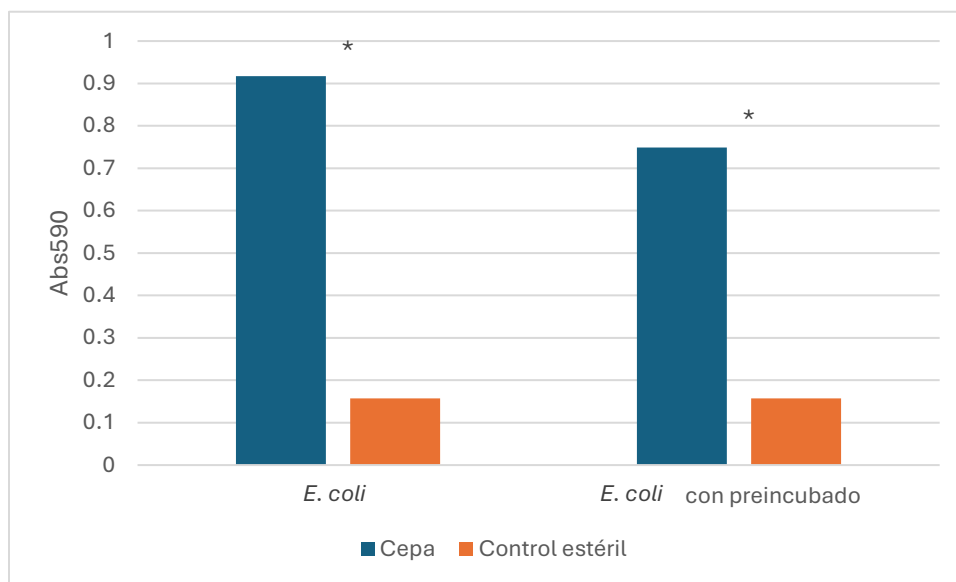


Figura 3.2. Formación de biofilm de *E coli* ATCC25922 en dos condiciones. Los asteriscos determinan diferencia estadística entre los tratamientos $p < 0.05$.

Determinación de Concentración Inhibitoria Mínima de Biofilm

Se determinó la CIMB para los extractos EtOH y MeOH de *S. crassiflorus* contra *C. albicans* (16 $\mu\text{g/ml}$ y 125 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente), el extracto EtOH de *S. heterotrichus* contra *S. aureus* (250 $\mu\text{g/ml}$) y *C. albicans* (125 $\mu\text{g/ml}$), el extracto MeOH de *S. heterotrichus* contra *C. albicans* (500 $\mu\text{g/ml}$) y los extractos EtOH y MeOH de *S. brasiliensis* contra *C. albicans* (500 $\mu\text{g/ml}$). El máximo porcentaje de inhibición de biofilm observado y las correspondientes concentraciones de extracto de *Senecio* utilizadas se muestran en la Tabla 3.2. Asimismo, los resultados de inhibición de biofilm a distintas concentraciones de cada extracto frente a cada microorganismo (seleccionando aquellos que tuvieron mayor actividad) se muestran en la Figura 3.3 y en las Figuras A1.1 a A1.6, contenidas en el Anexo I.

Sólo el extracto etanólico de *S. heterotrichus* fue capaz de inhibir los biofilms de los cuatro microorganismos evaluados (Figura 3.4). Sin embargo, los seis extractos evaluados fueron capaces de inhibir el crecimiento de alguno de los biofilms en estudio. Todas las muestras fueron capaces de inhibir parcialmente los biofilms de *C. albicans* y *S. aureus*.

De acuerdo con la bibliografía, la CIM para biofilms puede ser hasta 100-800 veces mayor que la CIM para células planctónicas (Grooters et al., 2024), por lo que estos resultados presentan resultados de CIMB muy prometedores.

Como se mencionó en la Introducción de este Capítulo, el único reporte de actividad antibiofilm de un extracto del género *Senecio* corresponde a *S. hoggariensis* (Arab et al., 2022), por lo que en esta tesis se presentan por primera vez resultados de actividad antibiofilm de las tres especies de *Senecio* contra cuatro microorganismos patógenos de interés.

Tabla 3.2. Máximo porcentaje de inhibición de biofilm observado y las correspondientes concentraciones de extracto de *Senecio* utilizadas.

Especie de <i>Senecio</i>	Solvente de extracción	<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>C. albicans</i>		<i>E. coli</i>	
		Conc. (µg/ml)	Inhib. (%)	Conc. (µg/ml)	Inhib. (%)	Conc. (µg/ml)	Inhib. (%)	Conc. (µg/ml)	Inhib. (%)
<i>S. crassiflorus</i>	EtOH 95%	4	32	NI		16	91	125	27
	MeOH 70%	4	42	NI		16	81	NI	
<i>S. heterotrichus</i>	EtOH 95%	4	35	16	83	63	52	16	33
	MeOH 70%	125	32	16	78	250	66	NI	
<i>S. brasiliensis</i>	EtOH 95%	8	28	NI		250	59	NI	
	MeOH 70%	125	39	16	57	250	17	NI	

ND: No determinado

NI: No inhibe

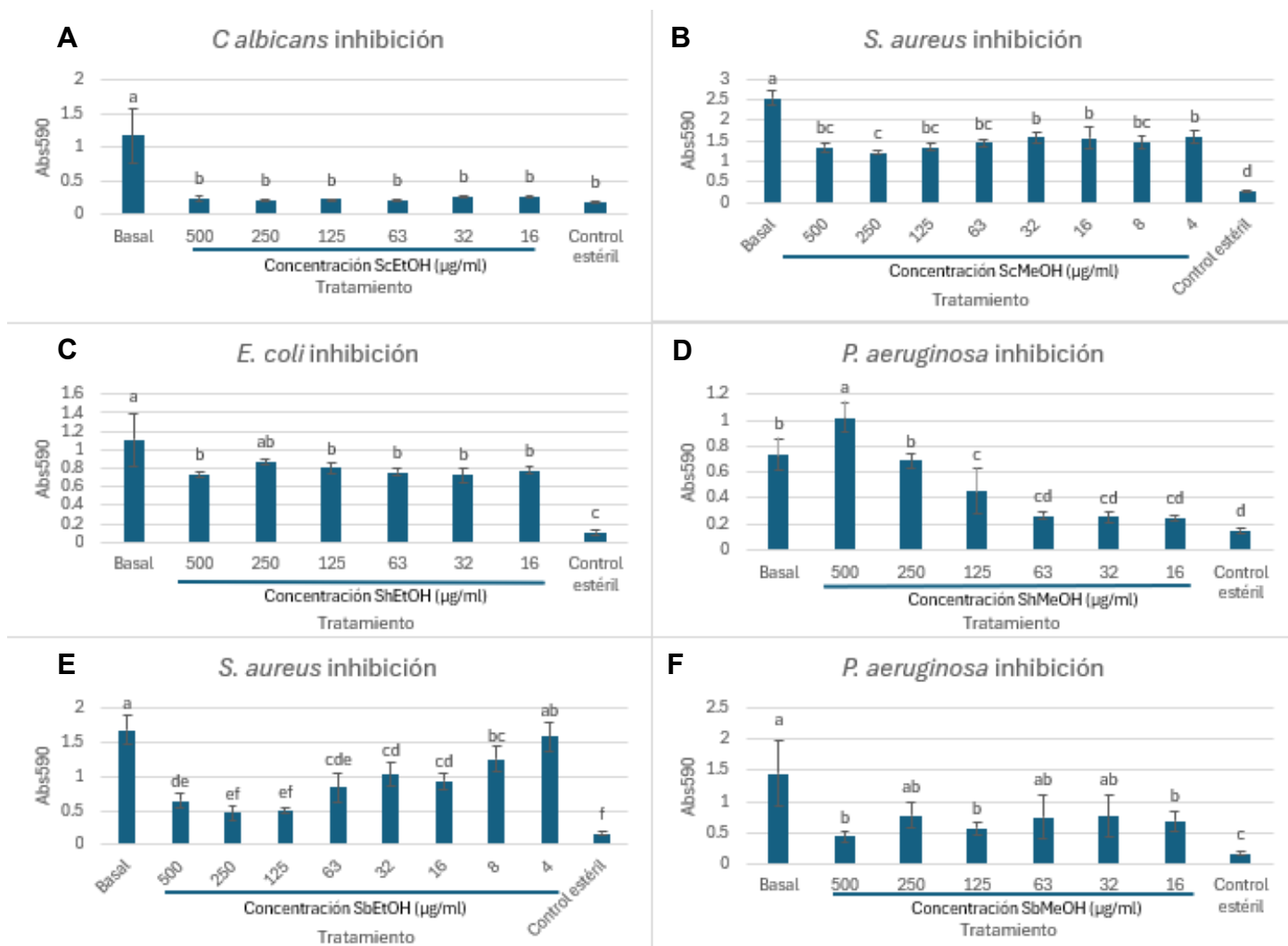


Figura. 3.3. Actividad inhibitoria de biofilms A. ScEtOH frente a *C. albicans*, B. ScMeOH frente a *S. aureus*. C. ShEtOH frente a *E. coli*. D. ShMeOH frente a *P. aeruginosa*. E. SbEtOH frente a *S. aureus*. F. SbMeOH frente a *P. aeruginosa*. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

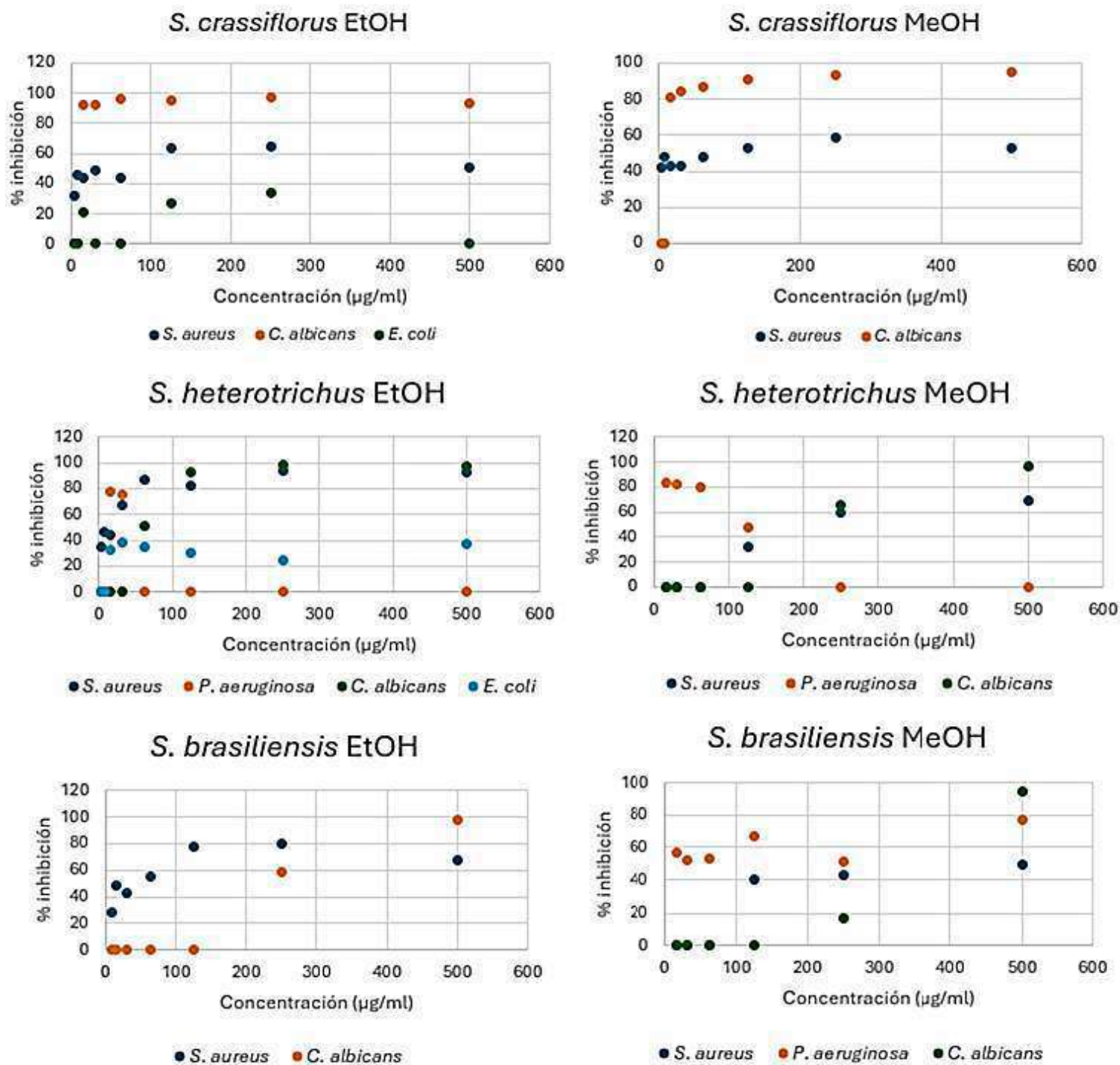


Figura 3.4. Porcentaje de inhibición de biofilms microbianos por los 6 extractos de *Senecio*

A partir de estos resultados, se seleccionaron para su fraccionamiento los extractos de *S. crassiflorus* en EtOH 95%, *S. heterotrichus* en EtOH 95% y *S. brasiliensis* en MeOH 70%. Los resultados de la actividad inhibitoria de biofilms se muestran en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Máximo porcentaje de inhibición de biofilm observado y las correspondientes concentraciones de fracciones de extracto de *Senecio* utilizadas.

Extracto	Fracciones	<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>C. albicans</i>	
		Conc. (µg/ml)	Inhib. (%)	Conc. (µg/ml)	Inhib. (%)	Conc. (µg/ml)	Inhib. (%)
<i>S. crassiflorus</i> EtOH	EtOH 100%	500	72	ND		16	59
	EtOH 70%	NI		ND		16	38
	EtOH 50%	NI		ND		16	70
	EtOH 30%	500	41	ND		31	53
	H ₂ O	NI		ND		63	50
<i>S. heterotrichus</i> EtOH	EtOH 100%	500	46	NI		250	17
	EtOH 70%	NI		NI		63	25
	EtOH 50%	500	84	NI		250	65
	EtOH 30%	NI		NI		63	19
	H ₂ O	NI		NI		125	42
<i>S. brasiliensis</i> MeOH	EtOH 100%	NI		NI		125	86
	EtOH 70%	NI		NI		4	74
	EtOH 50%	ND		NI		16	95
	EtOH 30%	NI		NI		16	76
	H ₂ O	NI		16	36	16	85

ND: No determinado

NI: No inhibe

Para los fraccionamientos de los extractos de *S. crassiflorus* y *S. heterotrichus* se observó una disminución de la actividad antibiofilm para los tres microorganismos evaluados, mientras que para el extracto de *S. brasiliensis* sucede lo mismo en el caso de la actividad contra *S. aureus* y *P. aeruginosa*, pero no contra *C. albicans*. Se puede teorizar que existe una sinergia o aditividad entre compuestos responsables de la actividad antibiofilm y, por lo tanto, este fraccionamiento no resulta útil como estrategia de fraccionamiento o aislamiento bioguiado. Por este motivo, para los sucesivos ensayos biológicos, se decidió continuar trabajando con los extractos enteros.

Microscopía Láser Confocal

Para todas las imágenes obtenidas mediante microscopía láser confocal (CLSM), se observó una disminución notable en la formación de biofilms en comparación con el biofilm basal (control) de *S. aureus* (Figura 3.5), *P. aeruginosa* (Figura 3.6) y *E. coli*

(Figura 3.7). Las reconstrucciones tridimensionales evidenciaron una menor continuidad de la biomasa superficial y reducciones en la altura y densidad de las estructuras del biofilm, lo que sugiere una disminución en la adhesión inicial, la formación o la maduración del biofilm en los tres microorganismos evaluados. Estos hallazgos concuerdan con los resultados obtenidos en los ensayos de microplaca, donde se registró una significativa actividad antibiofilm de los tratamientos evaluados. La microscopía confocal constituye una herramienta clave para el análisis estructural de biofilms, permitiendo obtener información sobre la arquitectura tridimensional y el espesor celular mediante el uso de colorantes específicos. En este caso, la reducción de la biomasa observada sugiere una alteración en los procesos de adhesión y cohesión celular, posiblemente asociada a la interferencia en la matriz extracelular o a efectos directos sobre la viabilidad microbiana, mecanismos reportados frecuentemente para agentes con actividad antibiofilm (Flemming et al., 2016). Las observaciones coinciden con diversos estudios que describen que los tratamientos antimicrobianos con propiedades redox pueden interferir en las etapas iniciales de formación del biofilm o inducir una desorganización estructural del mismo (Monteiro et al., 2012). Este efecto puede manifestarse tanto en la reducción del espesor y heterogeneidad del biofilm, como en la disminución de la cobertura superficial, parámetros que se correlacionan directamente con una menor resistencia a la acción de antimicrobianos.

Cabe destacar que, tal como se mencionó en el Capítulo 2, los biofilms de *C. albicans* no lograron desarrollarse bajo las condiciones experimentales establecidas para el análisis mediante CLSM. Este resultado impidió la obtención de imágenes tridimensionales, posiblemente debido a limitaciones en la adhesión inicial o en el crecimiento estructural del biofilm en el sustrato empleado, aspectos que han sido descritos previamente como dependientes de las condiciones de cultivo, del tipo de medio y de las características del soporte (Cavalheiro & Teixeira, 2018; Nobile & Johnson, 2015).

En conjunto, los resultados obtenidos mediante microscopía láser confocal respaldan los datos cuantitativos de inhibición de biofilm obtenidos en microplaca y confirman que los tratamientos aplicados reducen de manera efectiva la formación o maduración de los

biofilms, lo que podría representar una estrategia prometedora para el control de microorganismos resistentes asociados a superficies biológicas o inertes.

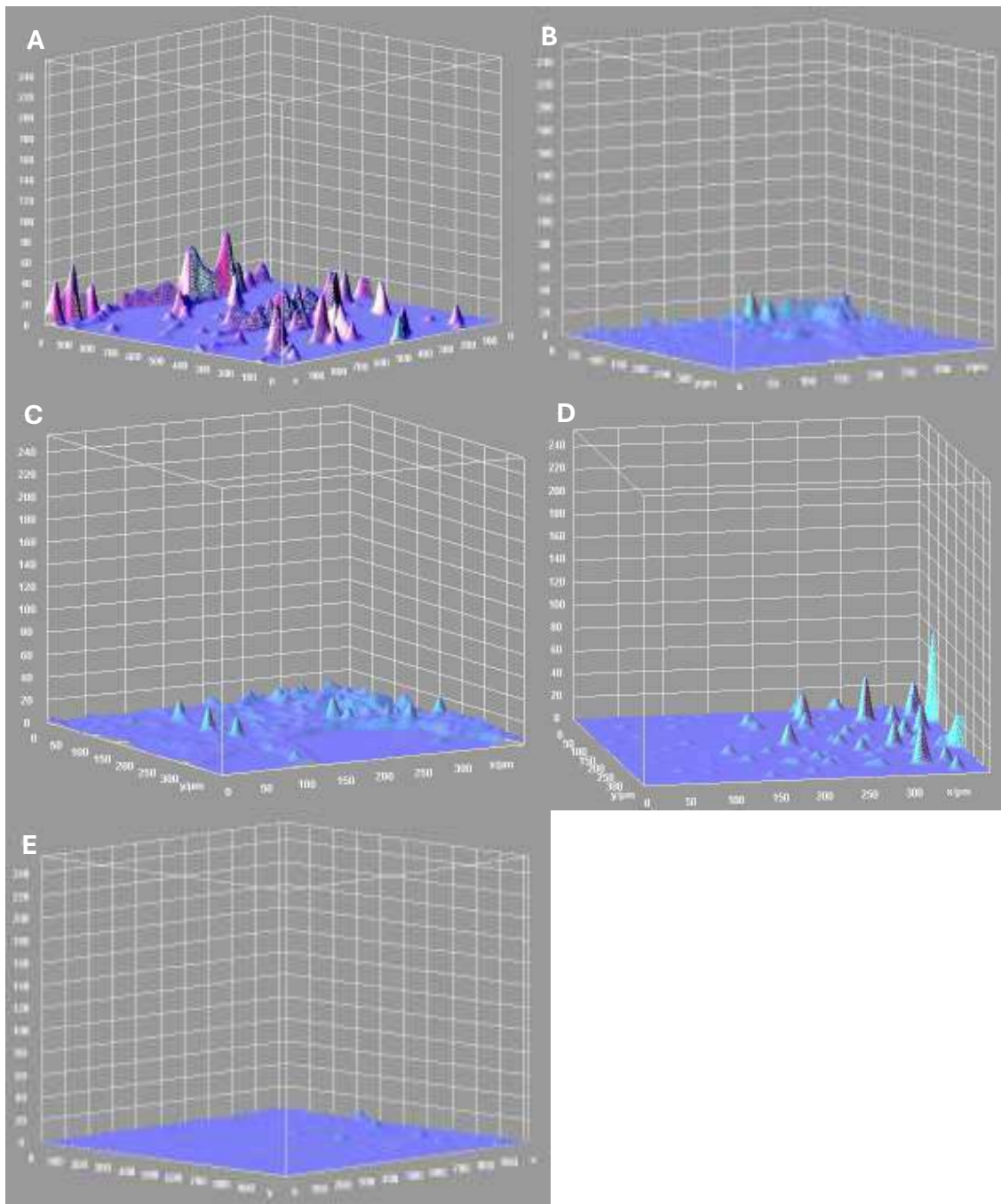


Figura 3.5. Reconstrucción en 3 dimensiones de imágenes de Microscopía Láser Confocal de biofilms de *S. aureus* con y sin tratamiento. A. Biofilm basal. B. ScEtOH. C. ScMeOH. D. ShEtOH. E. ShMeOH

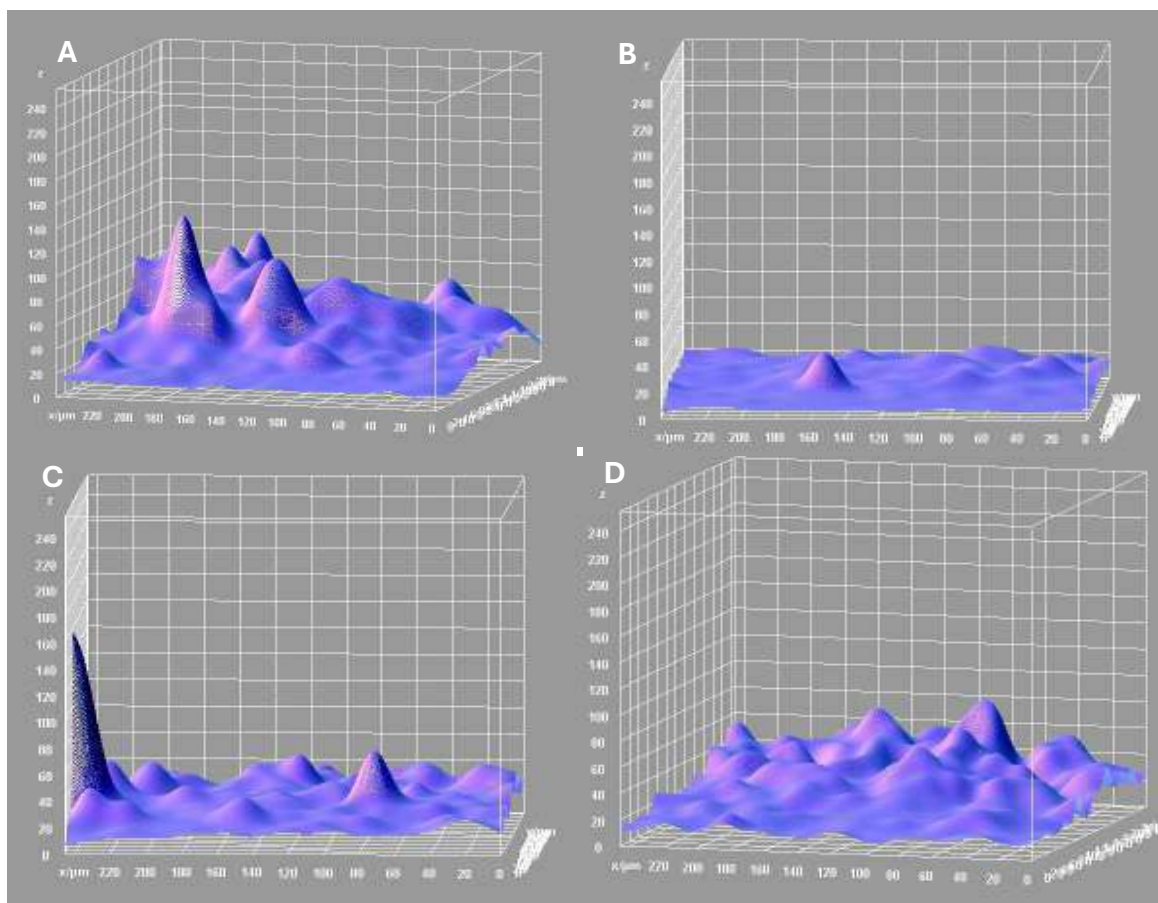


Figura 3.6. Reconstrucción en 3 dimensiones de imágenes de Microscopía Láser Confocal de biofilms de *P. aeruginosa* con y sin tratamiento. A. Biofilm basal. B. ShEtOH. C. ShMeOH. D. SbMeOH

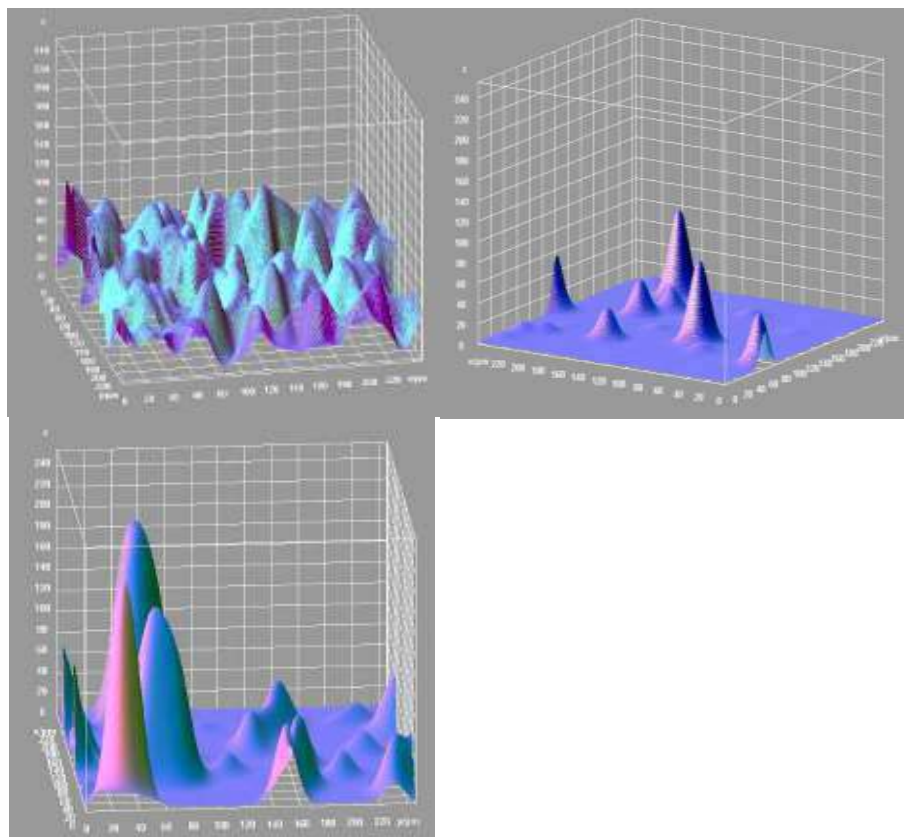


Figura 3.7. Reconstrucción en 3 dimensiones de imágenes de Microscopía Láser Confocal de biofilms de *E. coli* con y sin tratamiento. A. Biofilm basal. B. ScEtOH. C. ShEtOH

Determinación de la capacidad de erradicación de biofilms

Además de la inhibición de la formación de biofilms, se evaluó la capacidad de erradicar biofilms ya formados de los 6 extractos de *Senecio*. El extracto etanólico de *S. crassiflorus* no fue capaz de erradicar ninguno de los biofilms evaluados, mientras que el metanólico fue capaz de erradicar biofilms de *C. albicans* y *E. coli*, aunque a concentraciones altas (500 $\mu\text{g/ml}$) (Tabla 3.4). Ambos extractos de *S. heterotrichus* fueron capaces de erradicar biofilms de *S. aureus* y *E. coli*, los primeros a bajas concentraciones (4 $\mu\text{g/ml}$) y los segundos a altas concentraciones (500 $\mu\text{g/ml}$). Por su parte, los dos extractos de *S. brasiliensis* fueron capaces de erradicar biofilms de *S. aureus* y *C. albicans* a bajas concentraciones (4 $\mu\text{g/ml}$), pero no fueron capaces de erradicar biofilms de *P. aeruginosa* ni *E. coli*. Los resultados de erradicación de biofilm de cada extracto frente a cada microorganismo (seleccionando aquellos que tuvieron

mayor actividad) se muestran en la Figura 3.8 y en las Figuras A1.7 a A1.12, contenidas en el Anexo I.

Tabla 3.4. Porcentaje de erradicación de biofilm observado y las correspondientes concentraciones de extracto de *Senecio* utilizadas.

Especie de <i>Senecio</i>	Solvente de extracción	<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>C. albicans</i>		<i>E. coli</i>	
		Conc. (µg/ml)	Erradic. (%)	Conc. (µg/ml)	Erradic. (%)	Conc. (µg/ml)	Erradic. (%)	Conc. (µg/ml)	Erradic. (%)
<i>Senecio crassiflorus</i>	EtOH 95%	NE		NE		NE		NE	
	MeOH 70%	NE		NE		500	46	500	95
<i>Senecio heterotrichus</i>	EtOH 95%	4	84	NE		NE		500	97
	MeOH 70%	4	70	NE		NE		500	85
<i>Senecio brasiliensis</i>	EtOH 95%	4	61	NE		4	76	NE	
	MeOH 70%	4	77	NE		4	54	NE	

NE: No erradica

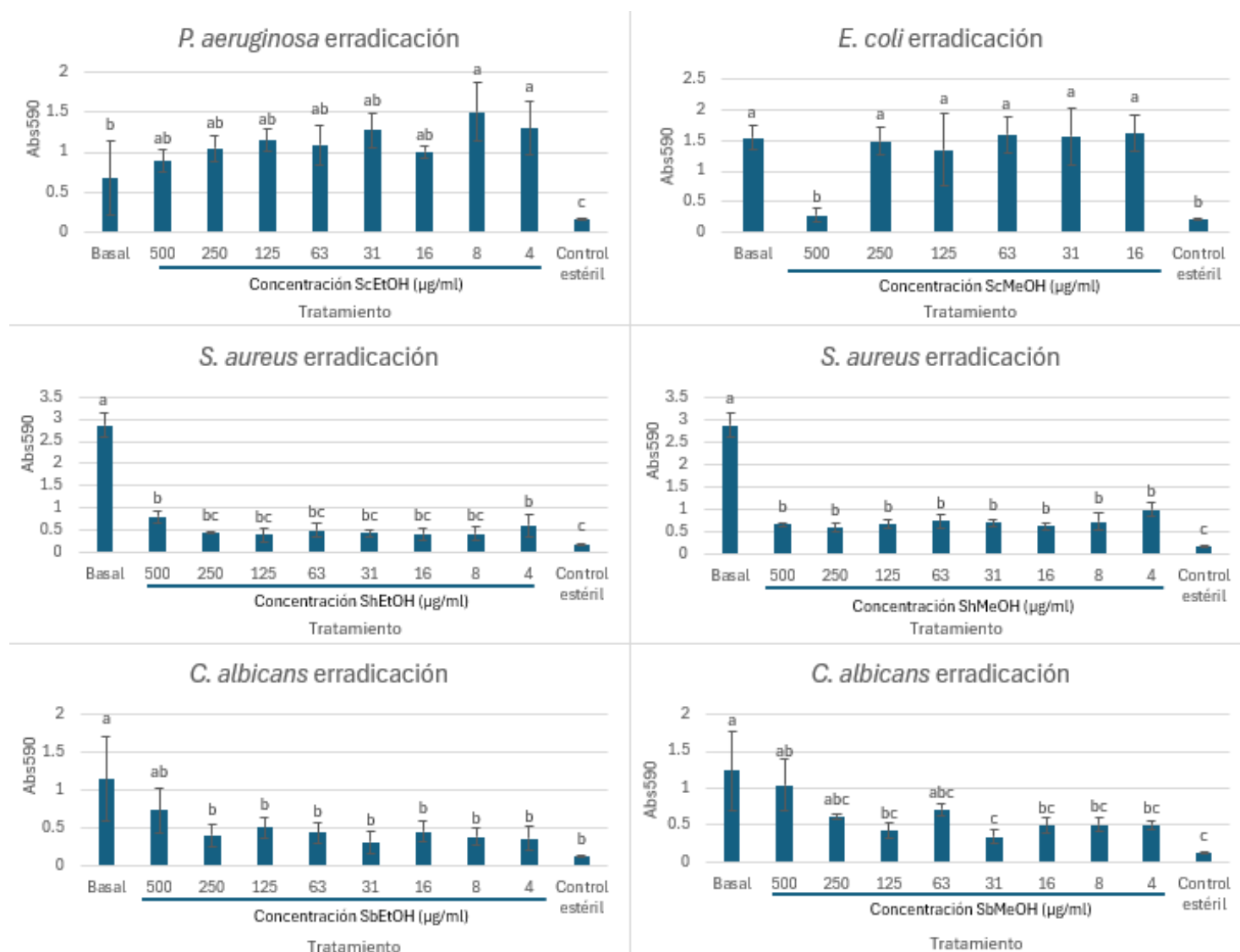


Figura. 3.8 Actividad erradicadora de biofilms A. ScEtOH frente a *C. albicans*, B. ScMeOH frente a *S. aureus*. C. ShEtOH frente a *E. coli*. D. ShMeOH frente a *P. aeruginosa*. E. SbEtOH frente a *S. aureus*. F. SbMeOH frente a *P. aeruginosa*. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Estudios de mecanismos antimicrobianos y antibiofilm

Determinación de aumento de la permeabilidad celular

El NPN es un fluoróforo incapaz de atravesar la membrana celular externa, por lo que su aumento de la fluorescencia respecto a un control puede indicar la permeabilización de dicha membrana causada por los extractos estudiados (Ramirez et al., 2022). Teniendo en cuenta los resultados de actividad antimicrobiana con células planctónicas (Tabla 3.1), este ensayo se realizó con el extracto etanólico de *S. heterotrichus* que presentó actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*. Los resultados mostraron que el extracto no fue capaz de provocar un aumento de fluorescencia respecto al microorganismo sin tratamiento, por lo que podemos interpretar que dicho extracto no genera permeabilidad celular (Figura 3.9).

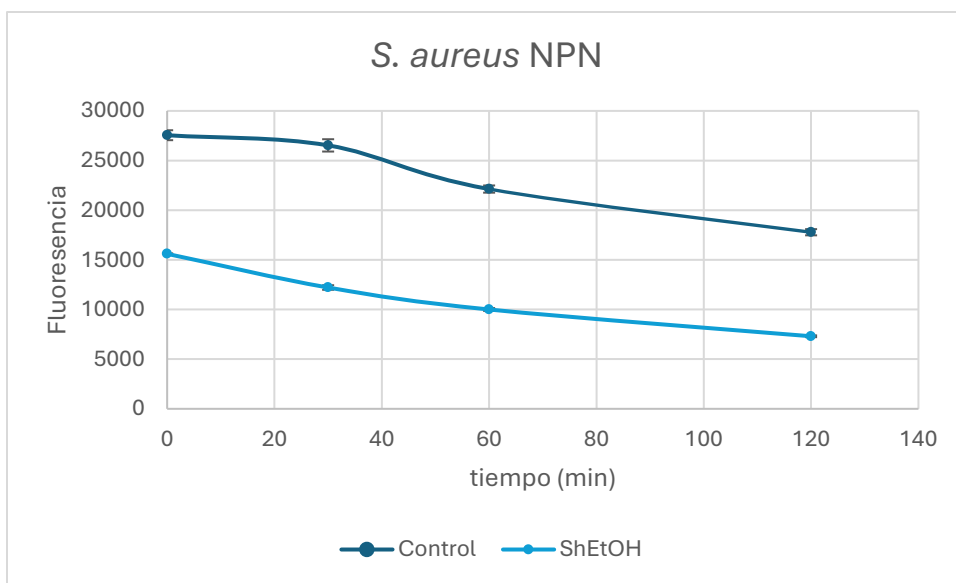


Figura 3.9. Evaluación de la permeabilidad celular de *S. aureus*

Determinación del contenido de fenoles totales y actividad antioxidante

Como se mencionó en la introducción de este Capítulo, este trabajo se orientó a la extracción de los compuestos fenólicos de *Senecio*, por lo que resulta relevante determinar el contenido de fenoles totales en los extractos. Además, un mayor contenido fenólico puede implicar una mayor actividad antioxidante, uno de los mecanismos involucrados en la inhibición de formación de biofilms microbianos (Gambino & Cappitelli, 2016).

El contenido de fenoles totales de los extractos se muestra en la Tabla 3.5. A partir de los resultados obtenidos, sólo mostraron diferencias significativas los extractos metanólico de *S. crassiflorus* y el extracto etanólico de *S. brasiliensis*.

Tabla 3.5 Contenido de fenoles totales en los 6 extractos.
Letras diferentes indican diferencias significativas.

Especie de Senecio	Solvente de extracción	Fenoles totales (mg ácido gálico/g extracto)
<i>S. crassiflorus</i>	EtOH 95%	14,4±3,8 ^{ab}
	MeOH 70%	25,4±2,3 ^a
<i>S. heterotrichus</i>	EtOH 95%	23,5±6,5 ^{ab}
	MeOH 70%	17,6±10,3 ^{ab}
<i>S. brasiliensis</i>	EtOH 95%	12,9±3,8 ^b
	MeOH 70%	19,5±0,7 ^{ab}

Se determinó la actividad antioxidante en equivalentes de Trolox para cada uno de los extractos. Los resultados se presentan en la Tabla 3.6. Para *S. brasiliensis*, se observa una actividad antioxidante equivalente entre los dos extractos y también con el extracto etanólico de *S. heterotrichus*. Por otro lado, sí se observa una importante diferencia entre los dos extractos de *S. crassiflorus*, mostrando el extracto metanólico una actividad mayor al doble de la correspondiente al etanólico, y una diferencia significativa, aunque menos marcada, entre los dos extractos de *S. heterotrichus*. Además, el extracto metanólico de *S. crassiflorus* mostro valores significativamente mayores al extracto etanolico de *S. brasiliensis* en actividad antioxidante, asi como en el contenido de fenoles totales. Estas diferencias podrian explicar la mayor capacidad del primero comparado con el segundo de inhibir biofilms de *S. aureus* y *C. albicans* (Tabla 3.2). Sin

embargo, para los otros extractos no se encontró un indicio de que la actividad antioxidante pueda tener una relación directa en los mecanismos de inhibición de formación de los biofilms.

Tabla 3.6. Actividad antioxidante de los 6 extractos.
Letras diferentes indican diferencias significativas.

Especie	Solvente de extracción	Actividad antioxidante (Eq. Trolox μM)
<i>Senecio crassiflorus</i>	EtOH 95%	156,3 $\pm$ 48 ^d
	MeOH 70%	410,8 $\pm$ 63 ^a
<i>Senecio heterotrichus</i>	EtOH 95%	261,4 $\pm$ 61 ^c
	MeOH 70%	351,8 $\pm$ 57 ^b
<i>Senecio brasiliensis</i>	EtOH 95%	234,6 $\pm$ 52 ^c
	MeOH 70%	239,4 $\pm$ 53 ^c

Inhibición de autoagregación de microorganismos

La autoagregación es una propiedad que exhiben muchos microorganismos por la cual las células pueden unirse entre sí. Este mecanismo es uno de los primeros pasos en la formación de los biofilms microbianos y está reportada para los cuatro microorganismos en estudio (Chantanawilas et al., 2024; Trunk et al., 2018).

Se evaluó la capacidad de aquellos extractos que presentaron actividad antibiofilm contra los microorganismos evaluados de inhibir la capacidad de autoagregación celular. Los resultados de los extractos que produjeron inhibición de la autoagregación se muestran en la Figura 3.10. Para *S. aureus*, se observó una disminución del porcentaje de autoagregación en el tratamiento con los extractos de *S. heterotrichus* y *S. brasiliensis* en MeOH 70% respecto al control, reduciéndose casi a la mitad. Para los otros extractos evaluados, no se observaron diferencias estadísticamente significativas con el control. En el caso de *E. coli*, se observa una disminución significativa en el tratamiento con el extracto etanólico de *S. crassiflorus* respecto del control, con una reducción mayor al 20% y para *C. albicans* se observó una reducción mayor al 10% para los extractos de *S. crassiflorus* en EtOH y *S. heterotrichus* en MeOH. En el caso de *P. aeruginosa*, no se observó variación de la capacidad de autoagregación con ninguno de los tratamientos evaluados.

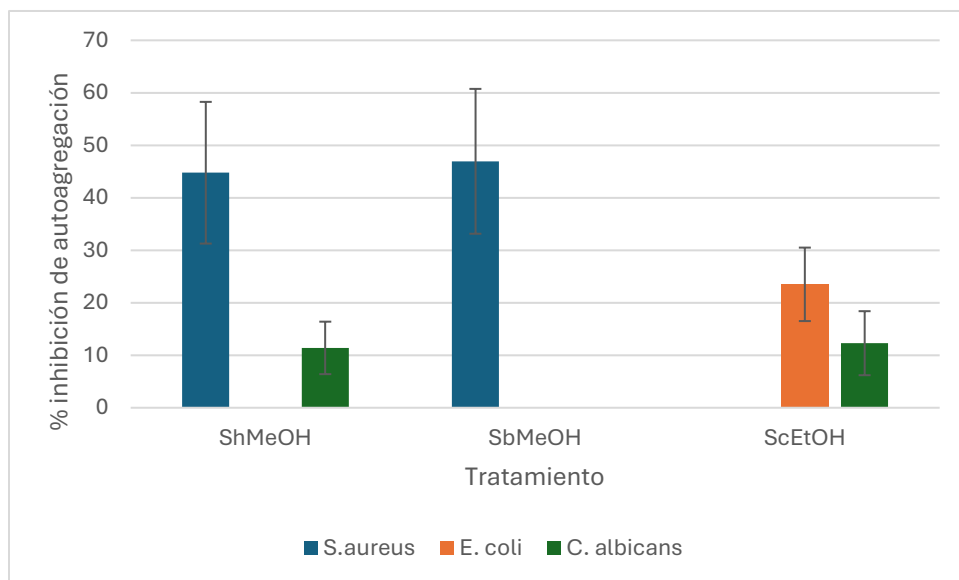


Figura 3.10. Inhibición de autoagregación de extractos de *Senecio*.

Determinación de actividad inhibitoria de *quorum-sensing*

Utilizando la cepa indicadora *C. violaceum* CV026, se determinó que los extractos metanólicos de *S. heterotrichus* y *S. brasiliensis*, los cuales inhibían la formación de biofilms de bacterias Gram negativas (Tabla 3.2), fueron capaces de inhibir el mecanismo

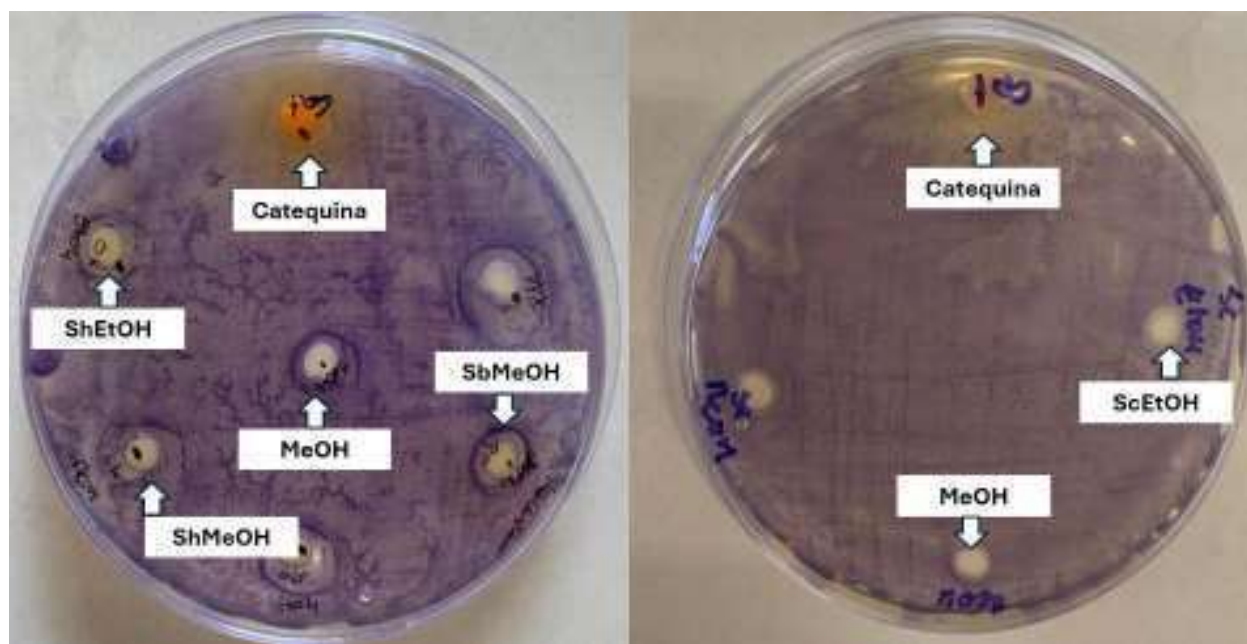


Figura 3.11. Ensayo de inhibición de *quorum-sensing* de *C. violaceum*. por extractos de *Senecio*. Catequina: control positivo. MeOH: control negativo.

de *quorum-sensing* de *C. violaceum*, mientras que los extractos etanólico de *S. heterotrichus* y *S. crassiflorus* no presentaron esta actividad (Figura 3.11). Dada la alta conservación en los mecanismos de *quorum-sensing* en las bacterias gram-negativas, se puede teorizar que esto influye en la capacidad inhibitoria de biofilms de *P. aeruginosa* y *E.coli*.

