



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS

POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“ACTIVIDAD DE EXTRACTOS METANÓLICOS DE TRES
ESPECIES DE *Echeveria* DE MÉXICO CONTRA LA
FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS BACTERIANAS”**

TESIS

QUE PRESENTA

QFB. LESLIE LIZETH PEINADO BELTRÁN

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

DIRECTOR(ES)

DRA. GABRIELA LÓPEZ ANGULO

DR. FRANCISCO DELGADO VARGAS

ASESORA

MC. YESMI PATRICIA AHUMADA SANTOS

CULIACÁN DE ROSALES, SINALOA, MÉXICO A JUNIO DE 2024.



Dirección General de Bibliotecas
Ciudad Universitaria
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57
dgbuas@uas.edu.mx

UAS-Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional Buelna

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial
Compartir Igual, 4.0 Internacional



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Maestría en Ciencia Biomédicas y en la Unidad de Investigaciones en Salud Pública “Dra. Kaethe Willms”. Ambos laboratorios pertenecen a la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa. La investigación se realizó bajo la dirección de la Dra. Gabriela López Angulo y del Dr. Francisco Delgado Vargas, además de contar con la asesoría de la MC. Yesmi Patricia Ahumada Santos, de la Dra. María Elena Báez Flores y del Dr. Rodolfo Bernal Reynaga. El CONHACYT proporcionó financiamiento al proyecto (A1-S-24537) y beca de maestría a Leslie Lizeth Peinado Beltrán.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi papá José Vicente Peinado Valdez, a mis hermanos Celina del Rosario Peinado Beltrán y José Roberto Peinado Beltrán. Especialmente a mi mamá Celina Beltrán Meza, como quisiera que estuvieras presente.

Gracias por todo su cariño y apoyo. ¡Los amo!

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco profundamente a Dios por haber sido mi guía, brindándome fortaleza, protección y vida para alcanzar una meta más.

Expreso mi gratitud a la Universidad Autónoma de Sinaloa, a la Facultad de Ciencias Químico Biológicas y al Posgrado en Ciencias Biomédicas por abrirme sus puertas, brindarme la oportunidad de ser parte de su programa y formarme académicamente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado durante la realización de este proyecto.

Al Laboratorio de Química de Productos Naturales (LPQN) y a la Unidad de Investigaciones en Salud Pública “Dra Kaethe Willms” por permitirme realizar esta investigación en sus instalaciones.

Mi familia merece un reconocimiento especial. A mi amada mamá, Celina Beltrán Meza, mi pilar inquebrantable, por su inmenso amor, apoyo incondicional, sabios consejos y por creer en mí. Gracias por siempre guiarme, espero estés orgullosa de mí, como solías estarlo. A mi papá José Vicente Peinado Valdez, por su constante respaldo desde mi infancia hasta el día de hoy, por siempre trabajar para darnos lo mejor a mis hermanos y a mí, por tus palabras de aliento, por confiar y creer en mí siempre. A mis hermanos Celina Peinado y Roberto Peinado, por su cariño, apoyo y compañía incondicional. Son lo más valioso que puedo tener. A mis hermosos sobrinos, Matias Etienne y Estela Marina, quienes han sido fuente de alegría y

fortaleza en mi vida. Soy la tía más feliz y afortunada de tenerlos. A la abuelinchis por compartir tu cocina y amor conmigo. ¡Los amo y aprecio mucho familia!

A mi novio, Arturo Chávez Palma por siempre estar a mi lado ante cualquier circunstancia dándome la fuerza para continuar, por su apoyo incondicional, tiempo, consejos, paciencia, por confiar en mí, por siempre escucharme y cuidarme. Te agradezco infinitamente, eres mi todo y valoro enormemente el equipo que formamos. ¡Te amo!. Agradezco a la familia de mi novio por los momentos compartidos y compartir su cocina y cariño conmigo.

Mis directores de tesis, la Dra. Gabriela López Angulo y al Dr. Francisco Delgado Vargas, merecen mi más sincero agradecimiento por sus enseñanzas, disposición, apoyo, paciencia y comprensión durante este proceso. Por todo el tiempo invertido en la tesis y ensayos, por siempre estar atentos a mis dudas y por toda la ayuda que me han brindado.

A mi asesora MC. Yesmi Patricia Ahumada Santos, por su gran disposición de compartir su conocimiento, por sus consejos, enseñanzas, paciencia, por la ayuda otorgada en los ensayos y la revisión de este trabajo.

A la Dra. María Elena Báez Flores y del Dr. Rodolfo Bernal Reynaga por su tiempo, revisión y sugerencias para mejorar el escrito de esta tesis.

A mis mejores amigos que nos hemos acompañado por muchos años y son parte de mi vida, los considero mis hermanos, les agradezco por todo, su compañía, consejos, apoyo incondicional, son lo mejor Minerva Ramírez, Edgar Estrada y Ricardo

Mendoza. Hermosas, brillantes y valiosas personas, los aprecio mucho. Gracias por todas las experiencias vividas y por animarme.

A mis amigas de la vida que son mi familia elegida y estoy eternamente agradecida por siempre animarme, por su apoyo incondicional y consejos: Anahí Osuna, Estefania Gastelum, Diana Rosales, Lizeth Inzunza, Nancy Martínez (honey) y Martha Zamudio. ¡Las aprecio mucho!

A mi psicoanalista Paula Del Cioppo, por brindarme las herramientas necesarias para poder sobrellevar la presión, el estrés y los momentos difíciles.

A mi gatito güero hermoso, por ser mi fiel y mejor compañero de desvelo, eres muy valioso en mi vida.

A mis amigos del laboratorio de Productos Naturales, por su apoyo, confianza, consejos, por su buen sentido del humor y por hacer tan agradable el área de trabajo en el laboratorio: Dr. Eleazar, Fabricio, Mario, Katia, Yudith, Agustín, Dr. Esteban, Maritza, Alejandra, Abraham, Kimberly, Fabiola, Alma.