Análisis químico de los extractos de *Senecio*

Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas tándem

Se realizó la Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas de los seis extractos, obteniéndose los cromatogramas que se muestran en las Figuras 3.12 a 3.17.

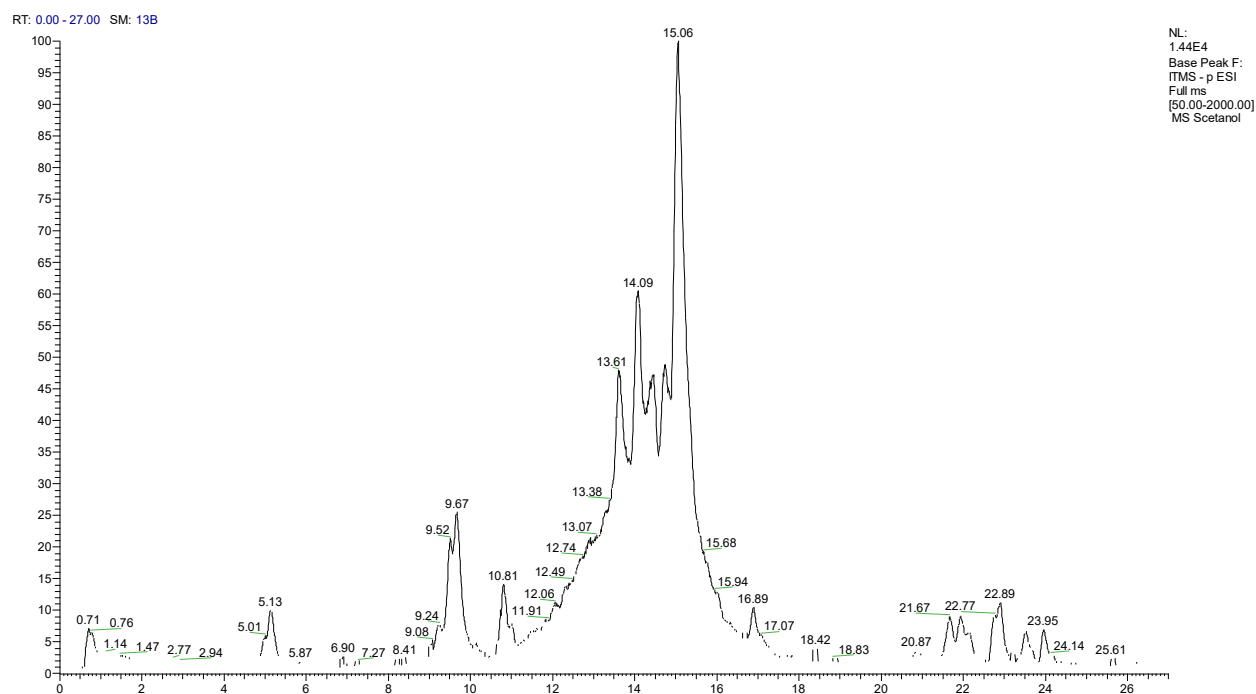


Figura 3.12. Cromatograma de Corriente Iónica Total (TIC) de la muestra ScEtOH.

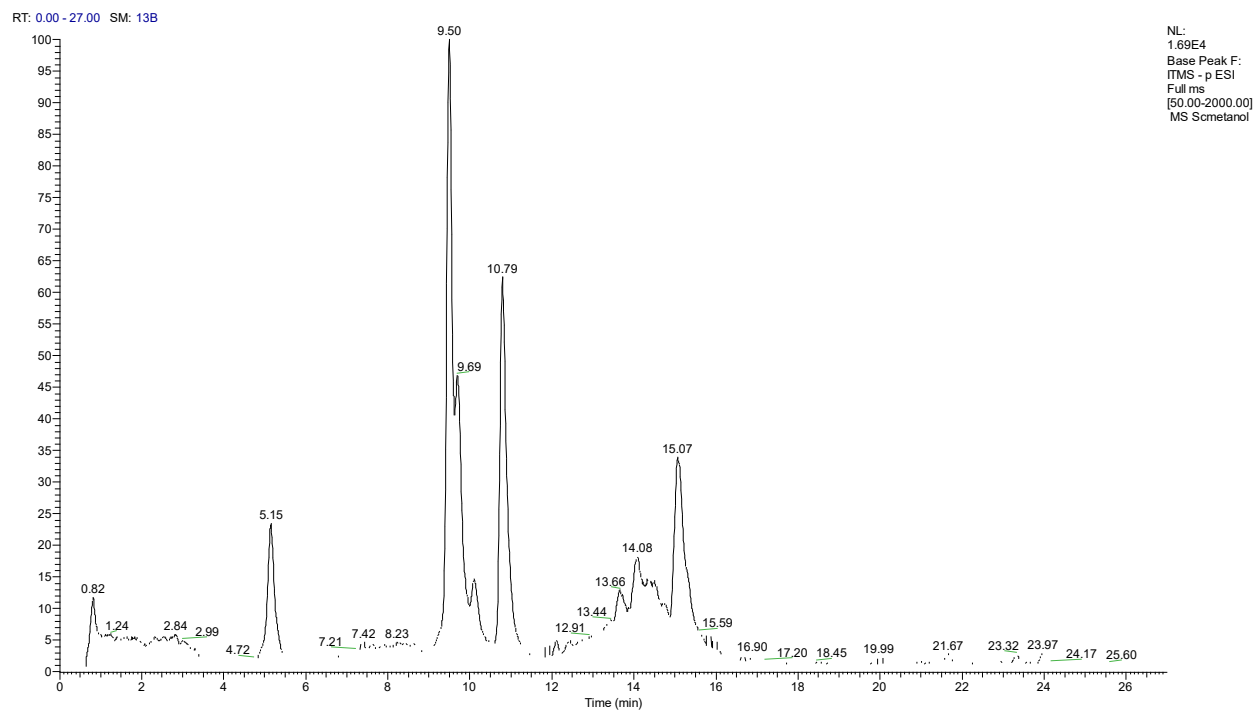


Figura 3.13. Cromatograma de Corriente Iónica Total (TIC) de la muestra ScMeOH.

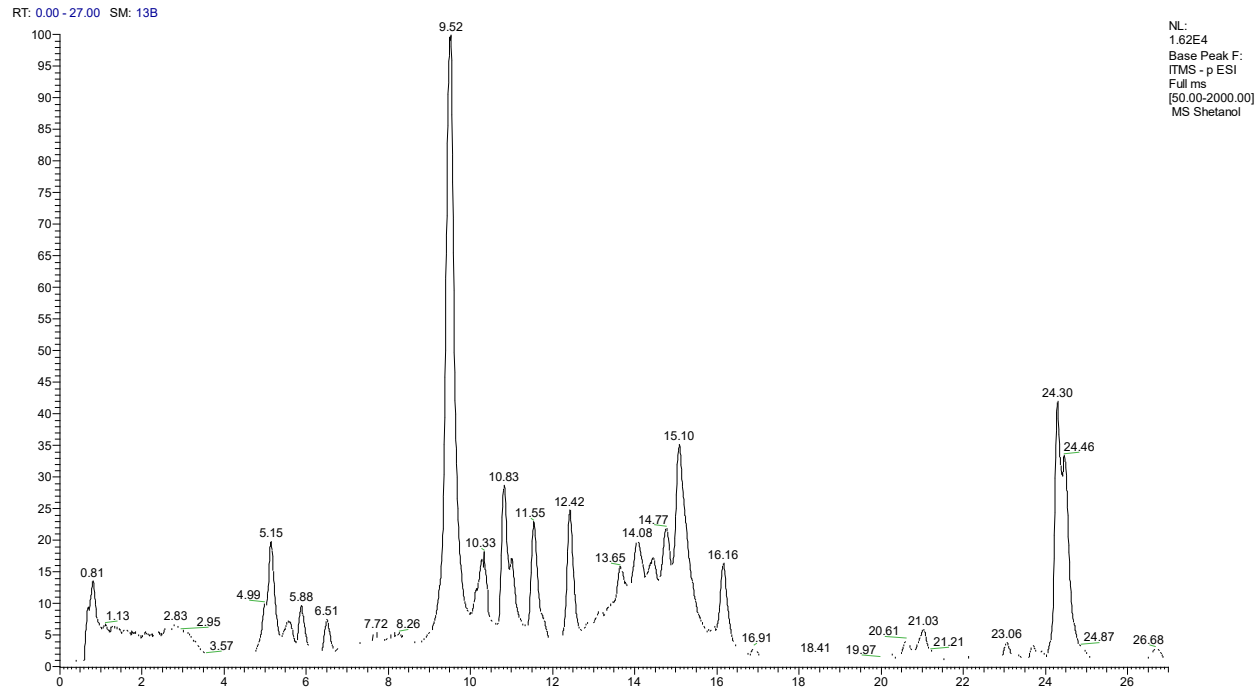


Figura 3.14. Cromatograma de Corriente Iónica Total (TIC) de la muestra ShEtOH.

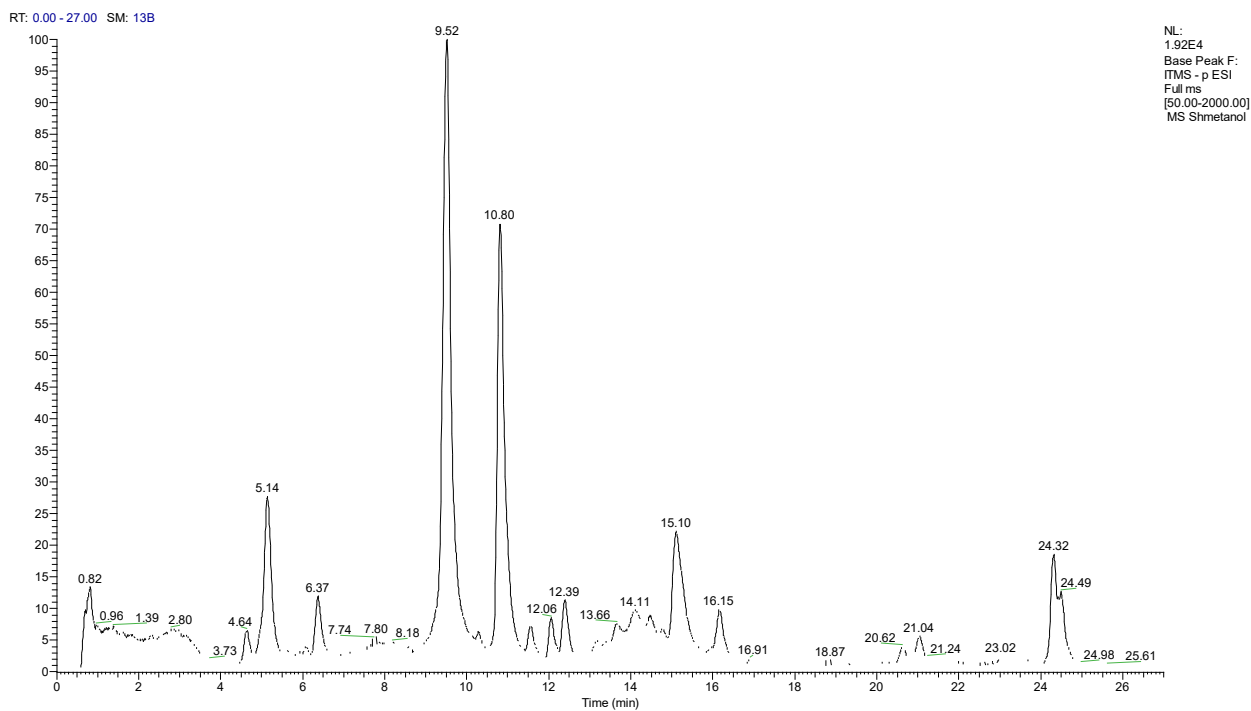


Figura 3.15. Cromatograma de Corriente Iónica Total (TIC) de la muestra ShMeOH.

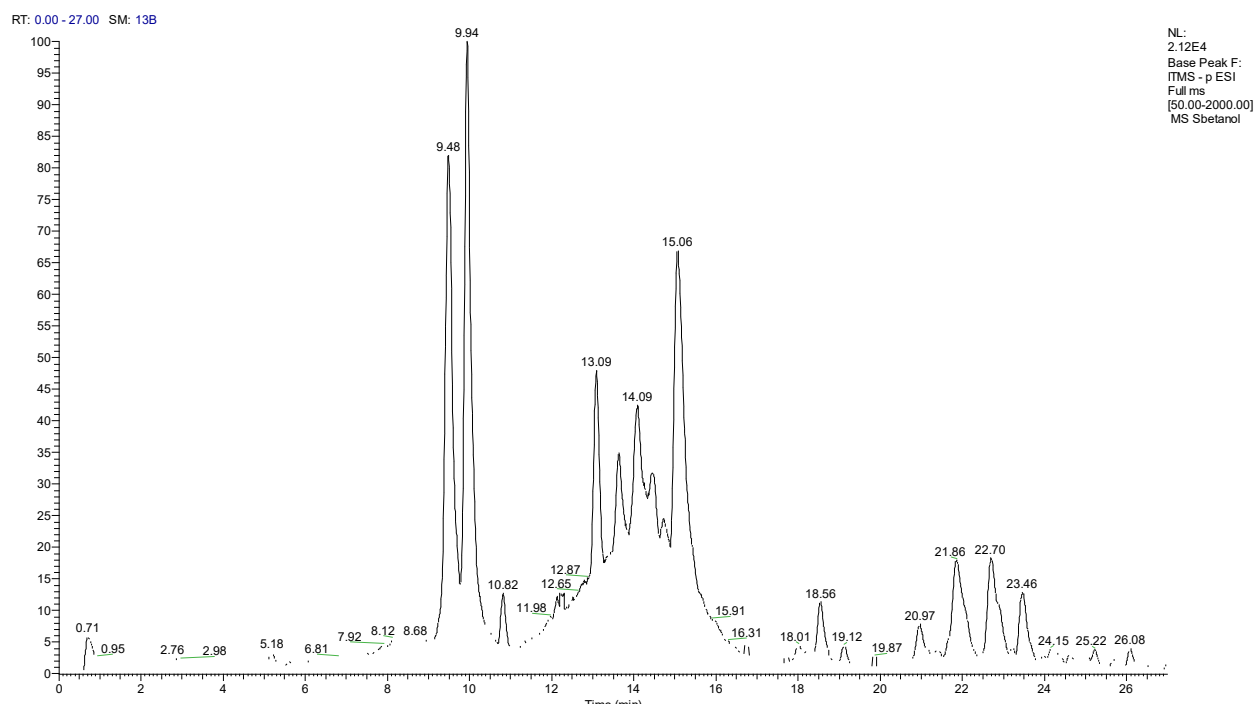


Figura 3.16. Cromatograma de Corriente Iónica Total (TIC) de la muestra SbEtOH.

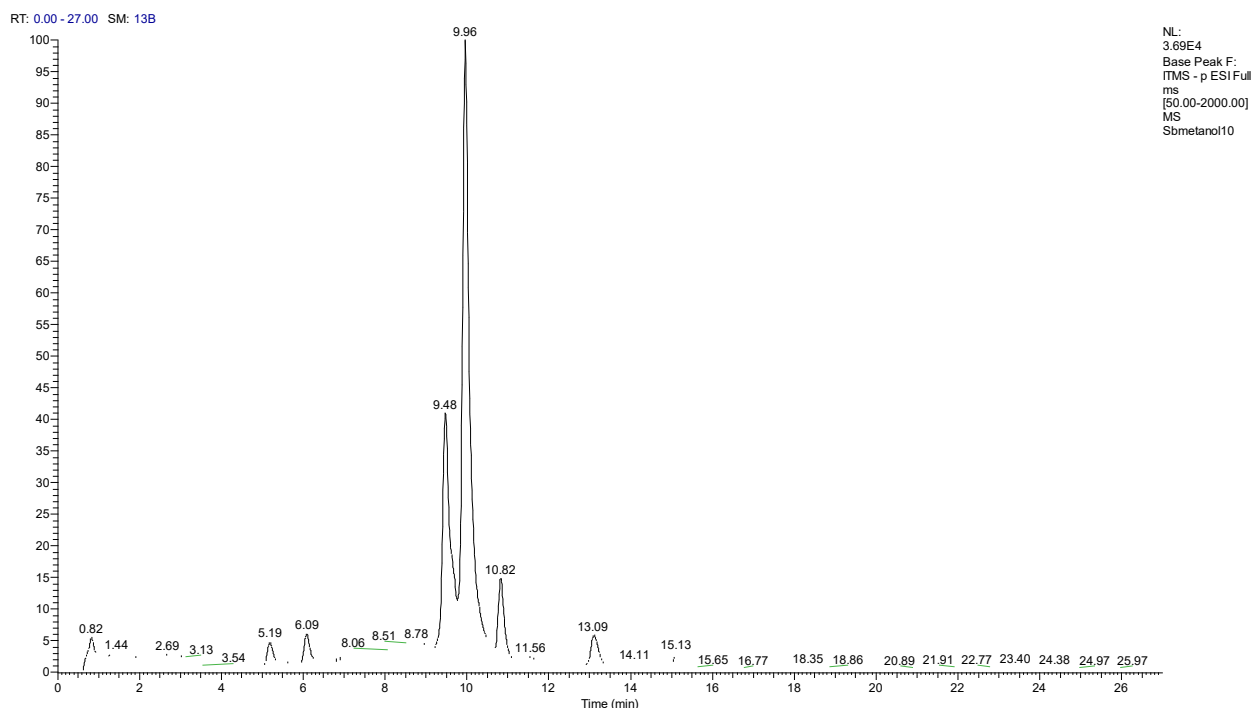


Figura 3.17. Cromatograma de Corriente Iónica Total (TIC) de la muestra SbMeOH.

En base a estos cromatogramas y sus espectros asociados, se elaboró la Tabla 3.7, donde se enumeran los treinta y tres picos identificados con sus tiempos de retención (tR) y presencia en las diferentes muestras.

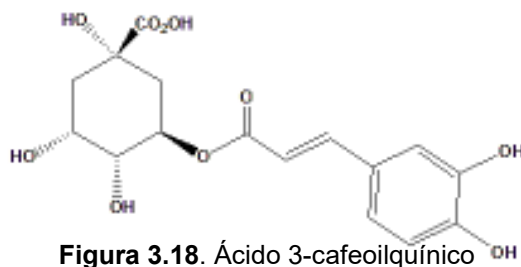
A partir de los espectros de masas de los picos, se realizó la elucidación estructural tentativa de algunos compuestos (Tabla 3.8). Los espectros de masas y masas tándem se muestran en las Figuras 3.18 a 3.24 y las Figuras A2.1 a A1.18, contenidas en el Anexo II.

Tabla 3.7. Picos obtenidos del análisis de los cromatogramas.

Compuesto	tR	Abundancia relativa					
		ScEtOH	ScMeOH	ShEtOH	ShMeOH	SbEtOH	SbMeOH
1	0,81	0	0	0.14	0.14	0	0
2	4,65	0	0	0	0.07	0	0
3	5,13	0.1	0.24	0.2	0.28	0	0.05
4	6,1	0	0	0	0	0	0.06
5	6,3	0	0	0	0.12	0	0
6	8,57	0	0.03	0	0	0	0
7	9,24	0.08	0	0	0	0	0
8	9,42	0.22	1	1	1	0.82	0.41
9	9,62	0.25	0.47	0	0	0	0
10	9,95	0	0.15	0	0	1	1
11	10,3	0	0	0.17	0	0	0
12	10,8	0.14	0.62	0.29	0.71	0.13	0.15
13	11,1	0	0	0.17	0	0	0
14	11,5	0	0	0.23	0	0	0
15	12,4	0	0	0.25	0.12	0	0
16	13,08	0	0	0	0	0.48	0.06
17	13,65	0.48	0.13	0.16	0	0.35	0
18	14,1	0.6	0.18	0.2	0	0.43	0
19	14,4	0.47	0.15	0.17	0	0.32	0
20	14,7	0.49	0	0.22	0	0.25	0
21	15,05	1	0.34	0.35	0.22	0.67	0.03
22	16,2	0	0	0.16	0.1	0	0
23	16,9	0.11	0	0	0	0	0
24	18,3	0	0	0	0	0.03	0
25	18,53	0	0	0	0	0.11	0
26	20,95	0	0	0	0	0.08	0
27	21,45	0.1	0	0	0	0	0
28	21,65	0.1	0	0	0	0	0
29	21,9	0.1	0	0	0	0.18	0
30	22,7	0.1	0	0	0	0.18	0
31	23,4	0.07	0	0	0	0.13	0
32	24,3	0	0	0.42	0.19	0	0
33	24,4	0	0	0.33	0.13	0	0

Tabla 3.8. Identificación preliminar a partir de espectros de MS de picos en los cromatogramas de espectros.

Pico	[M-H] ⁻	Fragmentos principales	Identificación preliminar
3	353	191, 179, 135	Ácido cafeoilquínico (Figura 3.18)
8	463, 515	353, 300, 191, 179	ácido dicafeoilquínico + quercetina O-hexósido (Figura 3.20).
9	609	463, 300, 271, 255	Desoxihexosil hexosil quercetina (Figura 3.22)
10	477	315, 299, 271	Rhamnetina hexósido (Figura 3.24)
11	441	323, 179, 135	Ácido cafeico O [(hidroxipentanoil-O)-hexósido]
12	515	353, 191, 179, 135	Ácido 4,5-dicafeoilquínico (Figura 3.25)
13	441	323, 179, 135	Ácido cafeico O [(hidroxipentanoil-O)-hexósido]
14	455	323, 179, 135	Ácido cafeico O [(hidroxihexanoil-O)-hexósido]
15	455	323, 179, 135	Ácido cafeico O [(hidroxihexanoil-O)-hexósido]
16	315	300, 271, 243	Isorhamnetina (Figura 3.27)
17	785	665, 545	Isómero de di-C-glicosil, O-glicosil (iso)rhamnetina (Figura 3.29)
18	785	665, 545	Isómero de di-C-glicosil, O-glicosil (iso)rhamnetina (Figura 3.29)
19	785	665, 545	Isómero de di-C-glicosil, O-glicosil (iso)rhamnetina (Figura 3.29)
20	785	665, 545	Isómero de di-C-glicosil, O-glicosil (iso)rhamnetina (Figura 3.29)
21	785	665, 545	Isómero de di-C-glicosil, O-glicosil (iso)rhamnetina (Figura 3.29)
22	785	665, 545	Isómero de di-C-glicosil, O-glicosil (iso)rhamnetina (Figura 3.29)



El espectro del pico número 3 se muestra en la Figura 3.19. Se observan los picos 353 y 706, que pueden atribuirse a los iones [M-H] y 2[M-H], además del ion 375, que puede atribuirse a [M-H+Na]. Se observan también los iones 179 y 135, característicos del ácido cafeico, y el ion 191, característico del ácido quínico. Además, al realizar el espectro MS/MS del ion 191, se observa el ion 173, también diagnóstico del mismo ácido (Clifford

et al., 2003). Se realizó la identificación preliminar del pico como un isómero del ácido cafeoilquínico (CQA) (Figura 3.18).

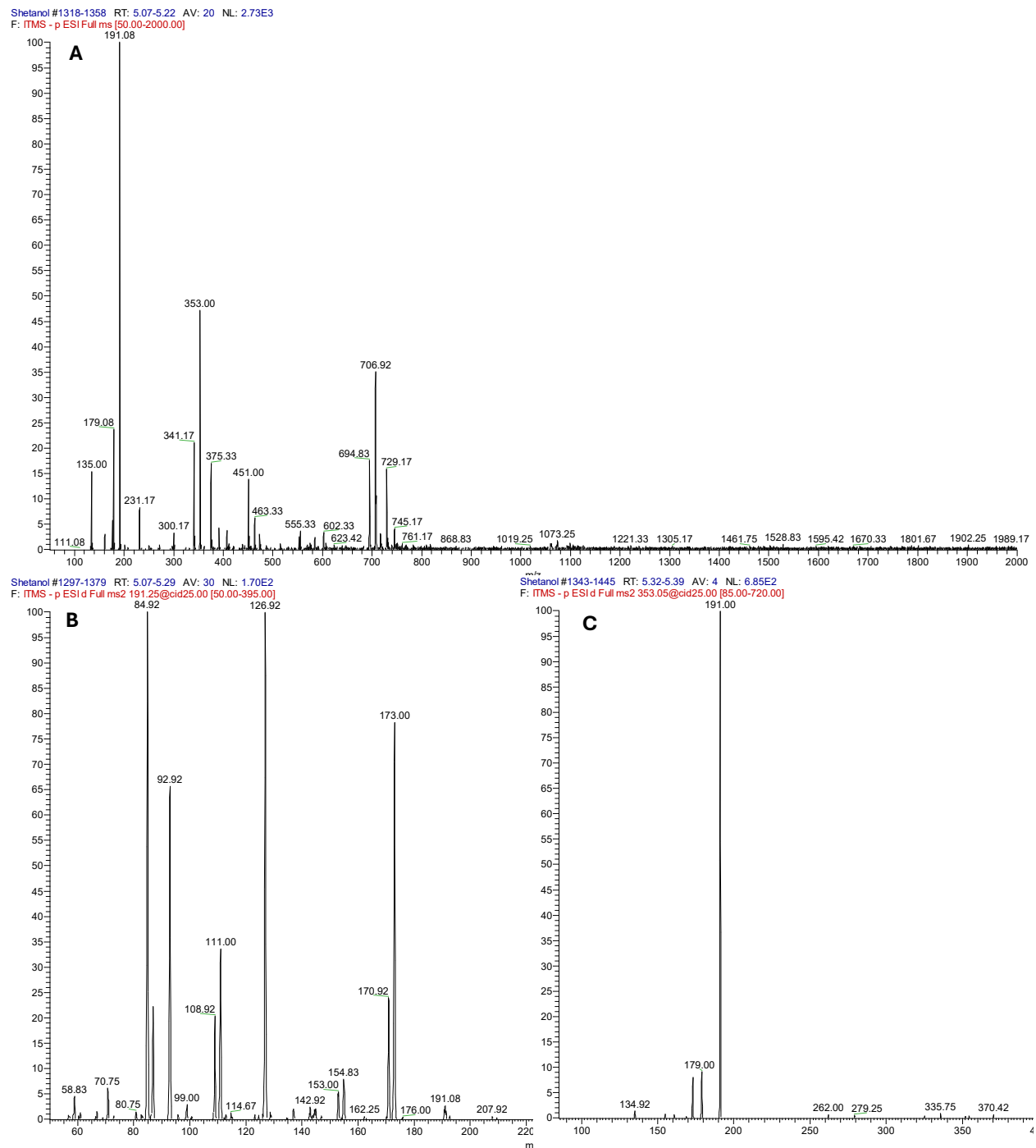


Figura 3.19. Espectros MS de compuesto 3. A. Full scan. B. MS² de *m/z* 191. C MS² de *m/z* 353

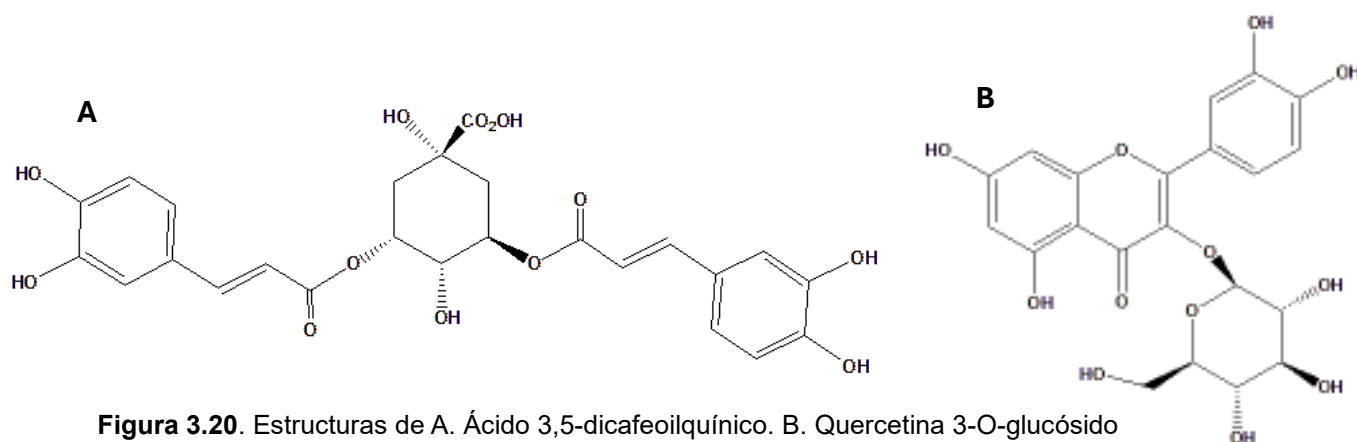


Figura 3.20. Estructuras de A. Ácido 3,5-dicafeoilquínico. B. Quercetina 3-O-glucósido

La Figura 3.21 presenta el espectro de masas del pico 8 presente en la muestra ScEtOH. En el mismo se pueden ver el ion base con un m/z de 515 y los iones 353, 191, 179 y 135, indicativos de la presencia de ácido cafeoilquínico, como se explicó para el compuesto 3. El compuesto correspondiente a $[M-H]^- = 515$ podría ser asignado como ácido dicafeoilquínico o ácido cafeoilquínico hexósido, según su masa y fragmentaciones. Sin embargo, para el caso de los hexósidos de ácido cafeoilquínico, se observa en su fragmentación la presencia de un ion con m/z 341, correspondiente al glicósido de ácido cafeico (Ncube et al., 2014), que no se observa en este caso en el espectro full MS ni en el espectro de MS/MS, por lo que podemos identificar preliminarmente el compuesto como isómero de ácido dicafeoilquínico (Figura 20.A). Por otro lado, se observan otros picos con m/z 463 y 301, y para el segundo su MS/MS tiene como único ion producto el m/z 301, indicativos de la presencia de un glicósido de quercetina unida a una hexosa (Cioffi et al., 2023)(Figura 20.B). La presencia del ion m/z 978, correspondiente a la suma de 515 y 463, podría indicar que la molécula corresponde a una combinación de ambos compuestos, sin embargo, este tipo de compuestos no existen en la naturaleza. Esto, sumado a la presencia de iones 926 y 1030 como dímeros de ambos compuestos, indicaría que el ion 978 corresponde a una agregación no covalente de los compuestos. En las otras muestras que presentan este pico se observa el mismo fenómeno, aunque las abundancias relativas de los iones varían de forma importante entre una y otra, lo que confirma la teoría de que existen dos compuestos que coeluyen.

Shetanol #2410-2485 RT: 9.34-9.64 AV: 38 NL: 9.12E3
 F: ITMS - p ESI Full ms [50.00-2000.00]

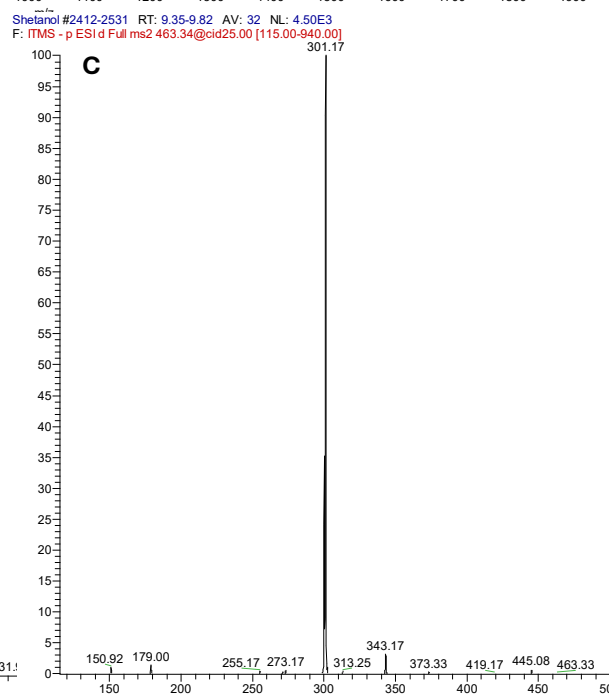
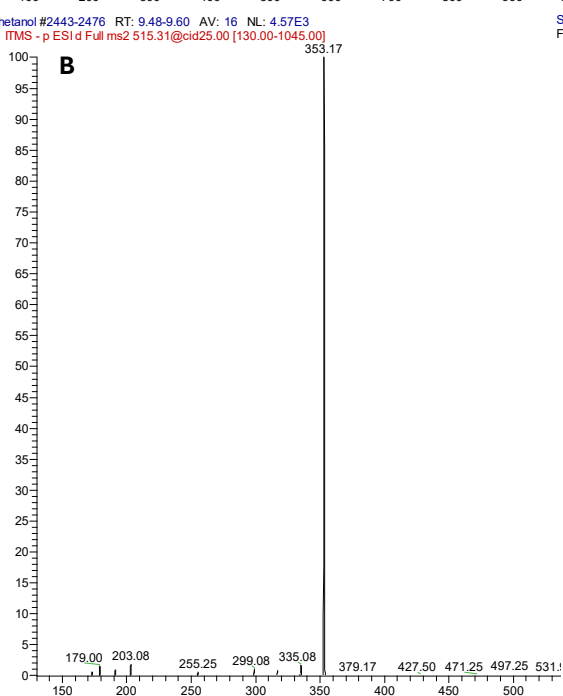
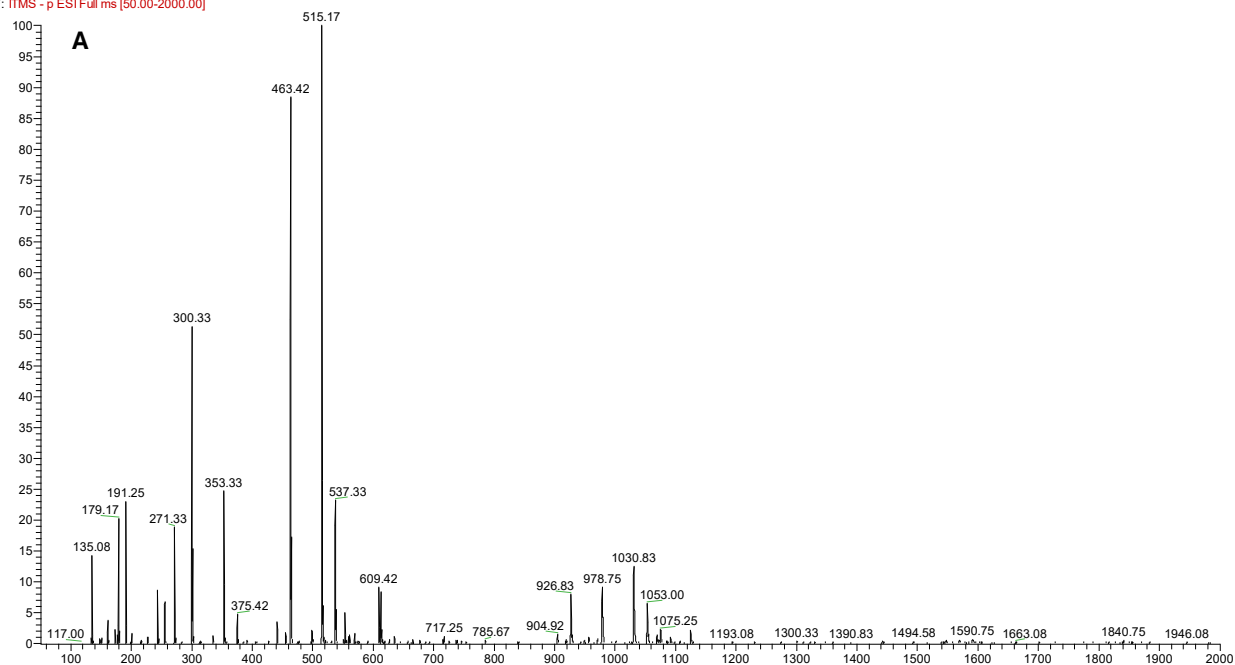


Figura 3.21. Espectro MS de compuesto 8 A. Full scan. B. MS² de m/z 515. C MS² de m/z 463

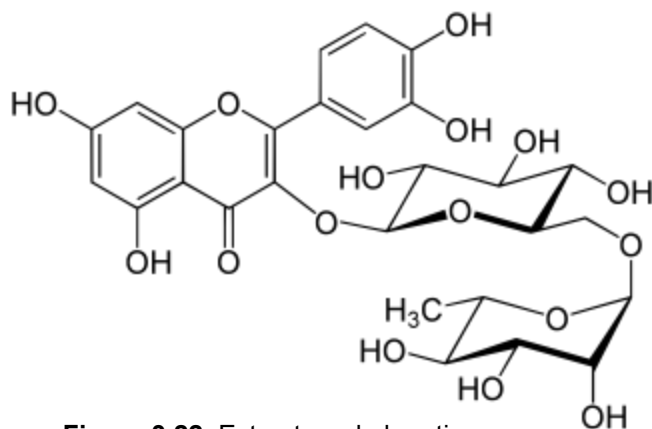


Figura 3.22. Estructura de la rutina

La Figura 3.23 presenta el espectro del pico 9. En él, los iones principales que se observan son los de m/z 609, 463 y 300. La pérdida de 146 Da entre el ion 609 y 463 puede atribuirse a la pérdida de un fragmento desoxihexosa. Los iones 463 y 300 pueden asignarse, de la misma forma que en el compuesto 8, a la presencia de un hexósido de quercetina, por lo que podemos realizar la asignación tentativa a un isómero de desoxihexosil-hexosil-quercetina. Como en el espectro del pico 8, se observa la

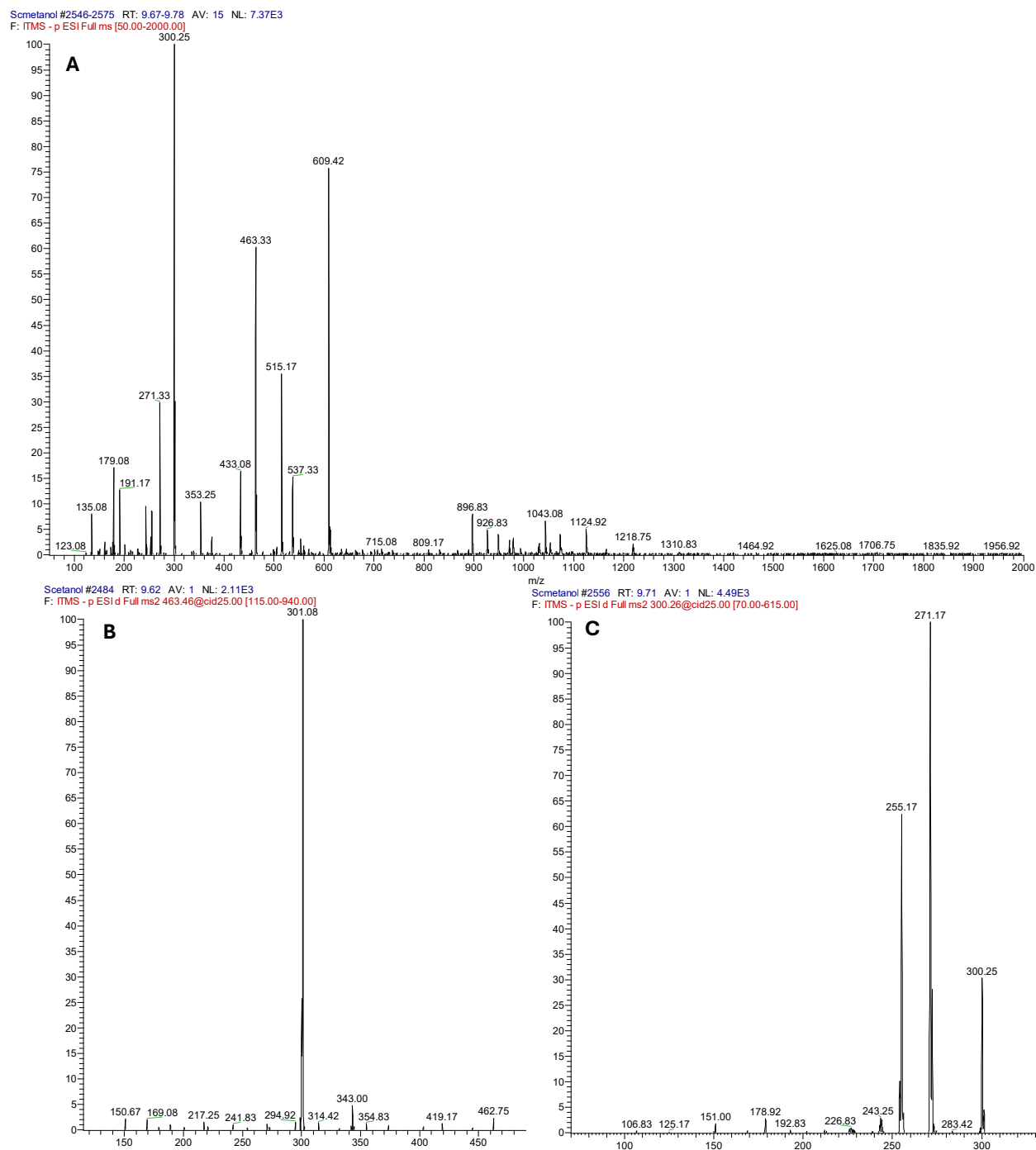


Figura 3.23. Espectro MS de compuesto 9. A. Full scan. B. MS² de m/z 463. C MS² de m/z 300

coelución de un compuesto que se puede asignar como isómero de ácido dicafeoilquínico, aunque en menor proporción.

El espectro del pico 10 se presenta en la Figura 3.26 Se observa el ion m/z 477, determinado como el ión $[M-H]^-$ y el m/z 954 como $2[M-H]^{2-}$. Se observa una pérdida de

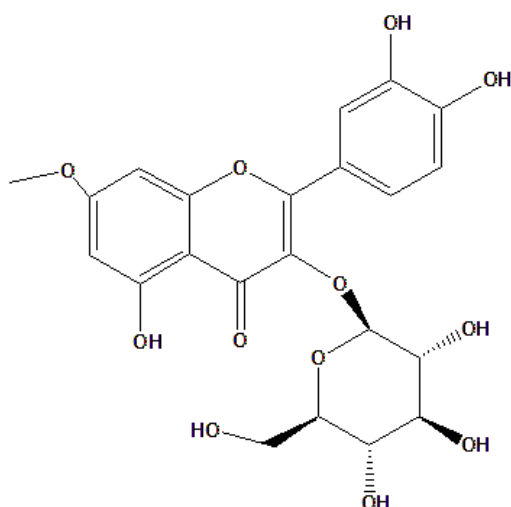


Figura 3.24. Estructura de isorhamnetina 3-O-glucósido

162 Da entre m/z 477 y m/z 315, correspondiente a la pérdida de una hexosa. El patrón de m/z 315, 300, 299 y 271 podría sugerir tanto rhamnetina como isorhamnetina, aunque la bibliografía indica que una predominancia del ion m/z 299 sobre m/z 300 es indicativo de rhamnetina, dado que el metilo en C7 hace más favorable la pérdida de CH_4 , mientras que en la isorhamnetina el metilo en C3' hace más favorable la pérdida homolítica del radical $\text{CH}_3\cdot$ (C. Jiang & Gates, 2024). Por lo tanto, se puede realizar la asignación preliminar de rhamnetina-O-hexósido (Figura 3.24).

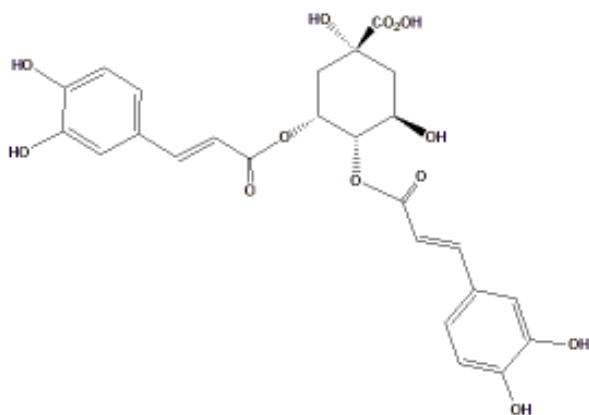


Figura 3.25. Estructura del ácido 4,5-dicafeoilquínico

El pico 12 presenta el mismo patrón de fraccionamiento que el previamente asignado como isómero de ácido dicafeoilquínico, con un $[\text{M}-\text{H}]^-$ de 515 y fragmentos de m/z 353, 191, 179 y 135, correspondientes a los ácidos cafeoilquínico, quínico y cafeico. (Figura 3.29). Para este pico, el espectro de MS/MS del ion m/z 515 muestra fragmentos de m/z

315 y 255 que, de acuerdo con Parveen et al. (2011), puede corresponderse particularmente con el ácido 4,5-dicafeoilquínico (Figura 3.25).