A mis amigos de la UISP, que los aprecio mucho, gracias por brindarme su confianza, apoyo y por todos los buenos momentos compartidos: Angeina, Arely, Karen, Verónica, Rodolfo, Esmeralda, Irving, MC. Patricia, Dr. Ricardo, Dr. Aldo, Edgardo, Ana María, Gilmar, Alejandro, Gladimar y a mis pupilos brillantes e inteligentes Guadalupe y Daniel.

Finalmente, mi más sincero agradecimiento a todas las personas que, de una u otra forma, han formado parte de mi vida y han contribuido a mi crecimiento personal y profesional. Su apoyo ha sido invaluable.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE CUADROS	xi
I. RESUMEN.....	1
II. ABSTRACT	2
III. INTRODUCCIÓN.....	3
IV. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
4.1. Enfermedades infecciosas farmacorresistentes	6
4.1.1. Principales cepas bacterianas resistentes.....	6
4.1.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina	6
4.1.1.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7
4.1.1.3. Enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC)	8
4.1.2. Mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos.....	9
4.2. Biopelículas bacterianas	10
4.2.1. Formación de biopelículas.....	10
4.2.2. Infecciones bacterianas asociadas a biopelículas	14
4.2.3. Resistencia que imparten las biopelículas hacia los antibióticos.....	16
4.3. Antecedentes.....	17
4.3.1. Plantas como fuente de compuestos antibiopelícula.....	17
4.3.2. Crassulaceae.....	20
4.3.3. El género <i>Echeveria</i>	21
4.3.4. Actividades biológicas de especies de <i>Echeveria</i>	25
4.3.5. Metabolitos secundarios en especies de <i>Echeveria</i>	28
4.3.6. Algunas especies de <i>Echeveria</i> en México.....	29
4.3.6.1. <i>Echeveria agavoides</i>	29
4.3.6.2. <i>Echeveria derenbergii</i>	32
4.3.6.3. <i>Echeveria secunda</i>	33
V. JUSTIFICACIÓN	34

VI.	HIPÓTESIS	35
VII.	OBJETIVOS	36
	7.1. Objetivo general	36
	7.2. Objetivos específicos	36
VIII.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
	8.1. Diseño experimental	37
	8.2. Materiales.....	37
	8.2.1. Material vegetal	37
	8.2.2. Material biológico.....	39
	8.2.2.1. Microorganismos	39
	8.2.3. Reactivos.....	39
	8.3. Metodología	40
	8.3.1. Elaboración de harinas.....	40
	8.3.2. Obtención de extractos metanólicos	40
	8.3.3. Actividad antibiopelícula.....	40
	8.3.3.1. Inhibición de la formación de biopelículas	40
	8.3.3.2. Evaluación de la erradicación de biopelículas	42
	8.3.3.3. Actividad metabólica en la inhibición de formación de biopelículas....	42
	8.3.3.4. Actividad metabólica en la erradicación de biopelículas.....	43
	8.3.3.5. Microscopía óptica de biopelículas	44
	8.3.4. Efecto del EM sobre la ECM de biopelículas.....	44
	8.3.4.1. Extracción de la matriz extracelular polimérica de biopelícula.....	44
	8.3.4.2. Cuantificación de polisacáridos	45
	8.3.4.3. Cuantificación de proteínas	45
	8.3.4.4. Cuantificación de ADNe.....	45
	8.4. Análisis estadístico.....	46
IX.	RESULTADOS	47
	9.1. Evaluación de la actividad antibiopelícula de extractos metanólicos de tres especies de <i>Echeveria</i> de México	47

9.1.1. Inhibición de la formación de biopelículas.....	47
9.1.1.1. <i>Echeveria secunda</i>	47
9.1.1.2. <i>Echeveria agavoides</i>	51
9.1.1.3. <i>Echeveria derenbergii</i>	56
9.1.2. Erradicación de biopelícula	60
9.1.2.1. <i>Echeveria secunda</i>	65
9.1.2.2. <i>Echeveria agavoides</i>	69
9.1.2.3. <i>Echeveria derenbergii</i>	74
9.1.3. Actividad metabólica en la inhibición de formación de biopelícula... 76	76
9.1.3.1. <i>Echeveria secunda</i>	76
9.1.3.2. <i>Echeveria agavoides</i>	80
9.1.3.3. <i>Echeveria derenbergii</i>	85
9.1.4. Actividad metabólica en la erradicación de biopelícula.....	85
9.1.4.1. <i>Echeveria secunda</i>	85
9.1.4.2. <i>Echeveria agavoides</i>	89
9.1.4.3. <i>Echeveria derenbergii</i>	93
9.2. Efecto del EM sobre la ECM de biopelícula	93
9.2.1. Cuantificación de polisacáridos	97
9.2.1.1. <i>Echeveria secunda</i>	97
9.2.1.2. <i>Echeveria agavoides</i>	97
9.2.2. Cuantificación de proteínas	97
9.2.2.1. <i>Echeveria secunda</i>	97
9.2.2.2. <i>Echeveria agavoides</i>	99
9.2.3. Cuantificación de ADNe	99
9.2.3.1. <i>Echeveria secunda</i>	99
9.2.3.2. <i>Echeveria agavoides</i>	99
X. DISCUSIÓN.....	100

10.1. Evaluación de la actividad antibiopelícula de extractos metanólicos de tres especies de <i>Echeveria</i> de México.....	100
10.1.1. Inhibición de la formación de biopelículas.....	100
10.1.2. Erradicación de biopelícula	107
10.1.3. Actividad metabólica en la biopelícula en la inhibición de su formación.....	111
10.1.4. Actividad metabólica en la erradicación de biopelícula.....	113
10.2. Efecto del EM sobre la ECM de biopelícula	115
10.2.1. Cuantificación de polisacáridos	115
10.2.2. Cuantificación de proteínas	117
10.2.3. Cuantificación de ADNe	119
XI. CONCLUSIONES.....	123
11.1 Conclusión general.....	123
11.2 Conclusiones específicas	123
XII. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO.....	126
XIII. SIGLAS Y ABREVIATURAS	141