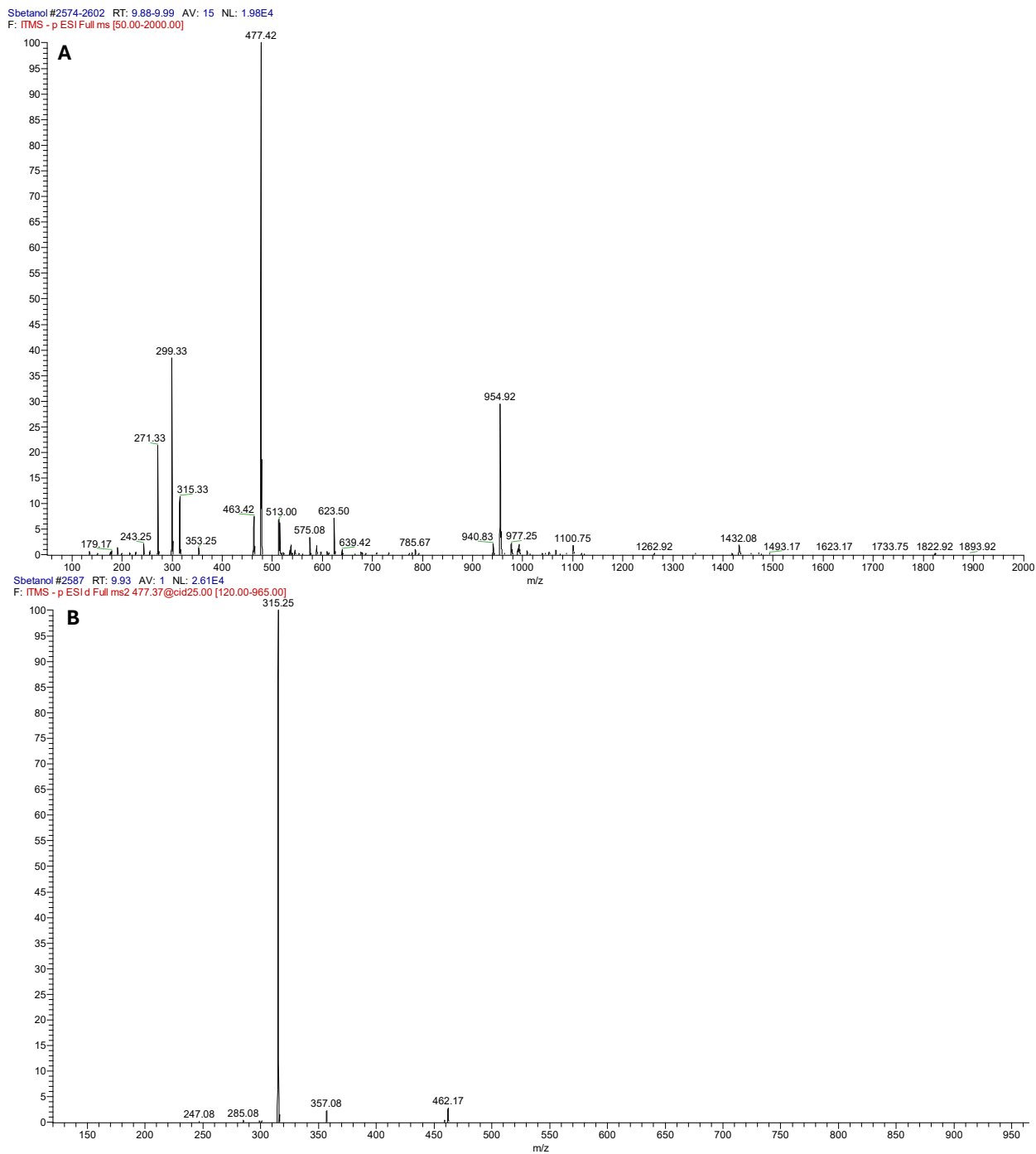


Figura 3.26. Espectro MS de compuesto 10. A. Full scan. B. MS² de m/z 477

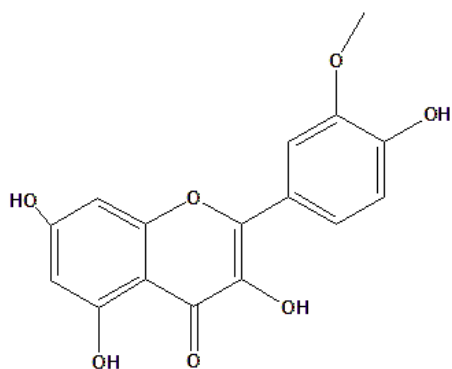


Figura 3.27. Estructura de la isorhamnetina

El pico 16 posee un ion molecular de m/z 315, un ión $2[M-H]^{2-}$ de m/z 630, así como iones de m/z 300, 271 y 243. En este caso, la predominancia del ion 300 y no el 299 podría indicar la presencia de isorhamnetina (Figuras 3.27 y 3.28).

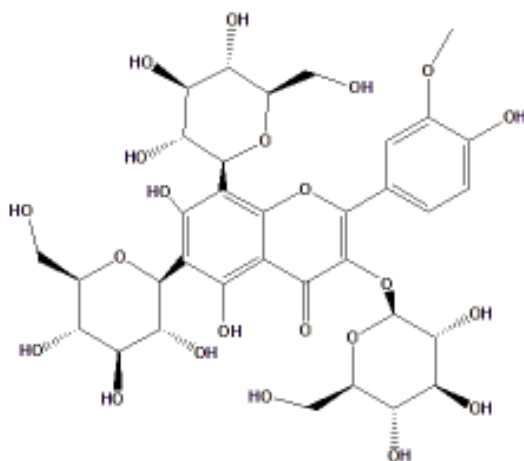


Figura 3.28. Estructura de di-C-glucosil, O-glucosil isorhamnetina

Los picos 17 a 22 presentan el mismo patrón de fraccionamiento, mostrando un $[M-H]^-$ con m/z 785 y dos pérdidas sucesivas de 120 Da (Figura 3.30), que pueden asociarse a la escisión parcial de C-glicósidos (Y. Wang et al., 2019). En MS3 y MS4 (Figuras 3.31 y 3.32) se observa una pérdida de 146 que puede atribuirse a la pérdida de una desoxihexosa, además de pérdidas típicas de 44 Da asociadas a pérdidas de CO_2 y de

18 Da asociadas a pérdidas de H₂O. Se teoriza, entonces, que el compuesto contiene dos hexosas unidas a una genina a través de un enlace C-glicosídico y una desoxihexosa

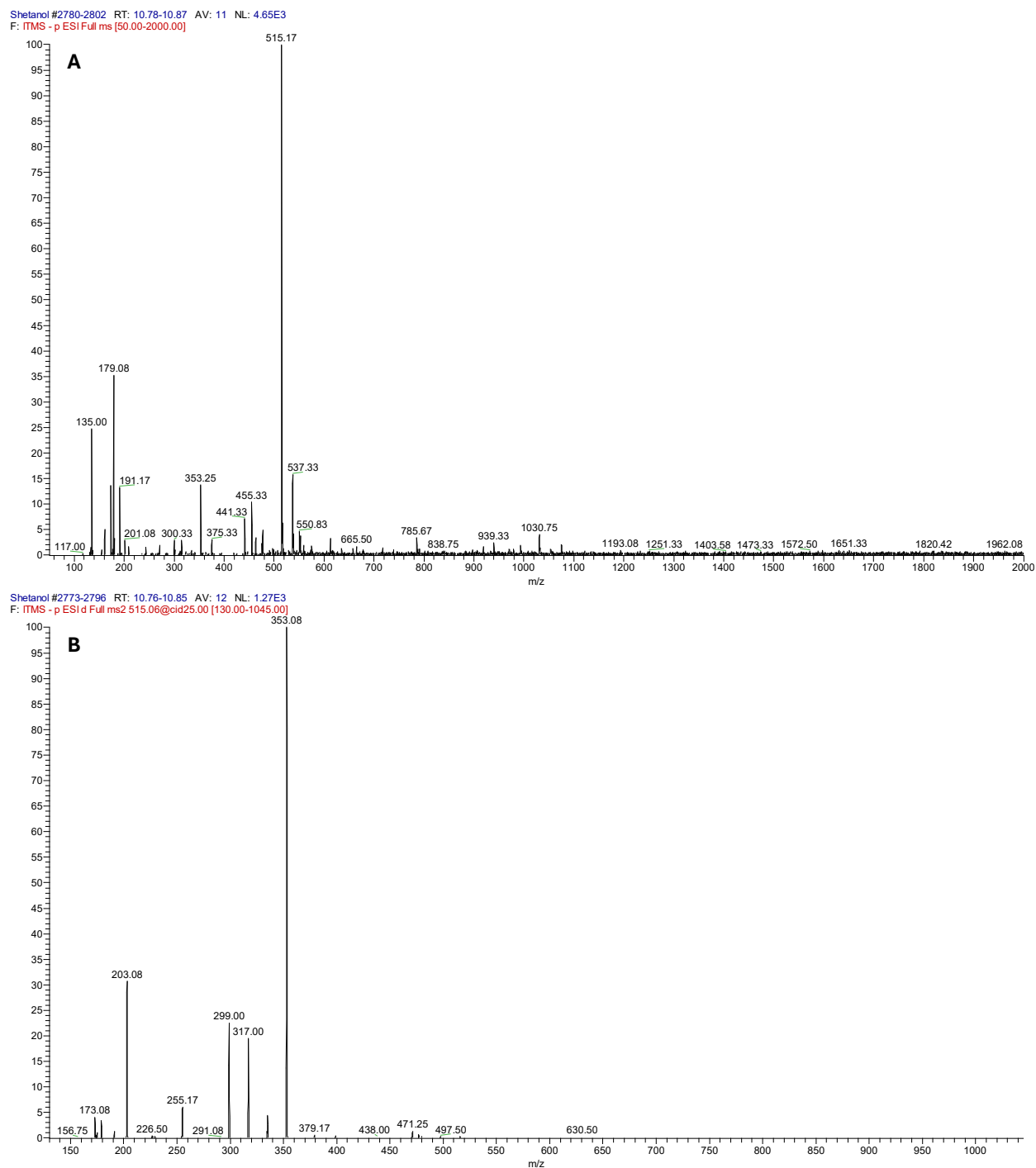


Figura 3.29. Espectro MS de compuesto 12. A. Full scan. B. MS² de m/z 515

unida a través de un enlace O-glicosídico. Partiendo del ion $[M-H]^-$ 785 y tomando en cuenta las masas de las dos hexosas y la desoxihexosa, llegamos a una genina con un

$[M-H]^-$ de m/z 315, ion que también se observa en pequeña proporción en el espectro de full MS. Este ion, dada la bibliografía y la presencia de otros compuestos con esta genina, podría provenir de una rhamnetina o isorhamnetina.

Shetanol #3461-3486 RT: 13.59-13.69 AV: 13 NL: 2.46E3
F: ITMS - p ESI Full ms [50.00-2000.00]

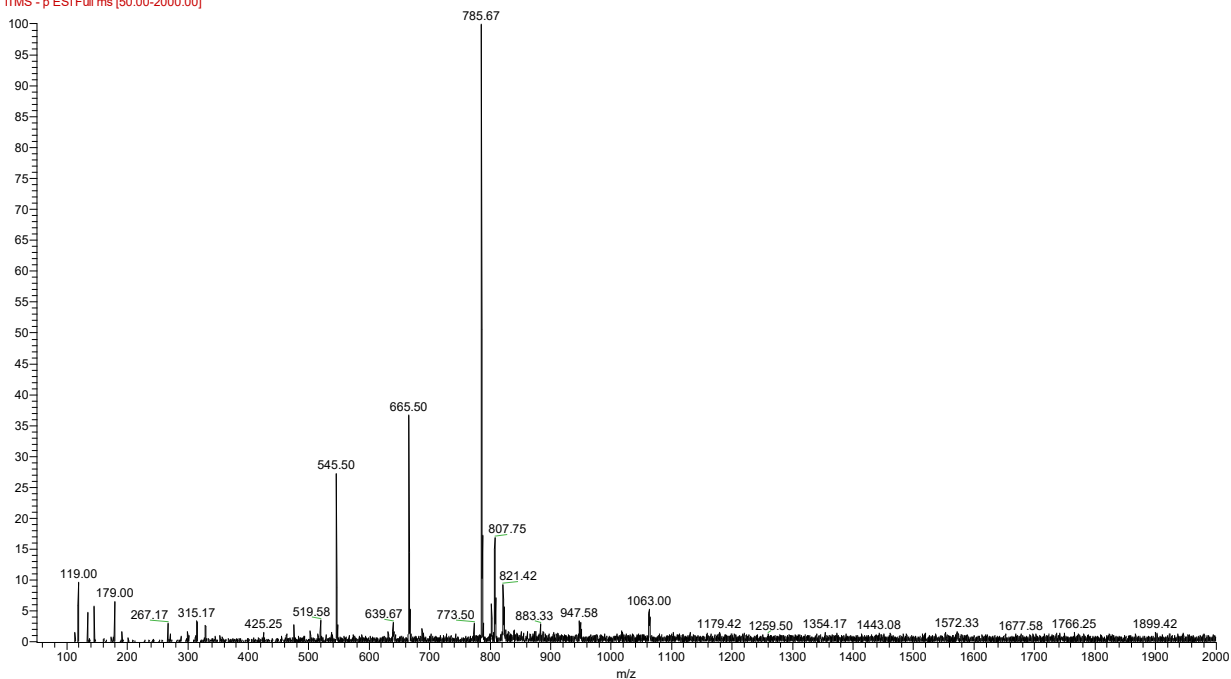


Figura 3.30. Espectro MS de pico 17

flores senecio #433-537 RT: 1.95-2.12 AV: 35 NL: 1.50E3
F: ITMS - c ESI Full ms 3 785.00@cid35.00 665.00@cid35.00 [180.00-1000.00]

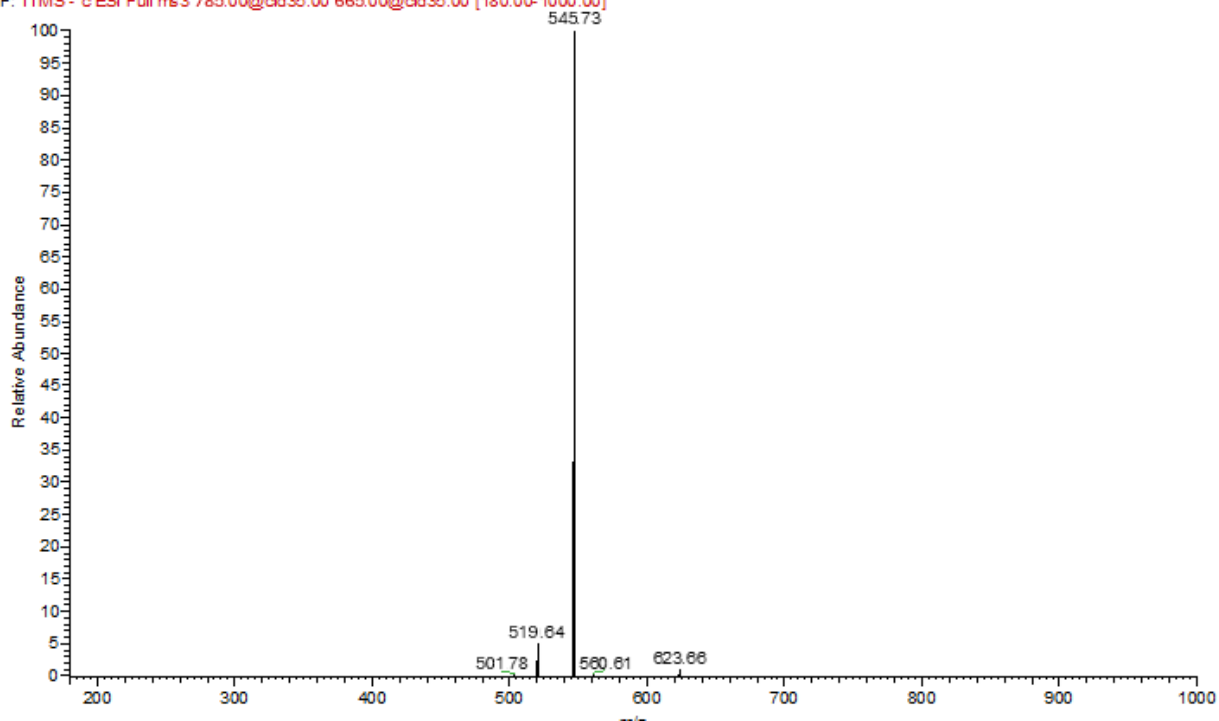


Figura 3.31. MS³ de ion m/z 785

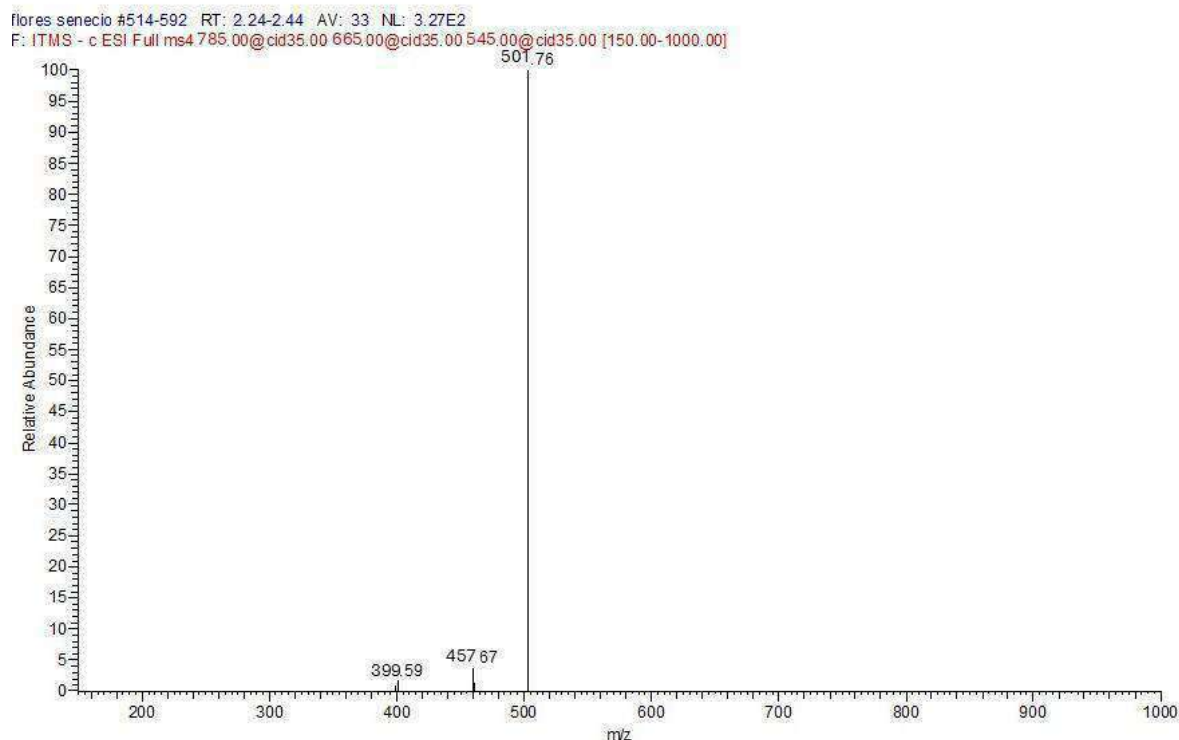


Figura 3.32. MS⁴ de ion m/z 785

Correlación entre compuestos y actividad inhibitoria de biofilms

Se clasificaron las correlaciones entre la actividad antibiofilm y la presencia de los diferentes compuestos según Dahlin et al. (2019), como previamente descrito en la sección de materiales y métodos. En la Tabla 3.9 se presentan los valores de correlaciones de Pearson menores a -0,5 y mayores a +0,5, lo que corresponde a correlaciones moderadas (entre 0,5 y 0,7), fuertes (entre 0,7 y 0,9) y muy fuertes (entre 0,9 y 1).

Para el caso de las correlaciones positivas, se consideraron como de interés para la interpretación todas aquellas moderadas, fuertes y muy fuertes. Las mismas pueden ser indicativas de actividad antibiofilm *per se* o de actividad sinérgica con otros compuestos antibiofilm contenidos en el extracto. Por otro lado, para moléculas con correlaciones negativas se puede inferir que, además de la posible actividad estimulante de la formación de biofilms, pueden presentar antagonismo sobre las activas. También pueden meramente actuar diluyendo la concentración de moléculas con actividad antibiofilm en

la muestra y, por lo tanto, disminuyendo la actividad global del extracto. Por este motivo, no se tomó en principio como relevante a la hora de definir qué moléculas son de interés en el contexto de esta tesis.

La presencia del compuesto 3 en los extractos se correlaciona de manera fuerte y estadísticamente significativa con la erradicación de biofilms de *C. albicans*. La presencia del compuesto 9 se correlaciona de forma moderada con la actividad inhibitoria de biofilms de *P. aeruginosa* y muy fuertemente con la erradicación de biofilms de *S. aureus*. El compuesto 10 en los extractos puede correlacionarse moderadamente con la actividad inhibitoria sobre biofilms de *S. aureus* y *C. albicans* y con la erradicación de biofilms de *E. coli*. Los compuestos 17, 18, 19 y 21 tienen una correlación negativa con la actividad antibiofilm contra *S. aureus* y *E. coli*, mientras que tienen una alta correlación positiva con la actividad inhibitoria de biofilms contra *P. aeruginosa*, que es estadísticamente significativa para todos menos el compuesto 21. Además, los compuestos 18, 19 y 21 presentan una correlación moderada con la erradicación de biofilms de *S. aureus*. El compuesto 20 presenta una moderada correlación con la actividad inhibitoria de biofilms de *P. aeruginosa*. Los compuestos 29, 30 y 31 presentan una correlación positiva moderada con la actividad inhibitoria sobre *P. aeruginosa* y de erradicación sobre *E. coli*.

Tabla 3.9. Correlación entre compuestos y actividad antibiofilm. Violeta: moderada, Azul: fuerte, Verde: muy fuerte. Rosa: negativo.

Compuestos	tR	Inhibición				Erradicación		
		<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>
1	0,81					-0.668		
2	4,65	NC						
3	5,13						0.834	-0.912
4	6,1	NC						
5	6,3	NC						
6	8,57	NC						
7	9,24	NC						
8	9,42							-0.822
9	9,62	-0.824		0.593		0.914		
10	9,95	0.634	0.515				-0.965	0.67
11	10,3	NC						
12	10,8						0.567	
13	11,1	NC						
14	11,5	NC						
15	12,4		-0.721			-0.64		-0.658
16	13,08						-0.874	0.51
17	13,65	-0.558		0.809	-0.588			
18	14,1	-0.583		0.823	-0.597	0.522		
19	14,4	-0.619		0.831	-0.624	0.536		
20	14,7		-0.545	0.604	-0.579			
21	15,05	-0.596		0.784	-0.532	0.527		
22	16,2		-0.648			-0.661		-0.679
23	16,9	NC						
24	18,3	NC						
25	18,53	NC						
26	20,95	NC						
27	21,45	NC						
28	21,65	NC						
29	21,9			0.598			-0.604	0.665
30	22,7			0.598			-0.604	0.665
31	23,4			0.595		-0.691	-0.613	0.662
32	24,3		-0.734					
33	24,4		-0.761			-0.621		-0.639

NC: No corresponde.

Todos los compuestos identificados preliminarmente son fenólicos, tanto aquellos donde se observa una correlación positiva con la actividad antibiofilm como aquellos en los que no. Dado esto, es coherente que la concentración de fenoles totales en cada extracto no tenga una correlación clara con la actividad antibiofilm.

Luego de obtener los resultados de los análisis químicos y correlacionarnos con su actividad antibiofilm, se realizó la evaluación de la actividad antibiofilm de compuestos puros de naturaleza similar a los obtenidos en los extractos de *Senecio*. Los resultados se muestran en las Tablas 3.11 y 3.12.

Tabla 3.11. Actividad inhibitoria de biofilm de compuestos puros

Compuesto	<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>C. albicans</i>		<i>E. coli</i>	
	Conc. (µg/ml)	Inhib. (%)	Conc. (µg/ml)	Inhib. (%)	Conc. (µg/ml)	Inhib. (%)	Conc. (µg/ml)	Inhib. (%)
Ácido cafeico	NI		50	61	1,6	53	NI	
Ácido clorogénico	NI		25	52	25	63	NI	
Rhamnetina	NI		NI		ND		NI	
Quercetina	ND		NI		NI		ND	
Rutina	ND		50	38	25	75	ND	

ND: No determinado

NI: No inhibe

Tabla 3.12. Actividad de erradicación de biofilms de compuestos puros

Compuesto	<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>C. albicans</i>		<i>E. coli</i>	
	Conc. (µg/ml)	Erradic. (%)	Conc. (µg/ml)	Erradic. (%)	Conc. (µg/ml)	Erradic. (%)	Conc. (µg/ml)	Erradic. (%)
Ácido cafeico	ND		ND		NE		ND	
Ácido clorogénico	ND		ND		25	63	ND	
Ácido quínico	ND		ND		50	36	ND	
Rhamnetina	NE		ND		ND		NE	
Quercetina	NE		ND		ND		ND	
Rutina	NE		ND		ND		ND	

ND: No determinado

NE: No erradica

Los compuestos con promisorio actividad antibiofilm determinados fueron asignados preliminarmente como ácido cafeoilquínico, desoxihexosil hexosil quercetina, rhamnetina hexósido, ácido 4,5-dicafeoilquínico, isorhamnetina, isómero de di-C-glicosil, O-glicosil (iso)rhamnetina.

Tanto el ácido cafeico (CA) como el ácido quínico (QA) son capaces de inhibir el crecimiento de biofilms de diferentes microorganismos, el primero contra *P. aeruginosa*, *Streptococcus mutans*, y *Candida* spp. (de Barros et al., 2021; Nakamura et al., 2017; Ugurlu et al., 2016) y el segundo contra *S. aureus*, *P. aeruginosa*, y *C. albicans* (Bai et al., 2019; Lu et al., 2021; Muthamil et al., 2018). En el caso de las cepas usadas en esta tesis, el ácido cafeico fue capaz de inhibir el 61% de la formación de biofilms de *P. aeruginosa* a una concentración alta (50 µg/ml) y el 53% de la formación de biofilms de *C. albicans* a una concentración baja (1,6 µg/ml). El ácido quínico fue capaz de erradicar 36% del biofilm formado de *C. albicans* a una concentración de 50 µg/ml.

Para los ácidos cafeoilquínicos, existen reportes de la actividad inhibitoria de biofilms de *P. aeruginosa* de ácido clorogénico (5-CQA) (L. Wang et al., 2023), pero no así contra *C. albicans*, aunque existe un reporte de interacción con el sitio activo ALS3, implicado en la adhesión inicial de la levadura a superficies (da Silva et al., 2022). Para la cepa estudiada de *C. albicans*, se observó una inhibición de hasta un 63% del crecimiento del biofilm a una concentración de 25 µg/ml. Los ácidos dicafeoilquínicos, por su parte, presentan actividad antibiofilm contra hongos como *Aspergillus fumigatus* (Luo et al., 2018), así como *S. aureus* y *E. faecalis*. Para estos dos últimos, el ácido 4', 5'-dicafeoilquínico es capaz de inhibir bombas de eflujo, que inhiben la formación de biofilms y les permite actuar como coadyuvantes de otras moléculas con actividad (Fiamegos et al., 2011). A pesar de que los ácidos cafeico y quínico no fueron encontrados de forma libre en los extractos, su actividad demostrada es coherente con la bibliografía, aunque, con excepción de la inhibición de biofilms de *C. albicans*, su actividad se da a concentraciones altas, al igual que la actividad estudiada del ácido clorogénico, que no esperaríamos encontrar de ellos ni sus conjugados en los extractos.

La rutina, compuesta por quercetina unida a glucosa y rhamnosa, es capaz de inhibir la formación de biofilms de *Staphylococcus xylosus* y *P. aeruginosa* (Qu et al., 2021; Sathiya Deepika et al., 2018). La rhamnetina-3-O-(6"-galoil)-β-D-glucopiranosido y rhamnetina-3-O-ramnósido son capaces de inhibir la formación de biofilms de *S. aureus* resistente a la meticilina, y potencian la actividad de β-lactámicos (Zhai et al., 2023). Para las cepas estudiadas en esta tesis, la rutina fue capaz de inhibir el 38% del crecimiento de biofilm

de *P. aeruginosa* a 50 µg/ml y el 75% del crecimiento de biofilm de *C. albicans* a 25 µg/ml. De la misma forma que para los ácidos, las altas concentraciones de acción de este compuesto, poco probables de ocurrir a las concentraciones inhibitorias de los extractos, indican que este compuesto, de encontrarse efectivamente en ellos, puede ser parcial pero no totalmente responsable de la actividad.

La isorhamnetina, por su parte, y también sus glicósidos, son capaces de inhibir la formación de biofilms de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *Serratia marcesens* (Blando et al., 2019; Majnooni et al., 2023), y existe también evidencia de la interferencia de la isorhamnetina con la α -hemolisina de *S. aureus*, que influye directamente en la adhesión y formación del biofilm (L. Jiang et al., 2016). En el estudio de la rhamnetina pura contra biofilms de tres de los cuatro microorganismos estudiados, no se observó inhibición ni erradicación a las concentraciones estudiadas. No hay reportes de C-glicósidos de rhamnetina o isorhamnetina con actividad antibiofilm.

La baja o nula actividad de compuestos aislados de naturaleza similar a la de las identificaciones preliminares de compuestos en los extractos nos permite nuevamente plegarnos a la teoría de que la actividad antibiofilm de los extractos no se debe a la actividad de compuestos aislados, si no que puede ser consecuencia de acciones sinérgicas de los mismos.

En este capítulo se profundizó en la búsqueda de compuestos antibiofilm y sus mecanismos de acción, utilizando para esto los extractos de tres especies de *Senecio*. Se obtuvieron resultados de gran interés, sorteando algunas de las dificultades planteadas en el capítulo 2, que se discuten en mayor profundidad en el próximo capítulo.

Bibliografía

- Albayrak, S., Aksoy, A., Yurtseven, L., & Yaşar, A. (2015). A Comparative Study on Antioxidant and Antimicrobial Activities of Four *Senecio* L. Species from Turkey. *International Journal of Secondary Metabolite* (Vol. 2).
- Albuquerque, P., & Casadevall, A. (2012). Quorum sensing in fungi a review. *Medical Mycology* (Vol. 50, Issue 4, pp. 337–345).
<https://doi.org/10.3109/13693786.2011.652201>
- Arab, Y., Sahin, B., Ceylan, O., Zellagui, A., Olmez, O. T., Kucukaydin, S., Tamfu, A. N., Ozturk, M., & Gherraf, N. (2022). Assessment of in vitro activities and chemical profiling of *Senecio hoggariensis* growing in Algerian Sahara. *Biodiversitas*, 23(7), 3498–3506.
<https://doi.org/10.13057/biodiv/d230724>
- Bai, J. R., Wu, Y. P., Elena, G., Zhong, K., & Gao, H. (2019). Insight into the effect of quinic acid on biofilm formed by *Staphylococcus aureus*. *RSC Advances*, 9(7), 3938–3945.
<https://doi.org/10.1039/C8RA09136F>
- Blando, F., Russo, R., Negro, C., De Bellis, L., & Frassinetti, S. (2019). Antimicrobial and Antibiofilm Activity against *Staphylococcus aureus* of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Cladode Polyphenolic Extracts. *Antioxidants* (Basel, 8(5).
<https://doi.org/10.3390/ANTIOX8050117>
- Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Vírveda, P., Marín-Arroyo, M. R., & Navarro, M. (2015). Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1), 204–209. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6706>
- Caesar, L. K., & Cech, N. B. (2019). Synergy and antagonism in natural product extracts: When 1 + 1 does not equal 2. In *Natural Product Reports* (Vol. 36, Issue 6, pp. 869–888).<https://doi.org/10.1039/c9np00011a>
- Cavalheiro, M., & Teixeira, M. C. (2018). Candida Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. *Frontiers in Medicine*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00028>
- Chaachouay, N., & Zidane, L. (2024). Plant-Derived Natural Products: A Source for Drug Discovery and Development. *Drugs and Drug Candidates*, 3(1), 184–207.
<https://doi.org/10.3390/ddc3010011>
- Chantanawilas, P., Pahumunto, N., & Teanpaisan, R. (2024). Aggregation and adhesion ability of various probiotic strains and *Candida* species: An in vitro study. *Journal of Dental Sciences*, 19(4), 2163–2171. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2024.03.016>

- Cioffi, E., Comune, L., Piccolella, S., Buono, M., & Pacifico, S. (2023). Quercetin 3-O-Glucuronide from Aglianico Vine Leaves: A Selective Sustainable Recovery and Accumulation Monitoring. *Foods*, 12(14), 2646. <https://doi.org/10.3390/FOODS12142646/S1>
- Clifford, M. N., Johnston, K. L., Knight, S., & Kuhnert, N. (2003). Hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 2900–2911. <https://doi.org/10.1021/JF026187Q>
- da Silva, C. R., do Amaral Valente Sá, L. G., dos Santos, E. V., Ferreira, T. L., do Nascimento Paiva Coutinho, T., Moreira, L. E. A., de Sousa Campos, R., de Andrade, C. R., da Silva, W. M. B., de Sá Carneiro, I., Silva, J., dos Santos, H. S., Marinho, E. S., Cavalcanti, B. C., de Moraes, M. O., Nobre, H. V., & Neto, J. B. A. (2022). Evaluation of the antifungal effect of chlorogenic acid against strains of *Candida* spp. resistant to fluconazole: apoptosis induction and in silico analysis of the possible mechanisms of action. *Journal of Medical Microbiology*, 71(5). <https://doi.org/10.1099/JMM.0.001526>
- Dahlin, J. L., Sittampalam, G. S., Coussens, N. P., Devanarayan, V., Weidner, J. R., Iversen, P. W., Haas, J. V., Bronson, D. D., Trask, O. J., Wiernicki, T. R., & Kahl, S. D. (2019). Basic Guidelines for Reporting Non-Clinical Data LsA limits of agreement. In S. Markossian, A. Grossman, & H. Baskir (Eds.), *Assay Guidance Manual*. NIH. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>
- de Barros, P. P., Rossoni, R. D., Garcia, M. T., Kaminski, V. de L., Loures, F. V., Fuchs, B. B., Mylonakis, E., & Junqueira, J. C. (2021). The Anti-Biofilm Efficacy of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) In Vitro and a Murine Model of Oral Candidiasis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.700305>
- Dincheva, I., Badjakov, I., & Galunska, B. (2023). New Insights into the Research of Bioactive Compounds from Plant Origins with Nutraceutical and Pharmaceutical Potential. *Plants* (Vol. 12, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/plants12020258>
- Egharevba, G. O., Dosumu, O. O., Evbuomwan, I. O., Njinga, N. S., Oluyori, A. P., Hamid, A. A., & Afolabi, Y. T. (2023). In vitro Antimicrobial, Antioxidant, and Antidiabetic Activities of Extracts of *Senecio Abyssinicus* Leaves. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 27(5), 939–948. <https://doi.org/10.4314/jasem.v27i5.8>
- Fiamegos, Y. C., Kastiris, P. L., Exarchou, V., Han, H., Bonvin, A. M. J. J., Vervoort, J., Lewis, K., Hamblin, M. R., & Tegos, G. P. (2011). Antimicrobial and Efflux Pump Inhibitory Activity of Caffeoylquinic Acids from *Artemisia absinthium* against Gram-Positive Pathogenic Bacteria. *PLoS ONE*, 6(4), e18127. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018127>

- 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>
- Francescato, L. N., Augusto, R., Deuschle, N., Mallmann, C. A., Alves, S. H., Heinzmann, B. M., & Heinzmann, B. M. (2007). Atividade antimicrobiana de *Senecio heterotrichus* DC. (Asteraceae). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* (Vol. 43, Issue 2).
- Gambino, M., & Cappitelli, F. (2016). Mini-review: Biofilm responses to oxidative stress. In *Biofouling* (Vol. 32, Issue 2, pp. 167–178). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/08927014.2015.1134515>
- García, J. A., y Santos, C. G., Rosas, J., Dutra, F., & Gardner, D. (2018). *Senecio* spp. Afetando a pecuária no Uruguai e sua associação com alcaloides pirrolizidínicos. *Ciencia Rural*, 48(2). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170621>
- Grooters, K. E., Ku, J. C., Richter, D. M., Krinock, M. J., Minor, A., Li, P., Kim, A., Sawyer, R., & Li, Y. (2024). Strategies for combating antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 14).. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1352273>
- Heep, G. L. (2007). *Caracterização Dos Óleos Essenciais De Folhas E Flores De Senecio brasiliensis (SPRENG.) LESS*. Universidade Federal do Paraná.
- Instituto de Botânica Darwinion. (n.d.). Retrieved November 6, 2025, from <http://www.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/DetalleEspecie.asp?forma=&variedad=&subespecie=&especie=heterotrichus&genero=Senecio&espcod=17547>
- Jiang, C., & Gates, P. J. (2024). Systematic Characterisation of the Fragmentation of Flavonoids Using High-Resolution Accurate Mass Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Molecules*, 29(22), 5246. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES29225246>
- Jiang, L., Li, H., Wang, L., Song, Z., Shi, L., Li, W., Deng, X., & Wang, J. (2016). Isorhamnetin Attenuates *Staphylococcus aureus*-Induced Lung Cell Injury by Inhibiting Alpha-Hemolysin Expression. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(3), 596–602. <https://doi.org/10.4014/JMB.1507.07091>
- Kalia, M., Yadav, V. K., Singh, P. K., Sharma, D., Narvi, S. S., & Agarwal, V. (2018). Exploring the impact of parthenolide as anti-quorum sensing and anti-biofilm agent against *Pseudomonas aeruginosa*. *Life Sciences*, 199(2017), 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.03.013>

- Kumar, R., Breindel, C., Saraswat, D., Cullen, P. J., & Edgerton, M. (2017). *Candida albicans* Sap6 amyloid regions function in cellular aggregation and zinc binding, and contribute to zinc acquisition. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03082-4>
- Li, R., Lu, J., Duan, H., Yang, J., & Tang, C. (2020a). Biofilm inhibition and mode of action of epigallocatechin gallate against *Vibrio mimicus*. *Food Control*, 113. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107148>
- Lobiuc, A., Pavăl, N. E., Mangalagiu, I. I., Gheorghiță, R., Teliban, G. C., Amăriucăi-Mantu, D., & Stoleru, V. (2023). Future Antimicrobials: Natural and Functionalized Phenolics. *Molecules* (Vol. 28, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules28031114>
- Lu, L., Zhao, Y., Yi, G., Li, M., Liao, L., Yang, C., Cho, C., Zhang, B., Zhu, J., Zou, K., & Cheng, Q. (2021). Quinic acid: a potential antibiofilm agent against clinical resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Chinese Medicine*, 16(1), 72. <https://doi.org/10.1186/s13020-021-00481-8>
- Luo, J., Wang, K., Li, G. S., Lei, D. Q., Huang, Y. J., Li, W. D., Chen, Y. Q., & Kong, J. L. (2018). 3,5-Dicaffeoylquinic Acid Disperses *Aspergillus Fumigatus* Biofilm and Enhances Fungicidal Efficacy of Voriconazole and Amphotericin B. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 24, 427. <https://doi.org/10.12659/MSM.908068>
- Magalhães, L. M., Santos, F., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. F. C. (2010). Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. *Talanta*, 83(2), 441–447. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.09.042>
- Majnooni, M. B., Ghanadian, S. M., Mojarab, M., Bahrami, G., Mansouri, K., Mirzaei, A., & Farzaei, M. H. (2023). Antibacterial, Antibiofilm, Antiswarming, and Antioxidant Activities of Flavonoids Isolated from *Allium colchicifolium* Leaves. *Journal of Food Biochemistry*, 2023(1), 5521661. <https://doi.org/10.1155/2023/5521661>
- Manubolu, M., Goodla, L., Ravilla, S., & Obulum, V. R. (2013). Activity-guided isolation and identification of anti-staphylococcal components from *Senecio tenuifolius* Burm. F. leaf extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(3), 191–195. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60048-9](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60048-9)
- Melaugh, G., Martinez, V. A., Baker, P., Hill, P. J., Howell, P. L., Wozniak, D. J., & Allen, R. J. (2023). Distinct types of multicellular aggregates in *Pseudomonas aeruginosa* liquid cultures. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41522-023-00412-5>
- Monteiro, D. R., Silva, S., Negri, M., Gorup, L. F., de Camargo, E. R., Oliveira, R., Barbosa, D. B., & Henriques, M. (2012). Silver nanoparticles: influence of stabilizing agent and diameter on antifungal activity against *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms.

Letters in Applied Microbiology, 54(5), 383–391. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03219.x>

Murari, A. L., Carvalho, F. H. de, Heinzmann, B. M., Michelot, T. M., Hörner, R., & Mallmann, C. A. (2008). Composição e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Senecio crassiflorus* var. *crassiflorus*. *Química Nova*, 31(5), 1081–1084. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000500026>

Muthamil, S., Balasubramaniam, B., Balamurugan, K., & Pandian, S. K. (2018). Synergistic Effect of Quinic Acid Derived from *Syzygium cumini* and Undecanoic Acid Against *Candida* spp. Biofilm and Virulence. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02835>

Nakamura, K., Shirato, M., Kanno, T., Lingström, P., Örtengren, U., & Niwano, Y. (2017). Photo-irradiated caffeic acid exhibits antimicrobial activity against *Streptococcus mutans* biofilms via hydroxyl radical formation. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/S41598-017-07007-Z;TECHMETA>

Ncube, E. N., Mhlongo, M. I., Piater, L. A., Steenkamp, P. A., Dubery, I. A., & Madala, N. E. (2014). Analyses of chlorogenic acids and related cinnamic acid derivatives from *Nicotiana tabacum* tissues with the aid of UPLC-QTOF-MS/MS based on the in-source collision-induced dissociation method. *Chemistry Central Journal*, 8(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s13065-014-0066-z>

Nobile, C. J., & Johnson, A. D. (2015). *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annual Review of Microbiology*, 69(1), 71–92. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104330>

Ong, K. S., Mawang, C. I., Daniel-Jambun, D., Lim, Y. Y., & Lee, S. M. (2018). Current anti-biofilm strategies and potential of antioxidants in biofilm control. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* (Vol. 16, Issue 11, pp. 855–864). <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1535898>

Parveen, I., Threadgill, M. D., Hauck, B., Donnison, I., & Winters, A. (2011). Isolation, identification and quantitation of hydroxycinnamic acid conjugates, potential platform chemicals, in the leaves and stems of *Miscanthus × giganteus* using LC-ESI-MS n. *Phytochemistry*, 72(18), 2376–2384. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.08.015>

Qu, Q., Cui, W., Xing, X., Zou, R., Huang, X., Wang, X., Wu, T., Bello-Onaghise, G., Yuan, S., & Li, Y. (2021). Rutin, A Natural Inhibitor of IGPD Protein, Partially Inhibits Biofilm Formation in *Staphylococcus xylosus* ATCC700404 in vitro and in vivo. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.728354/PDF>

Ramirez, D. M., Ramirez, D., Arthur, G., Zhanel, G., & Schweizer, F. (2022). Guanidinylated Polymyxins as Outer Membrane Permeabilizers Capable of Potentiating Rifampicin,

- Erythromycin, Ceftazidime and Aztreonam against Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101277>
- Sathiya Deepika, M., Thangam, R., Sakthidhasan, P., Arun, S., Sivasubramanian, S., & Thirumurugan, R. (2018). Combined effect of a natural flavonoid rutin from *Citrus sinensis* and conventional antibiotic gentamicin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Food Control*, 90, 282–294. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2018.02.044>
- Slobodníková, L., Fialová, S., Rendeková, K., Kováč, J., & Mučaji, P. (2016). Antibiofilm activity of plant polyphenols. *Molecules*, 21(12), 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules21121717>
- Surco-Laos, F., Garcia, J. A., Bendezú, M. R., Laos-Anchante, D., Panay-Centeno, J. F., Valle-Campos, M., Palomino-Jhong, J. J., Yarasca-Carlos, P. E., Loja, B., & Alvarado, A. T. (2022). In vitro antioxidant properties and antimicrobial activity of the ethanolic extract of *Senecio nutans* Sch. Beep. (Asteraceae). *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research*, 10(6), 1026–1036. https://doi.org/10.56499/jppres22.1471_10.6.1026
- Touzani, S., Imtara, H., Katekhaye, S., Mechchate, H., Ouassou, H., Alqahtani, A. S., Noman, O. M., Nasr, F. A., Fearnley, H., Fearnley, J., Paradkar, A., Elarabi, I., & Lyoussi, B. (2021). Determination of Phenolic Compounds in Various Propolis Samples Collected from an African and an Asian Region and Their Impact on Antioxidant and Antibacterial Activities. *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 4589, 26(15), 4589. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26154589>
- Trunk, T., S. Khalil, H., & C. Leo, J. (2018). Bacterial autoaggregation. *AIMS Microbiology*, 4(1), 140–164. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.1.140>
- Ugurlu, A., Karahasan Yagci, A., Ulusoy, S., Aksu, B., & Bosgelmez-Tinaz, G. (2016). Phenolic compounds affect production of pyocyanin, swarming motility and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(8), 698–701. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.06.008>
- Wagner, H., & Ulrich-Merzenich, G. (2009). Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, 16(2–3), 97–110. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.12.018>
- Walter, G. M., Abbott, R. J., Brennan, A. C., Bridle, J. R., Chapman, M., Clark, J., Filatov, D., Nevado, B., Ortiz-Barrientos, D., & Hiscock, S. J. (2020). *Senecio* as a model system for integrating studies of genotype, phenotype and fitness. *New Phytologist* (Vol. 226, Issue 2, pp. 326–344). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/nph.16434>

- Wang, L., Cao, X., Pei, H., Liu, P., Song, Y., & Wu, Y. (2023). Anti-Biofilm Activity of Chlorogenic Acid against *Pseudomonas* Using Quorum Sensing System. *Foods*, 12(19), 3601. <https://doi.org/10.3390/FOODS12193601/S1>
- Wang, Y., Liang, Z., Liao, X., Zhou, C., Xie, Z., Zhu, S., Wei, G., & Huang, Y. (2019). Identification of C-glycosyl flavones by high performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry and quantification of five main C-glycosyl flavones in *Flickingeria fimbriata*. *BMC Chemistry*, 13(3). <https://doi.org/10.1186/s13065-019-0616-5>
- Wong, E. L. Y., Hiscock, S. J., & Filatov, D. A. (2022). The Role of Interspecific Hybridisation in Adaptation and Speciation: Insights from Studies in *Senecio*. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.907363>
- Wu, M., Wu, Y., Li, R., Cheng, S., Tao, C., Lu, Y., Wan, L., & Zhang, J. (2025). Genus *Senecio* in China: A review on its traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicity. *Journal of Ethnopharmacology*, 347, 119651. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2025.119651>
- Zhai, X., Wu, G., Tao, X., Yang, S., Lv, L., Zhu, Y., Dong, D., & Xiang, H. (2023). Success stories of natural product-derived compounds from plants as multidrug resistance modulators in microorganisms. *RSC Advances*, 13(12), 7798. <https://doi.org/10.1039/D3RA00184A>
- Zhao, X., Yu, Z., & Ding, T. (2020). Quorum-sensing regulation of antimicrobial resistance in bacteria. *Microorganisms* (Vol. 8, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030425>
- Zouine, N., Ghachtouli, N. El, Abed, S. El, & Koraichi, S. I. (2024). A comprehensive review on medicinal plant extracts as antibacterial agents: Factors, mechanism insights and future prospects. *Scientific African* (Vol. 26). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2024.e02395>

CAPÍTULO 4. Discusión general, conclusiones y perspectivas

Discusión general

Los productos naturales han sido históricamente protagonistas del descubrimiento de nuevas drogas en diversos campos de aplicación, pero con mucha notoriedad en el combate a enfermedades infecciosas y cáncer. Tienen características particulares en comparación con los compuestos sintéticos, lo cual ofrece ventajas y desventajas. Suelen tener mayor complejidad estructural, tamaño, rigidez, menor cantidad de nitrógenos y halógenos, y han sido seleccionados evolutivamente para cumplir funciones específicas, lo cual los hace excelentes en su capacidad de actuar sobre blancos específicos. Sin embargo, la complejidad de los extractos hace difícil la identificación de los compuestos efectivamente activos, así como su purificación y aislamiento. Esto, sumado al difícil acceso a suficiente material para una correcta purificación y producción a gran escala, y a la variabilidad metabólica propia de los productos naturales, hace que los compuestos naturales sean una fuente desafiante a la hora de buscar nuevos compuestos activos (Atanasov et al., 2021).

Los organismos presentan una importante variabilidad metabólica, que puede deberse a las condiciones ambientales en su crecimiento, la disponibilidad de nutrientes, la etapa de crecimiento, la interacción con otros organismos y la variabilidad intraespecie (Moore et al., 2014), entre otros (Kessler & Kalske, 2018). Para reducir o controlar esta variabilidad, que muchas veces es relevante en la producción de los compuestos de interés, es necesario tener condiciones de cultivo o crecimiento controladas, lo cual no siempre es factible de realizar. En términos generales, los microorganismos presentan mayores facilidades para su cultivo bajo condiciones controladas, dado que las especies cultivables pueden desarrollarse en laboratorio o en biorreactores a diferentes escalas. En contraste, el crecimiento de plantas en condiciones controladas y a gran escala implica requerimientos significativamente mayores de espacio, equipamiento e inversión. Además, su complejidad anatómica, fisiológica y química las coloca en desventaja frente a los microorganismos en cuanto a la posibilidad de obtener una producción controlada y predecible de metabolitos secundarios. En el contexto de esta tesis, los microorganismos empleados en el Capítulo 2 fueron cultivados bajo condiciones

controladas de temperatura, tiempo y disponibilidad de nutrientes, las cuales fueron seleccionadas para maximizar los rendimientos y minimizar interferencias experimentales. En cambio, las plantas utilizadas fueron colectadas en condiciones naturales, por lo que la reproducibilidad de los resultados se ve limitada por la variabilidad de los factores bióticos y abióticos del entorno, así como por las diferencias en el quimiotipo de los ejemplares analizados.

Por otro lado, los rendimientos de extracción varían de forma importante con el método de extracción, el solvente utilizado, la temperatura y las características del material de partida (Q. W. Zhang et al., 2018). Como se observó en esta tesis, son muy distintos para metabolitos de microorganismos y de plantas. Para los caldos de cultivo de microorganismos, el rendimiento de la extracción realizada fue de entre 0,1 y 0,3 mg/ml, mientras que para las plantas oscilaron entre 35 y 100 mg/g luego de la pre-extracción. Aunque para microorganismos pueden optimizarse las condiciones de cultivo y hasta, en algunos casos, fomentar la producción de determinados compuestos, este bajo rendimiento complejiza el screening inicial y la derreplicación para llegar a un cultivo y extracción dirigidos. Para el caso de las plantas, los altos rendimientos de extracción, incluso en una segunda extracción que asegura la obtención de un extracto de menor nivel de complejidad, permite un mejor trabajo de análisis y fraccionamiento de los extractos, además de la posibilidad de obtener mayor cantidad de compuestos luego de la purificación, lo cual es importante en una búsqueda de compuestos con utilidad farmacológica.

El trabajo se orientó inicialmente a los metabolitos de microorganismos, obteniéndose promisorios resultados. Los metabolitos producidos por microorganismos, como se discutió en el capítulo 1, han sido la base de la antibioticoterapia conocida, representando ellos o sus derivados la mayoría de los compuestos antimicrobianos que se comercializan actualmente (Rani et al., 2021). En ese sentido, no es sorprendente haber obtenido promisorias actividades antimicrobianas a partir de los extractos de caldos de cultivo. Sin embargo, por los motivos expuestos previamente, se consideró la posibilidad de ampliar el enfoque a los metabolitos de plantas. Para estos existe amplia evidencia

de su actividad antimicrobiana y antibiofilm, particularmente de compuestos fenólicos (Ecevit et al., 2022).

Considerando lo anterior, se realizó un cribado primario con diferentes plantas: *Plantago major*, *Xanthium cavanillesii*, *Baccharis trimera*, *Polypodium spp.* y *S. crassiflorus*. En todos los casos, las extracciones fueron dirigidas a metabolitos fenólicos, evitando la presencia de posibles alcaloides tóxicos, lo cual se confirmó mediante análisis de cromatografía en capa fina (TLC) y ensayos de reconocimiento con reactivo de Dragendorff —no detallados en esta tesis— que mostraron la ausencia de bandas compatibles con dichos compuestos. Si bien algunos extractos mostraron actividad antibiofilm, los resultados obtenidos para *S. crassiflorus*, junto con la escasa información disponible sobre su actividad biológica y la facilidad de acceso a esta y otras especies del mismo género, llevaron a seleccionar este material vegetal para continuar con los estudios posteriores presentados en el Capítulo 3 de esta tesis.

Comparando ambas fuentes, se observó que varios de los caldos de cultivo (ILBB7, ILBB162, ILBB219) tuvieron mejor actividad antimicrobiana, a bajas concentraciones y frente a un amplio espectro de microorganismos planctónicos, que las determinadas para los seis extractos de *Senecio*. Para el caso de la inhibición de biofilms microbianos, los resultados fueron más comparables entre unos y otros, aunque los dos extractos de *S. crassiflorus* y los extractos etanólicos de *S. heterotrichus* y *S. brasiliensis* fueron capaces de inhibir biofilms a concentraciones más bajas que las determinadas para todos los extractos de caldos de cultivo. Estos resultados no parecen ser completamente fortuitos y pueden explicarse en función de las estrategias ecológicas y evolutivas que determinan la producción de metabolitos bioactivos en distintos organismos. Los microorganismos sintetizan y secretan metabolitos antimicrobianos principalmente como mecanismo de competencia y supervivencia en entornos donde los recursos son limitados, inhibiendo el crecimiento de otros microorganismos competidores y asegurando su permanencia en el nicho ecológico (Granato et al., 2019). En cambio, las plantas producen compuestos bioactivos fundamentalmente como parte de sus mecanismos de defensa frente a infecciones por patógenos y otros estreses bióticos, actuando muchas veces de manera moduladora o preventiva más que directamente microbicida (Touw & van Dam, 2023).

En este contexto, es razonable suponer que los metabolitos microbianos tienden a mostrar una mayor eficacia frente a células planctónicas, activamente metabólicas y susceptibles a interferencias en procesos esenciales de crecimiento (Firn & Jones, 2000; Wink, 2003, 2008). Por el contrario, los compuestos derivados de plantas podrían actuar preferentemente sobre mecanismos asociados a la adhesión, la comunicación intercelular o la formación y mantenimiento de biofilms, afectando etapas críticas del ciclo de vida microbiano más que el crecimiento celular per se. Esta diferencia en la naturaleza y función ecológica de los metabolitos podría, por tanto, explicar las variaciones observadas en los perfiles de actividad entre extractos microbianos y vegetales.

Asimismo, independientemente de su origen, la abundancia y diversidad de los metabolitos secundarios presentes en productos naturales poseen ventajas y desventajas. Por un lado, diferentes compuestos en un extracto pueden presentar efectos aditivos o sinérgicos, mejorando la actividad respecto a los compuestos puros. En el primer caso, el efecto global es simplemente la suma de los efectos de cada componente, mientras que, en el segundo caso, la actividad total es mayor a la de la suma de cada componente. Esto puede darse por diversos mecanismos: sinergia farmacodinámica, donde los compuestos actúan sobre diferentes blancos, ya sea de la misma o de diferentes vías metabólicas; sinergia farmacocinética, donde uno o más compuestos pueden regular la solubilidad o disponibilidad del compuesto en el sitio activo; modulación de la resistencia al o los compuestos activos, entre otros (Vaou et al., 2022). Por otro lado, sin embargo, los componentes del extracto pueden presentar actividad antagónica, así como también efectos secundarios al ser utilizados con fines terapéuticos (Caesar & Cech, 2019b; Posadzki et al., 2013). En este sentido, también existe otro tipo de acción sinérgica entre compuestos, que consiste en la modulación o eliminación de compuestos con actividad antagónica (Vaou et al., 2022).

Para agregar un nuevo nivel de complejidad, la sinergia entre compuestos puede ser relevante en algunas actividades biológicas y no en otras, siendo un ejemplo muy habitual la reducción o aumento de actividad antimicrobiana al fraccionar un extracto, según el microorganismo contra el que se esté evaluando (Rajčević et al., 2022). Esto se evidencia también en las muestras evaluadas en el Capítulo 3, donde se observa que el

fraccionamiento de los extractos de *Senecio* disminuye la actividad antibiofilm frente a la mayoría de los microorganismos, pero se observa, en algunos casos, un mantenimiento o ligero aumento de la actividad antibiofilm frente a *C. albicans*. Aunque se han logrado importantes avances en el estudio de la actividad y sinergia de compuestos presentes en extractos o purificados utilizando técnicas de metabolómica, estos aún son preliminares y los estudios más fiables sobre la sinergia de compuestos continúan siendo basados en fraccionamiento bioguiado o, más específicamente, fraccionamiento dirigido por sinergia (Vaou et al., 2022).

A la hora de identificar a el o los compuestos responsables de la actividad de un extracto, la sinergia, los bajos rendimientos y los posibles cambios moleculares en el transcurso de las operaciones de separación hacen que el fraccionamiento bioguiado sea considerado cada vez más limitado y factible de fracaso. La derreplicación busca sortear algunos de estos problemas, buscando identificar los compuestos activos previo a su separación, utilizando técnicas como cromatografía líquida o gaseosa acoplada a espectrometría de masas, por ejemplo, y relacionando la presencia de compuestos identificados preliminarmente con la actividad biológica observada. A partir de esto, puede evitarse el redescubrimiento de moléculas previamente reportadas y, de ser necesario un fraccionamiento, pueden utilizarse estos datos para dirigirlo más apropiadamente (Nothias et al., 2018). En el trabajo con metabolitos microbianos se observaron exactamente estas limitaciones, donde los intentos de fraccionamiento bioguiado e identificación de compuestos fueron frustrados por los bajos rendimientos de extracción y aún más bajos de purificación y notoria pérdida de actividad en el fraccionamiento. Al trabajar con metabolitos de plantas también se observó esa limitante de la pérdida de actividad en el fraccionamiento. En base a eso se decidió trabajar con los extractos enteros y buscar aproximarnos a la naturaleza de compuestos activos mediante el uso de UHPLC acoplado a espectrometría de masas y análisis estadístico de correlación entre la abundancia relativa de los compuestos y la actividad antibiofilm de cada extracto. A partir de estos análisis se logró una aproximación a compuestos que pueden ser responsables de la actividad, entre ellos derivados del ácido cafeico y de flavonoides como la quercetina, rhamnetina e isorhamnetina. Aunque la elucidación de los compuestos no fue completa, esta primera aproximación nos permitió realizar

comparaciones con compuestos puros. A pesar de que algunos de los compuestos teorizados se reportan como activos contra biofilms, en las pruebas *in vitro* realizadas contra las cepas de estudio en esta tesis, casi ninguno de los compuestos presentó actividad relevante. Esto sustenta la teoría de que la actividad antibiofilm presentada por los extractos se debe a una combinación de las actividades de varios de los compuestos presentes, ya sea aditiva o sinérgica.

A pesar de que la temática de sinergia entre distintos productos naturales y entre productos naturales y antimicrobianos conocidos está ampliamente documentada (Bonincontro et al., 2023; Sanhueza et al., 2017), y que algunos trabajos estudian y reportan sinergia intra-extracto para actividad antimicrobiana (Dettweiler et al., 2020), no existe particular evidencia de esto para actividad antibiofilm. Este tipo de sinergia puede ser altamente relevante ya que, dada la complejidad de los mecanismos de formación y mantenimiento de los biofilms microbianos, acceder a extractos que, en sí mismos, contengan moléculas con acción sobre diferentes pasos de este proceso puede ser de gran utilidad para lograr un control más efectivo de los biofilms.

En cuanto a los resultados de actividad antibiofilm obtenidos en esta tesis, se observa que algunas de las gráficas de inhibición o erradicación de biofilms no responden a la habitual lógica de curvas dosis-respuesta, mostrando actividad antibiofilm a bajas concentraciones, pero no así a altas, como el caso del extracto metanólico de *S. heterotrichus* contra biofilms de *P. aeruginosa* (Figura 3.3B), o actividad inhibitoria a determinadas concentraciones y estimulante a concentraciones menores, como en el extracto metanólico de *S. brasiliensis* contra *S. aureus* (Figura A1.6B). Este comportamiento está ampliamente documentado. El primer reporte de la disminución de inhibición al aumentar las concentraciones de antimicrobianos fue dado en un estudio de concentración bactericida mínima y se denominó, por su descubridor, el efecto Eagle o efecto paradójico (Prasetyoputri et al., 2019). Puede darse en microorganismos en su estado planctónico y su estado de biofilm (Fathy et al., 2025; B. T. Jacobson et al., 2024; Vanstraelen et al., 2013). Aunque no hay evidencia concreta de la forma en la cual esto sucede, se teoriza que puede implicar la interferencia del antimicrobiano con proteínas implicadas en la lisis celular, generación de especies reactivas del oxígeno, activación

de mecanismos de respuesta al estrés, regulación de la síntesis de quitina en el caso de hongos, así como estimulación de la formación de células persistentes (Prasetyoputri et al., 2019). Por otro lado, la estimulación de la formación de biofilms o del crecimiento de microorganismos planctónicos a concentraciones subinhibitorias también ha sido reportado, en un fenómeno denominado hormesis, que implica una curva dosis-respuesta bifásica. Se teoriza que esto puede deberse a una respuesta adaptativa de defensa, estimulada por pequeñas concentraciones del agente antimicrobiano, que no son capaces de afectar a las células o el biofilm. (Al-Momani et al., 2024; Lin et al., 2023; Y. Zhang et al., 2019). Además, si volvemos a pensar en el concepto de antagonismo dentro de un extracto, podemos teorizar que estas moléculas con efectos antagónicos pueden tener distintas concentraciones efectivas. De esta forma, a distintas concentraciones del extracto, puede regir una u otra acción. Esto sumado a la naturaleza multifactorial de la formación y el mantenimiento de los biofilms microbianos, y por tanto los diferentes mecanismos en los que se puede interferir, tanto aquellos evaluados en esta tesis como los que no, hacen a la complejidad de la completa interpretación de la actividad antibiofilm.

A lo largo de esta tesis se pudo estudiar y comparar distintas fuentes de productos naturales, con sus ventajas y desventajas, y determinar su capacidad antimicrobiana y antibiofilm, con las particularidades mostradas para las diferentes fuentes. Por otro lado, resulta interesante observar que para extractos de naturaleza similar y provenientes de plantas del mismo género, se observan diferencias fitoquímicas y de actividad biológica muy importantes. Incluso para extractos que presentan actividad antibiofilm comparable, se observan mecanismos de acción distintos, algunos de los cuales se pueden asociar a la presencia de alto contenido de fenoles en el extracto, o a la inhibición de la señal de *quorum sensing* necesaria para la formación de biofilms.

Conclusiones

En el transcurso de esta tesis se obtuvieron diferentes extractos con bioactividad frente a microorganismos, tanto en su estado planctónico como en forma de biofilms, de relevancia en salud humana y animal así como fitopatógenos que afectan el sector agrícola en Uruguay. Los resultados evidenciaron que los metabolitos provenientes de microorganismos y de plantas constituyen una fuente diversa y promisorio de compuestos con potencial antimicrobiano y antibiofilm.

Se observaron diferencias notorias entre los extractos de origen vegetal y los de origen microbiano en cuanto a su espectro y modo de acción sobre las células microbianas. En términos generales, los extractos microbianos mostraron una actividad más marcada sobre células planctónicas, mientras que los de plantas presentaron efectos más pronunciados sobre la formación y estructura de biofilms. Esta distinción sugiere que la naturaleza y complejidad química de los metabolitos involucrados, así como su modo de producción y el contexto ecológico del organismo que los genera, determinan en gran medida su comportamiento frente a las comunidades microbianas.

En particular, el estudio de los metabolitos de plantas permitió caracterizar seis extractos obtenidos de tres especies del género *Senecio*, cuyas fracciones mostraron una significativa actividad antibiofilm. Se logró una primera aproximación a la identificación de los compuestos responsables de dicha actividad, observándose que no parece depender de una única molécula, sino del efecto combinado y posiblemente sinérgico de varios componentes presentes en los extractos. Este hallazgo es relevante desde el punto de vista biotecnológico, ya que refuerza la idea de que la eficacia de los productos naturales radica no solo en la potencia de sus constituyentes individuales, sino también en su interacción y complementariedad funcional.

En los extractos que presentaron mayor actividad, se avanzó en la comprensión de los posibles mecanismos de acción. Los estudios realizados demostraron que algunos de ellos fueron capaces de interferir en las vías de comunicación bacteriana (*quorum-sensing*) en bacterias Gram negativas, inhibiendo la expresión de factores de virulencia, y los procesos de autoagregación celular. Además, mediante análisis por Microscopía Laser Confocal se observaron alteraciones notables en la arquitectura de los biofilms

tratados, incluyendo una reducción en la densidad celular desorganización de la matriz extracelular y cambios morfológicos compatibles con estrés celular o inhibición de la formación de microcolonias.

A partir de este trabajo se logró una contribución significativa al conocimiento sobre los biofilms microbianos y las estrategias naturales para su control. Los resultados obtenidos en esta tesis respaldan la hipótesis de que los extractos de productos naturales no sólo constituyen una importante fuente de moléculas bioactivas, sino que reflejan una forma de “diseño natural inteligente”, en la actividad global de extracto es superior a la suma de las actividades individuales de sus componentes. Esta característica abre nuevas perspectivas para el desarrollo de formulaciones naturales o combinadas que aprovechen los efectos sinérgicos entre compuestos, evitando la rápida aparición de resistencia microbiana y ofreciendo alternativas sostenibles frente a la pérdida de eficacia de los antimicrobianos convencionales.

En conjunto, los resultados de esta tesis consolidan el concepto de que los productos naturales representan un reservorio biotecnológico de alto valor, especialmente en el contexto actual de resistencia antimicrobiana. Su estudio no solo amplía el conocimiento básico sobre las interacciones químico-ecológicas entre organismos, sino que también sienta bases para el diseño de nuevas estrategias de control microbiano basadas en mezclas o consorcios de moléculas naturales, más compatibles con el ambiente y con potencial aplicación tanto en salud humana como en producción agropecuaria.

Perspectivas

Los hallazgos alcanzados en este trabajo abren múltiples líneas de investigación y aplicación a futuro a diferentes plazos. En primer lugar, sería de gran interés evaluar el potencial sinérgico entre metabolitos de diferentes orígenes (microbianos y vegetales), o entre extractos naturales y antibióticos convencionales. La combinación racional de compuestos naturales con fármacos de referencia podría permitir la reducción de las dosis necesarias de antimicrobianos, minimizando efectos colaterales y retardando la aparición de resistencia. En este sentido y teniendo en cuenta la bibliografía citada en la discusión, también es plausible que los extractos presenten una actividad sinérgica con antimicrobianos de uso clínico en la erradicación efectiva de los biofilms establecidos. Es así que evaluar esta interacción sería beneficioso para ampliar la aplicabilidad de los compuestos naturales y contribuir al desarrollo de tratamientos combinados más eficaces frente a infecciones persistentes.

Otra perspectiva posible consiste en trasladar estos resultados a modelos biológicos más complejos, tales como sistemas de cultivo celular o modelos animales, que permitan validar la eficacia y seguridad de los extractos o fracciones bioactivas. El estudio de su biocompatibilidad, toxicidad y estabilidad en condiciones fisiológicas resultará esencial para avanzar hacia el desarrollo de formulaciones aplicables en contextos clínicos o agrobiotecnológicos.

Asimismo, la optimización de los procesos de obtención y purificación de extractos bioactivos mediante estrategias biotecnológicas podría incrementar su rendimiento y sustentabilidad. En el caso de los metabolitos microbianos, la manipulación de las condiciones de cultivo o el co-cultivo con otros microorganismos podría potenciar la producción de compuestos secundarios con actividad antibiofilm.

La posibilidad de continuar trabajando en encontrar las combinaciones de metabolitos más efectivas para combatir biofilms microbianos, ya sea explorando alternativas de fraccionamiento o aumentando el número y diversidad de muestras, ya sea de estas especies u otras, aumentaría su valor comparativo. La aplicación de herramientas estadísticas multivariadas o de metabolómica permitiría realizar aproximaciones más precisas y predecir asociaciones entre composición química y actividad biológica.

Resultaría también interesante continuar explorando los mecanismos de actividad antibiofilm, ya sea de extractos enteros o purificados, buscando si afectan la producción o permeabilidad de EPS, la síntesis de estructuras de adhesión a superficies, los mecanismos de *quorum-sensing* de Gram positivas o levaduras, entre otros.

Por otro lado, con vistas a una posible aplicación práctica de los extractos, fracciones purificadas o compuestos aislados, sería fundamental estudiar su toxicidad, estabilidad y compatibilidad con diferentes materiales de uso biomédico o agroindustrial. Esta información permitiría avanzar hacia el desarrollo de recubrimientos, formulaciones o aditivos de origen natural destinados a la prevención de la formación de biofilms en superficies y dispositivos.

Finalmente, los resultados de esta tesis invitan a una reflexión más amplia sobre la necesidad de redescubrir la biodiversidad como fuente de soluciones naturales frente a los desafíos sanitarios y ambientales actuales. El estudio sistemático de plantas y microorganismos autóctonos, adaptados a condiciones ecológicas particulares, puede conducir al descubrimiento de nuevas moléculas con propiedades únicas y a la valorización del patrimonio biológico local mediante su aplicación en biotecnología, salud y agricultura sustentable.

En suma, el trabajo aquí presentado no solo amplía el conocimiento sobre la actividad antibiofilm de productos naturales, sino que sienta las bases para futuras investigaciones orientadas al desarrollo de estrategias integradas de control microbiano, que combinen la diversidad química de la naturaleza con las herramientas analíticas y biotecnológicas contemporáneas, contribuyendo así a enfrentar uno de los mayores retos de la microbiología moderna: la resistencia a los antimicrobianos y la persistencia de los biofilms.

Bibliografía

- Al-Momani, H., Aolymat, I., Ibrahim, L., Albalawi, H., Al Balawi, D., Albiss, B. A., Almasri, M., & Alghweiri, S. (2024). Low-dose zinc oxide nanoparticles trigger the growth and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*: a hormetic response. *BMC Microbiology* 2024 24:1, 24(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/S12866-024-03441-Y>
- Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., Orhan, I. E., Banach, M., Rollinger, J. M., Barreca, D., Weckwerth, W., Bauer, R., Bayer, E. A., Majeed, M., Bishayee, A., Bochkov, V., Bonn, G. K., Braid, N., Bucar, F., Cifuentes, A., D'Onofrio, G., Bodkin, M., ... Supuran, C. T. (2021). Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(3), 200–216. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>
- Bonincontro, G., Scuderi, S. A., Marino, A., & Simonetti, G. (2023). Synergistic Effect of Plant Compounds in Combination with Conventional Antimicrobials against Biofilm of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida* spp. *Pharmaceuticals*, 16(11), 1531. <https://doi.org/10.3390/PH16111531>
- Caesar, L. K., & Cech, N. B. (2019). Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1 + 1 does not equal 2. *Natural Product Reports*, 36(6), 869. <https://doi.org/10.1039/C9NP00011A>
- Dettweiler, M., Marquez, L., Bao, M., & Quave, C. L. (2020). Quantifying synergy in the bioassay-guided fractionation of natural product extracts. *PLOS ONE*, 15(8), e0235723. <https://doi.org/10.1371/>
- Ecevit, K., Barros, A. A., Silva, J. M., & Reis, R. L. (2022). Preventing Microbial Infections with Natural Phenolic Compounds. *Future Pharmacology* 2022, Vol. 2, Pages 460-498, 2(4), 460–498. <https://doi.org/10.3390/FUTUREPHARMACOL2040030>
- Fathy, H. M., Ahmed, M. N., Goda, H. A., & Moselhy, M. A. (2025). Thyme essential oil potentials as a bactericidal and biofilm-preventive agent against prevalent bacterial pathogens. *Scientific Reports* 2025 15:1, 15(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-16485-5>
- Firn, R. D., & Jones, C. G. (2000). The evolution of secondary metabolism – a unifying model. *Molecular Microbiology*, 37(5), 989–994. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02098.x>
- Granato, E. T., Meiller-Legrand, T. A., & Foster, K. R. (2019). The Evolution and Ecology of Bacterial Warfare. *Current Biology*, 29(11), R521–R537. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2019.04.024>
- Jacobson, B. T., DeWit-Dibbert, J., Selong, E. T., Quirk, M., Throolin, M., Corona, C., Sonar, S., Zanca, L. S., Schwarz, E. R., & Bimczok, D. (2024). Innovative Methodology for

- Antimicrobial Susceptibility Determination in Mycoplasma Biofilms. *Microorganisms*, 12(12), 2650. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS12122650/S1>
- Kessler, A., & Kalske, A. (2018). Plant secondary metabolite diversity and species interactions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 49(Volume 49, 2018), 115–138. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ECOLSYS-110617-062406/>
- Lin, H., Ning, X., Wang, D., Wang, Q., Bai, Y., & Qu, J. (2023). Quorum-sensing gene regulates hormetic effects induced by sulfonamides in Comamonadaceae. *Applied and Environmental Microbiology*, 89(12). <https://doi.org/10.1128/AEM.01662-23;>
- Moore, B. D., Andrew, R. L., Külheim, C., & Foley, W. J. (2014). Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. *The New Phytologist*, 201(3), 733–750. <https://doi.org/10.1111/NPH.12526>
- Nothias, L. F., Nothias-Esposito, M., Da Silva, R., Wang, M., Protsyuk, I., Zhang, Z., Sarvepalli, A., Leyssen, P., Touboul, D., Costa, J., Paolini, J., Alexandrov, T., Litaudon, M., & Dorrestein, P. C. (2018). Bioactivity-Based Molecular Networking for the Discovery of Drug Leads in Natural Product Bioassay-Guided Fractionation. *Journal of Natural Products*, 81(4), 758–767. <https://doi.org/10.1021/ACS.JNATPROD.7B00737>
- Posadzki, P., Watson, L. K., & Ernst, E. (2013). Adverse effects of herbal medicines: an overview of systematic reviews. *Clinical Medicine*, 13(1), 7–12. <https://doi.org/10.7861/CLINMEDICINE.13-1-7>
- Prasetyoputri, A., Jarrad, A. M., Cooper, M. A., & Blaskovich, M. A. T. (2019). The Eagle Effect and Antibiotic-Induced Persistence: Two Sides of the Same Coin? *Trends in Microbiology* (Vol. 27, Issue 4, pp. 339–354). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.10.007>
- Rajčević, N., Bukvički, D., Dodoš, T., & Marin, P. D. (2022). Interactions between Natural Products—A Review. *Metabolites* (Vol. 12, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/metabo12121256>
- Rani, A., Saini, K. C., Bast, F., Varjani, S., Mehariya, S., Bhatia, S. K., Sharma, N., & Funk, C. (2021). A Review on Microbial Products and Their Perspective Application as Antimicrobial Agents. *Biomolecules*, 11(12), 1860. <https://doi.org/10.3390/biom11121860>
- Sanhueza, L., Melo, R., Montero, R., Maisey, K., Mendoza, L., & Wilkens, M. (2017). Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 12(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172273>
- Touw, A. J., & van Dam, N. M. (2023). Optimal chemical defence allocation in roots: where, why and how? *Phytochemistry Reviews* 2023 24:1, 24(1), 27–36. <https://doi.org/10.1007/S11101-023-09872-1>

- Vanstraelen, K., Lagrou, K., Maertens, J., Wauters, J., Willems, L., & Spriet, I. (2013). The Eagle-like effect of echinocandins: What's in a name? *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 11(11), 1179–1191. <https://doi.org/10.1586/14787210.2013.841543>
- Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C., Tsakris, Z., Rozos, G., Tsigalou, C., & Bezirtzoglou, E. (2022). Interactions between Medical Plant-Derived Bioactive Compounds: Focus on Antimicrobial Combination Effects. In *Antibiotics* (Vol. 11, Issue 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081014>
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64(1), 3–19. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00300-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00300-5)
- Wink, M. (2008). Plant secondary metabolism: Diversity, function and its evolution. *Natural Product Communications*, 3(8), 1205–1216. <https://doi.org/10.1177/1934578X0800300801>
- Zhang, Q. W., Lin, L. G., & Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine* 2018 13:1, 13(1), 1–26. <https://doi.org/10.1186/S13020-018-0177-X>
- Zhang, Y., Song, J., Wang, T., Sun, H., Lin, Z., & Zhang, Y. (2019). Time-Dependent Toxicities of Quorum Sensing Inhibitors to *Aliivibrio fischeri* and *Bacillus subtilis*. *Dose-Response*, 17(1), 1559325818822938. <https://doi.org/10.1177/1559325818822938>

ANEXO I

Gráficas de inhibición y erradicación de biofilms por extractos de Senecio

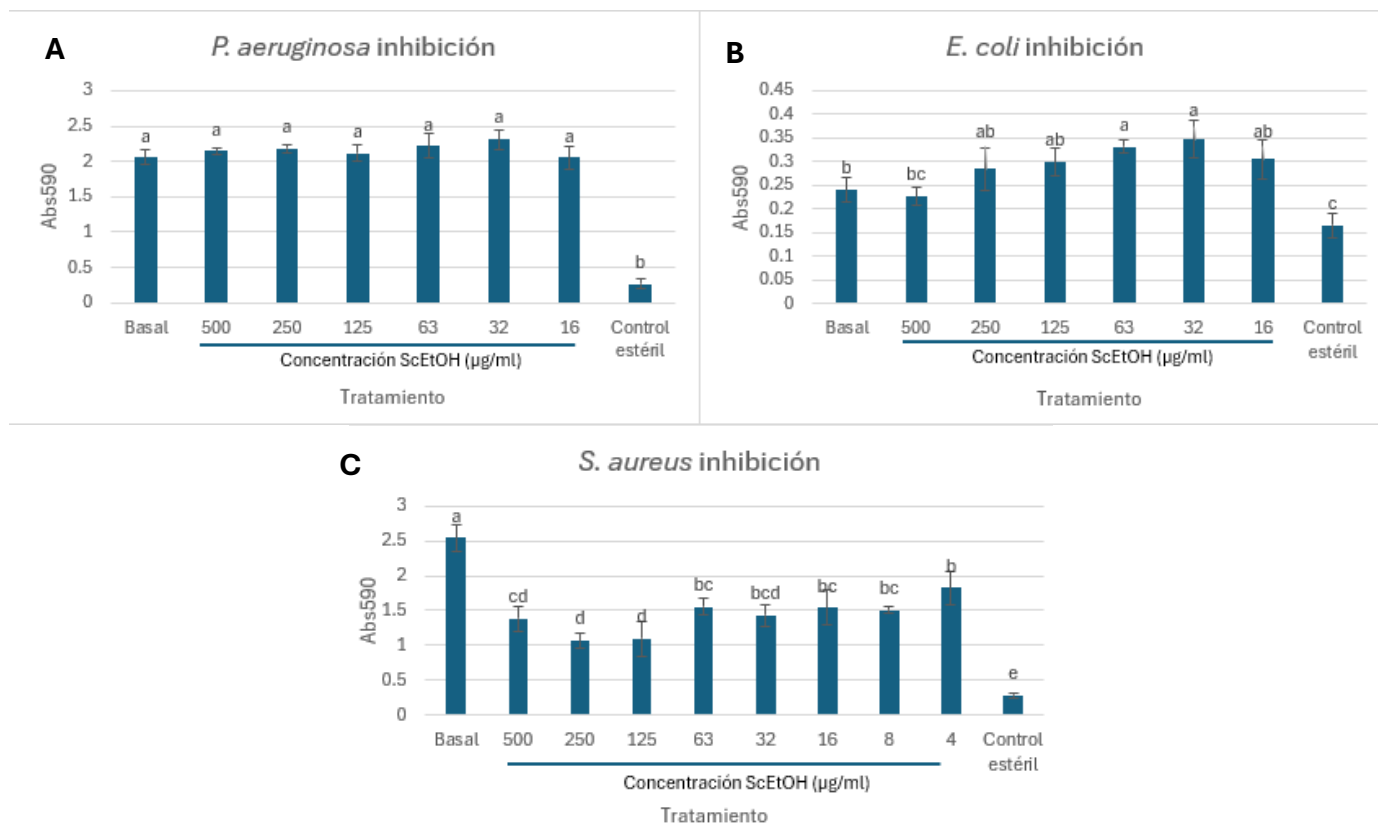


Figura A1.1. Actividad inhibitoria de biofilms por ScEtOH A. Frente a *P. aeruginosa*, B. Frente a *E. coli* C. Frente a *S. aureus*. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

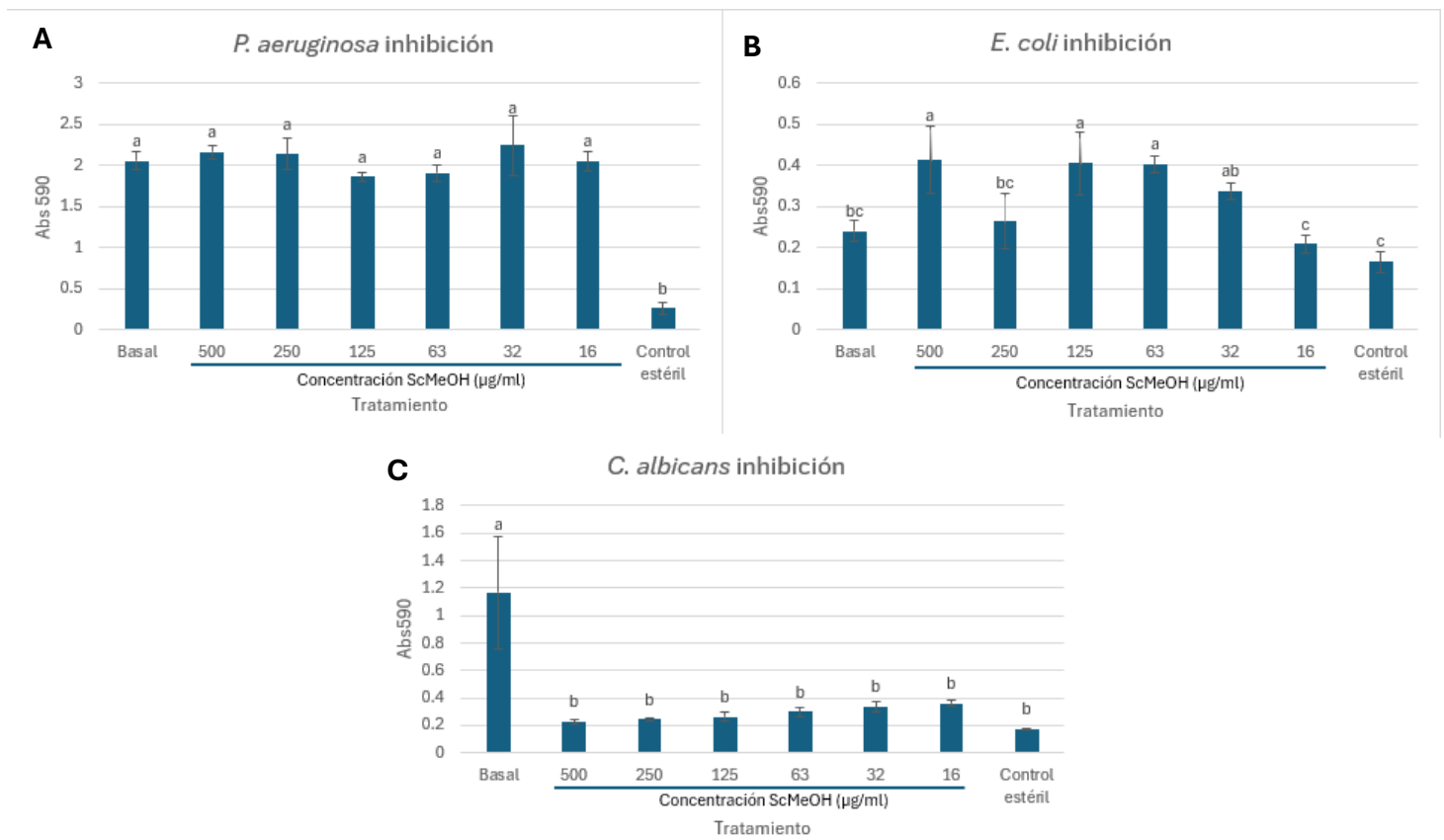


Figura A1.2. Actividad inhibitoria de biofilms por ScMeOH A. Frente a *P. aeruginosa*, B. Frente a *E. coli* C. Frente a *C. albicans* Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

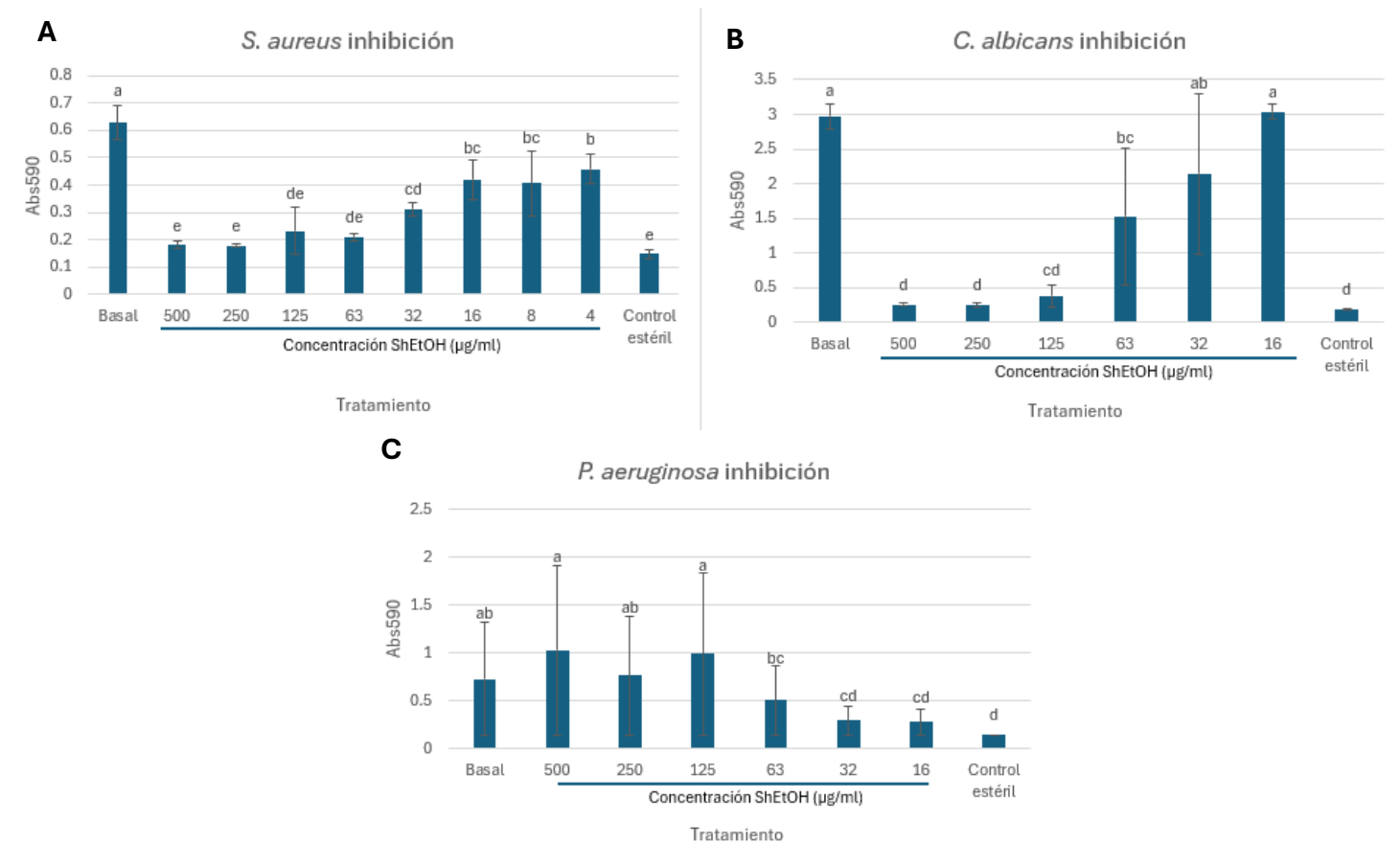


Figura A1.3. Actividad inhibitoria de biofilms por ShEtOH A. Frente a *S. aureus*, B. Frente a *C. albicans* C. Frente a *P. aeruginosa* Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

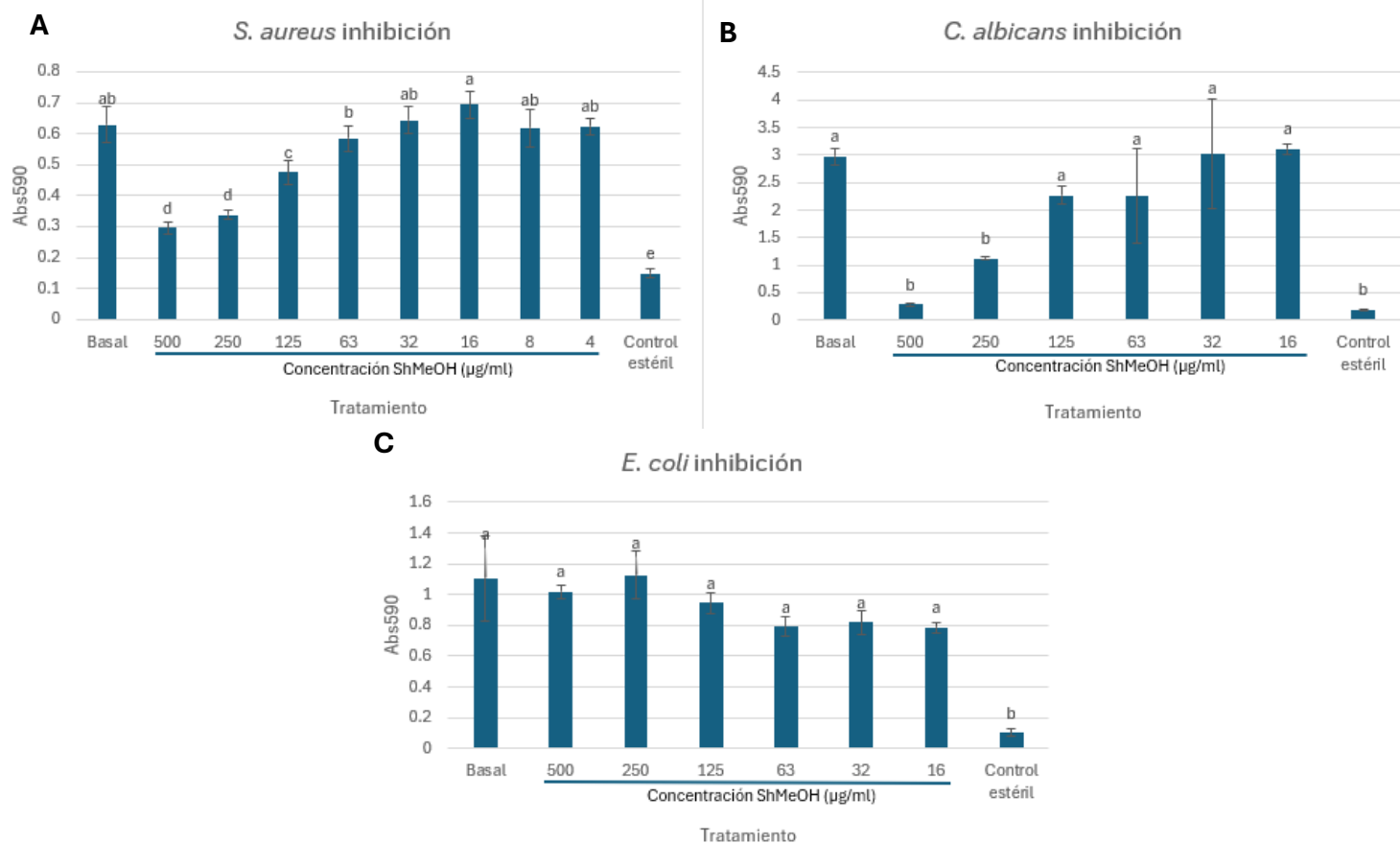


Figura A1.4. Actividad inhibitoria de biofilms por ShMeOH A. Frente a *S. aureus*, B. Frente a *C. albicans* C. Frente a *E. coli* Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