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Representación esquemática de una formación de biopelículas.	<u>13</u>
2	Distribución del género <i>Echeveria</i> en México.	<u>23</u>
3	Especies de <i>Echeveria</i> : A) <i>E. agavoides</i> , B) <i>E. derenbergii</i> , C) <i>E. secunda</i> .	<u>31</u>
4	Diagrama de flujo correspondiente al efecto del extracto metanólico de tres especies <i>Echeveria</i> de México sobre la formación de biopelículas bacterianas y sobre los componentes de la matriz extracelular de biopelículas (polisacáridos, proteínas y ADNe).	<u>38</u>
5	Efecto del extracto metanólico de <i>Echeveria secunda</i> (125-15.625 µg/mL) en la inhibición de la formación de biopelícula de cepas Gram positivas <i>Staphylococcus aureus</i> .	<u>49</u>
6	Efecto del extracto metanólico de <i>Echeveria secunda</i> (1000-7.81 µg/mL) en la inhibición de la formación de biopelícula de cepas Gram negativas: (A) <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, (B) <i>Escherichia coli</i> M51-3 y (C) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.	<u>50</u>
7	Cubreobjetos mostrando el efecto del EM de <i>Echeveria secunda</i> en la inhibición de formación de biopelículas bacterianas.	<u>52</u>
8	Microscopia óptica (40X) del efecto del EM de <i>E. secunda</i> en la inhibición de formación de biopelículas bacterianas.	<u>53</u>
9	Efecto del extracto metanólico de <i>Echeveria agavoides</i> (500-7.81 µg/mL) en la inhibición de la formación de biopelícula de cepas Gram	<u>54</u>

positivas: (A) *Staphylococcus aureus* (3R, 4R y 5R) y (B) *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300 y ATCC 25923).

- 10 Efecto del extracto metanólico de *Echeveria agavoides* (1000-7.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en la inhibición de la formación de biopelícula de cepas Gram negativas: (A) *Escherichia coli* ATCC 25922, (B) *Escherichia coli* M51-3 y (C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. 55
- 11 Cubreobjetos mostrando el efecto del EM de *Echeveria agavoides* en la inhibición de formación de biopelículas bacterianas. 57
- 12 Microscopia óptica (40X) del efecto del EM de *E. agavoides* en la inhibición de formación de biopelículas bacterianas. 58
- 13 Efecto del extracto metanólico de *Echeveria derenbergii* (1000-125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en la inhibición de la formación de biopelícula de cepas Gram positivas *Staphylococcus aureus*. 59
- 14 Efecto del extracto metanólico de *Echeveria derenbergii* (1000-125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en la inhibición de la formación de biopelícula de cepas Gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*). 61
- 15 Cubreobjetos mostrando el efecto del EM de *Echeveria derenbergii* en la inhibición de formación de biopelículas bacterianas. 62
- 16 Microscopia óptica (40X) del efecto del EM de *E. derenbergii* en la inhibición de formación de biopelículas bacterianas. 63
- 17 Efecto del extracto metanólico de *Echeveria secunda* (250-31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en la erradicación de la biopelícula de cepas Gram positivas *Staphylococcus aureus*. 64
- 18 Efecto del extracto metanólico de *Echeveria secunda* (2000-15.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en la erradicación de la biopelícula de cepas Gram negativas: 66

(A) *Escherichia coli* ATCC 25922, (B) *Escherichia coli* M51-3 y (C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

- 19** Cubreobjetos mostrando el efecto del EM de *E. secunda* en la erradicación de biopelículas bacterianas preformadas. 67
- 20** Microscopia óptica (40X) del efecto del EM de *E. secunda* en la erradicación de las biopelículas bacterianas. 68
- 21** Efecto del extracto metanólico de *Echeveria agavoides* (1000-15.625 µg/mL) en la erradicación de la biopelícula de cepas Gram positivas: (A) *Staphylococcus aureus* (3R, 4R y 5R) y (B) *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300 y ATCC 25923). 70
- 22** Efecto del extracto metanólico de *Echeveria agavoides* (2000-15.625 µg/mL) en la erradicación de la biopelícula de cepas Gram negativas: (A) *Escherichia coli* ATCC 25922, (B) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y (C) *Escherichia coli* M51-3. 71
- 23** Cubreobjetos mostrando el efecto del EM de *E. agavoides* en la erradicación de biopelículas bacterianas preformadas. 72
- 24** Microscopia óptica (40X) del efecto del EM de *E. agavoides* en la erradicación de las biopelículas bacterianas. 73
- 25** Efecto del extracto metanólico de *Echeveria derenbergii* (2000-250 µg/mL) en la erradicación de la biopelícula de cepas Gram positivas *Staphylococcus aureus*. 75
- 26** Efecto del extracto metanólico de *Echeveria derenbergii* (2000-250 µg/mL) en la erradicación de la biopelícula de cepas Gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*). 77

- 27** Cubreobjetos mostrando el efecto del EM de *E. derenbergii* en la erradicación de biopelículas bacterianas preformadas. 78
- 28** Microscopia óptica (40X) del efecto del EM de *E. derenbergii* en la erradicación de las biopelículas bacterianas. 79
- 29** Efecto del extracto metanólico de *Echeveria secunda* (125-15.625 µg/mL) sobre la actividad metabólica en la biopelícula obtenida en ensayo de inhibición de la formación de biopelícula de cepas Gram positivas *Staphylococcus aureus*. 81
- 30** Efecto del extracto metanólico de *Echeveria secunda* (1000-7.81 µg/mL) sobre la actividad metabólica en la biopelícula obtenida en ensayo de inhibición de la formación de biopelícula de cepas Gram negativas: (A) *Escherichia coli* ATCC 25922, (B) *Escherichia coli* M51-3 y (C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. 82
- 31** Efecto del extracto metanólico de *Echeveria agavoides* (500-7.81 µg/mL) sobre la actividad metabólica en la biopelícula obtenida en ensayo de inhibición de la formación de biopelícula de cepas Gram positivas: (A) *Staphylococcus aureus* (3R, 4R y 5R) y (B) *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300 y ATCC 25923). 83
- 32** Efecto del extracto metanólico de *Echeveria agavoides* (1000-7.81 µg/mL) sobre la actividad metabólica en la biopelícula obtenida en ensayo de inhibición de la formación de biopelícula de cepas Gram negativas: (A) *Escherichia coli* ATCC 25922, (B) *Escherichia coli* M51-3 y (C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. 84
- 33** Efecto del extracto metanólico de *Echeveria derenbergii* (1000-125 µg/mL) sobre la actividad metabólica en la biopelícula obtenida en ensayo de inhibición de la formación de biopelícula de cepas Gram positivas *Staphylococcus aureus*. 86