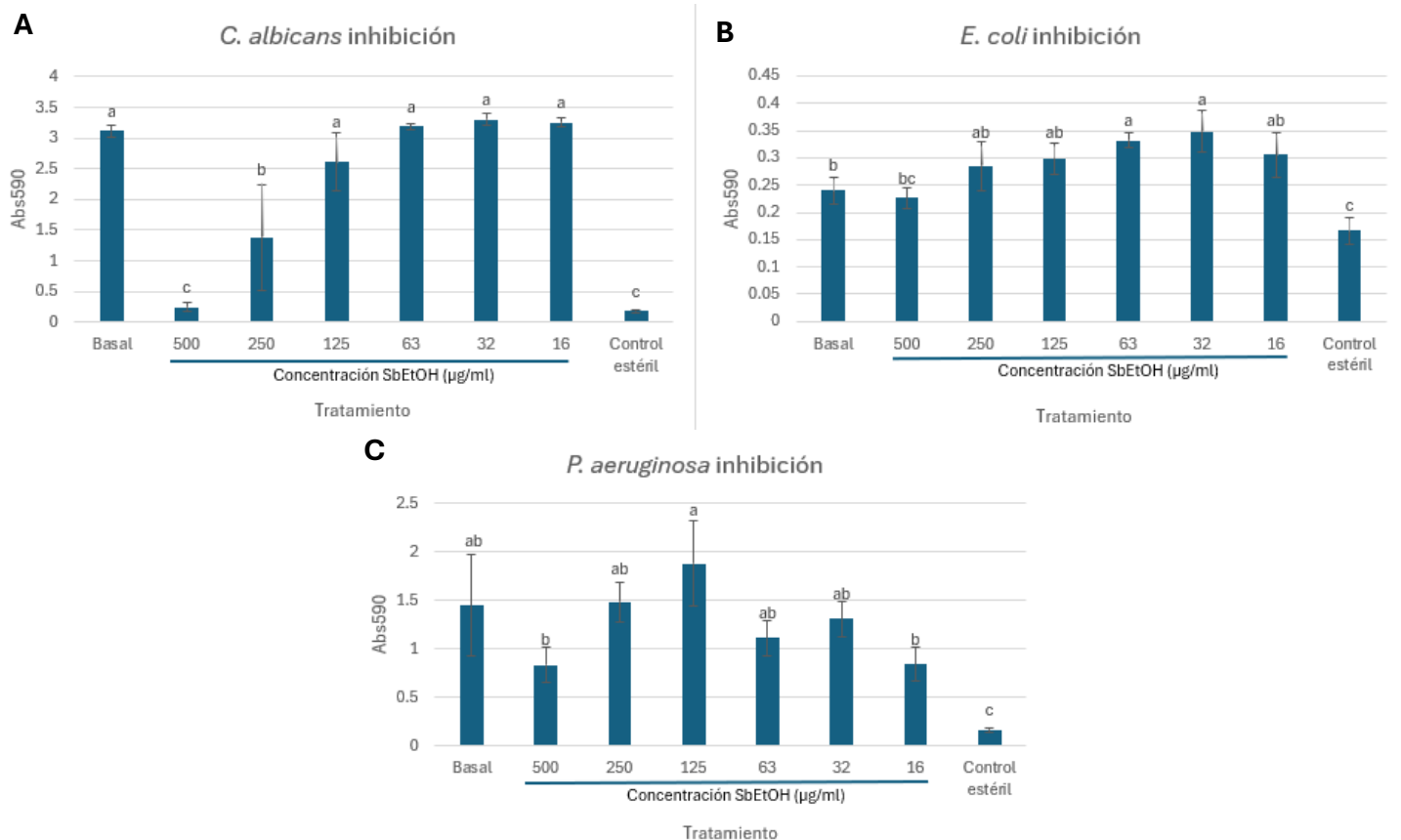


Figura A1.5. Actividad inhibitoria de biofilms por SbEtOH A. Frente a *C. albicans*, B. Frente a *E. coli*. C. Frente a *P. aeruginosa* Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

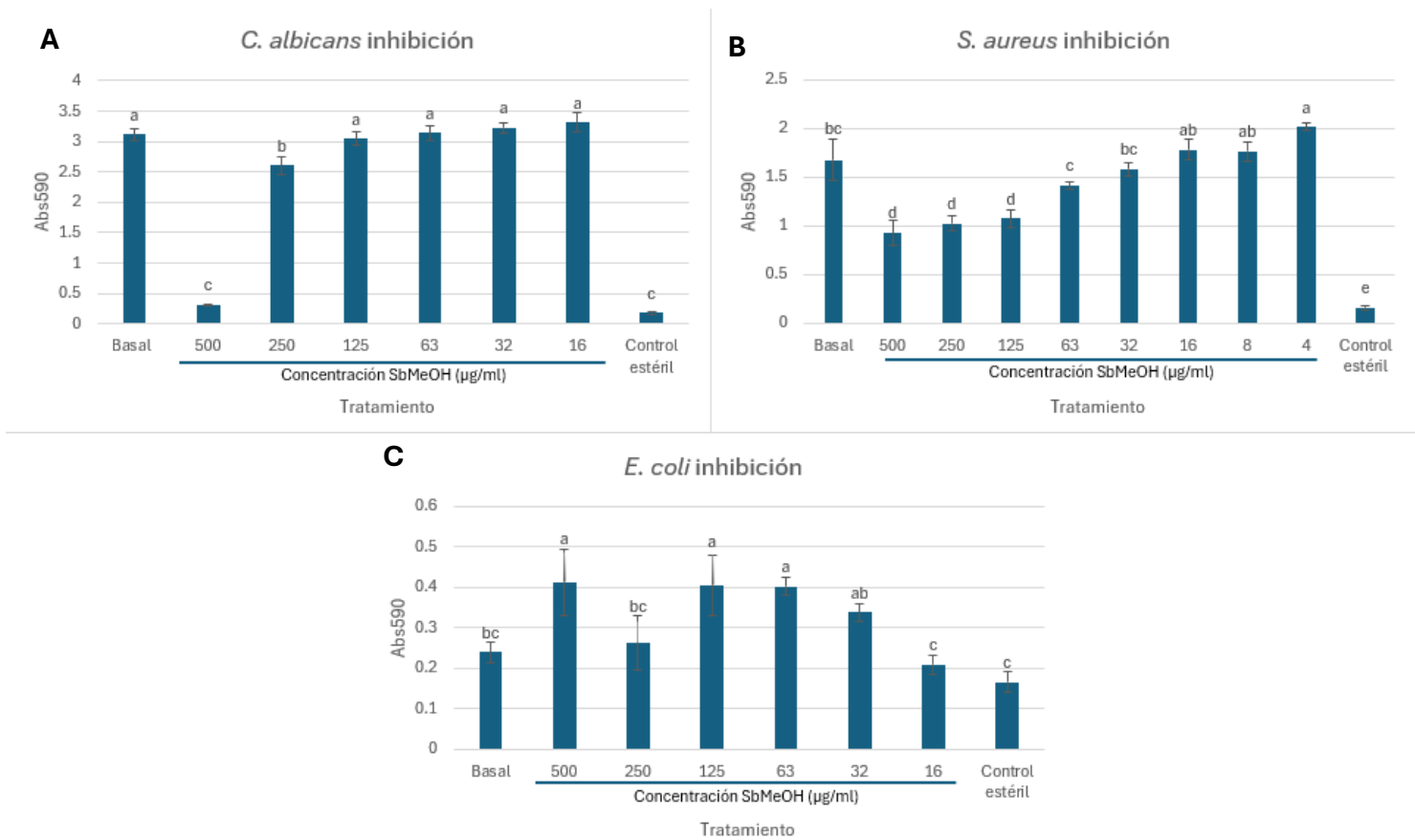


Figura A1.6. Actividad inhibitoria de biofilms por SbMeOH A. *C. albicans*, B. Frente a *S. aureus*. C. Frente a *E. coli*. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

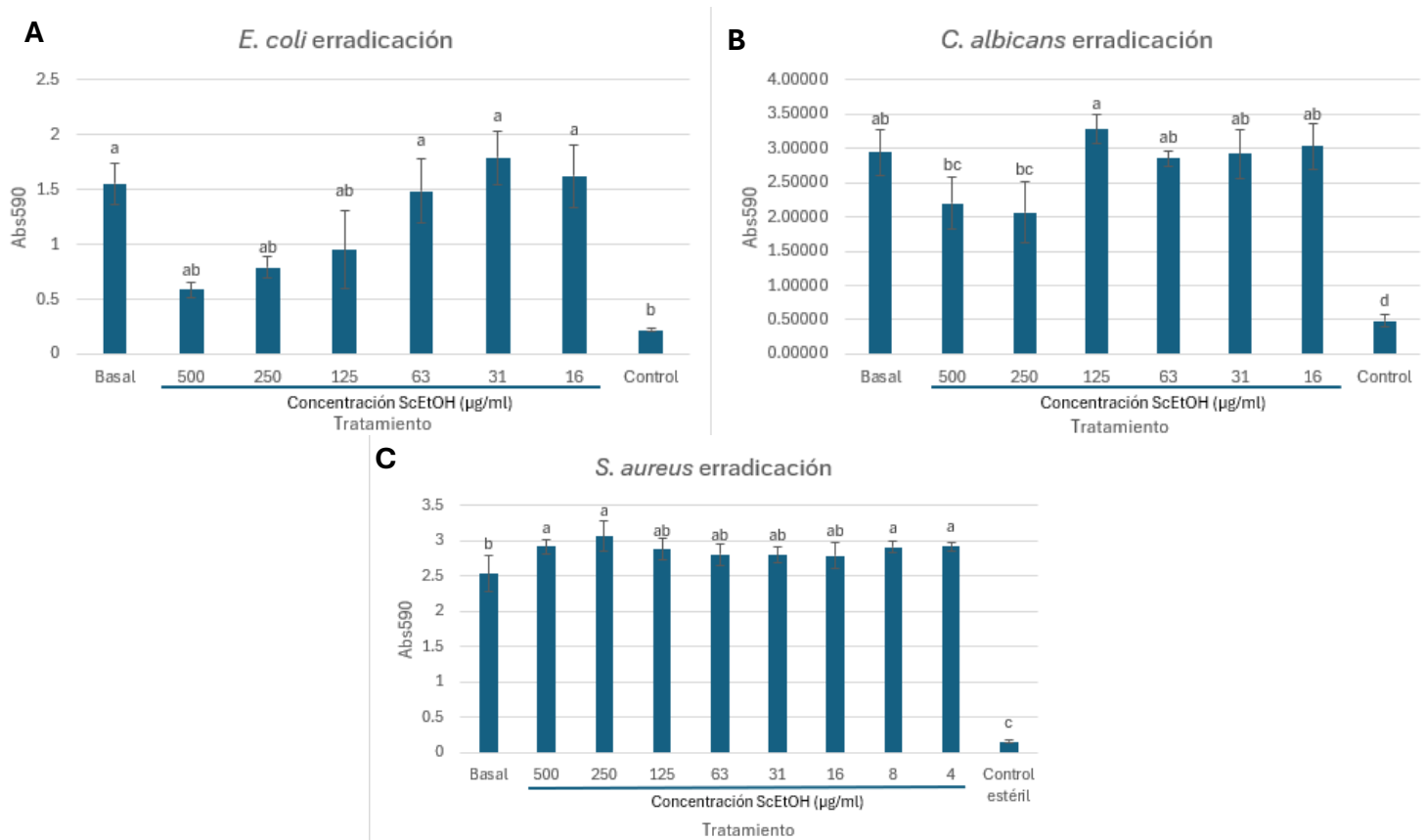


Figura A1.7. Actividad erradicadora de biofilms por ScEtOH A. *E. coli*, B. Frente a *C. albicans*. C. Frente a *S. aureus*. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

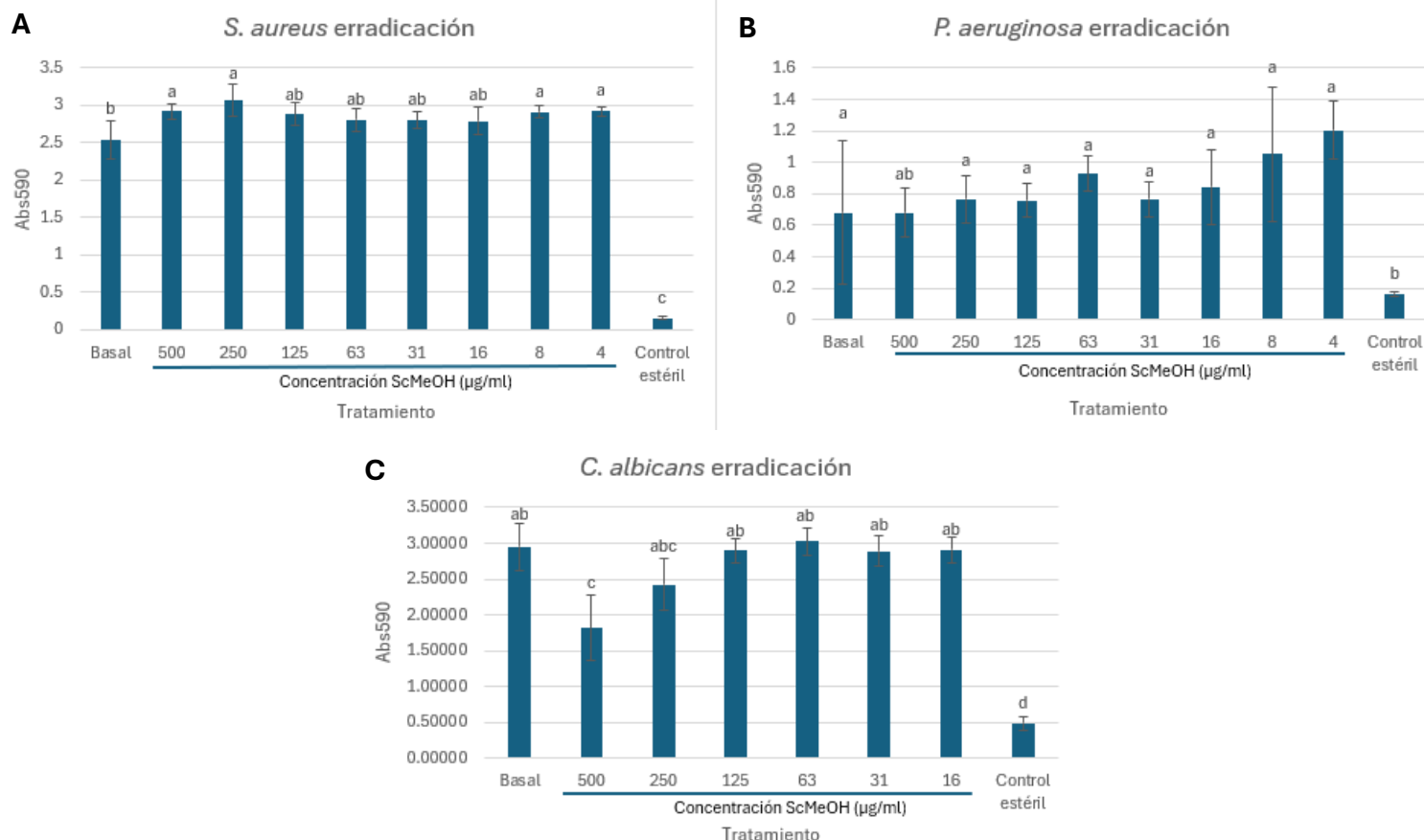


Figura A1.8. Actividad erradicadora de biofilms por ScMeOH A. *S. aureus*, B. Frente a *P. aeruginosa*. C. Frente a *C. albicans*. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

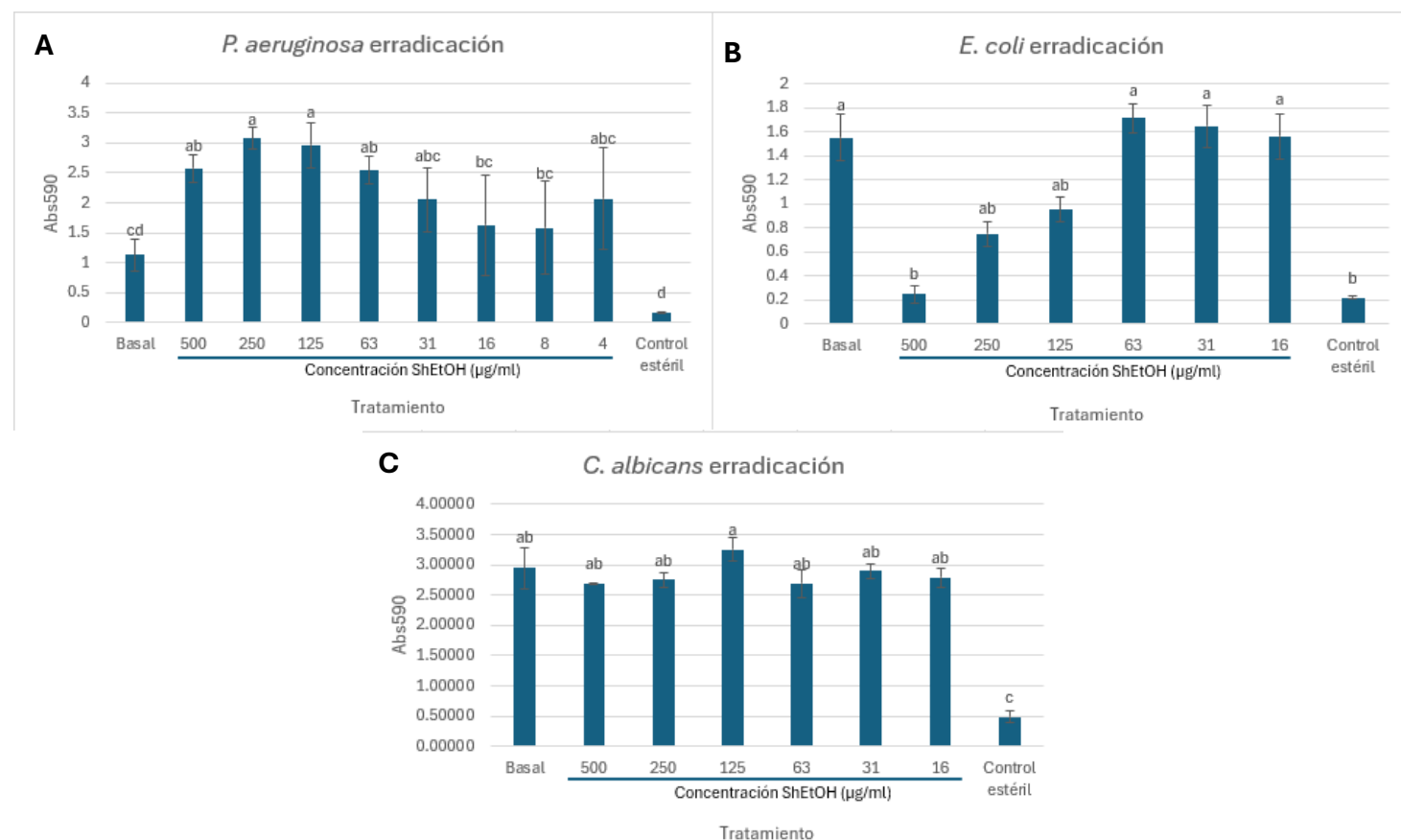


Figura A1.9. Actividad erradicadora de biofilms por ShEtOH A. *P. aeruginosa*, B. Frente a *E. coli*. C. Frente a *C. albicans*. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

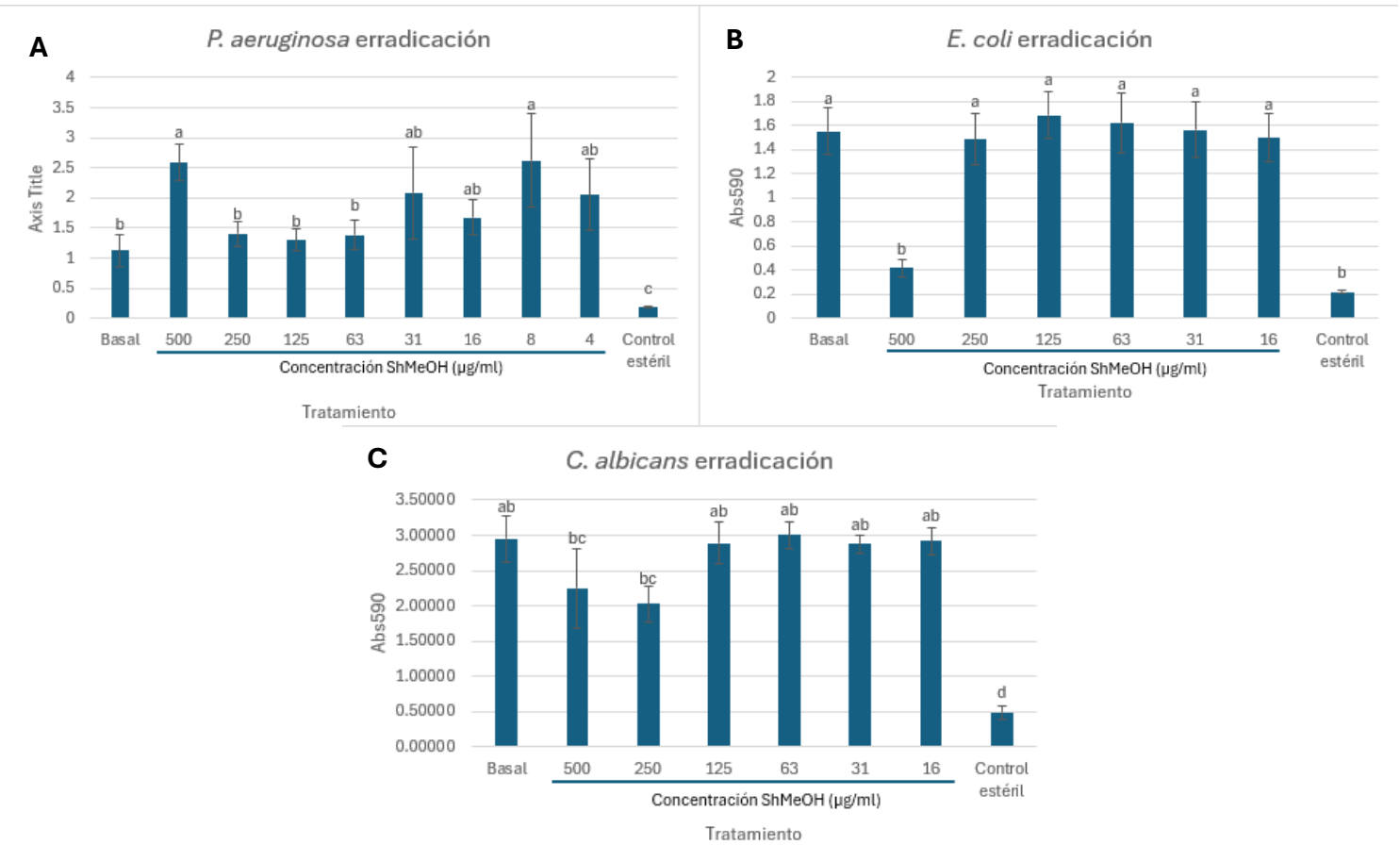


Figura A1.10. Actividad erradicadora de biofilms por ShMeOH A. *P. aeruginosa*, B. Frente a *E. coli*. C. Frente a *C. albicans*. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

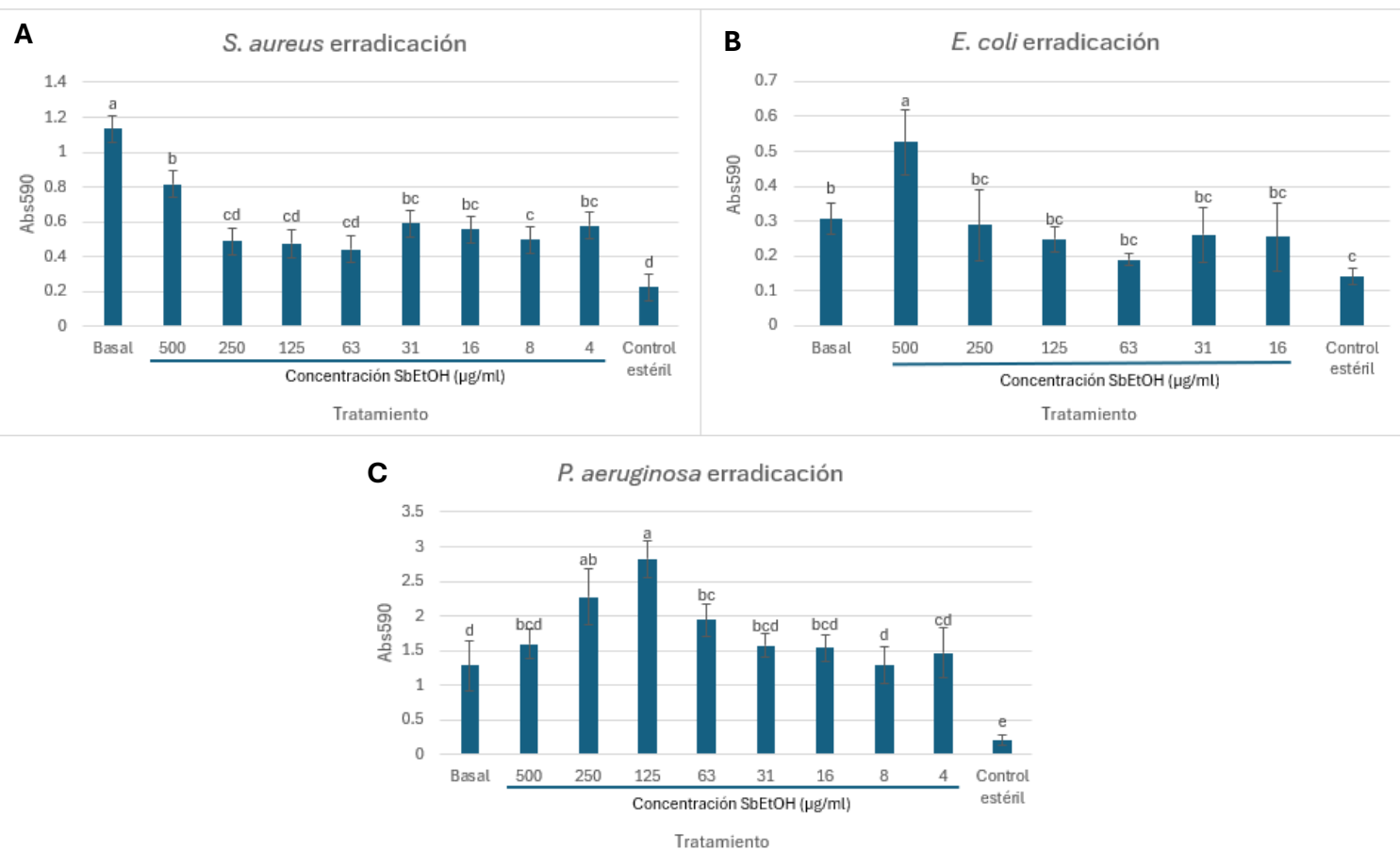


Figura A1.11. Actividad erradicadora de biofilms por SbEtOH. A. Frente a *S. aureus*., B. Frente a *E. coli*., C. Frente a *P. aeruginosa*. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

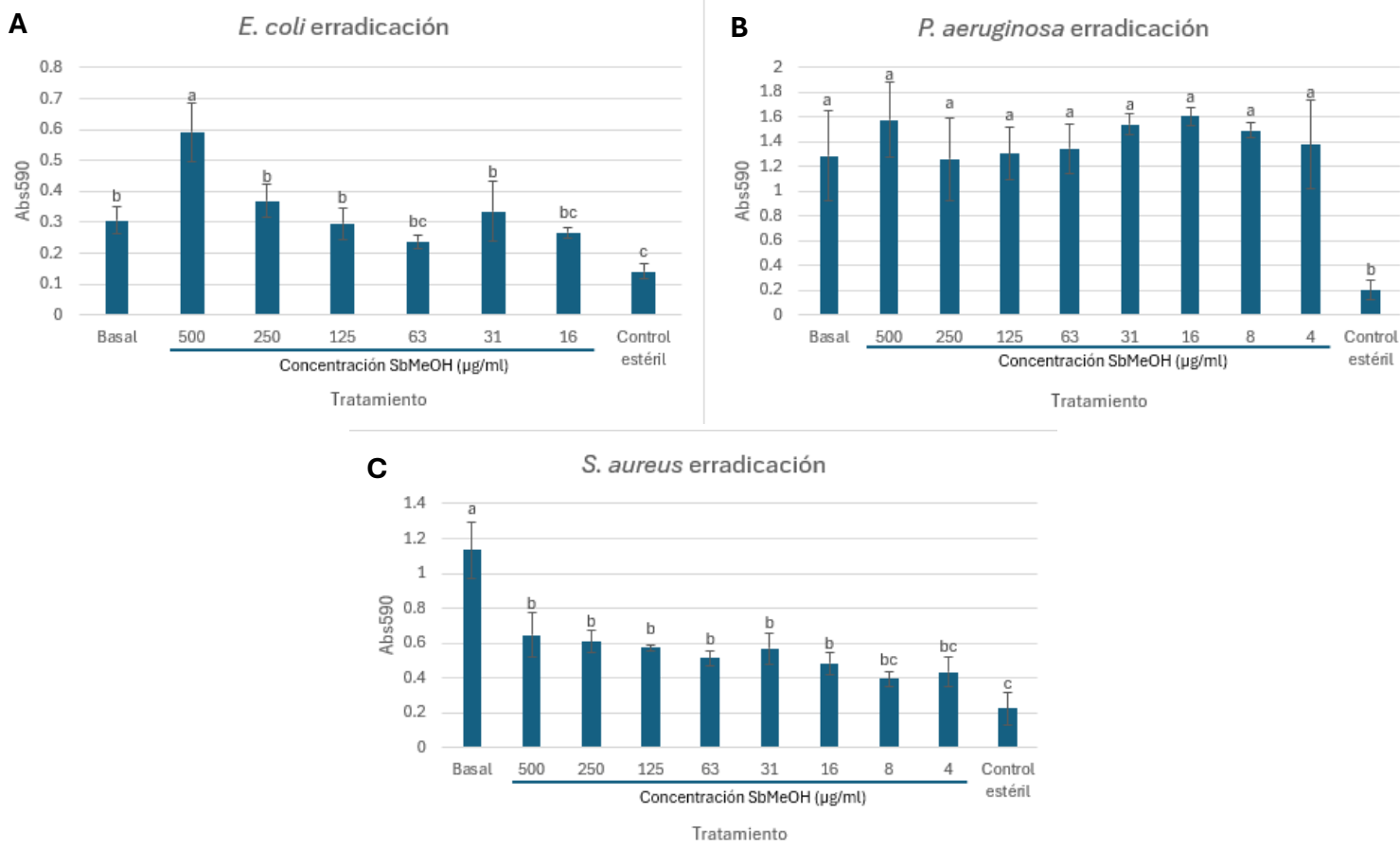
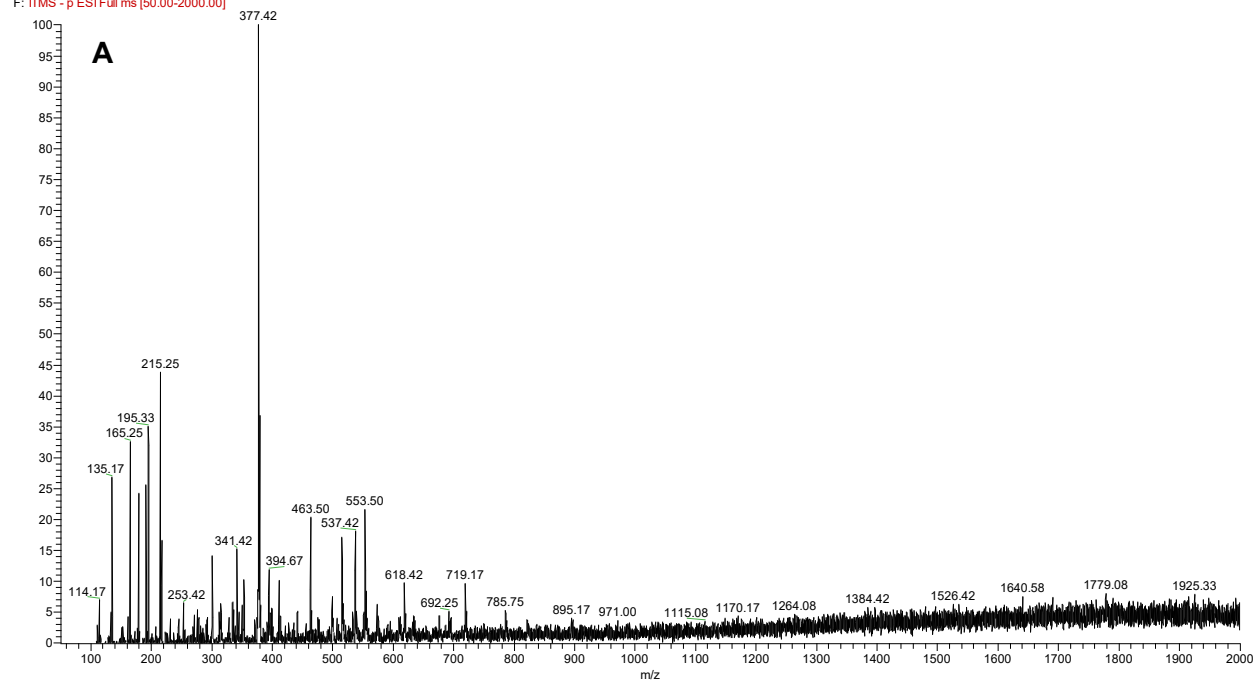


Figura A1.11. Actividad erradicadora de biofilms por SbMeOH. A. Frente a *E. coli*., B. Frente a *P. aeruginosa*., C. Frente a *S. aureus*
Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

ANEXO II

Espectros de masas de compuestos

Shetanol #196-225 RT: 0.75-0.86 AV: 15 NL: 1.91E3
F: ITMS - p ESI Full ms [50.00-2000.00]



Shetanol #185-221 RT: 0.71-0.84 AV: 15 NL: 8.95E2
F: ITMS - p ESI d Full ms2 377.41@cid25.00 [90.00-765.00]

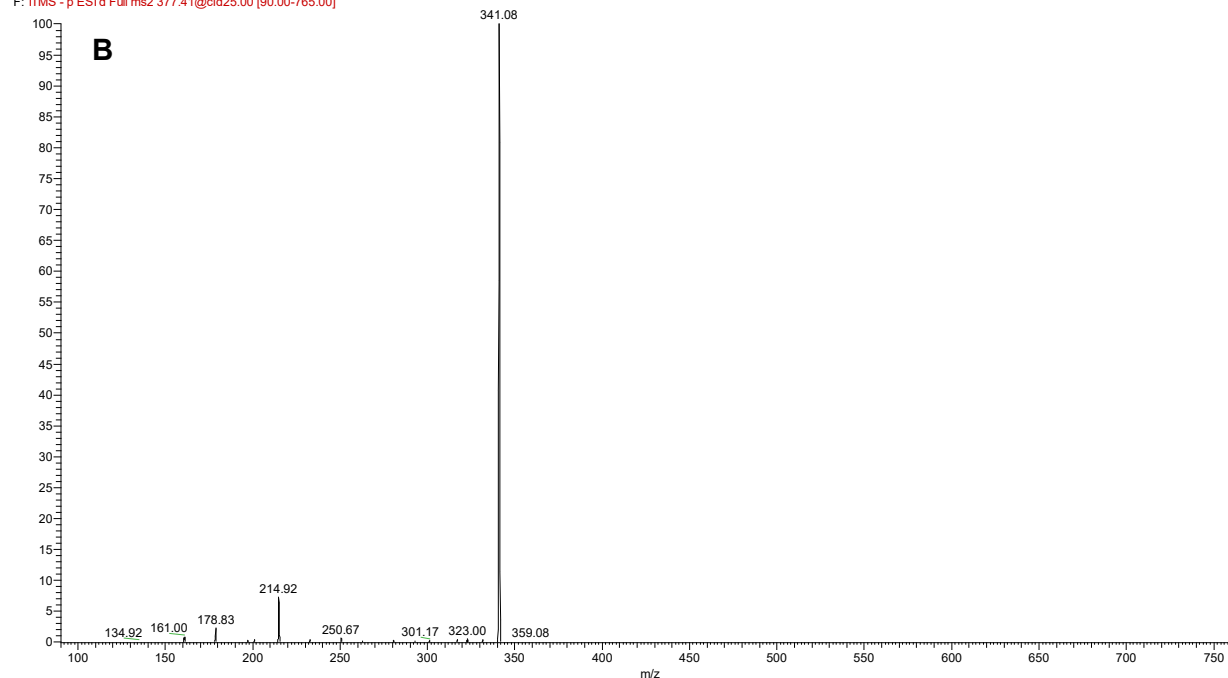
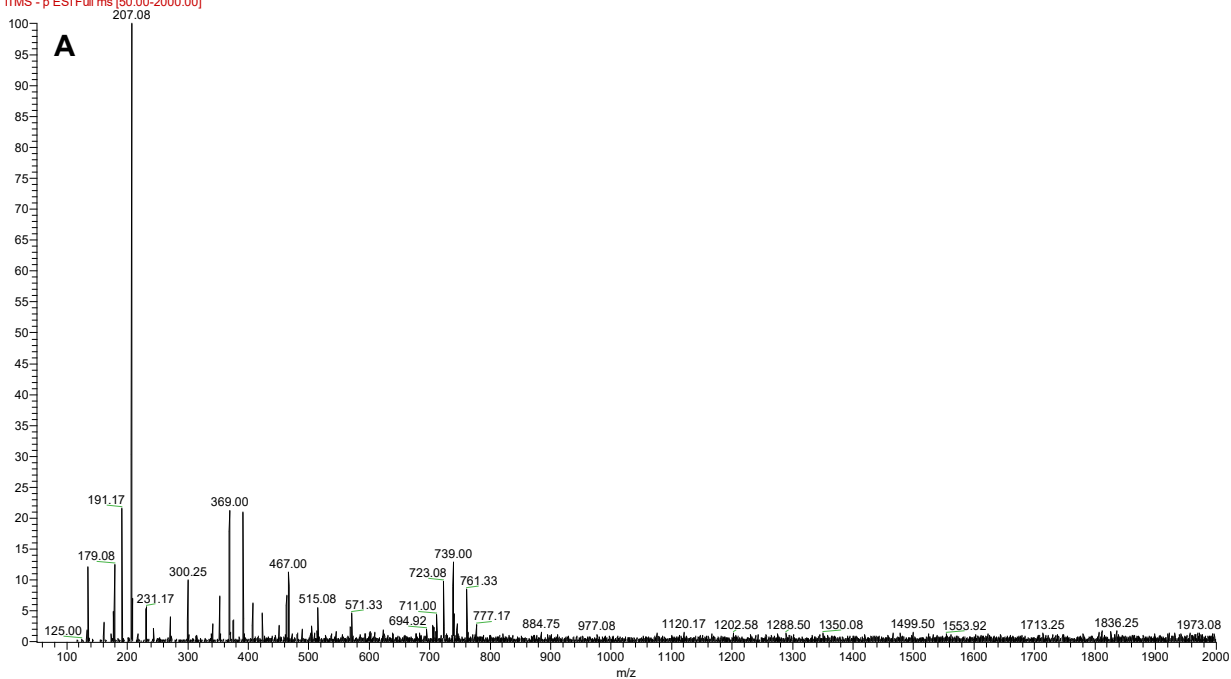


Figura A2.1. Espectros de MS de compuesto 1 en ShEtOH. A. Full scan. B. MS² de ión m/z 377

Shmetanol #1213-1243 RT: 4.58-4.68 AV: 15 NL: 1.21E3
 F: ITMS - p ESI Full ms [50.00-2000.00]



Shmetanol #1209-1260 RT: 4.56-4.74 AV: 26 NL: 8.96E1
 F: ITMS - p ESI d Full ms2 207.05@cid25.00 [50.00-425.00]

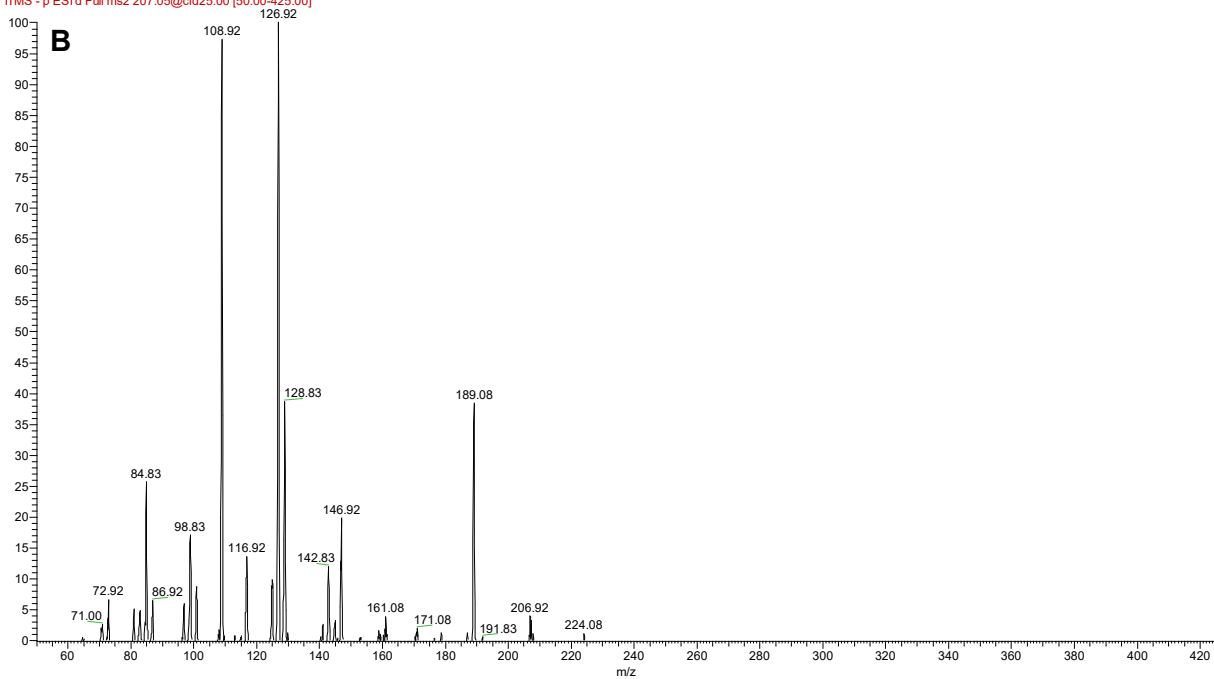
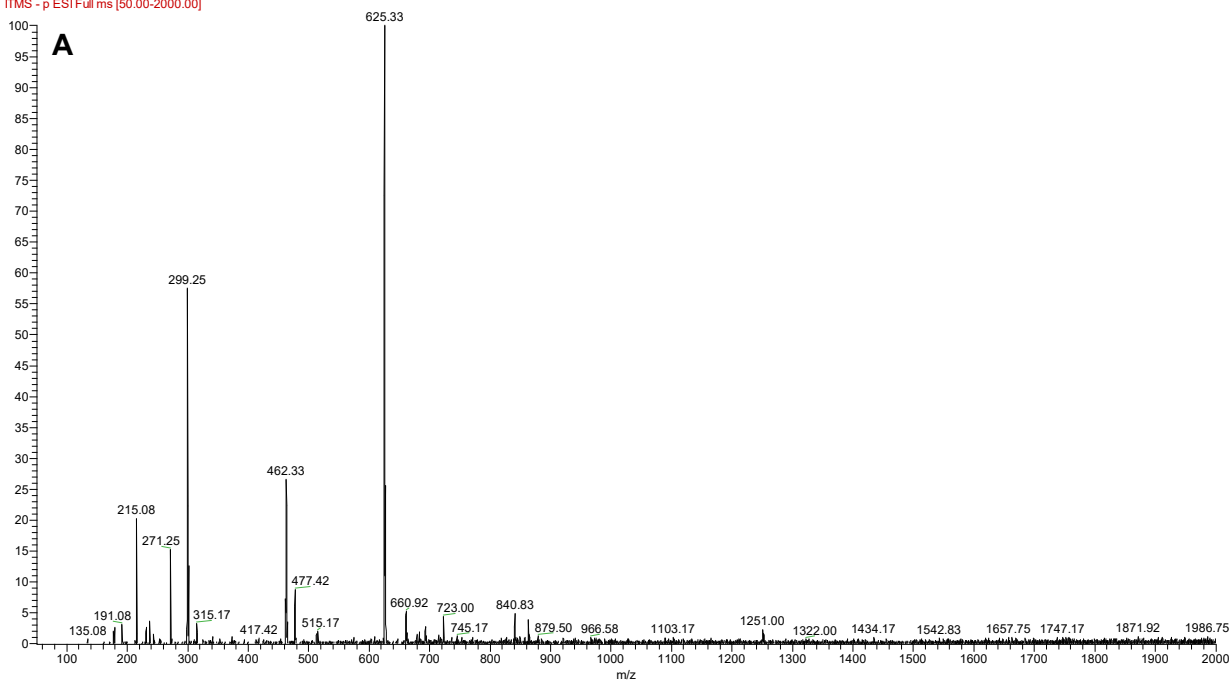
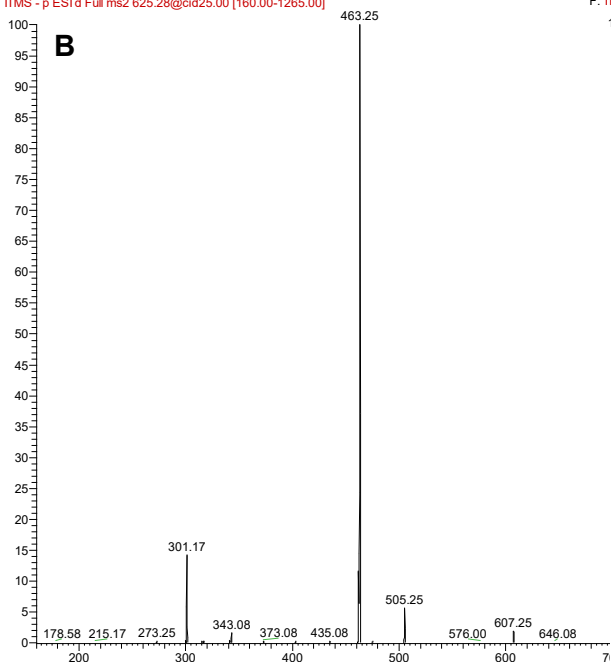


Figura A2.2. Espectros de MS de compuesto 2 en ShMeOH. A. Full scan. B. MS² de ión m/z 207

Sbmetanol10 #1589-1620 RT: 6.01-6.14 AV: 16 NL: 2.01E3
F: ITMS - p ESI Full ms [50.00-2000.00]



Sbmetanol10 #1587-1642 RT: 6.00-6.22 AV: 27 NL: 8.29E2
F: ITMS - p ESI d Full ms2 625.28@cid25.00 [160.00-1265.00]



Sbmetanol10 #1634-1672 RT: 6.23-6.32 AV: 8 NL: 5.93E2
F: ITMS - p ESI d Full ms2 299.29@cid25.00 [70.00-610.00]

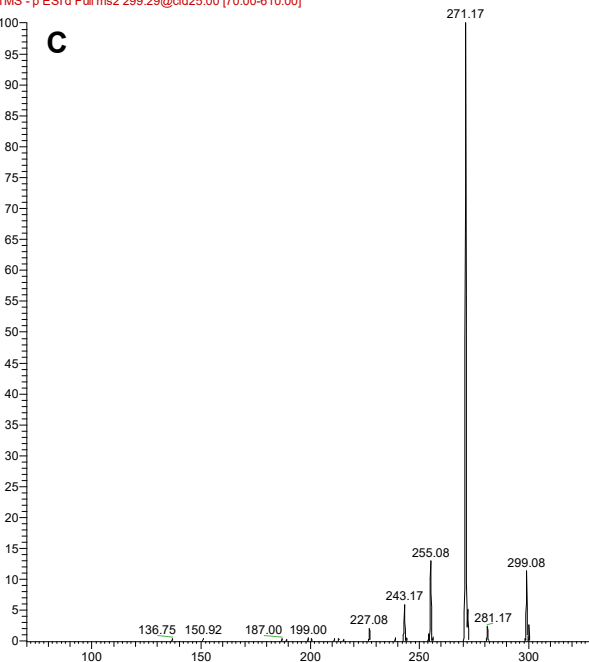
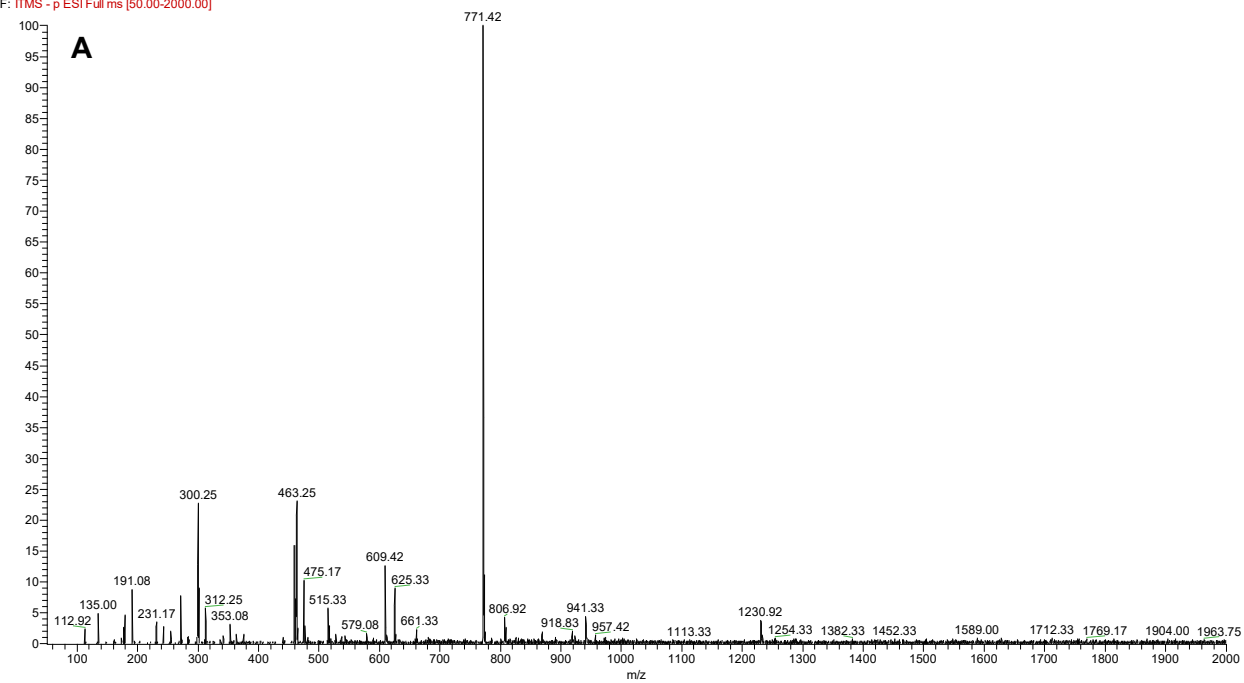


Figura A2.3. Espectros de MS de compuesto 4 en SbMeOH. A. Full scan. B. MS² de ión m/z 625. C. MS² de ión m/z 299

Shmetanol #1662-1700 RT: 6.28-6.45 AV: 20 NL: 1.89E3
F: ITMS - p ESI Full ms [50.00-2000.00]



Shmetanol #1661-1709 RT: 6.28-6.49 AV: 24 NL: 9.94E2
F: ITMS - p ESI d Full ms2 771.55@cid25.00 [200.00-1555.00]

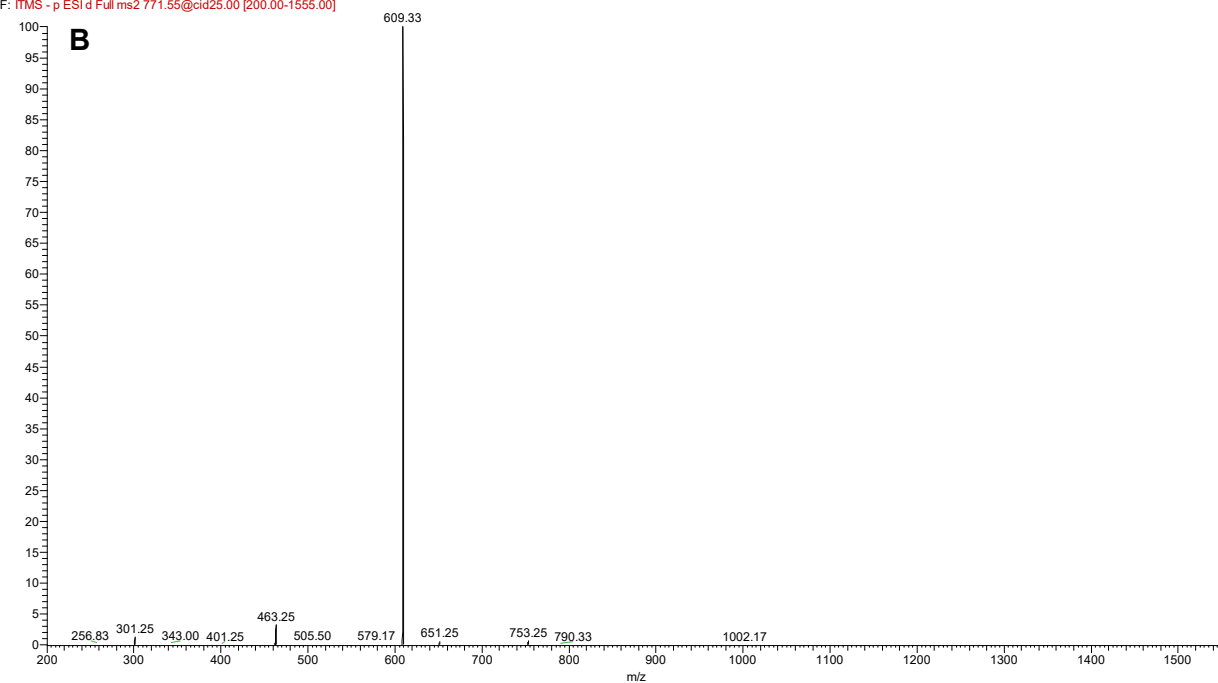
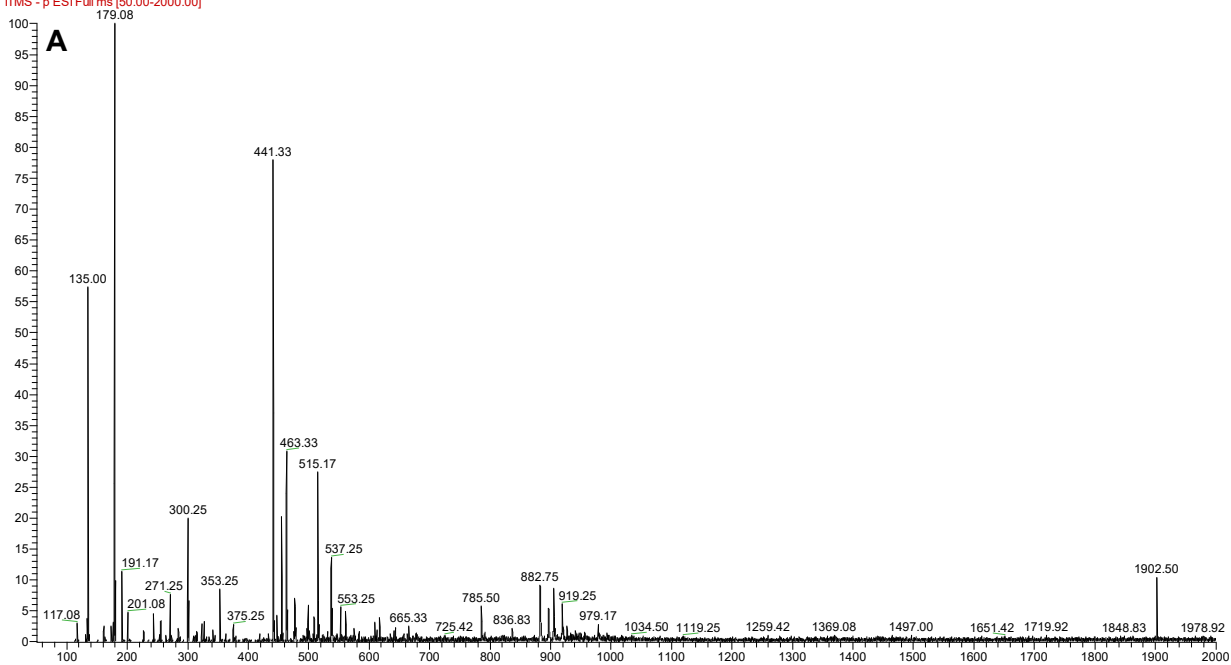
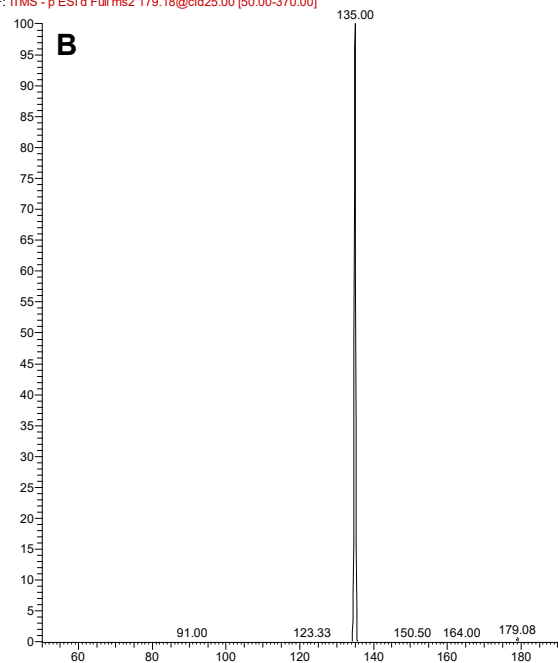


Figura A2.4. Espectros de MS de compuesto 5 en ShMeOH. A. Full scan. B. MS² de ión m/z 771

Shetanol #2613-2685 RT: 10.14-10.42 AV: 37 NL: 2.18E3
 F: ITMS - p ESI d Full ms [50.00-2000.00]



Shetanol #2595-2690 RT: 10.08-10.44 AV: 31 NL: 1.76E3
 F: ITMS - p ESI d Full ms2 179.18@cid25.00 [50.00-370.00]



Shetanol #2625-2659 RT: 10.22-10.32 AV: 12 NL: 1.82E3
 F: ITMS - p ESI d Full ms2 441.24@cid25.00 [110.00-895.00]

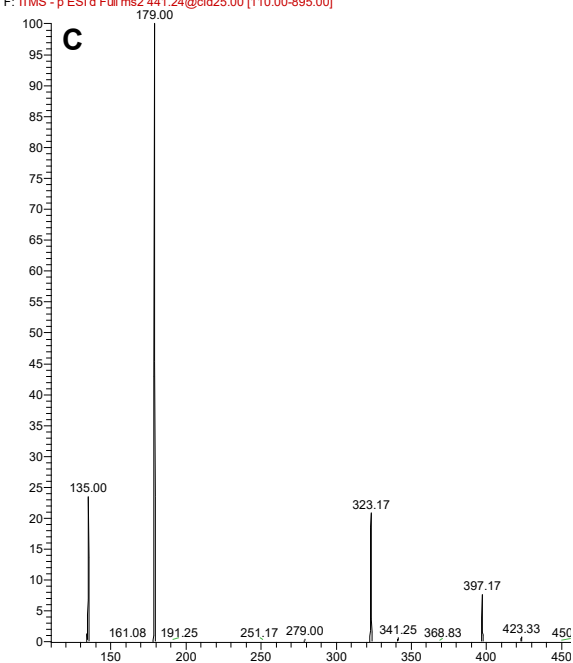
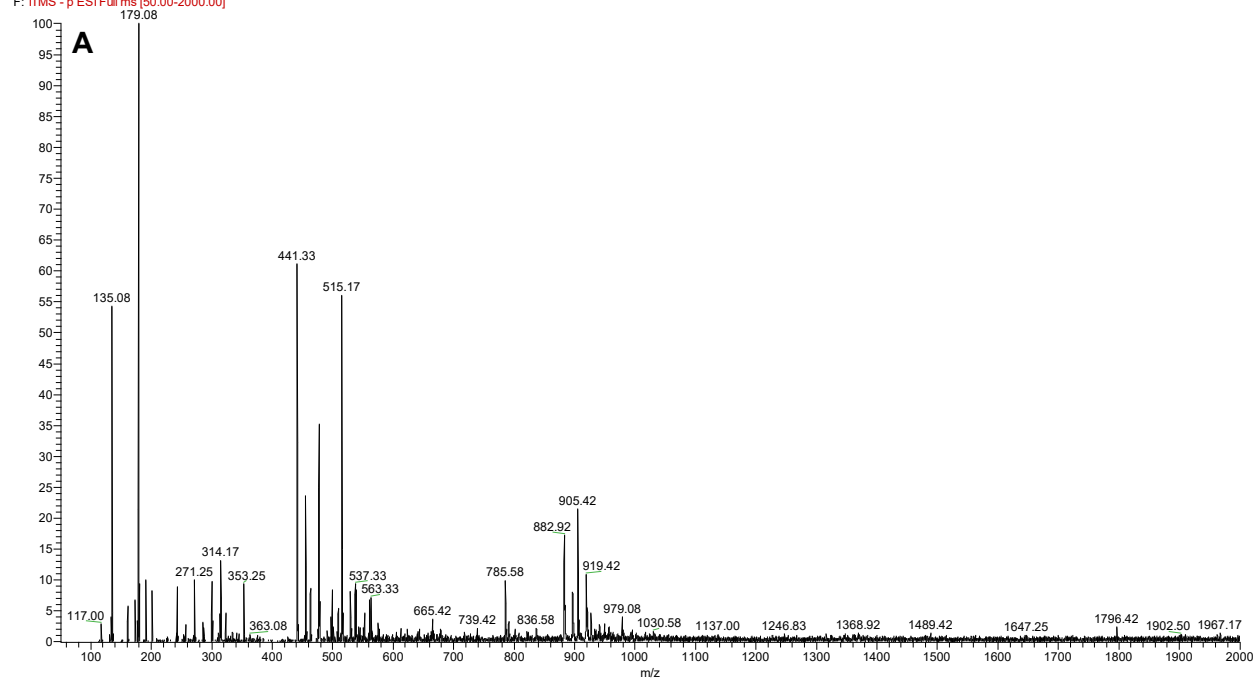


Figura A2.5. Espectros de MS de compuesto 11 en ShEtOH. A. Full scan. B. MS² de ión m/z 179. C MS² de ión m/z 441

Shetanol #2821-2870 RT: 10.95-11.13 AV: 25 NL: 2.29E3
F: ITMS - p ESI Full ms [50.00-2000.00]



Shetanol #2819-2854 RT: 10.98-11.07 AV: 14 NL: 2.54E3
F: ITMS - p ESI d Full ms2 179.18@cid25.00 [50.00-370.00]

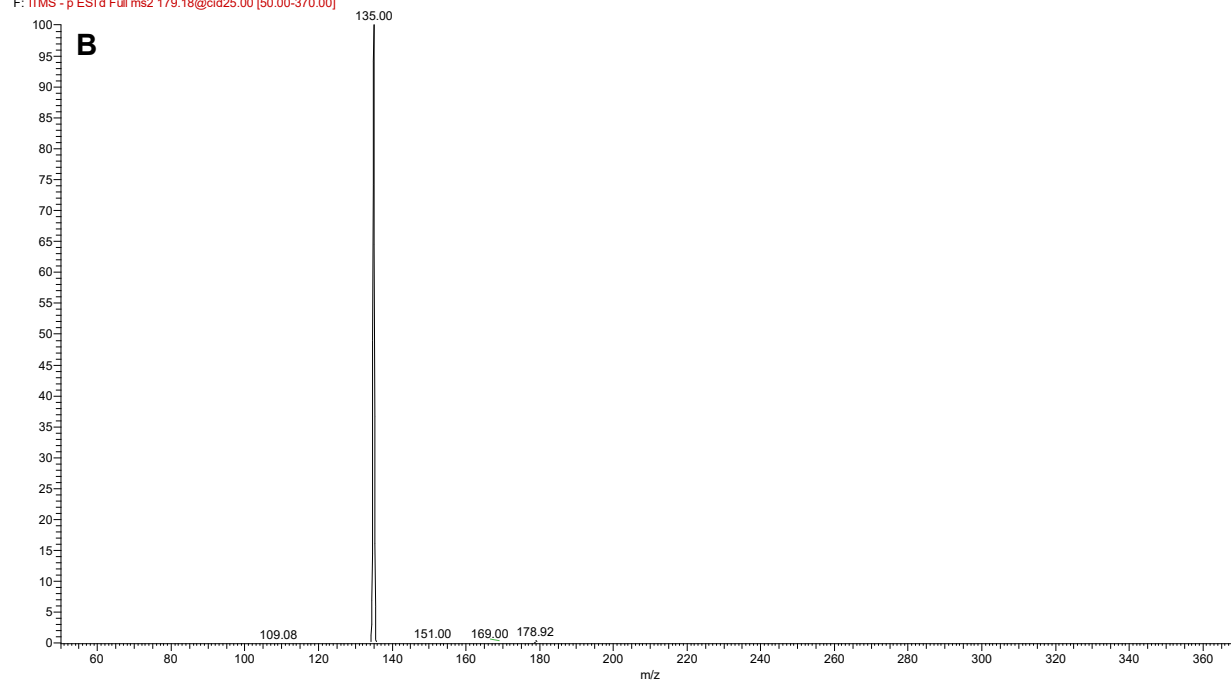
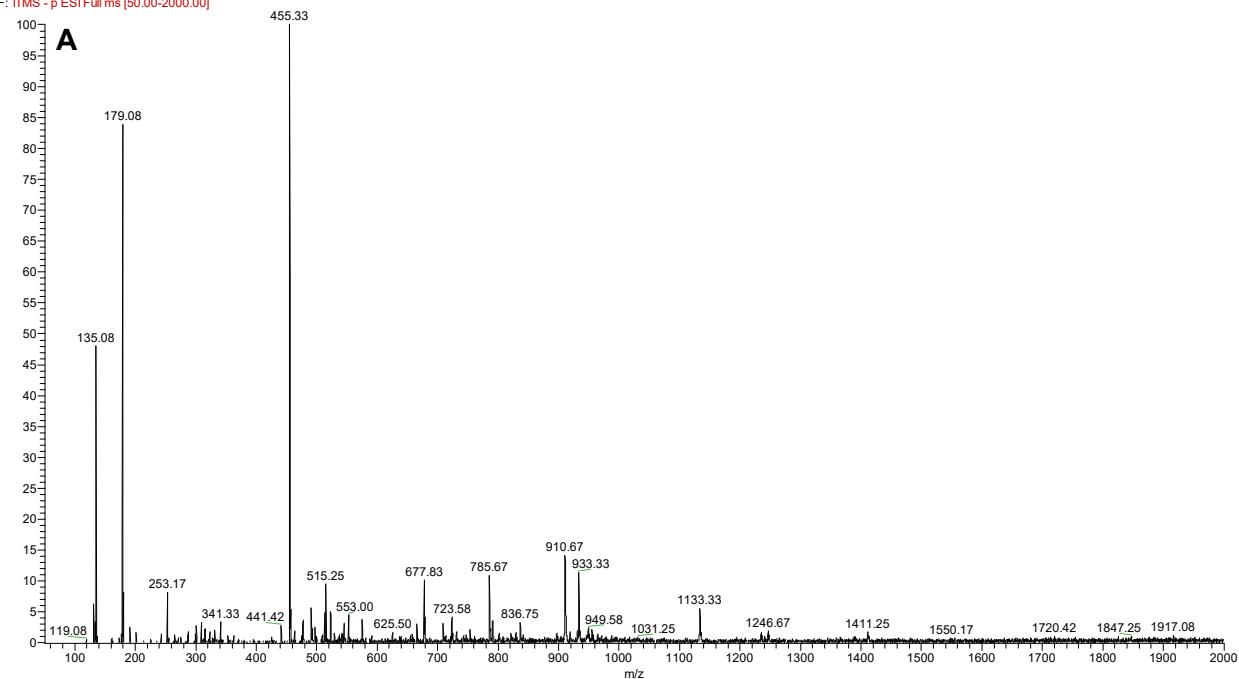
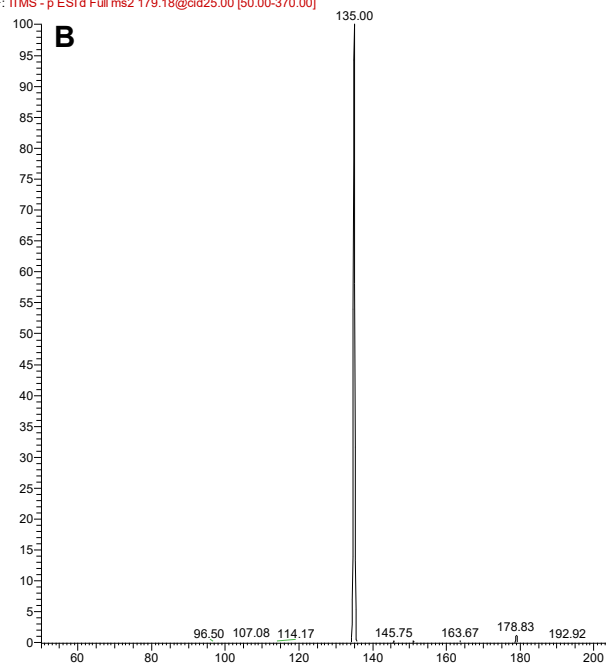


Figura A2.6. Espectros de MS de compuesto 13 en ShEtOH. A. Full scan. B. MS² de ión m/z 179.

Shetanol #2955-3012 RT: 11.45-11.67 AV: 29 NL: 2.82E3
F: ITMS - p ESI d Full ms [50.00-2000.00]



Shetanol #2926-3028 RT: 11.34-11.74 AV: 9 NL: 1.09E3
F: ITMS - p ESI d Full ms2 179.18@cid25.00 [50.00-370.00]



Shetanol #2950-3003 RT: 11.43-11.64 AV: 27 NL: 2.02E3
F: ITMS - p ESI d Full ms2 455.21@cid25.00 [115.00-925.00]

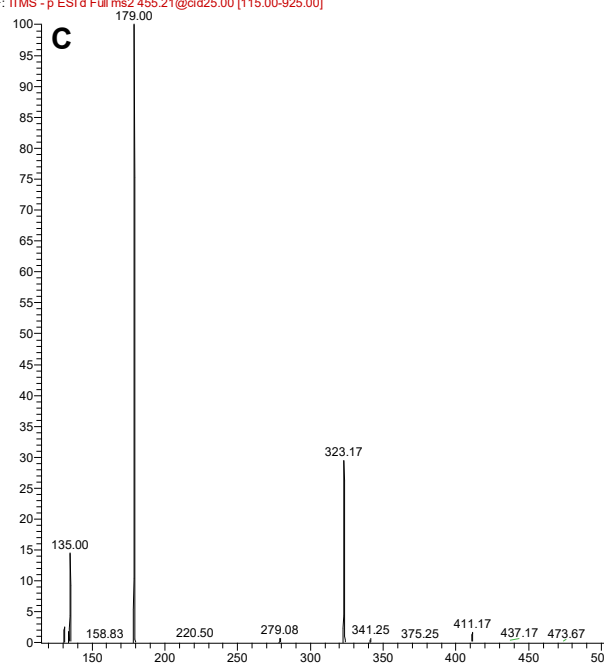
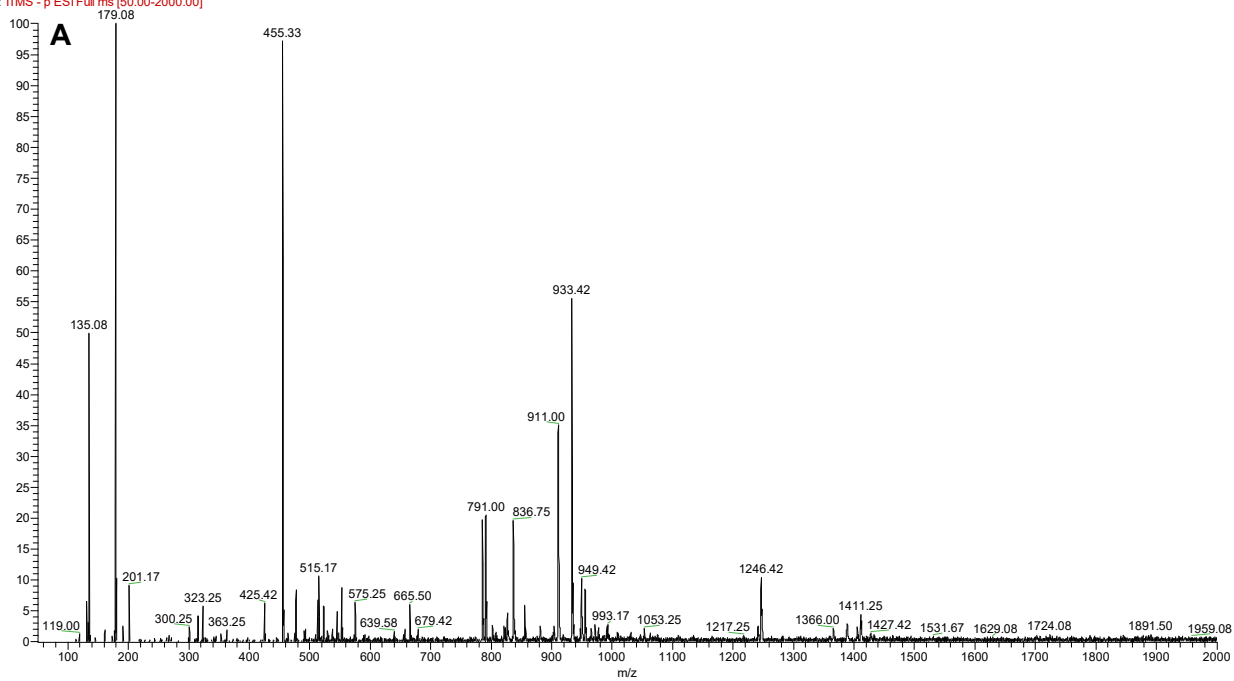
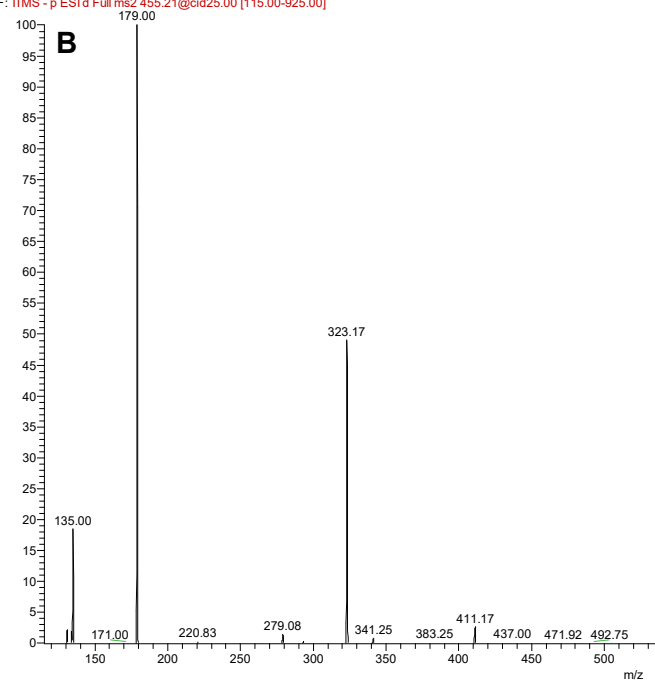


Figura A2.7. Espectros de MS de compuesto 14 en ShEtOH. A. Full scan. B. MS² de ión m/z 179. C. MS² de ión m/z 455.

Shetanol #3171-3214 RT: 12.33-12.50 AV: 22 NL: 3.13E3
F: ITMS - p ESI Full ms [50.00-2000.00]



Shetanol #3172-3221 RT: 12.34-12.49 AV: 18 NL: 1.76E3
F: ITMS - p ESI d Full ms2 455.21@cid25.00 [115.00-925.00]



Shetanol #3167-3236 RT: 12.32-12.58 AV: 13 NL: 2.00E3
F: ITMS - p ESI d Full ms2 179.18@cid25.00 [50.00-370.00]

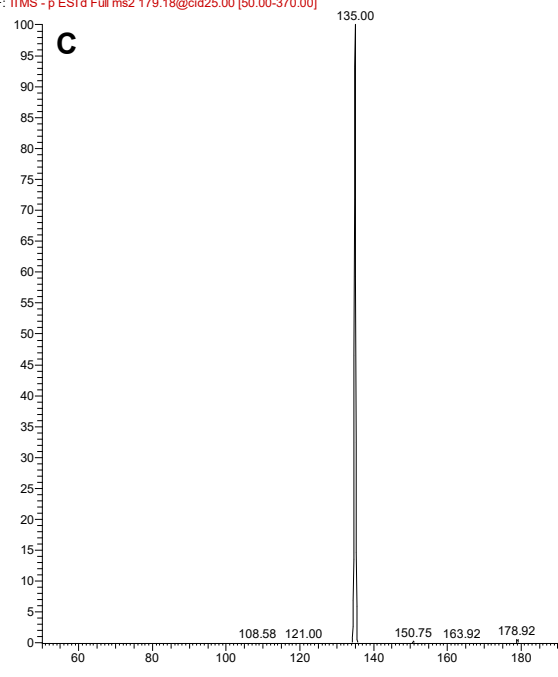
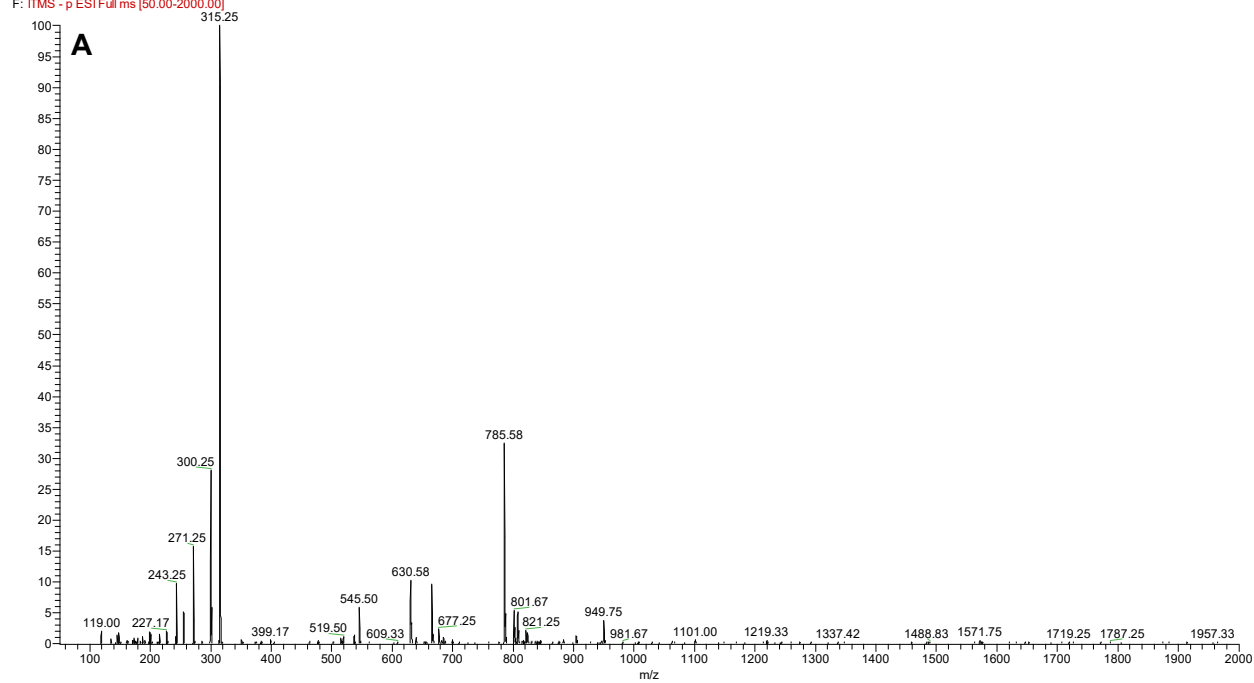


Figura A2.8. Espectros de MS de compuesto 15 en ShEtOH. A. Full scan. B. MS² de ión m/z 455. C. MS² de ión m/z 179.

Sbetanol #3312-3341 RT: 13.02-13.13 AV: 15 NL: 9.71E3
 F: ITMS - p ESI Full ms [50.00-2000.00]



Sbetanol #3321 RT: 13.06 AV: 1 NL: 9.83E3
 F: ITMS - p ESI d Full ms2 315.17@cid25.00 [75.00-645.00]

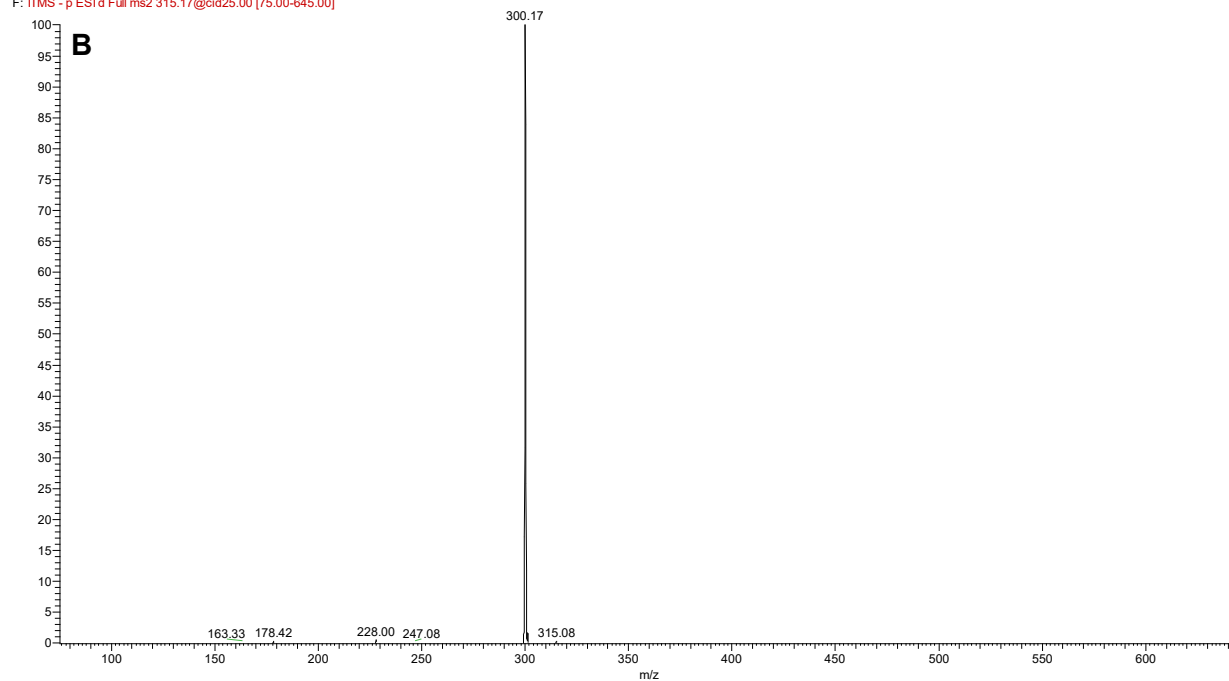
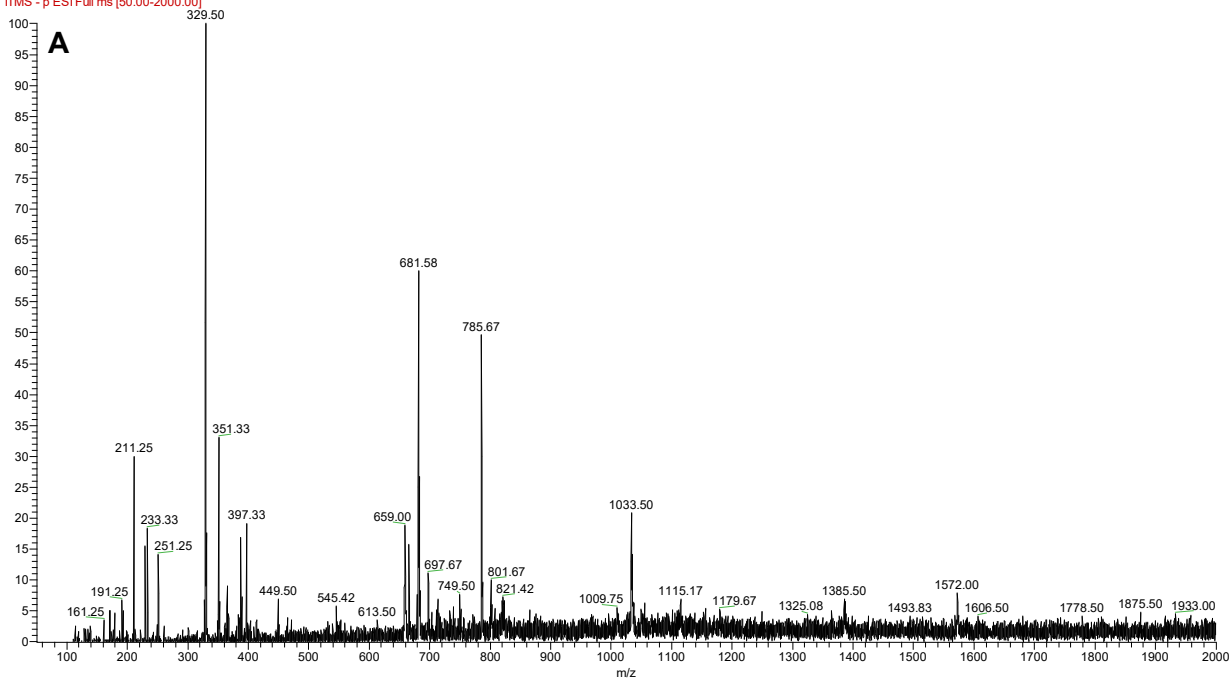


Figura A2.9. Espectros de MS de compuesto 16 en SbEtOH. A. Full scan. B. MS² de ión m/z 315.

Scetanol #4135-4155 RT: 16.84-16.92 AV: 11 NL: 1.47E3
 F: ITMS -p ESI d Full ms [50.00-2000.00]



Scetanol #4128 RT: 16.81 AV: 1 NL: 3.67E2
 F: ITMS -p ESI d Full ms2 329.54@cid25.00 [80.00-670.00]

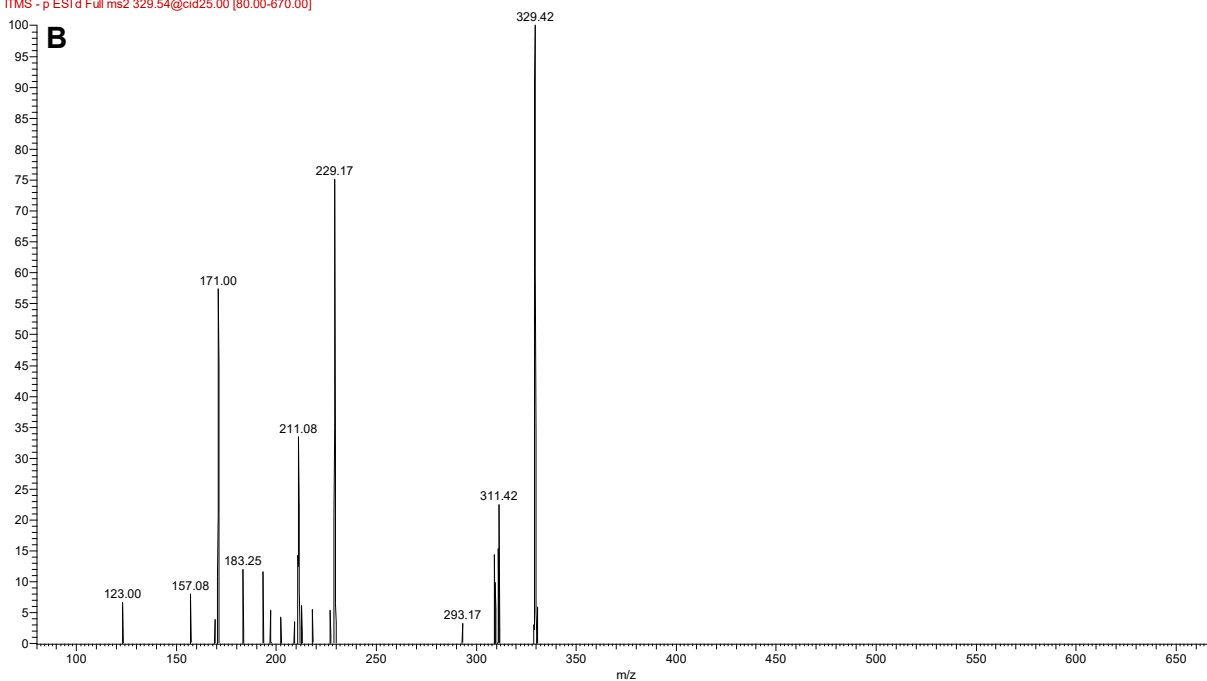
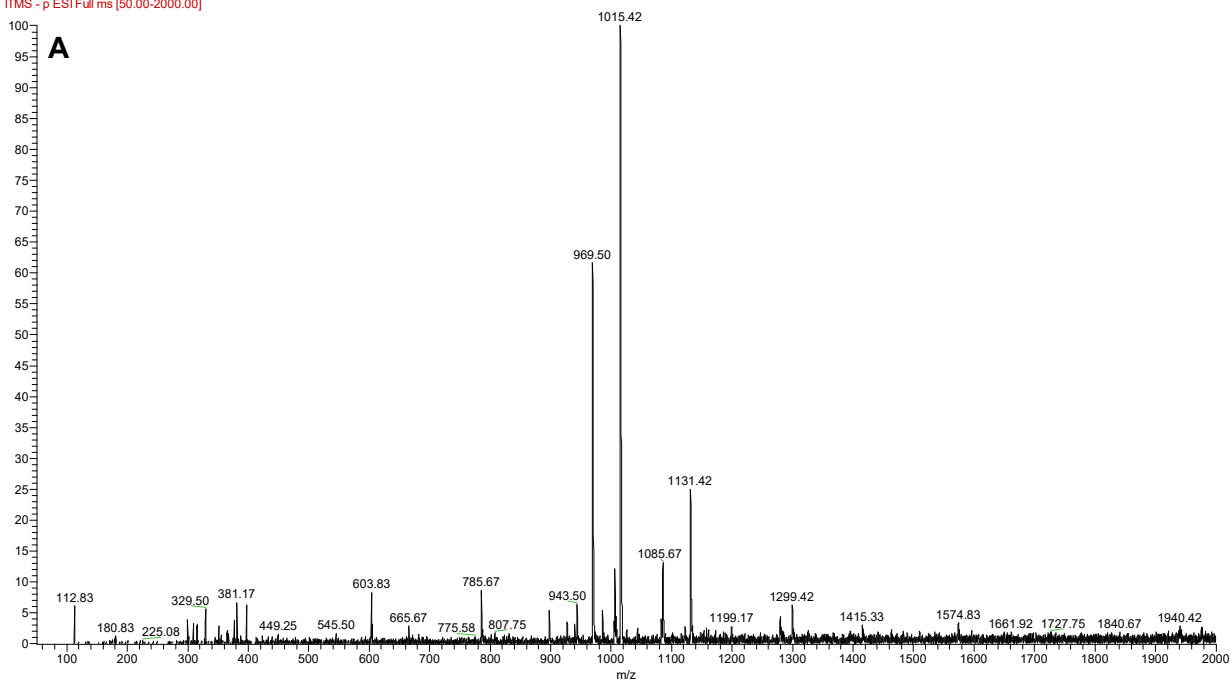


Figura A2.10. Espectros de MS de compuesto 23 en ScEtOH. A. Full scan. B. MS² de ión m/z 329.