- 34** Efecto del extracto metanólico de *Echeveria derenbergii* (1000-125 µg/mL) sobre la actividad metabólica en la biopelícula obtenida en ensayo de inhibición de la formación de biopelícula de cepas Gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*). 87
- 35** Efecto del extracto metanólico de *Echeveria secunda* (250-31.25 µg/mL) sobre la actividad metabólica en la biopelícula obtenida en ensayo de erradicación de la biopelícula de cepas Gram positivas *Staphylococcus aureus*. 88
- 36** Efecto del extracto metanólico de *Echeveria secunda* (2000-15.625 µg/mL) sobre la actividad metabólica en la biopelícula obtenida en ensayo de erradicación de la biopelícula de cepas Gram negativas: (A) *Escherichia coli* ATCC 25922, (B) *Escherichia coli* M51-3 y (C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. 90
- 37** Efecto del extracto metanólico de *Echeveria agavoides* (1000-15.62 µg/mL) sobre la actividad metabólica en la biopelícula obtenida en ensayo de erradicación de la biopelícula de cepas Gram positivas: (A) *Staphylococcus aureus* (3R, 4R y 5R) y (B) *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300 y ATCC 25923). 91
- 38** Efecto del extracto metanólico de *Echeveria agavoides* (2000-15.625 µg/mL) sobre la actividad metabólica en la biopelícula obtenida en ensayo de erradicación de la biopelícula de cepas Gram negativas: (A) *Escherichia coli* ATCC 25922, (B) *Escherichia coli* M51-3 y (C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. 92
- 39** Efecto del extracto metanólico de *Echeveria derenbergii* (2000-250 µg/mL) sobre la actividad metabólica en la biopelícula obtenida en ensayo de erradicación de la biopelícula de cepas Gram positivas *Staphylococcus aureus*. 94

- 40** Efecto del extracto metanólico de *Echeveria derenbergii* (2000-250 95
µg/mL) sobre la actividad metabólica en la biopelícula obtenida en
ensayo de erradicación de la biopelícula de cepas Gram negativas
(*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*).

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Especies bacterianas involucradas en infecciones asociada a biopelículas y superficies a las que se adhieren.	<u>15</u>
2 Metabolitos obtenidos de plantas que presentan actividad antimicrobiana.	<u>19</u>
3 Clasificación taxonómica del género <i>Echeveria</i> .	<u>22</u>
4 Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de los extractos metanólicos de tres especies de <i>Echeveria</i> .	<u>48</u>
5 Porcentaje de inhibición de formación de biopelícula de cepas Gram positivas y Gram negativas inducido por el extracto metanólico de las especies de <i>Echeveria</i> seleccionadas.	<u>96</u>
6 Efecto de los EMs de <i>Echeveria</i> sobre los componentes de la matriz extracelular polimérica de biopelícula de cepas Gram positivas y Gram negativas.	<u>98</u>

I. RESUMEN

Las bacterias han desarrollado resistencia a los antibióticos mediante diferentes mecanismos, dificultando el tratamiento efectivo de enfermedades infecciosas y representando un grave problema de salud pública en el mundo. La capacidad de las bacterias para formar biopelículas favorece el desarrollo de la resistencia, generando tolerancia bacteriana y supervivencia en condiciones ambientales adversas. Este contexto justifica la constante búsqueda de nuevas sustancias antimicrobianas. Al respecto, las plantas son una fuente importante de compuestos bioactivos, incluyendo antibacterianos eficientes contra patógenos resistentes a antibióticos. En particular, las plantas del género *Echeveria* presentan actividades biológicas que sustentan su potencial para tratar infecciones asociadas a bacterias resistentes. Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad de extractos metanólicos de tres especies de *Echeveria* (*E. agavoides*, *E. derenbergii* y *E. secunda*) de México contra la formación de biopelículas bacterianas y los componentes de la matriz extracelular de biopelículas (polisacáridos, proteínas y ADNe). Las especies de *Echeveria* se obtuvieron de viveros certificados por SEMARNAT localizados en diferentes estados de México. En la investigación se emplearon bacterias de interés clínico: cinco Gram positivas (*S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300, MRSA-03, MRSA-04, MRSA-05) y tres Gram negativas (*P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* M51-3). Las hojas de *Echeveria* se liofilizaron y extrajeron con metanol para preparar extractos metanólicos (EMs). El efecto de los EMs sobre la inhibición y erradicación de biopelículas bacterianas fue evaluado mediante el método de tinción con cristal violeta en microplaca y por microscopía óptica. La actividad metabólica en la biopelícula fue evaluada empleando XTT. En la matriz de la biopelícula se determinó el contenido de polisacáridos, proteínas y ADN extracelular (ADNe). Los EMs de las tres especies de *Echeveria* presentaron actividad antibiopelícula. *Echeveria secunda* y *E. agavoides* fueron las más efectivas en la inhibición de la formación de biopelículas, el EM de *Echeveria agavoides* (500-62.5 µg/mL) fue el mejor contra las MRSA (3R, 4R, 5R) con valores de inhibición de 68.10-100%; mientras que en la cepa ATCC 25923 indujo una inhibición del 89.21% a 62.5 µg/mL. En el ensayo de XTT, el EM de *E. agavoides* también presentó el mejor efecto inhibitorio de la actividad metabólica (81.65-100%) en las mismas cepas y concentraciones. El EM de *E. derenbergii* fue el único que erradicó la biopelícula preformada de las cepas *S. aureus* 4R y *P. aeruginosa* ATCC 27853; asimismo, disminuyó la viabilidad celular de la biopelícula preformada de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (27.91-63.44%) a 2000-250 µg/mL. Las especies de *E. secunda* y *E. agavoides* mostraron un buen efecto en la disminución del contenido de componentes de la matriz extracelular polimérica (ECM, por sus siglas en inglés) (polisacáridos, proteínas y ADNe) de la biopelícula, destacando *E. agavoides* con los siguientes valores: polisacáridos 100%, proteínas del 88.53 al 99.01% y ADNe de 13.82 a 100%. El análisis global indica que el EM de *E. agavoides* tiene el mayor potencial para desarrollar productos con actividad antibiopelícula, sugerimos que se debe a su contenido de flavonoides que actúan como inhibidores del QS.

(Palabras clave: *Echeveria*, biopelículas, matriz extracelular polimérica)

II. ABSTRACT

Bacteria have developed resistance to antibiotics through various mechanisms, making the effective treatment of infectious diseases difficult and posing a serious global public health problem. The ability of bacteria to form biofilms promotes the development of resistance, generating bacterial tolerance and survival in adverse environmental conditions. This context underscores the need for a continuous search for new antimicrobial substances. In this regard, plants are an important source of bioactive compounds, including efficient antibacterials against antibiotic-resistant pathogens. In particular, plants of the genus *Echeveria* exhibit biological activities that support their potential for treating infections associated with resistant bacteria. Therefore, the objective of this research is to evaluate the activity of methanolic extracts from three species of *Echeveria* (*E. agavoides*, *E. derenbergii*, and *E. secunda*) from Mexico against the formation of bacterial biofilms and the components of the biofilm extracellular matrix (ECM), *i.e.*, polysaccharides, proteins, and extracellular DNA (eDNA). The *Echeveria* species were obtained from SEMARNAT-certified nurseries in various states of Mexico. This study included bacterial pathogens of clinical interest: five Gram-positive strains (*S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300, MRSA-03, MRSA-04, and MRSA-05) and three Gram-negative strains (*P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922, and *E. coli* M51-3). The *Echeveria* leaves were freeze-dried, milled, and extracted with methanol to obtain the methanolic extracts (MEs). The effect of the MEs on the inhibition and eradication of bacterial biofilms was evaluated using the crystal violet staining method in microwell plates and optical microscopy. The metabolic activity in biofilms was determined by the XTT assay. The contents of polysaccharides, proteins, and eDNA in the biofilm matrix were also measured. The MEs of the three *Echeveria* species showed antibiofilm activity, with *E. secunda* and *E. agavoides* being the best inhibitors. The ME of *E. agavoides* (500-62.5 $\mu\text{g/mL}$) was particularly effective against the MRSA isolates (3R, 4R, and 5R), reaching inhibition values ranging from 68.10 to 100%, whereas the inhibition value against the ATCC 25923 strain was 89.21% at 62.5 $\mu\text{g/mL}$. In the XTT assay, the *E. agavoides* ME also showed the highest metabolic activity inhibition (81.65-100%) against the same strains and employing the same concentrations. Only the *E. derenbergii* ME induced the eradication of biofilms pre-formed by *S. aureus* 4R and *P. aeruginosa* ATCC 27853; additionally, it decreased the cellular viability of the biofilm pre-formed by *P. aeruginosa* ATCC 27853 (27.91-63.44%) at 2000-250 $\mu\text{g/mL}$. The MEs of *E. secunda* and *E. agavoides* also showed a significant effect in decreasing the ECM components, with *E. agavoides* being the most effective: polysaccharides (100%), proteins (88.53 to 99.01%) and eDNA (13.82 to 100%). This investigation showed that *E. agavoides* ME has the best potential for developing products with antibiofilm activity, likely due to its flavonoid content that acts as a QS inhibitor.

(Keywords: *Echeveria*, biofilms, extracellular polymeric matrix.)

III. INTRODUCCIÓN

Alexander Fleming descubrió la penicilina en 1928 y advirtió sobre los riesgos de la resistencia antimicrobiana (González-Mendoza y col., 2019). La predicción fue acertada y los primeros casos de resistencia a la penicilina se reportaron diez años después de iniciado su uso (González-Mendoza y col., 2019).

Los antibióticos son una de las principales herramientas para tratar enfermedades infecciosas bacterianas (Torres-Manrique, 2012). En el mundo, el incremento de resistencia bacteriana a los antibióticos es alarmante (Suasnavas y col., 2017). Por este motivo, la resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema de salud pública mundial que debe entenderse a profundidad; incentivando la búsqueda y desarrollo de alternativas antibacterianas factibles y eficientes (Torres-Manrique, 2012). En este sentido, la formación de biopelículas bacterianas es un factor de virulencia que contribuye significativamente al desarrollo de resistencia a antibióticos (Suasnavas y col., 2017). En 1683, Anton van Leeuwenhoek evidenció por primera vez la existencia de biopelículas al observar en un microscopio muestras del raspado de placa de sus propios dientes. Sin embargo, la investigación sobre biopelículas bacterianas inició en la década de 1970 (Vestby y col., 2020; Khan y col., 2021). Las biopelículas bacterianas son una matriz compleja donde se incrustan las bacterias y están formadas por diversas sustancias como proteínas, polisacáridos y ADN extracelular (ADNe) (Abebe, 2020). El microambiente en la biopelícula permite que las bacterias toleren condiciones ambientales adversas (*e.g.*, temperatura y pH extremos, alta salinidad) y la exposición a antibióticos (Abebe, 2020). Las biopelículas pueden formarse en superficies bióticas o abióticas debido a sus propiedades de adherencia;

por lo tanto, éstas pueden encontrarse en entornos alimentarios, médicos, industriales y naturales, representando un gran peligro en el ámbito sanitario y en la salud humana (Abebe, 2020). De esta manera, las biopelículas favorecen el desarrollo de infecciones crónicas y el incremento de resistencia bacteriana. En este sentido, aproximadamente el 80% de las infecciones crónicas se ha asociado a la presencia de biopelículas (Abebe, 2020).