Sbetanol #4534-4554 RT: 18.48-18.58 AV: 11 NL: 2.43E3
F: ITMS - p ESI Full ms [50.00-2000.00]



Sbetanol #4531 RT: 18.47 AV: 1 NL: 4.38E1
F: ITMS - p ESI d Full ms2 1015.50@cid25.00 [265.00-2000.00]

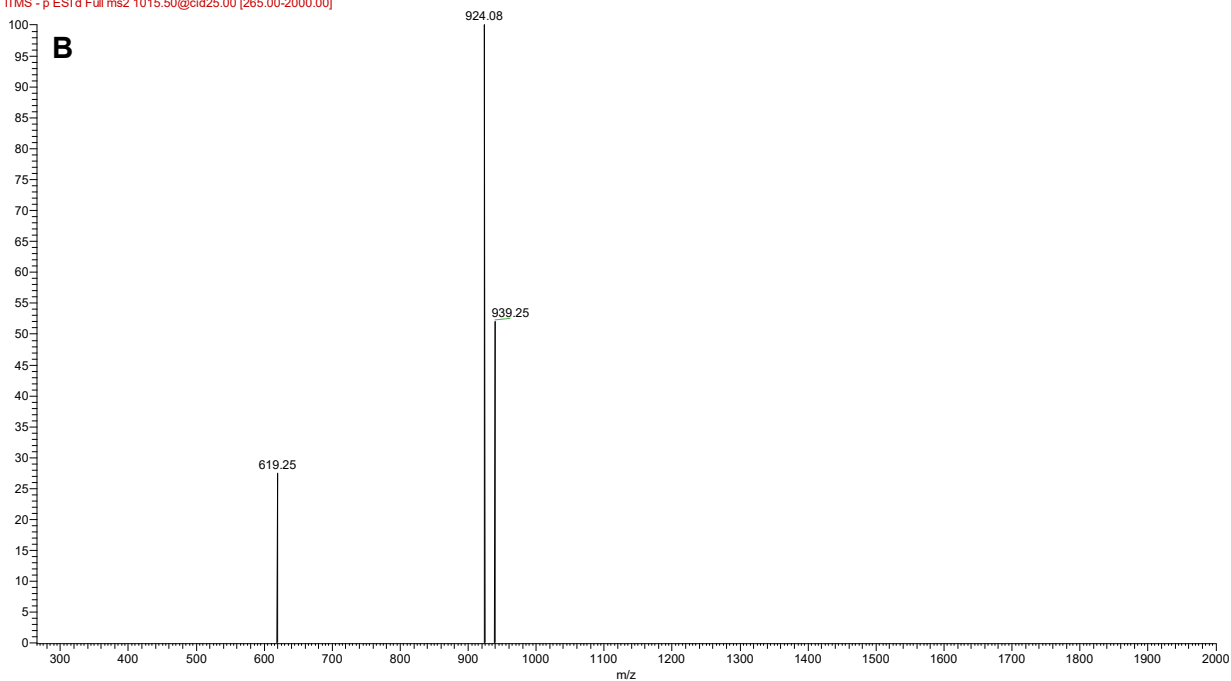
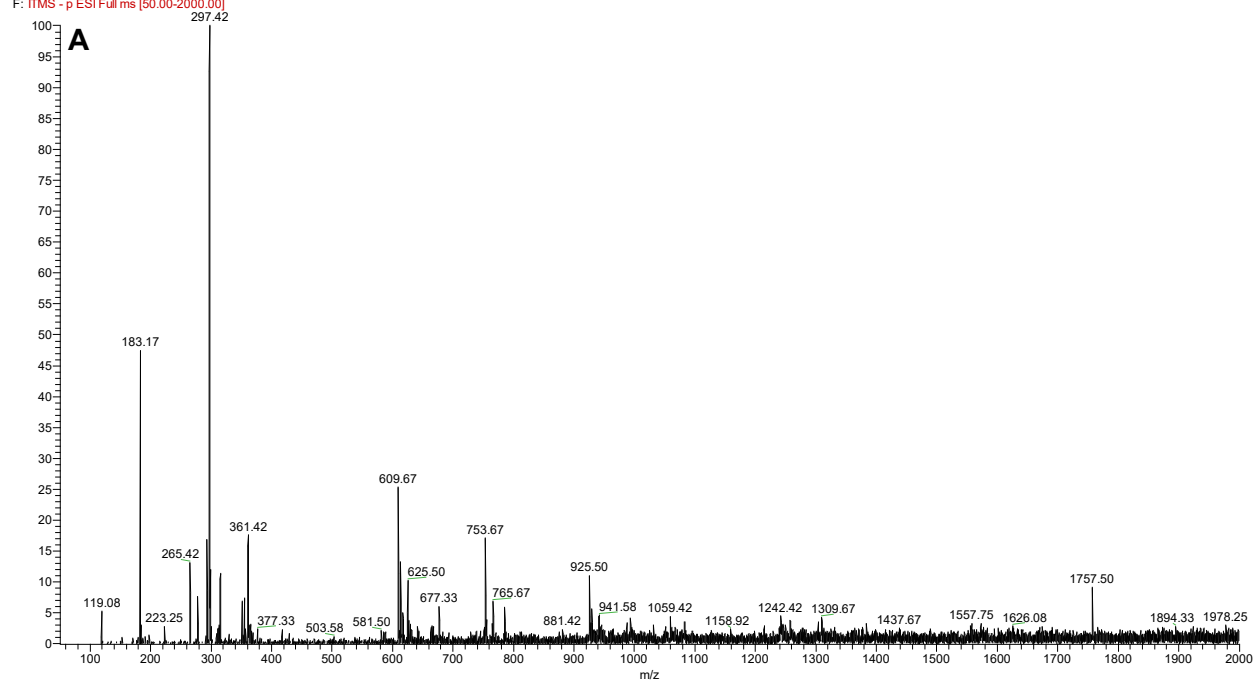


Figura A2.11. Espectros de MS de compuesto 24 en SbEtOH. A. Full scan. B. MS² de ión m/z 1015.

Sbetanol #5090-5115 RT: 20.90-20.99 AV: 13 NL: 1.54E3
 F: ITMS - p ESI Full ms [50.00-2000.00]



Sbetanol #5087 RT: 20.89 AV: 1 NL: 1.54E3
 F: ITMS - p ESI d Full ms2 297.58@cid25.00 [70.00-610.00]

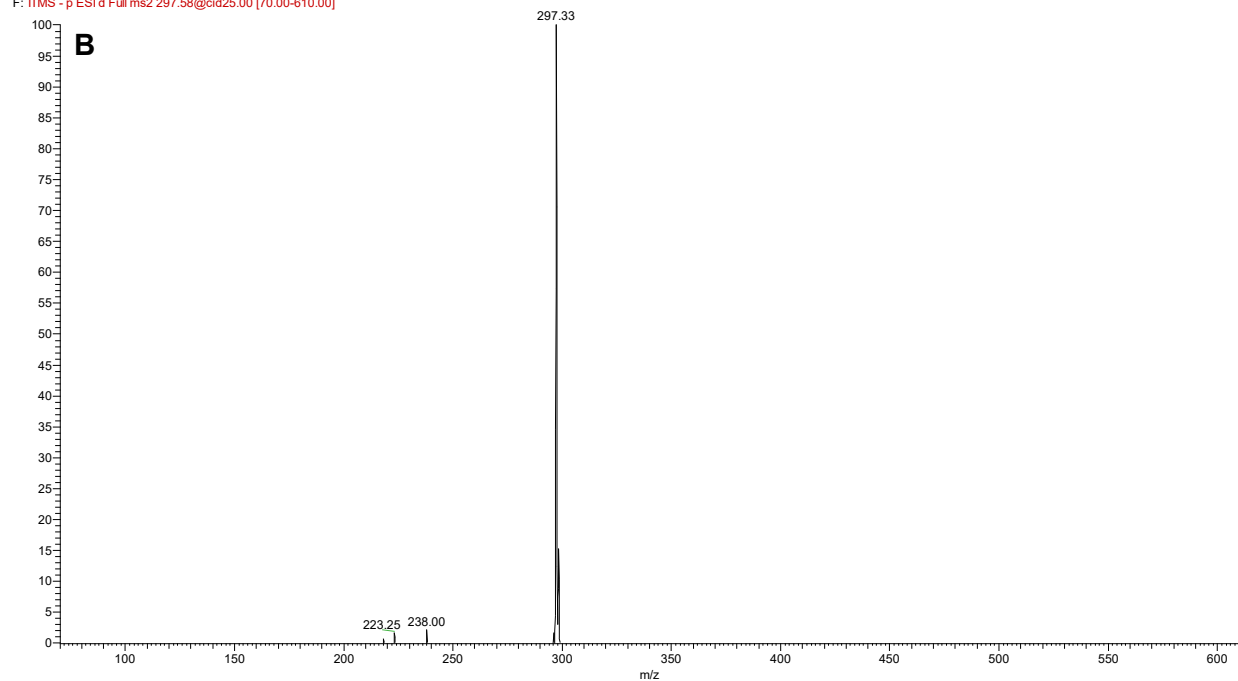
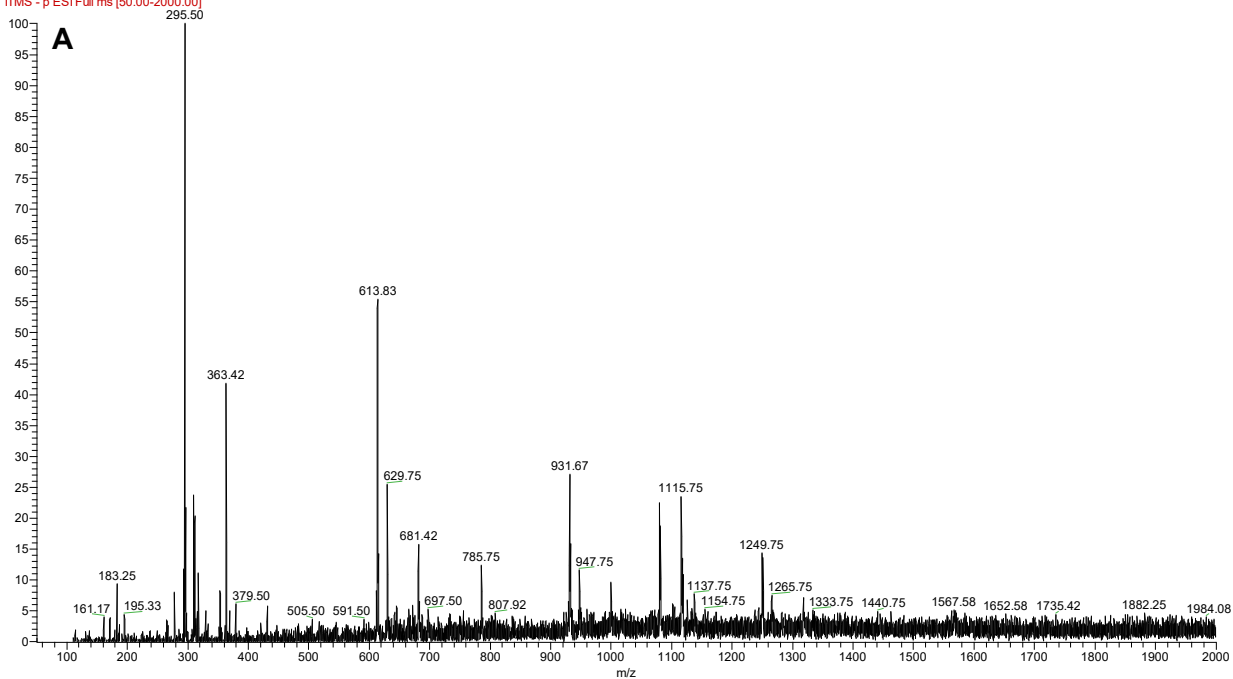


Figura A2.12. Espectros de MS de compuesto 26 en SbEtOH. A. Full scan. B. MS² de ión m/z 297.

Scetanol #5219-5248 RT: 21.61-21.72 AV: 15 NL: 1.22E3
 F: ITMS - p ESI Full ms [50.00-2000.00]



Scetanol #5232 RT: 21.66 AV: 1 NL: 3.39E2
 F: ITMS - p ESI d Full ms2 295.61@cid25.00 [70.00-605.00]

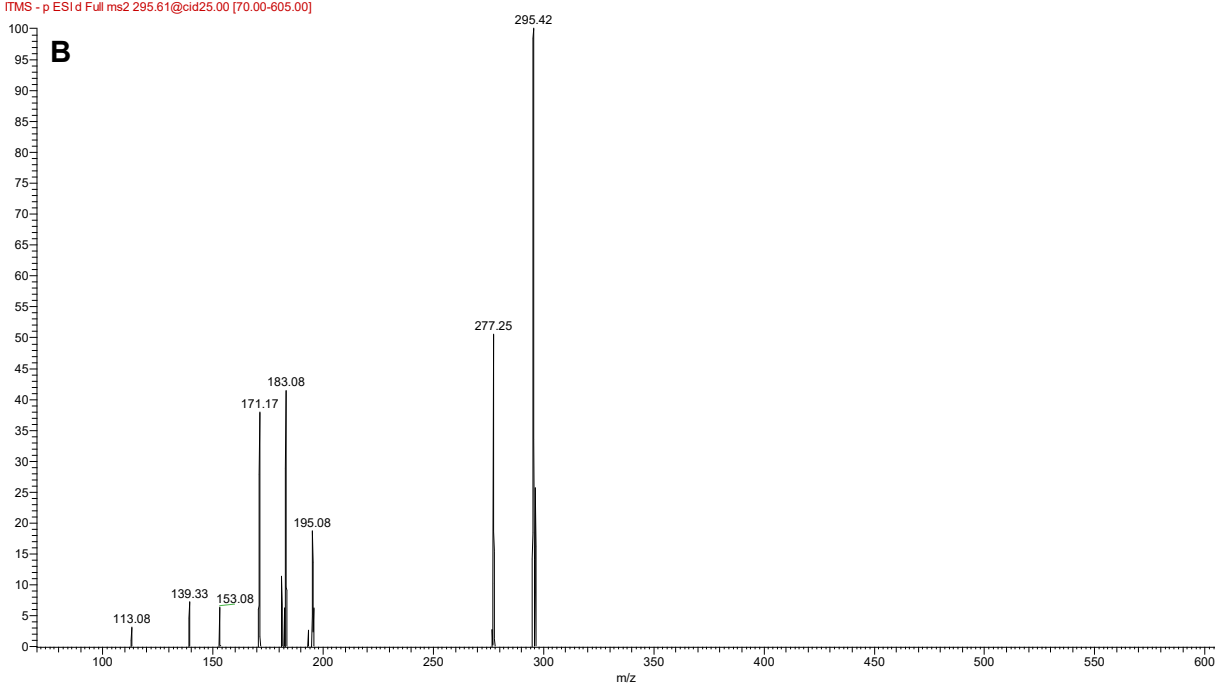
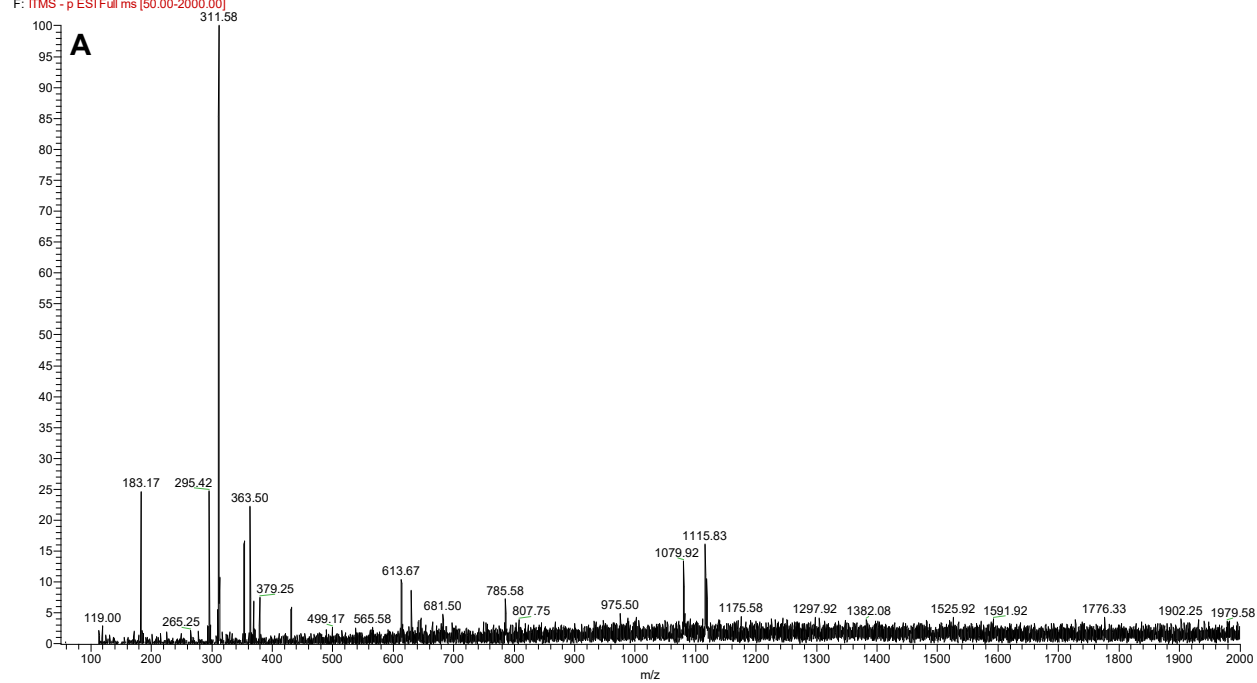


Figura A2.13. Espectros de MS de compuesto 28 en ScEtOH. A. Full scan. B. MS² de ión m/z 295.

Scetanol #5287-5317 RT: 21.87-21.99 AV: 16 NL: 1.21E3
 F: ITMS - p ESI Full ms [50.00-2000.00]



Scetanol #5298 RT: 21.92 AV: 1 NL: 1.39E3
 F: ITMS - p ESI d Full ms2 311.64@cid25.00 [75.00-635.00]

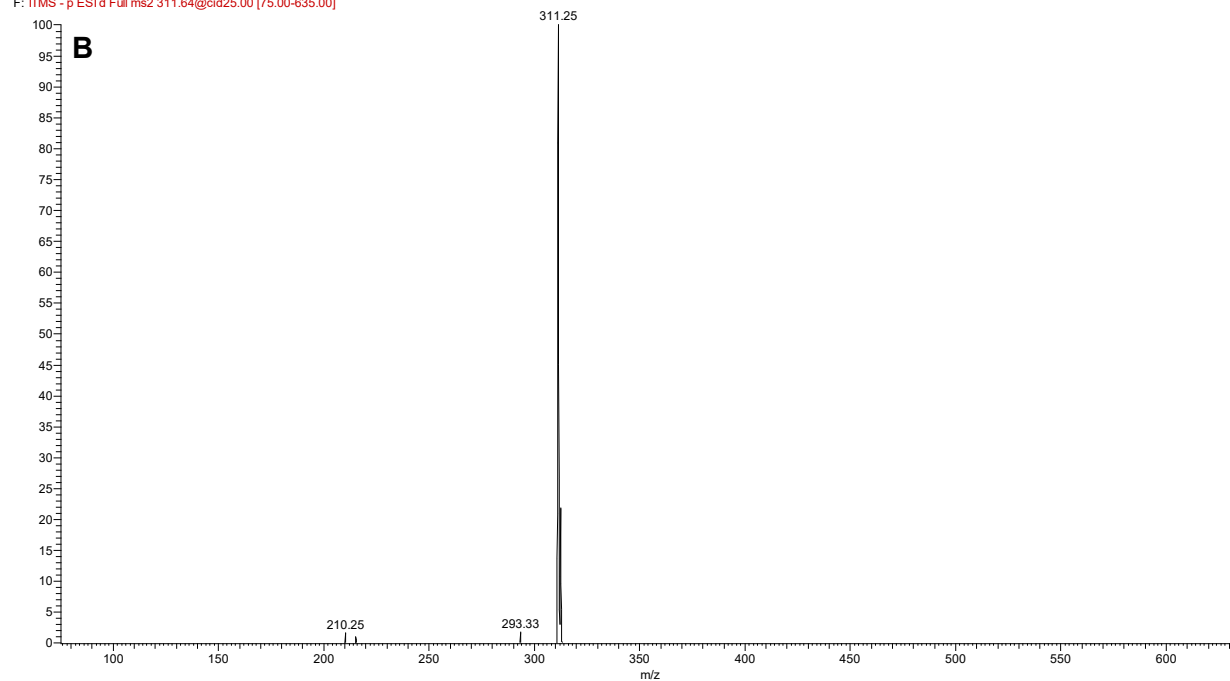
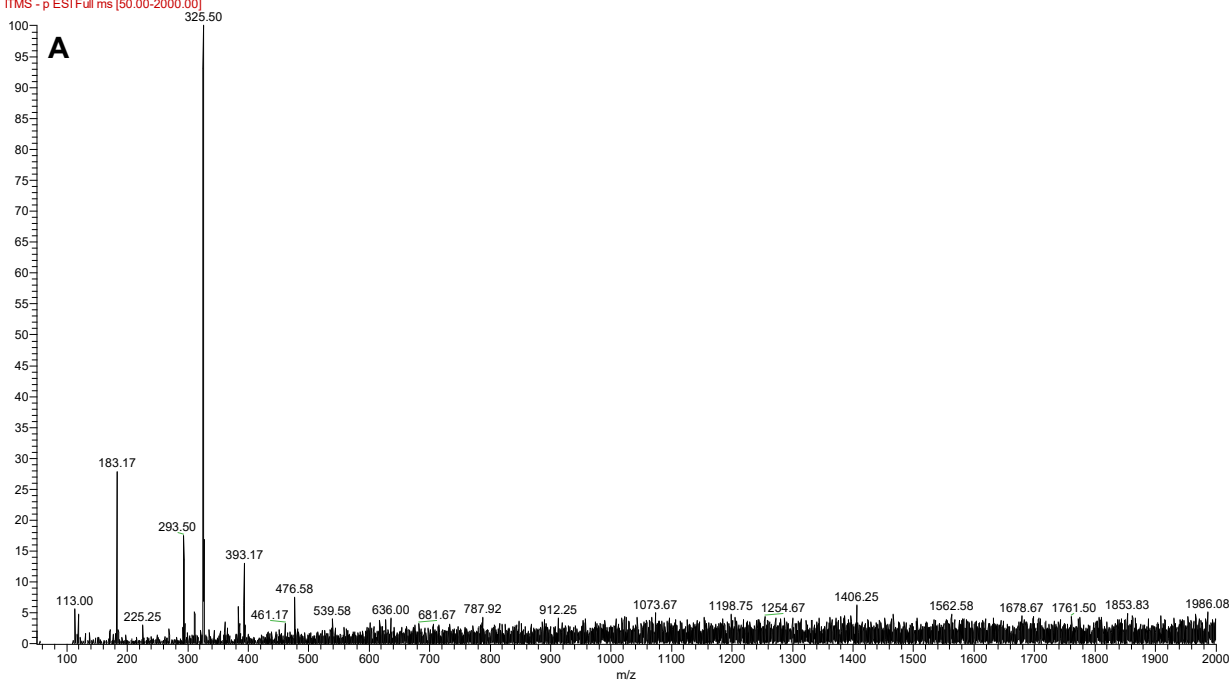


Figura A2.14. Espectros de MS de compuesto 29 en ScEtOH. A. Full scan. B. MS² de ión m/z 311.

Scetanol #5504-5518 RT: 22.72-22.77 AV: 7 NL: 1.30E3
 F: ITMS - p ESI Full ms [50.00-2000.00]



Scetanol #5514 RT: 22.76 AV: 1 NL: 1.67E3
 F: ITMS - p ESI d Full ms2 325.65@cid25.00 [75.00-665.00]

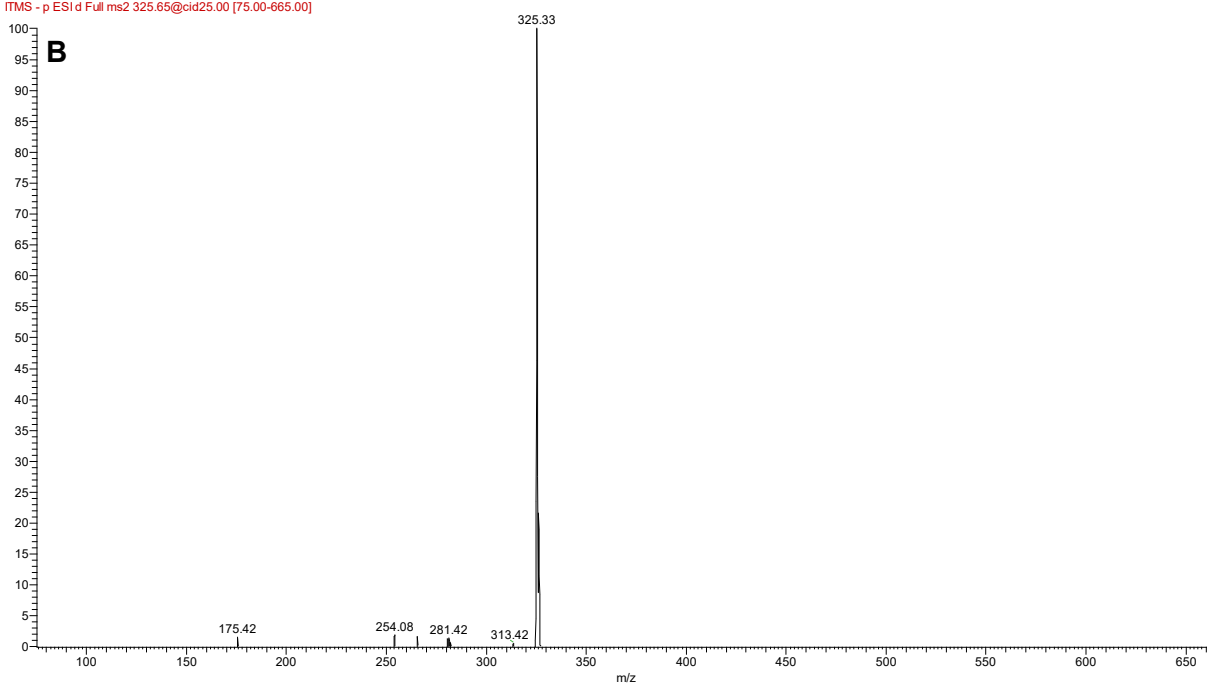
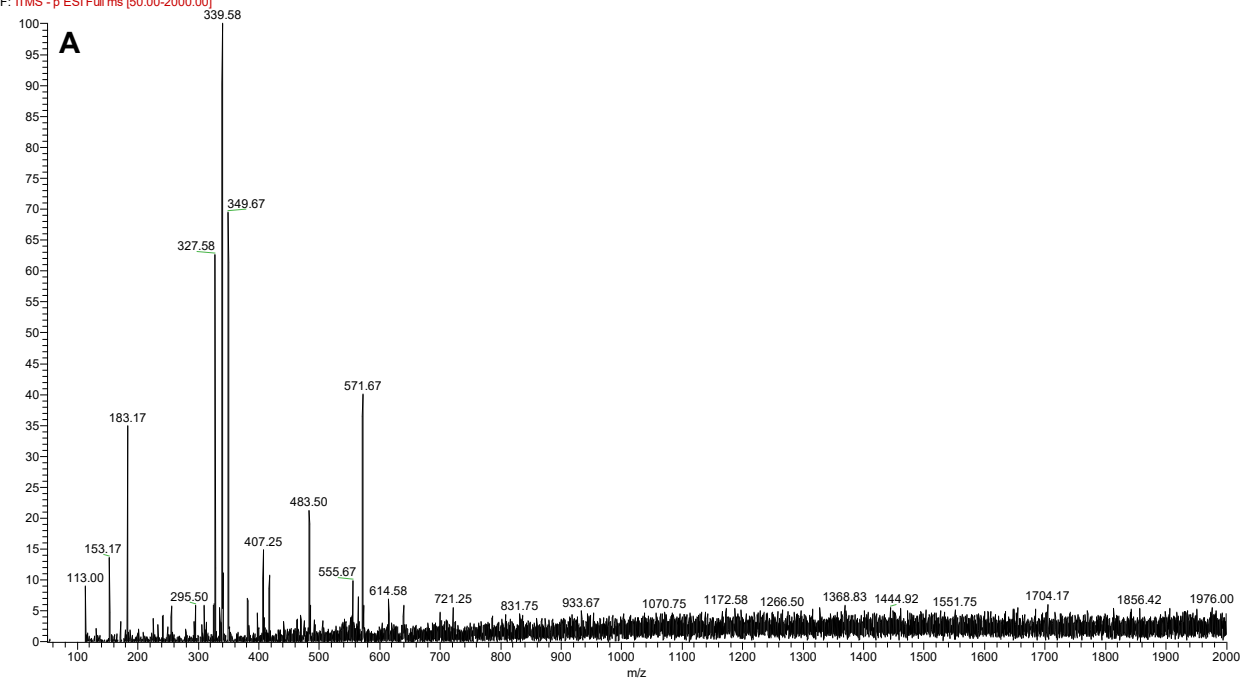


Figura A2.15. Espectros de MS de compuesto 30 en ScEtOH. A. Full scan. B. MS² de ión m/z 325.

Scetanol #5699-5738 RT: 23.48-23.63 AV: 20 NL: 7.52E2
 F: ITMS - p ESI Full ms [50.00-2000.00]



Scetanol #5704 RT: 23.50 AV: 1 NL: 1.01E3
 F: ITMS - p ESI d Full ms2 339.71@cid25.00 [80.00-690.00]

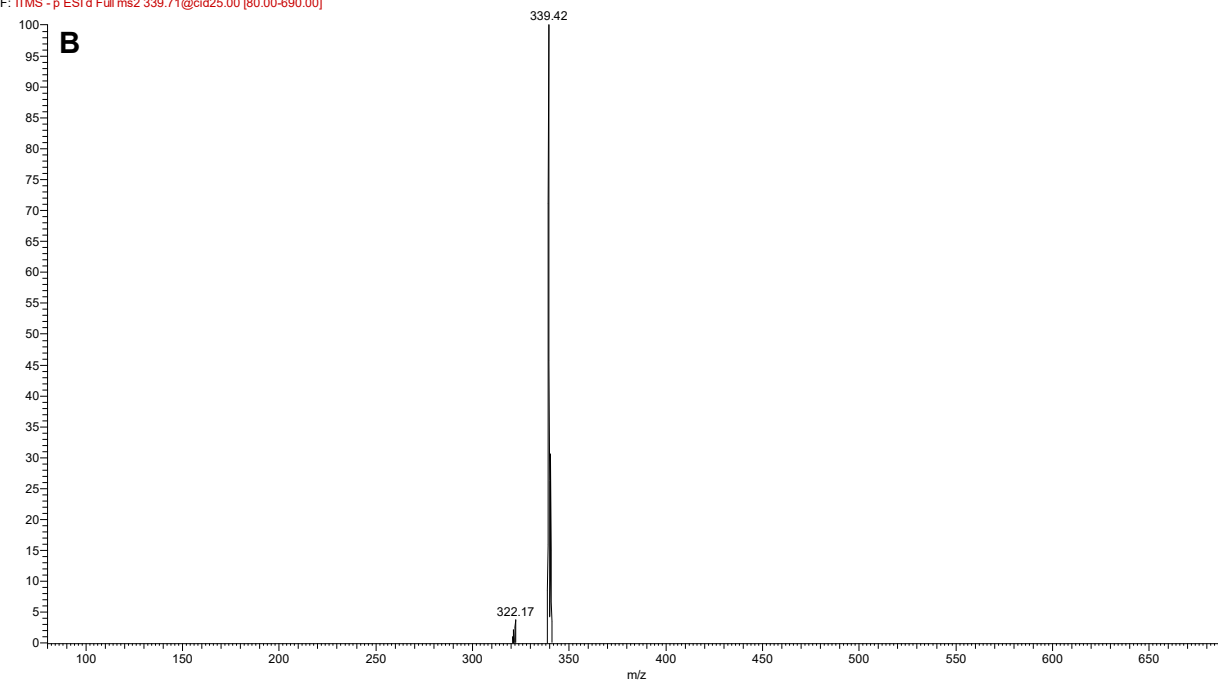
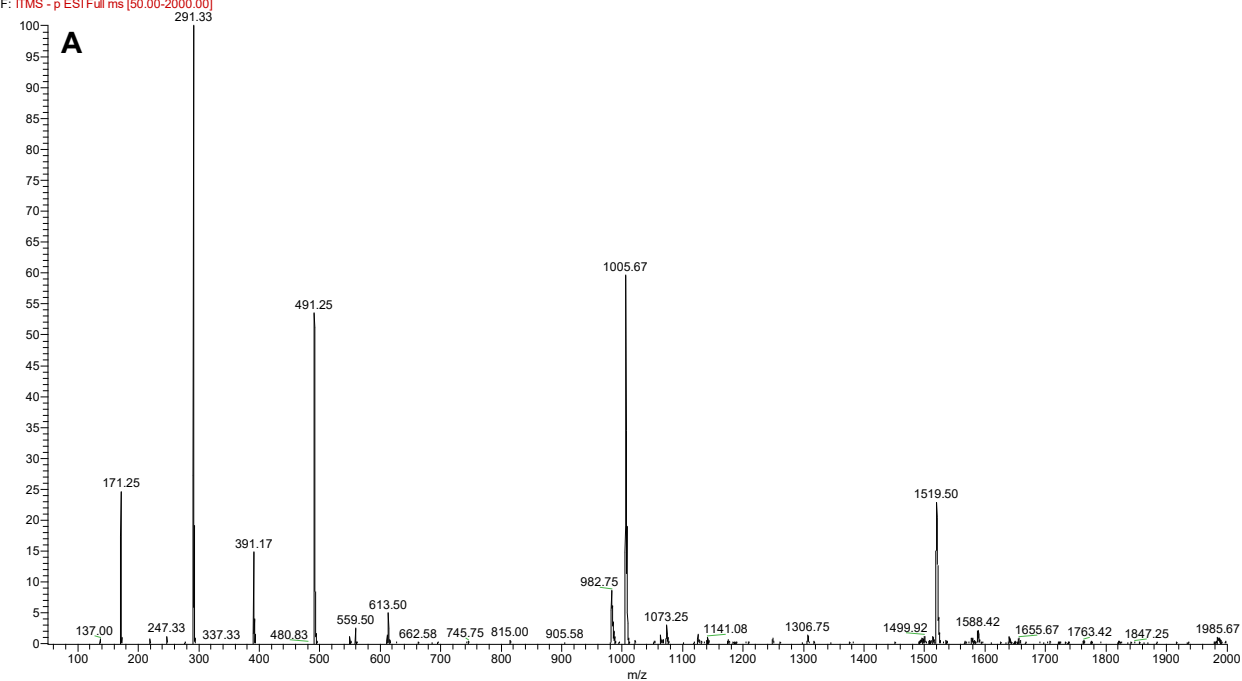


Figura A2.16. Espectros de MS de compuesto 31 en ScEtOH. A. Full scan. B. MS² de ión m/z 339.

Shetanol #5995-6014 RT: 24.26-24.33 AV: 10 NL: 6.97E3
 F: ITMS - p ESI Full ms [50.00-2000.00]



Shetanol #5999-6019 RT: 24.27-24.35 AV: 11 NL: 1.88E3
 F: ITMS - p ESI d Full ms2 291.32@cid25.00 [70.00-595.00]

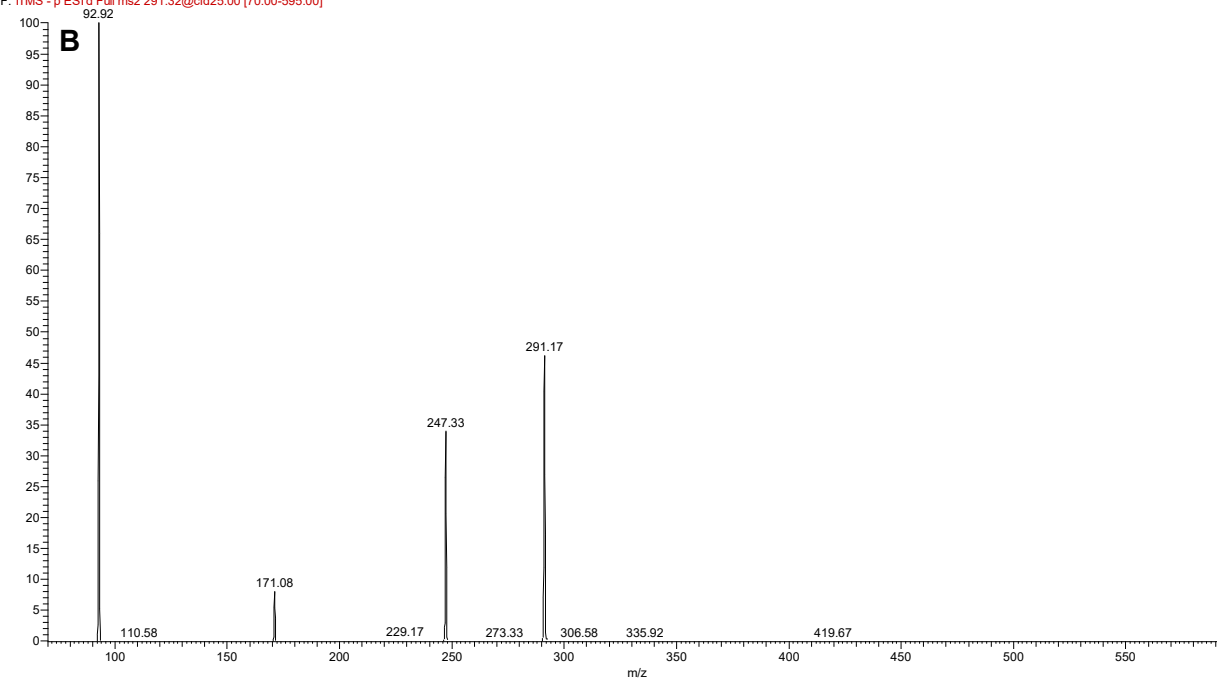
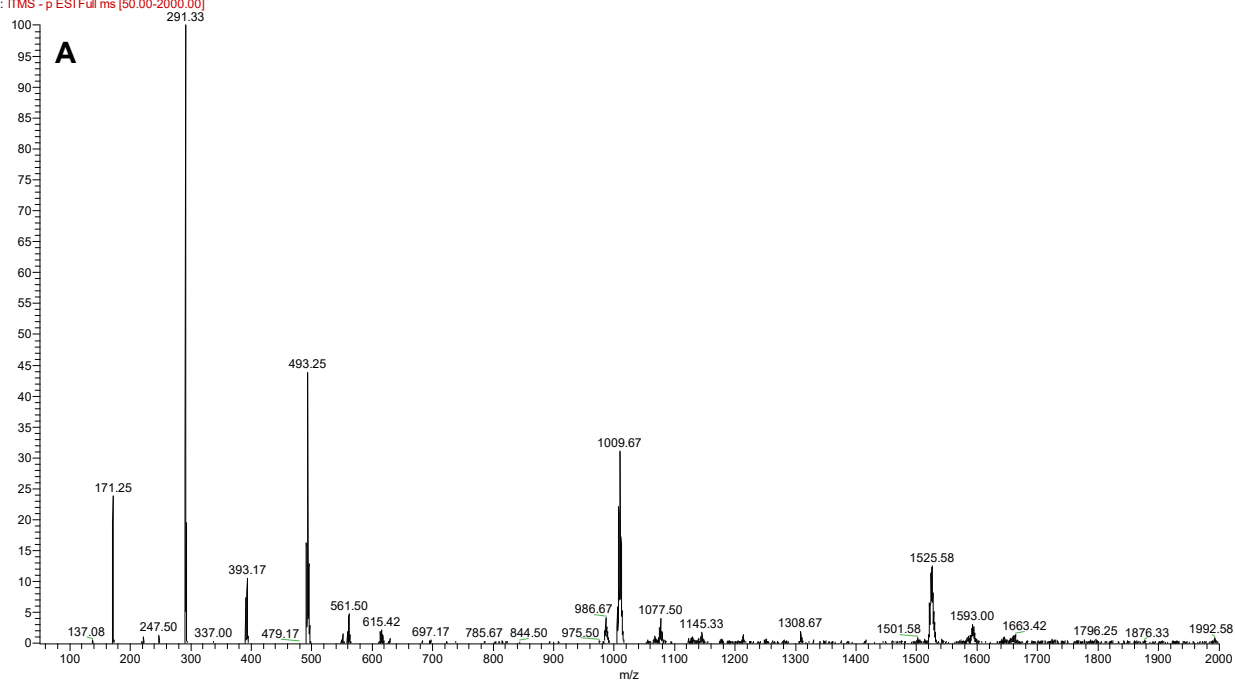


Figura A2.17. Espectros de MS de compuesto 32 en ShEtOH. A. Full scan. B. MS² de ión m/z 291.

Shetanol #6039-6059 RT: 24.42-24.49 AV: 10 NL: 5.32E3
 F: ITMS - p ESI Full ms [50.00-2000.00]



Shetanol #6029-6069 RT: 24.38-24.54 AV: 21 NL: 1.26E3
 F: ITMS - p ESI d Full ms2 291.32@cid25.00 [70.00-595.00]

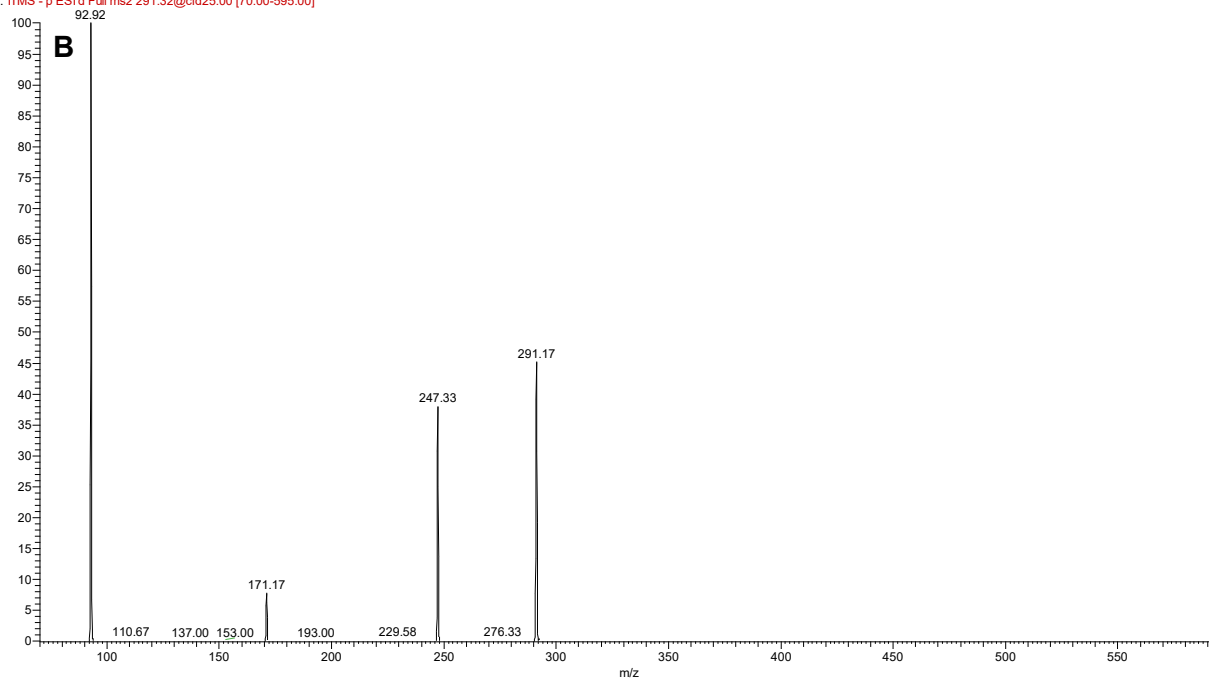


Figura A2.18. Espectros de MS de compuesto 33 en ShEtOH. A. Full scan. B. MS² de ión m/z 291.

ANEXO III. Artículo “Bioprospecting the antibiofilm and antimicrobial activity of soil and insect gut bacteria”

Article

Bioprospecting the antibiofilm and antimicrobial activity of soil and insect gut bacteria

Sofía Raffaelli^{1,2,3}, Eduardo Abreo⁴, Nora Altier⁴, Álvaro Vázquez^{2*} and Silvana Alborés^{1*}

¹. Área de Microbiología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. sraffaelli@fq.edu.uy, salbores@fq.edu.uy

². Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. sraffaelli@fq.edu.uy, avazquez@fq.edu.uy

³. Posgrado en Química, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. sraffaelli@fq.edu.uy

⁴. Laboratorio de Bioproducción, Plataforma de Bioinsumos, Estación Experimental INIA Las Brujas, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Canelones, Uruguay. naltier@inia.org.uy, eabreo@inia.org.uy

* Correspondence: salbores@fq.edu.uy (SA), avazquez@fq.edu.uy (AV)

Citation: Lastname, F.; Lastname, F.;
Lastname, F. Title. *Molecules* **2022**,
27, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Firstname
Lastname

Received: date

Accepted: date

Published: date

Publisher’s Note: MDPI stays
neutral with regard to jurisdictional
claims in published maps and
institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors.

Submitted for possible open access
publication under the terms and
conditions of the Creative Commons
Attribution (CC BY) license

Abstract: Antimicrobial resistance is a growing concern in public health and current research shows an important role for bacterial biofilms in recurrent or chronic infections. New strategies, therefore, are necessary to overcome antimicrobial resistance, through the development of new therapies that could alter or inhibit biofilm formation. In this sense, antibiofilm natural products are very promising. In this work, a bioprospection of antimicrobial and antibiofilm extracts from Uruguayan soil bacteria and insect gut bacteria was carried out. Extracts from extracellular broths were tested for their ability to inhibit planktonic cell growth and biofilm formation. Genomic analysis of *Bacillus cereus* ILBB55 was carried out. All extracts were able to inhibit the growth of, at least, one microorganism and several extracts showed MIC lower than 500 µg/mL against microorganisms of clinical relevance (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter cloacae*). Among the extracts evaluated for biofilm inhibition only ILBB55, from *B. cereus*, was able to inhibit, *S. aureus* (99%) and *P. aeruginosa* (62%) biofilms. Genomic analysis of this strain showed gene clusters similar to other clusters that code for known antimicrobial compounds. Our study revealed that extracts from soil bacteria and insect gut bacteria, especially from *B. cereus* ILBB55, could be potential candidates for drug discovery to treat infectious diseases and inhibit *S. aureus* and *P. aeruginosa* biofilms.

Keywords: antibiofilm; antimicrobial; soil bacteria; genome

1. Introduction

Antimicrobial resistance is a growing concern in public health. According to WHO reports, three of the ten main causes of death worldwide were infectious diseases, causing around 6 million deaths [1] and more than 2 million deaths in children under 5 years old per year [2]. Numerous programs, such as the ESKAPE program, are being conducted to find a solution, promoting the development of new treatments. ESKAPE microorganisms [3] *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and various species of *Enterobacter* are currently the pathogens that cause most of the hospital acquired infections in the US, which can effectively “escape” the effects of antimicrobial drugs. In addition, recent studies pose that antimicrobials in developing stages that could be commercialized - approximately one third of them- will not be enough to gain ground against rapidly appearing resistance, and very few of the new drugs actually possess novelty action mechanisms [4]. Fungal infections are also a cause of worry in public health. It is estimated that, at any given time, a quarter of the population is affected by a skin fungal infection and that 75% of women experience vulvovaginal candidiasis at least once in their lifetime [5]. *Candida albicans* is one of the most important fungal pathogens in humans, affecting particularly the immunocompromised population. Its biofilms are resistant to conventional antifungals, as well as to the host immune defenses, which has turned them into an important health issue [6].