La OMS ha estimado que para el año 2050 ocurrirán más muertes por resistencia a los antibióticos que por cáncer. Debido a este escenario, los países deben coordinarse y diseñar e implementar estrategias para prevenir y revertir el fenómeno de resistencia bacteriana, de lo contrario, muchas enfermedades infecciosas controlables y de fácil curación pueden volverse intratables (Pérez-Vega, 2018). En el año 2014, las principales causas de morbilidad en México fueron las enfermedades infecciosas (Soto-Estrada y col., 2016). Dentro de este grupo, las infecciones respiratorias agudas, intestinales por otros organismos y las mal definidas y la infección de vías urinarias son las tres principales causas de morbilidad (Soto-Estrada y col., 2016). La situación mundial de la resistencia antimicrobiana establece con claridad la necesidad de encontrar alternativas contra infecciones asociadas a estas bacterias. Al respecto, las plantas son una buena fuente de compuestos bioactivos (Suasnavas y col., 2017) y se ha demostrado que plantas del género *Echeveria* (Crassulaceae) presentan actividad antimicrobiana e inhibitoria de la formación de biopelículas (Reyes-Santiago y col., 2011). El género *Echeveria* agrupa un gran número de especies, la mayoría endémicas de México, considerándose el centro de mayor diversidad y endemismo en este grupo de plantas. Tradicionalmente, estas

plantas se han usado con fines ornamentales y medicinales (Reyes-Santiago y col., 2011). Recientemente, nuestro grupo de trabajo reportó la caracterización química-biológica de 20 especies de *Echeveria* de Sinaloa, presentando importantes actividades biológicas asociadas con el tratamiento/prevención de enfermedades crónico degenerativas e infecciosas, destacando la actividad antibacteriana con concentraciones mínimas inhibitorias (MICs, por sus siglas en inglés) de relevancia clínica, posiblemente asociada a su contenido de compuestos fenólicos (López-Angulo, 2016; Beltrán-Aguilar, 2020; Peinado-Beltrán, 2021). La presente investigación evaluó el efecto de extractos metanólicos de tres especies de *Echeveria* sobre la formación de biopelículas bacterianas y sobre los componentes de la matriz extracelular de biopelículas (polisacáridos, proteínas y ADN). Esto con la finalidad de establecer el potencial del género *Echeveria* para tratar enfermedades infecciosas mediante la inhibición o control de la formación de biopelículas bacterianas infecciosas. La información que se generó contribuye a darle valor agregado a las plantas en estudio.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Enfermedades infecciosas farmacorresistentes

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2020), la resistencia a los antimicrobianos se define como “la capacidad que tienen los microorganismos (e.g., bacterias, virus) de impedir que los antimicrobianos (e.g., antibióticos, antivíricos y antipalúdicos) actúen contra ellos. En consecuencia, los tratamientos habituales se vuelven ineficaces y las infecciones persisten y pueden transmitirse a otras personas”.

Actualmente, las enfermedades farmacorresistentes ocasionan aproximadamente 700,000 muertes al año en el mundo. Asimismo, la OMS estima que la principal causa de muerte para el año 2050 será provocada por cepas bacterianas resistentes a los antibióticos, superando a enfermedades crónico degenerativas como el cáncer y la diabetes (Chávez-Jacobo, 2020). En México, aproximadamente el 21% de los pacientes hospitalizados presentan infecciones asociadas a los cuidados de la salud, la neumonía es la más frecuente (33.2%), seguida de las infecciones de vías urinarias (24.6%), de infecciones en herida quirúrgica (15.5%) y de bacteriemia asociada a catéter (5.8%) (Rizo-Amézquita y Camargo, 2017).

4.1.1. Principales cepas bacterianas resistentes

4.1.1.1. *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina

Las infecciones con las cepas *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA, por sus siglas en inglés) son un problema de salud pública grave y de las más comunes en ambientes hospitalarios. Lo anterior a pesar de que MRSA se encuentra comúnmente en la piel o en la nariz de personas sanas. El MRSA puede invadir el

cuerpo y causar infecciones potencialmente mortales en los huesos, articulaciones, corazón y pulmones (NYU Langlone, 2024). Esta bacteria es resistente a los antibióticos más comunes como los β -lactámicos (e.g., penicilina, cefalosporinas y carbapenémicos) (García y col., 2019).

En décadas recientes se ha registrado a MRSA como uno de los principales patógenos bacterianos en el mundo, causando un amplio rango de enfermedades que varían en severidad y características epidemiológicas (Cervantes-García y col., 2015). La prevalencia de infecciones por MRSA difiere con la ubicación geográfica (Castañeda-Méndez y col., 2018). En el 2011, se reportaron en EE.UU. un 5.31% de infecciones adquiridas en la comunidad y 4.54% intrahospitalarias (Castañeda-Méndez y col., 2018). En el 2014 en Europa, el porcentaje de infecciones invasivas fue aproximadamente de 17.5%; mientras que en el este de Asia y el pacífico occidental se documentaron incidencias entre 2.3 y 69.1% (Castañeda-Méndez y col., 2018). En Latinoamérica, los valores son muy heterogéneos y varían del 6% en Centroamérica hasta 80% en Sudamérica (Castañeda-Méndez y col., 2018). Por otra parte, la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica de México ha reportado que el porcentaje de mortalidad en pacientes infectados con *S. aureus* varía de 5 a 70% (García y col., 2019). Asimismo, en hospitales generales, pediátricos, universitarios y de especialidades han reportado que *S. aureus* ocupó el tercer lugar en morbilidad y el cuarto lugar en mortalidad en el periodo de 1997 a 2003 (García y col., 2019).

4.1.1.2. *Mycobacterium tuberculosis*

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa crónica, causada por la bacteria *M. tuberculosis* (CENAPRECE, 2012). Suele transmitirse con mayor frecuencia por vía

aérea al momento de toser o estornudar (CENAPRECE, 2012). Existen factores de riesgo que incrementan la susceptibilidad a la tuberculosis: el VIH, la desnutrición, diabetes mellitus, persona con tratamiento con esteroides y situaciones que alteran el sistema inmunológico (CENAPRECE, 2012). Afecta principalmente los pulmones, aunque también puede afectar otros órganos (Instituto Nacional de Salud Pública, 2020).

Según la OMS, cada día fallecen casi 4,500 personas por tuberculosis y aproximadamente 30,000 contraen esta enfermedad prevenible y curable (Instituto Nacional de Salud Pública, 2020). En 2016, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) registró 12,458 muertes por tuberculosis en 14 países de América, de las cuales 2,569 fueron en México (Instituto Nacional de Salud Pública, 2020). Ese mismo año, el Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE) reportó 21,184 nuevos casos de tuberculosis a nivel nacional (Instituto Nacional de Salud Pública, 2020).

En México se han reportado más de 18,000 casos nuevos de tuberculosis anualmente, afectando en mayor porcentaje a hombres y al grupo etario entre 18 y 49 años (CENAPRECE, 2012). La migración, especialmente entre México y Estados Unidos, contribuye a la propagación global de la enfermedad (Orozco-Andrade y col., 2018).

4.1.1.3. *Enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC)*

Las ERC son altamente resistentes e incluyen patógenos que se encuentran en el tracto digestivo y el medio ambiente (e.g., *E. coli*, *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp. y *Shigella* spp.) (NYU Langlone, 2024). Las ERC afectan principalmente a pacientes en

hospitales y a aquellos que tienen sistemas inmunológicos comprometidos (NYU Langlone, 2024). En hospitales, las bacterias pueden ingresar al cuerpo a través de los dispositivos médicos como ventiladores, catéteres o procedimientos quirúrgicos (NYU Langlone, 2024). Estas bacterias pueden vivir en los intestinos sin causar enfermedades, pero la ingestión de comida o agua contaminada por ciertas cepas de enterobacterias puede causar intoxicación alimentaria o gastroenteritis, cuyos principales síntomas son vómitos y diarrea (NYU Langlone, 2024). Algunas veces, las bacterias gastrointestinales pueden invadir otros tejidos y ocasionar infecciones graves del tracto urinario, torrente sanguíneo o heridas (NYU Langlone, 2024). En México, la tasa de contaminación bacteriana (*e.g.*, *Escherichia* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. y *Serratia* spp.) del agua disponible en hospitales es alta, provocando que se incremente la probabilidad de infecciones nosocomiales (Rodríguez-Herrera, 2017).

4.1.2. Mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos

El uso masivo e inadecuado de antibióticos ha contribuido al aumento alarmante de resistencia bacteriana, incluso una cepa puede presentar diferentes mecanismos de resistencia para la misma familia de antibióticos (Alós, 2015). Entre los mecanismos de resistencia bacteriana se incluyen modificaciones enzimáticas (*e.g.*, mediante transferencias de grupos funcionales), alteraciones del sitio blanco del antibiótico (impide la unión del fármaco evitando que establezca su función), protección de la diana del antibiótico (la pared celular ayuda a proteger la diana del antibiótico), alteración en la permeabilidad celular, poros/bombas y formación de biopelículas (Varela y col., 2021).

4.2. Biopelículas bacterianas

Karygianni y col. (2020) definen a una biopelícula como “una comunidad estructurada de células microbianas firmemente adheridas a una superficie e incrustadas en una matriz compuesta de sustancias poliméricas extracelulares (SPE)”. Las SPE incluyen exopolisacáridos, ácidos nucleicos extracelulares (ADNe y ARNe), proteínas, lípidos y otras biomoléculas (Goel y col., 2021). En las biopelículas, el 90% corresponde a las SPE y menos del 10% a las células microbianas. El principal componente de las biopelículas es el agua (hasta un 97%), seguido de polisacáridos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Karygianni y col., 2020; Goel y col., 2021; Srinivasan y col., 2021).

Las biopelículas se adhieren a superficies bióticas o abióticas, tales como tejidos vivos, dispositivos clínicos domésticos, tuberías de agua industrial/potable, sistemas acuáticos naturales, entre otras (Goel y col., 2021). Además, la matriz de las biopelículas protege a los microorganismos del estrés ambiental (e.g., desecación, radiación ultravioleta, metales, antibióticos y agentes oxidantes) y del sistema inmunitario del hospedero (Goel y col., 2021). Diversas bacterias (Gram positivas y Gram negativas) causantes de infecciones mortales forman biopelículas: *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *M. tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Bacillus subtilis*, *Helicobacter pylori*, *Proteus vulgaris* y *Streptococcus viridans* (Karygianni y col., 2020).

4.2.1. Formación de biopelículas

El proceso de formación de biopelículas es complejo y progresivo. Inicialmente, la comunicación célula-célula activa la “detección de quórum” (QS, quorum sensing,

por sus siglas en inglés) provocando el aumento en la expresión de un conjunto de genes diferente al que presenta la forma planctónica de la misma bacteria (Goel y col., 2021; Srinivasan y col., 2021). En la formación de biopelículas, las bacterias detectan las condiciones de estrés ambiental y se adhieren a una superficie biótica o abiótica (**Figura 1**) (Goel y col., 2021; Srinivasan y col., 2021). La condición que desencadena la formación y el proceso de formación de biopelículas puede variar entre microorganismos (Goel y col., 2021; Srinivasan y col., 2021). En general, la formación de biopelículas implica cuatro pasos:

- 1) Adhesión inicial a la superficie biótica o abiótica. En esta etapa se producen dos tipos de unión (reversible e irreversible), primero las células planctónicas libres se adhieren reversiblemente a las superficies bióticas o abióticas a través de interacciones débiles como ácido-base, hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals y fuerzas electrostáticas, también los apéndices bacterianos como fimbrias, flagelos y pili ayudan en la adhesión de las células bacterianas planctónicas a la superficie.
- 2) Formación de microcolonias. Las bacterias se multiplican, producen pequeñas cantidades de matriz extracelular de biopelícula y forman microcolonias (aproximadamente 100 bacterias). En las microcolonias puede haber una sola especie bacteriana o varias, dependiendo de las condiciones de formación.
- 3) Maduración de la biopelícula. Las células se comunican entre si (QS) a través de la producción de moléculas autoinducidas que conducen a la activación de varios genes necesarios para la biosíntesis de las SPE que forman la

matriz extracelular de la biopelícula.