Current research shows an important role for bacterial biofilms in recurrent or chronic infections, including those that do not respond to antibiotics [7,8]. It is known that approximately 99% of bacteria exist as biofilms, and the NIH reports that 65% of recurrent diseases and 80% of

chronic diseases in humans are produced by them [9]. In addition, microorganisms are capable of forming biofilms on medical devices, such as heart valves or catheters, representing a large part of healthcare-associated infections and can lead to increased mortality and morbidity, higher healthcare costs and increased length of hospital stay [10]. Resistance presented by microorganisms in a biofilm can be up to 1000 times higher than their planktonic counterparts [11,12]. Moreover, cellular and community resistance can be synergic, increasing greatly the general resistance of all microorganisms involved [13].

Traditionally, persistent infections are treated with conventional antimicrobials, using higher doses and longer time periods. However, tolerance to antimicrobials can be developed through metabolic dormancy or molecular persistence programs inside the biofilm [14]. New strategies, therefore, are necessary to overcome antimicrobial resistance, through the development of new therapies that could alter biofilms and destroy their constituent bacteria [15,16]. The field of natural products with activity against biofilms has shown promising results. For example, anti-biofilm activity of plant derived extracts against the infectious pathogen *P. aeruginosa* PAO1 was recently reported [17]. Various antibiofilm molecules have been identified. These molecules act in different ways, penetrating physical barriers of the biofilm, destabilizing the matrix, inhibiting quorum sensing, inducing oxidative stress, etc. [18-20]. Among natural products, the production of secondary metabolites with antimicrobial activity are a common feature of bacteria. However, most of them have been assessed for their antimicrobial activity against planktonic bacteria, but not against biofilms. Among these antibiofilm metabolites, nisin as well as gallidermin can inhibit the formation of staphylococcal biofilms [21,22].

Apart from *Streptomyces* and *Pseudomonas*, *Bacillus cereus* sensu lato and *Serratia* spp. are soil-dwelling bacteria also regarded as producers of secondary metabolites. Members of these genera, capable of colonizing a range of environments, represent a source of undisclosed secondary metabolites that needs to be explored [23,24]. Hence, the search for antimicrobial and antibiofilm compounds in isolates from these genera, obtained from different environments, is envisaged as a starting point for the discovery of novel compounds with activity against resistant pathogens and biofilms.

The aim of this work was the bioprospection of extracts from Uruguayan soil bacteria or insect gut bacteria -in particular members of *Bacillus* and *Serratia* genera- that could inhibit planktonic cell growth and biofilm formation in clinical relevant microorganisms.

2. Results

2.1. Antimicrobial activity

Previously identified microbial strains isolated from Uruguayan soil or insect gut (Table 1) were retrieved and used to inoculate broths and obtain a concentrated extract. Thirteen extracts were analyzed for their antimicrobial activity against seven microorganisms of clinical relevance (planktonic cells). The results of minimal inhibitory concentration (MIC) are listed in Table 2.

Table 1. Bacterial strains screened for production of antimicrobial and antibiofilm extracts.

ILBB55	<i>Bacillus cereus</i>
ILBB44	<i>Bacillus pumilus</i>
ILBB19	<i>Bacillus thuringiensis</i>
ILBB139	<i>Bacillus wiedmannii</i>
ILBB7	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>
ILBB63	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>
ILBB68	<i>Paenibacillus durus</i>
ILBB15	<i>Peribacillus butanolivorans</i>
ILB172	<i>Priestia megaterium</i>
ILBB95	<i>Priestia megaterium</i>
ILBB 162	<i>Serratia bockelmannii</i>
ILBB 219	<i>Serratia nevei</i>
ILBB 145	<i>Serratia ureilytica</i>

Table 2. Determination of Minimal Inhibitory Concentration of the extracts against planktonic cells.

CB extract	Minimal Inhibitory Concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)						
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>C. albicans</i>
ILBB55	1250	312	2500	NI	NI	NI	125
ILBB44	312	156	2500	NI	NI	NI	NI
ILBB19	625	2500	2500	NI	NI	2500	NI
ILBB139	1250	NI	2500	2500	2500	NI	NI
ILBB7	625	625	NI	ND	NI	NI	NI
ILBB63	625	NI	2500	625	2500	NI	NI
ILBB68	1250	NI	2500	2500	2500	NI	NI
ILBB15	312	76	2500	ND	NI	NI	NI
ILBB172	625	312	2500	1250	2500	2500	NI
ILBB95	1250	1250	NI	2500	NI	2500	2500
ILBB 162	156	63	76	NI	NI	1250	NI
ILBB 219	1250	2500	2500	NI	NI	NI	NI
ILBB 145	1250	250	1250	NI	NI	1250	NI

NI: No inhibition. ND: Not done

All extracts, except the one obtained from the sterile broth, were able to inhibit the growth of, at least, one microorganism in the assay conditions. Additionally, several culture broth (CB) extracts showed MICs lower than 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Taking this value into consideration, three of the CB extracts had promising activity against *Staphylococcus aureus*, six against *Pseudomonas aeruginosa*, one against *Enterobacter cloacae* and one against *Candida albicans*. ILBB162 had a MIC lower than 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. cloacae* and ILBB55 against *C. albicans*. MIC against *E. faecalis*, *K. pneumonia*, *A. baumannii* were above 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for all extracts.

Planktonic cells of *P. aeruginosa* were susceptible to 6 out of 13 of the tested CB extracts (Table 2). Because it was the most sensitive among the five Gram-negative strains, it was selected to test CB extracts for biofilm inhibition.

2.2. Antibiofilm activity

2.2.1. Biofilm formation

In order to study different types of biofilms, three strains were selected: a Gram-positive bacterium (*S. aureus*), a Gram-negative bacterium (*P. aeruginosa*) and a yeast (*C. albicans*).

The results of biofilms-forming ability of the strains is shown in Figure 1, where 1 BBU (biofilm biomass unit) was arbitrarily defined as 0.1 OD₅₉₀.

Since all the evaluated strains were classified as moderate (*S. aureus*) or strong (*P. aeruginosa* and *C. albicans*) biofilm producers, they were used in the in vitro antibiofilm activity test.

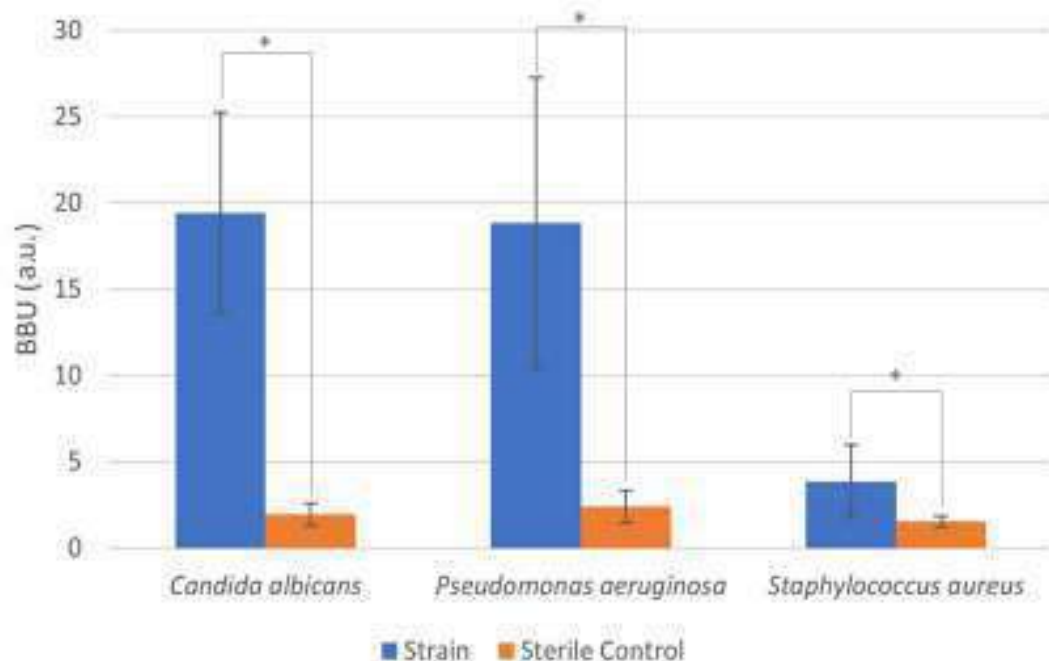


Figure 1. Biofilm-forming ability of *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Right: Sterile control. Left: Strain. *P < 0.05.

2.2.2. Biofilm inhibition ability

The same thirteen extracts were analyzed for their ability to inhibit biofilm growth. The lowest concentration of each extract which inhibited the biofilm formation is shown in Table 3. The inhibitory concentrations ranged from 4 to 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

For *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, four of the extracts could partially inhibit biofilm growth, showing statistically significant differences from the non-treated control (Table 3). In all cases, higher concentrations tested did not yield important differences in percentage of inhibition. Only ILBB55's extract showed a relatively high inhibition with a low MIC.

Table 3. Inhibition of extracts on biofilm formation.

	<i>C. albicans</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>	
	Concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Inhibition (%)	Concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Inhibition (%)	Concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Inhibition (%)
ILBB55	16	71	125	62	16	99
ILBB44	16	60	NI		NI	
ILBB19	125	55	NI		32	42
ILBB139	250	40	63	9	NI	
ILBB7	16	79	NI		NI	
ILBB63	16	64	500	68	NI	
ILBB68	250	68	63	13	NI	
ILBB15	16	30	NI		NI	
ILBB172	125	71	NI		NI	
ILBB95	500	93	NI		NI	
ILBB162	63	54	NI		250	77
ILBB219	32	49	NI		500	78
ILBB145	32	46	NI		125	94

NI: no inhibition.

For *Staphylococcus aureus*, five extracts showed significant biofilm inhibition (Table 3). As described in Methods, minimal biofilm inhibitory concentration (MBIC) was determined as the minimal concentration able to inhibit at least 90% of the biofilm formation. Four of the extracts (ILBB19, ILBB55, ILBB145 and ILBB162) were able to inhibit at least 90% of *S. aureus* biofilm growth at some of the tested concentrations. MBIC were 500, 16, 125 and 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. For ILBB55 extract, the inhibition was significant at doses as low as 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figure 2). For ILBB19, the inhibition capacity diminishes progressively at lower concentrations, stimulating the biofilm growth at subinhibitory concentrations (Figure 3).

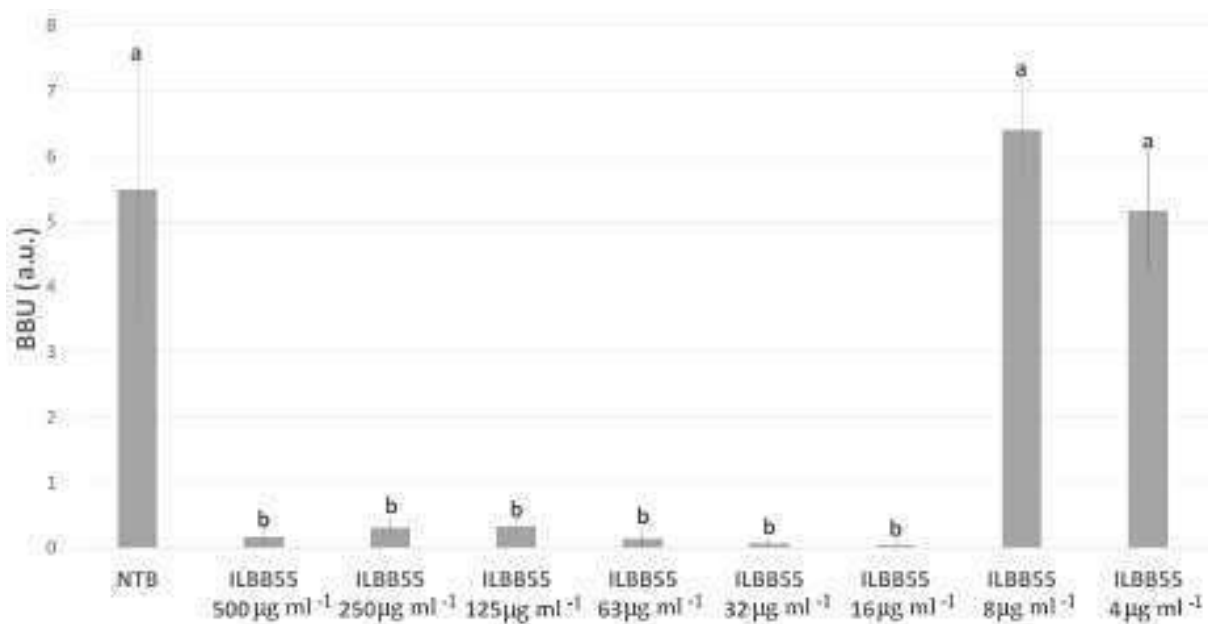


Figure 2. Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm by different concentrations of ILBB55 extract.

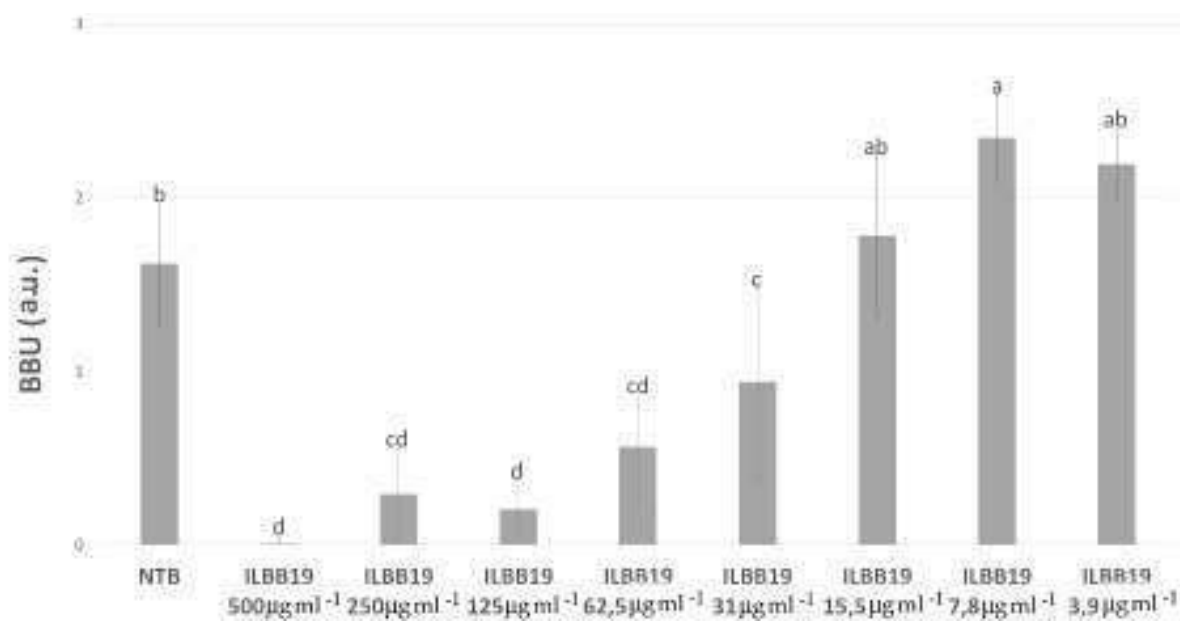


Figure 3. Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm by different concentrations of ILBB19 extract.

When analyzing *Candida albicans* biofilms, extracts ILBB7, ILBB55, ILBB44 and ILBB63 show a higher inhibition percentage than the sterile broth at 16 µg mL⁻¹. However, no inhibition of the *C. albicans* planktonic growth was detected at this concentration of the extracts (Table 2). Figure 4 shows that all concentrations of ILBB7 extract tested were able to inhibit *C. albicans* biofilm growth to some extent. A slight decrease in inhibition was observed

at lower concentrations, however, this difference is not statistically significant.

Among the 13 extracts evaluated for biofilm inhibition only ILBB55 was able to inhibit *C. albicans* (71%), *S. aureus* (99%) and *P. aeruginosa* (62%) biofilms.

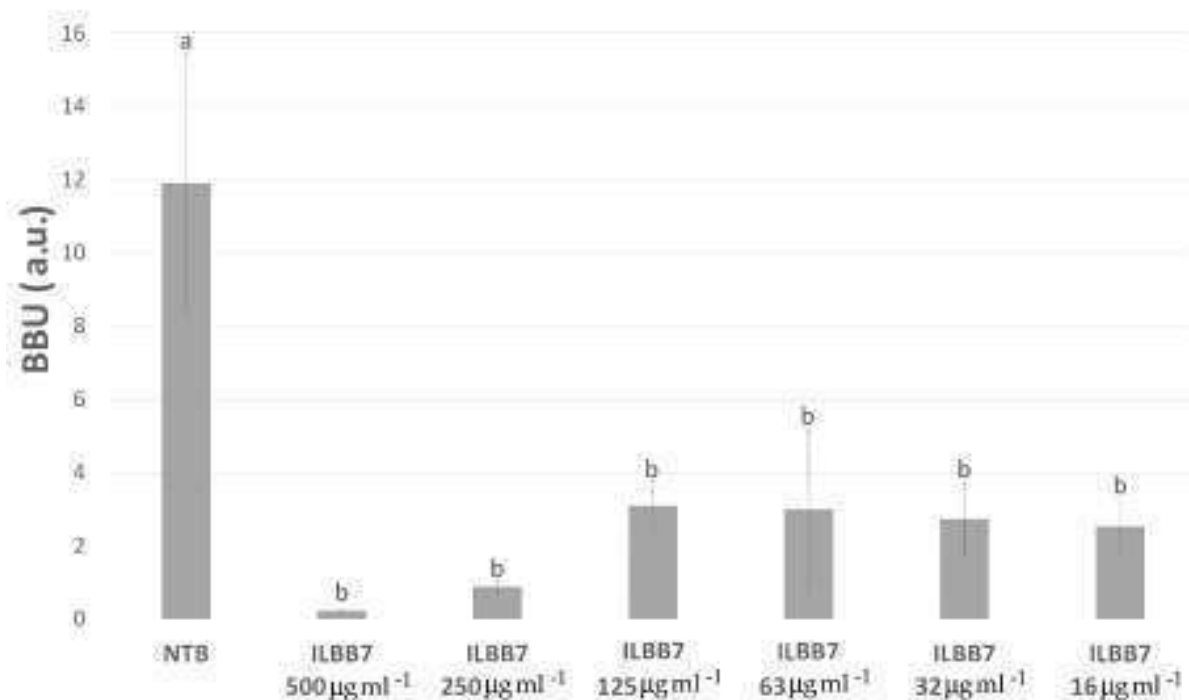


Figure 4. Inhibition of *Candida albicans* biofilm by different concentrations of ILBB7 extract.

2.3. Genomic analysis of *Bacillus cereus* ILB55

Since among all the extracts evaluated only ILBB55 was able to inhibit the biofilm formation of *C. albicans*, *S. aureus* and *P. aeruginosa*, and it was also the only strain whose extract could inhibit *C. albicans* planktonic cells, this bacterial strain was selected for genomic analysis.

The assembled draft genome of *Bacillus cereus* ILBB55 contains 5,842,177 bp, 34.9% GC and 36 contigs with parameters N50 = 573946, L50 = 4. Genome mining carried out using antiSMASH 5.1.2 allowed to identify types of secondary metabolite biosynthetic gene clusters that could be related to the observed antimicrobial and antibiofilm activity of ILBB55 extract.

Bacillus cereus ILBB55 contains 16 biosynthetic gene clusters (BGC) comprising 4 clusters of non-ribosomal peptide synthetase (NRPS), 1 NRPS-like cluster, 4 ribosomally synthesized and posttranslationally modified peptides (RiPPs), 1 betalactone, 1 siderophore, 1 terpene, 1 lanthipeptide class ii (RiPP), 1 sactipeptide (RiPP), 1 arylpolyene, 1 linear azole-containing peptide (LAP, RiPP). Of these, 100% similarity with known BGC was found for the siderophore petrobactin (BGC0000942), 70% for sactipeptide thurincin H (BGC0000600), 46% for NRPS bacillibactin (BGC0000309), 40% for the

betalactone (fengycin BGC0001095) and 17% with terpene molybdenum cofactor (BGC0000916).

2.4. Thin layer chromatography (TLC)

For all extracts analyzed various phenols, organic acids and lactones were detected by TLC. However, alkaloids, cardenolides and indoles were not detected using this method.

3. Discussion

We explored extracts that could have antimicrobial and antibiofilm effects against clinically relevant microorganisms, from a collection of bacteria originally obtained from complex environments where resident microbes interact and compete with other members of microbial communities [25].

S. bockelmanii ILBB162 and *B. cereus* ILBB55, showed the most promising activities. ILBB162 CB had a very low MIC against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. cloacae*, whereas ILBB55 CB was the only one with a low MIC against *Candida albicans*. ILBB162 had been shown to inhibit the fungus *Pythium cryptoirregulare*, through production of diffusible and volatile metabolites in vitro [26], so this strain could be considered of biotechnological interest. Its genome mining [26] showed that it carries the BGC for althiomycin, which is known to inhibit *S. aureus*, and has the *swrA* gene coding for non-ribosomal serrawettin synthetase and can potentially produce serrawettin W2, a biosurfactant with low range antimicrobial activity that can affect clinical *P. aeruginosa* strain PA3 [24].

CB of ILBB55 was not only able to inhibit *C. albicans* planktonic cells, but also reduced the biofilm formation of *S. aureus* and *C. albicans* at the lowest concentration of 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Interestingly, synthetic Dermaseptin-S1 peptide, previously isolated from *Phyllomedusa sauvagii*, inhibited *C. albicans* biofilm formation at 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ [27]. In this work, a first chemical analysis of ILBB55 extracts was carried out by TLC, a simple and inexpensive method to determine the nature of the constituents in the extract [28]. These studies allowed the detection of organic acids and phenols, but not alkaloids, cardenolides or indoles. Therefore, it would be interesting to encourage future works to isolate the highly active compound or mix of compounds excreted by *B. cereus* ILBB55 to evaluate the antibiofilm properties. Furthermore, we selected the strain *Bacillus cereus* ILBB55 for the genomic analysis because, as explained before, it was the only strain whose culture broth extract inhibited *C. albicans* planktonic cells and the biofilm formation of *C. albicans*, *S. aureus* and *P. aeruginosa*. Then, genome mining allowed to identify types of secondary metabolite biosynthetic gene clusters that could be related to the antimicrobial and antibiofilm activities. In this regard, fengycin was reported as an antifungal lipopeptide with activity against filamentous fungi but not yeast, while bacillibactin, also inhibited fungal species [29]. Additionally, siderophores produced by *Bacillus* sp. GZDF3 were active against *C. albicans* [30] and it is known that iron plays a crucial role on *C. albicans* growth [31]. According to the genomic analysis, *B. cereus* ILBB55 showed a cluster 46% similar to another known cluster that codes for bacillibactin, suggesting that it could be a variant of that compound [32]. In a recent report, isolates which showed antimicrobial activity were screened for

the presence of NRPS [33]. Despite most isolates were positive for NRPS, these genes were not detected for *B. cereus* isolates. However, in our work, genomic analysis of *Bacillus cereus* ILB55 showed 4 clusters of NRPS. This having been stated, these compounds are not expected to be present in the extracts analyzed, as their solubility in ethyl acetate is very low. Nevertheless, a global comprehension of the metabolite production of this microorganism could help in unveiling the structure of the metabolites implicated in the antibiofilm activity or aid in further investigations using other extraction methods.

Overall, results of antimicrobial assays against planktonic cells showed that all extracts inhibited the growth of at least one clinical relevant microorganism in the evaluated conditions.

Metabolites from *Bacillus pumilus* with antibacterial activity have been reported against pathogenic bacteria including *S. aureus*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella gallinarum*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, with MIC 1.6-2.0 mg mL⁻¹ [34]. From our results, *S. aureus* was more sensitive to *B. pumilus* ILBB 44 and *Peribacillus butanolivorans* ILBB15 extracts, with MIC 0.3 mg mL⁻¹. Furthermore, this extract was able to inhibit *P. aeruginosa* growth at 0.1 mg mL⁻¹.

Extracellular extracts of a marine bacterial isolate, identified as *Lysinibacillus xylanilyticus*, showed that extracellular components present in the culture supernatant had antibacterial and antifungal properties [35]. We here determined that extracts from *L. xylanilyticus* ILBB63 isolated from Uruguayan soil showed MIC 0.6 mg mL⁻¹ against two bacteria of clinical relevance, *S. aureus* and *E. faecalis*.

Paenibacillus strains isolated from various ecological niches synthesize a wide range of antibiotics, with inhibitory activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Recently, antibacterial activity against *P. aeruginosa* and *A. baumannii* but not *S. aureus* was reported for *Paenibacillus* spp [33]. However, extracts from *Paenibacillus durus* ILBB68 isolated from soil in Uruguay were able to inhibit *S. aureus*, with a MIC of 1.25 mg mL⁻¹.

Apart from antimicrobial potential against planktonic cells, extracts from different natural products have shown potential activity against microbial biofilms. Moreover, bacterial extracts from *Streptomyces chrestomyceticus* showed antimicrobial activity against *Candida* biofilms in concentrations ranging from 4 to 250 µg mL⁻¹ [36] and extracts from three different species of *Bacillus* were able to inhibit *Alteromonas* sp. biofilms [37]. In this work, the antibiofilm activity of thirteen extracts from soil bacteria and insect gut bacteria is reported. The inhibitory concentrations ranged from 4 to 500 µg mL⁻¹, which are very promising values compared to previous reports.

For all the extracts able to inhibit biofilm growth of *P. aeruginosa*, the minimal inhibitory concentration (MBIC) is lower than the MIC (Tables 2 and 3). This indicates that the metabolites are interfering with the biofilm forming mechanism and not with the planktonic cell growth. Similarly, extracts ILBB7, ILBB55, ILBB44 and ILBB63 showed a significant inhibition percentage of *C. albicans* biofilm at 16 µg mL⁻¹ (Table 3), but no inhibition of the planktonic growth was detected at this concentration of the extracts (Table 2). This suggests that the bacterial metabolites are able to disrupt the formation of the biofilm without affecting yeast cell growth. Mechanisms

involved in this phenomenon can be very different, for example, molecules may be able to interfere with any of the steps in biofilm formation, such as adherence, cellular communication (quorum-sensing), structural integrity of the biofilm matrix, etc. Future works should be focus in the evaluation of these antibiofilm mechanisms of action.

For ILBB19, the ability to inhibit *S. aureus* biofilm diminishes progressively at lower concentrations. Interestingly, for subinhibitory concentrations, stimulation of the biofilm growth was observed (Figure 3), as previously reported by Ranieri et al. [38].

Therefore, novel microorganisms, as soil bacteria used here, could be used as resources for the renewable production of antibiofilm compounds.

In conclusion, extracts from soil bacteria and insect gut bacteria were able to inhibit bacterial and yeast biofilm growth, showing promising results at low concentrations, being potential candidates for drug discovery to treat and prevent infectious diseases.

4. Materials and Methods

4.1. Organisms and culture

The microbial strains used in the screening were isolated from rhizospheric soil samples or the digestive tract of natural insect populations and identified. Pure cultures deposited in INIA Las Brujas Bacteria Culture Collection (ILBB) were retrieved and used to inoculate broths and obtain a concentrated extract (Table 1). The bacteria were grown in 500 mL Erlenmeyer flasks containing 200 mL of modified liquid LB medium (10 g peptone, 10 g NaCl, 0.05 g yeast extract, per litre of distilled water), incubated in a rotary shaker at 180 RPM, at 25 °C for 48 hours. Sterile broth was also used as a control, in order to evaluate the influence of its components on the antimicrobial and antibiofilm activity.

4.2. Preparation of extracts

Cell-free culture broths (CB) were saturated with NaCl and filtered through cotton. A liquid-liquid extraction was then performed using ethyl acetate (AcOEt). Three portions (from three times extraction) were combined, and the solvent evaporated to dryness in a vacuum. Extracts were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) for biological assays.

4.3. Antimicrobial assays

4.3.1. Determination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

The extracts were evaluated against the following microorganisms: *S. aureus* ATCC6538P, *E. cloacae* CCMGb3, *E. faecalis* CCMGb2, *K. pneumoniae* CCMG12716, *A. baumannii* CCMGb1, *C. albicans* ATCC 101231, *P. aeruginosa* ATCC 15442. MIC of the extracts was determined by the microdilution technique according to the Clinical and Laboratory Standards Institute [39]. MIC analyses were carried out in a microdilution plate with 96 wells containing Mueller-Hinton broth. The extracts were dissolved in DMSO. The initial solutions of the extracts were prepared and further serial dilutions of the extracts and DMSO were performed. Positive controls (growth control) were prepared containing inoculum and sterile broth (without extracts) assuring no antimicrobial effect. Negative controls were also prepared with

antimicrobial solutions and sterile broth to ensure they were not contaminated. Gentamicin ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) and propiconazole ($125 \mu\text{g mL}^{-1}$) were used as antibacterial and antifungal controls, respectively. The MIC was determined as the lowest extract concentration (antimicrobial agent) that inhibited the visible growth of a microorganism after incubation.

4.4. Antibiofilm activity

4.4.1. Biofilm formation assay

The biofilms-forming ability of the strains was measured based on the facility of bacterial (*S. aureus* ATCC6538P, *P. aeruginosa* ATCC 15442) and yeast (*C. albicans* ATCC 101231) strains to form biofilms on solid surfaces, stained with crystal violet. The assay was adjusted to 96-well microtiter plates according to previously published procedure [40].

Briefly, a bacterial cell suspension (1×10^7 cells mL^{-1}) was inoculated in sterile Nutrient Broth [41,42] (Oxoid) and plates were incubated at 37°C for 24 h without shaking to allow the attachment of cells on the surface. Control wells contained only sterile Nutrient Broth. After incubation, nonadhered cells were removed by washing the wells with distilled water. Then, plates were dried for 40 minutes at 50°C prior to crystal violet (1% w/v) staining. Adherent biofilms were washed with water to remove unbound dye. Finally, crystal violet was extracted with the bleaching solution (0.2mL): ethanol: acetone (70:30). The optical density (OD) was determined at 590nm using a microplate reader. The average OD of the strain was compared with average OD of the control wells (OD_c), both reported as means $\pm$ standard deviations. The amount of formed biofilm was expressed as biofilm biomass unit (BBU), which was arbitrarily defined as 0.1 OD_{590} equal to 1 BBU [26]. Strains were classified according to its ability to form biofilm by following these criteria: $\text{OD} \leq \text{OD}_c$ = no biofilm producer; $\text{OD}_c < \text{OD} \leq (2 \times \text{OD}_c)$ = weak biofilm producer, $(2 \times \text{OD}_c) < \text{OD} (4 \times \text{OD}_c)$ = moderate biofilm producer and $(4 \times \text{OD}_c) < \text{OD}$ = strong biofilm producer.

For *C. albicans*, a suspension of yeast cells (1×10^6 cells mL^{-1}) in Potato Dextrose Broth (PDB, HiMedia) was incubated for 30 min in each plate well (except for the sterile control) at 37°C . Supernatant was removed and the wells washed with PBS 1x. Then, fresh PDB was placed in the wells. Control wells containing sterile PDB were included. The plate was incubated 24 h at 37°C . Then, the procedure was done as described for bacteria assay.

4.4.2. Determination of Minimal Biofilm Inhibitory Concentration (MBIC)

The effect of extracts on biofilm formation was examined by using the modified microdilution method [43]. Briefly, assays against bacterial biofilms were carried out in a 96-well plate, with four replicates. Serial dilutions of the extracts and DMSO in nutrient broth were deposited and a bacterial suspension (1×10^8 cells mL^{-1}) was added. Control wells containing sterile Nutrient Broth and Nutrient Broth+DMSO+bacterial suspension (non-treated biofilm, NTB) were included. The plate was incubated 24 h at 37°C . Supernatant was removed, the wells were washed with distilled water and dried at 50°C for 40 min. Then, the attached cells were dyed with 1% crystal violet solution. The crystal violet was resuspended in ethanol:acetone (70:30) and the absorbance of the solution measured at 590nm. The absorbance of

each sample, extracts, NTB, and sterile Nutrient Broth were compared and inhibition percentage was calculated. The MBIC was determined as the minimal concentration able to inhibit at least 90% of the biofilm formation.

For *C. albicans*, a suspension of yeast cells (1×10^6 cells mL^{-1}) in PDB was incubated for 30 min in each plate well (except for the sterile control) at 37°C. Supernatant was removed and the wells washed with PBS 1x. Then, serial dilutions of the extracts and DMSO in PDB were deposited. Control wells containing sterile PDB and PDB+DMSO+yeast suspension (non-treated biofilm, NTB) were included. The plate was incubated 24 h at 37 °C. Then, the procedure was continued as described for bacteria assay.

4.4.3. Statistical analysis

Experiments were performed at least in quadruplicate, and the averages and standard deviations were calculated for all experiments. Results were plotted as means values with error bars that represent standard deviations. Data were statistically analyzed using ANOVA and a post-hoc Tukey test for multiple comparisons (p value <0.05).

4.5. Genomic analysis

Bacillus cereus ILBB55 was used for mining biosynthetic gene clusters (BGC). For whole genome sequencing, DNA was purified with kitDNeasy Blood & Tissue (QIAGEN) and quantified with Qubit 4(Thermo Fisher). 1 g genomic DNA was randomly fragmented by Covaris, followed by purification by AxyPrep Mag PCR clean upkit. The fragments were end repaired by End Repair Mix and purified afterwards. The repaired DNAs were combined with A-TailingMix, then the Illumina adaptors were ligated to the Adenylate3'Ends DNA and followed by products' purification. All kits and mixes contained BGI self-prepared reagents. The products were selected based on the insert size (350 bp). After purification, the library was qualified by the Agilent Technologies 2100 bioana-lyzer and ABI Step One Plus Realtime PCR System. Finally, 150 bp paired-ends were sequenced using Hiseq 4000 System (Illumina) by BGI (China). Adaptors and low-quality reads were filtered with BGI internal software SOAPnuke v1.5.2 (parameters: -l 15-q 0.2-n0.05-i). Reads were then assembled into contigs with CLC software (QIAGEN) to obtain the draft genome.

Draft genome of ILBB55 was submitted to Genbank and automatically annotated using prokka (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/) as part of BioProject PRJNA745340, accession JAIQVG000000000. The version described in this paper is version JAIQVG010000000. Putative antimicrobial biosynthetic gene cluster were predicted using antiSMASH software version 5.1.2.

4.6. Thin layer chromatography (TLC)

For all extracts, TLC analyses were carried out. Extracts (10 μL) were applied in TLC plates (Silica Gel 60 F254, Merck Co.) and developed with a variety of solvents, CH_2Cl_2 :MeOH in different proportions (95:5 to 50:50), Toluene/AcOEt/ Diethylamine 70:20:10, Ethyl acetate/Methanol/water (100 :13.5 :10), Ethyl acetate/Formic acid/glacial acetic acid/water (100 :11 :11 :26) in order to analyze the metabolites contained in the extracts. Detection was carried out using different reagents and methods, such as Fast Blue B Salt,

Draggendorff, Ehrlich, Van Urk's, Kedde's and Natural Products II reagents for polyphenols, alkaloids, indoles, lactones, cardenolides and phenols and phenolic acids, respectively. As general detection reagents copper sulfate reagent/heat, UV detection at 254 and 356 nm were used [44-45].

Author Contributions: Conceptualization: S.A., A.V., Data curation: S.R., E.A., Formal analysis: S.R., Methodology: S.R., Funding acquisition: S.A., A.V. Supervision: S.A., A.V., Resources: S.A., A.V., E.A., N.A., Writing - original draft: S.R., S.A., A.V., E.A., Writing - review & editing: S.A., A.V., S.R., E.A., N.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Program for the Development of Basic Sciences (PEDECIBA-Química) y Comisión Académica de Posgrado (CAP) (Universidad de la República, Uruguay).

Acknowledgments: Authors acknowledge Guilherme Sastre and Ruby Valadez for technical support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. WHO. Global Health Estimates 2016: Deaths by cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2018, 2000-2016. Geneva
2. WHO. Causes of child mortality. Global Health Observatory data, 2017.
3. Pandey, R.; Mishra, S.K.; Shrestha, A. Characterisation of escape pathogens with special reference to multidrug resistance and biofilm production in a nepalese hospital. *Infect. Drug Resist.* 2021, 14, 2201–2212.
4. Simpkin, V.L.; Renwick, M.J.; Kelly, R.; Mossialos, E. Incentivising innovation in antibiotic drug discovery and development: Progress, challenges and next steps. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2017, 70, 1087–1096.
5. Simpkin, V.L.; Renwick, M.J.; Kelly, R.; Mossialos, E. Incentivising innovation in antibiotic drug discovery and development: Progress, challenges and next steps. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2017, 70, 1087–1096.
6. Peralta, M.A.; Ortega, M.G.; Cabrera, J.L.; Paraje, M.G. The antioxidant activity of a prenyl flavonoid alters its antifungal toxicity on *Candida albicans* biofilms. *Food Chem. Toxicol.* 2018, 114, 285–291.
7. Paraje, M.G. Antimicrobial resistance in biofilms. *Sci. against Microb. Pathog. Commun. Curr. Res. Technol. Adv.* 2011, 2, 736–744, doi:10.1590/S1517-83822013005000004.
8. Del Pozo, J.L. Biofilm-related disease. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2018, 16, 51–65.
9. Jamal, M.; Ahmad, W.; Andleeb, S.; Jalil, F.; Imran, M.; Asif, M.; Hussain, T.; Ali, M.; Rafiq, M.; Atif, M. Bacterial biofilm and associated infections. *J. Chinese Med. Assoc.* 2018, 81, 7–11.
10. Carvalho, F.M.; Teixeira-Santos, R.; Mergulhão, F.J.M.; Gomes, L.C. The use of probiotics to fight biofilms in medical devices: A systematic review and meta-analysis. *Microorganisms* 2021, 9, 1–26.
11. Hall, C.W.; Mah, T.F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 2017, 41, 276–301.
12. Srinivasan, R.; Santhakumari, S.; Poonguzhali, P.; Geetha, M.; Dyavaiah, M.; Xiangmin, L. Bacterial Biofilm Inhibition: A Focused Review on Recent Therapeutic Strategies for Combating the Biofilm Mediated Infections. *Front. Microbiol.* 2021, 12, 1–19.
13. Penesyan, A.; Gillings, M.; Paulsen, I.T. Antibiotic discovery: Combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. *Molecules* 2015, 20, 5286–5298.
14. Jiang, Y.; Geng, M.; Bai, L. Targeting biofilms therapy: Current research strategies and development hurdles. *Microorganisms* 2020, 8, 1–34.
15. Divakar, S.; Lama, M.; Asad U., K. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 2019, 3, 1–10.
16. Estevez, M.B.; Raffaelli, S.; Mitchell, S.G.; Faccio, R.; Alborés, S. Biofilm eradication using biogenic silver nanoparticles. *Molecules* 2020, 25, 1–14.

17. Alam, K.; Farraj, D.A.A.; Mah-e-Fatima, S.; Yameen, M.A.; Elshikh, M.S.; Alkufeidy, R.M.; Mustafa, A.E.Z.M.A.; Bhasme, P.; Alshammari, M.K.; Alkubaisi, N.A.; et al. Anti-biofilm activity of plant derived extracts against infectious pathogen-*Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Infect. Public Health* 2020, 13, 1734–1741.
18. Beoletto, V.G.; de las Mercedes Oliva, M.; Marioli, J.M.; Carezzano, M.E.; Demo, M.S. Antimicrobial Natural Products Against Bacterial Biofilms. *Antibiotic Resistance: Mechanisms and New Antimicrobial Approaches*; 2016; pp. 291–307.
19. Song X, Xia Y, He Z, Zhang H. A Review of Natural Products with Anti-Biofilm Activity. *Curr. Org. Chem.* 2018, 21, 789–817.
20. Ćirić, A.D.; Petrović, J.D.; Glamočlija, J.M.; Smiljković, M.S.; Nikolić, M.M.; Stojković, D.S.; Soković, M.D. Natural products as biofilm formation antagonists and regulators of quorum sensing functions: A comprehensive review update and future trends. *South African J. Bot.* 2019, 120, 65–80.
21. Shin, J.M.; Ateia, I.; Paulus, J.R.; Liu, H.; Fenno, J.C.; Rickard, A.H.; Kapila, Y.L. Antimicrobial nisin acts against saliva derived multi-species biofilms without cytotoxicity to human oral cells. *Front. Microbiol.* 2015, 6, 1–14.
22. Saising, J.; Dube, L.; Ziebandt, A.K.; Voravuthikunchai, S.P.; Nega, M.; Götz, F. Activity of gallidermin on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012, 56, 5804–5810.
23. Sansinenea, E.; Ortiz, A. Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnol. Lett.* 2011, 33, 1523–1538.
24. Clements, T.; Ndlovu, T.; Khan, W. Broad-spectrum antimicrobial activity of secondary metabolites produced by *Serratia marcescens* strains. *Microbiol. Res.* 2019, 229, 126329.
25. Saxena, A.K.; Kumar, M.; Chakdar, H.; Anuroopa, N.; Bagyaraj, D.J. *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. *J. Appl. Microbiol.* 2020, 128, 1583–1594.
26. Abreo, E.; Valle, D.; González, A.; Altier, N. Control of damping-off in tomato seedlings exerted by *Serratia* spp. strains and identification of inhibitory bacterial volatiles in vitro. *Syst. Appl. Microbiol.* 2021, 44, 126177.
27. Belmadani, A.; Semlali, A.; Rouabhia, M. Dermaseptin-S1 decreases *Candida albicans* growth, biofilm formation and the expression of hyphal wall protein 1 and aspartic protease genes. *J. Appl. Microbiol.* 2018, 125, 72–83.
28. Oshima, N.; Saito, M.; Niino, M.; Hiraishi, Y.; Ueki, K.; Okoshi, K.; Hakamatsuka, T.; Hada, N. Using Quantitative Thin-Layer Chromatography Analysis. *Molecules* 2022, 27, 593.
29. Li, B.; Li, Q.; Xu, Z.; Zhang, N.; Shen, Q.; Zhang, R. Responses of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to different soilborne fungal pathogens through the alteration of antifungal compounds production. *Front. Microbiol.* 2014, 5, 1–10.
30. Sheng, M.; Jia, H.; Zhang, G.; Zeng, L.; Zhang, T.; Long, Y.; Lan, J.; Hu, Z.; Zeng, Z.; Wang, B.; et al. Siderophore Production by Rhizosphere Biological Control Bacteria *Brevibacillus brevis* GZDF3 of *Pinellia ternata* and Its Antifungal Effects on *Candida albicans*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2020, 30, 689–699.
31. Fourie, R.; Kuloyo, O.O.; Mochochoko, B.M.; Albertyn, J.; Pohl, C.H. Iron at the centre of *Candida albicans* interactions. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018, 8, 1–14.
32. Chen, Z.Y.; Abuduaini, X.; Mamat, N.; Yang, Q.L.; Wu, M.J.; Lin, X.R.; Wang, R.; Lin, R.R.; Zeng, W.J.; Ning, H.C.; et al. Genome sequencing and functional annotation of *Bacillus* sp. strain BS-Z15 isolated from cotton rhizosphere soil having antagonistic activity against *Verticillium dahliae*. *Arch. Microbiol.* 2021, 203, 1565–1575.
33. Tsadila, C.; Nikolaidis, M.; Dimitriou, T.G.; Kafantaris, I.; Amoutzias, G.D.; Pournaras, S.; Mossialos, D. Antibacterial activity and characterization of bacteria isolated from diverse types of greek honey against nosocomial and foodborne pathogens. *Appl. Sci.* 2021, 11, 5801.
34. Chu, J.; Wang, Y.; Zhao, B.; Zhang, X. ming; Liu, K.; Mao, L.; Kalamiyets, E. Isolation and identification of new antibacterial compounds from *Bacillus pumilus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019, 103, 8375–8381.
35. Suvega, T.; Arunkumar, K. Antimicrobial Activity of Bacteria Associated with Seaweeds against Plant Pathogens on Par with Bacteria Found in Seawater and Sediments. *Br. Microbiol. Res. J.* 2014, 4, 841–855.
36. Ranieri, M.R.; Whitchurch, C.B.; Burrows, L.L. Mechanisms of biofilm stimulation by subinhibitory concentrations of antimicrobials. *Curr. Opin. Microbiol.* 2018, 45, 164–169.
37. CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. In *Approved Standard*, 10th ed.; CLSI: Wayne, PA, USA, 2015; p. 35.
38. Marioni, J.; da Silva, M.A.; Cabrera, J.L.; Montoya, S.C.N.; Paraje, M.G. The anthraquinones rubiadine and its 1-methyl ether isolated from *Heterophyllaea pustulata* reduces *Candida tropicalis* biofilms formation. *Phytomedicine* 2016, 23, 1321–1328.
39. Chebbi, A.; Elshikh, M.; Haque, F.; Ahmed, S.; Dobbin, S.; Marchant, R.; Sayadi, S.; Chamkha, M.; Banat, I.M. Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* strain W10; as antibiofilm/antibiofouling products for metal protection. *J. Basic Microbiol.* 2017, 57, 364–375.

40. Silva, S.S.; Carvalho, J.W.P.; Aires, C.P.; Nitschke, M. O. Disruption of *Staphylococcus aureus* biofilms using rhamnolipid biosurfactants *J. Dairy Sci.* 2017, 100, 7864–7873.
41. Teanpaisan, R.; Kawsud, P.; Pahumunto, N.; Puripattanavong, J. Screening for antibacterial and antibiofilm activity in Thai medicinal plant extracts against oral microorganisms. *J. Tradit. Complement. Med.* 2016, 7, 172–177.
42. Jork, H.; Funk, W.; Fisher, W.; Wimmer, H. *Thin Layer Chromatography Reagents and Detection Methods*, Vol 1a: VCH, Weinheim, 1990
43. Galand, N.; Pothier, J.; Viel, C. Plant drug analysis by planar chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* 2002, 40, 585–597.
44. Pascual, M.E.; Carretero, M.E.; Slowing, K. V.; Villar, A. Simplified screening by TLC of plant drugs. *Pharm. Biol.* 2002, 40, 139–143.