- 4) Dispersión de células planctónicas. Los nutrientes en la biopelícula se agotan cierto tiempo después del desarrollo completo de la biopelícula, mientras que los compuestos tóxicos se acumulan. En estas condiciones, algunas células de la biopelícula madura se desprenden y propagan en el medioambiente nuevamente como células planctónicas para comenzar un nuevo ciclo de formación de biopelícula (colonizar otras superficies) (Goel y col., 2021; Srinivasan y col., 2021).

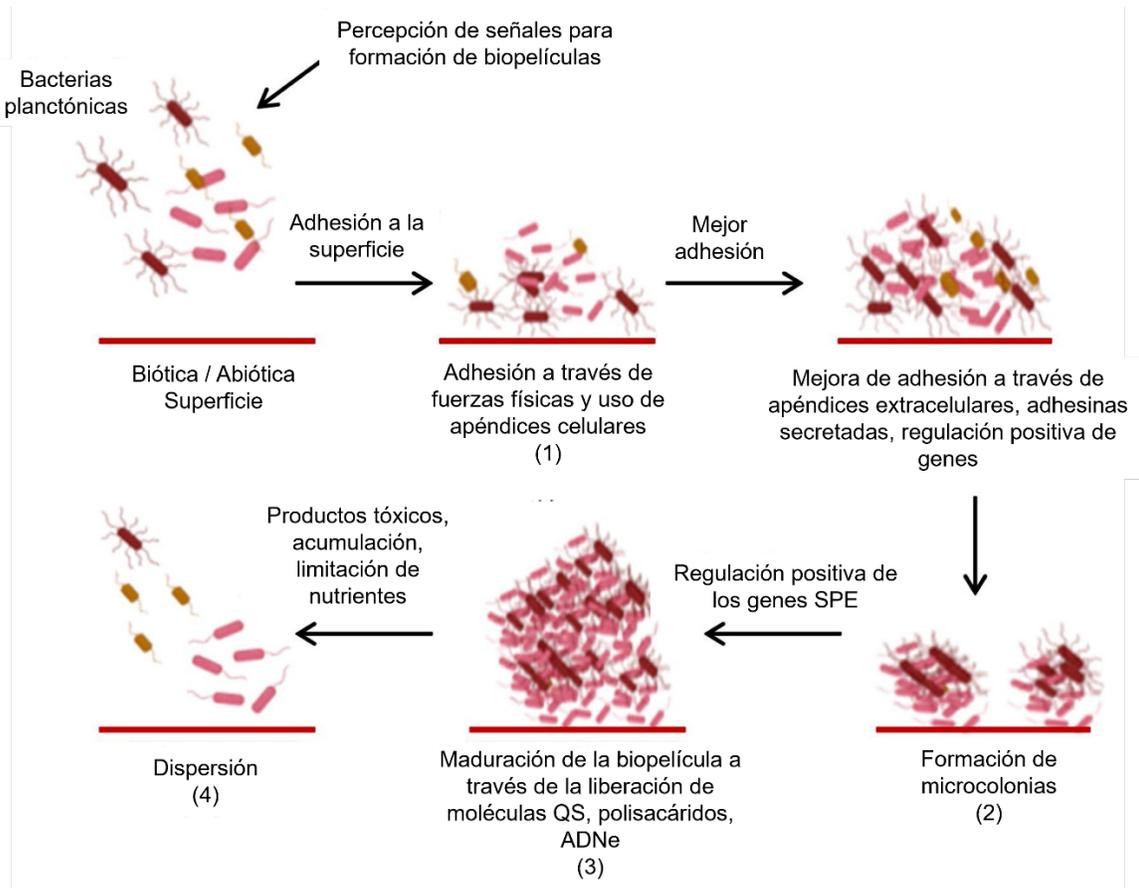


Figura 1. Representación esquemática de una formación de biopelículas. Adaptada de Goel y col. (2021).

4.2.2. Infecciones bacterianas asociadas a biopelículas

La formación de biopelículas bacterianas está implicada en el desarrollo de resistencia a antibióticos y se considera el principal factor de virulencia para una amplia variedad de microorganismos causantes de infecciones crónicas (Sharma y col., 2019; Abebe, 2020). Las infecciones del tracto urinario y del torrente sanguíneo se encuentran asociadas a la formación de biopelículas en dispositivos médicos implantables (e.g., válvulas cardíacas, catéteres, lentes de contacto, prótesis articulares, dispositivos intrauterinos y unidades dentales); sin embargo, estas infecciones solo pueden tratarse mediante la extracción de los implantes (Sharma y col., 2019; Abebe, 2020). Por otro lado, la formación de biopelículas en tejidos del hospedero se ha asociado a diversas infecciones crónicas: pulmonares en pacientes con fibrosis quística, osteomielitis, prostatitis, rinosinusitis, otitis media, heridas, infección recurrente del tracto urinario, endocarditis, periodontitis y caries dental (Sharma y col., 2019; Abebe, 2020). Aproximadamente el 80% de las enfermedades infecciosas crónicas están asociadas a biopelículas bacterianas y se conoce que los antibióticos de uso común son inadecuados para erradicarlas (Sharma y col., 2019; Abebe, 2020). En este contexto, las infecciones derivadas del contacto con instrumentos médicos y tejidos que presentan biopelículas han tenido un gran impacto en la salud humana y economía de la población (Sharma y col., 2019; Abebe, 2020). El **Cuadro 1** presenta algunas de las principales especies bacterianas involucradas en infecciones mediadas por biopelículas que causan enfermedades humanas (Sharma y col., 2019; Abebe, 2020).

Cuadro 1. Especies bacterianas involucradas en infecciones asociada a biopelículas y superficies a las que se adhieren.

Especies bacterianas	Infección/Enfermedades	Superficie
<i>Streptococcus mutans</i>	Caries dental Endocarditis	Superficie del diente Injertos vasculares
<i>Enterococcus faecalis</i>	Endocarditis Infección del conducto radicular	Válvulas cardíacas, catéteres urinarios Diente Catéteres venosos centrales
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Neumonía Infección del tracto respiratorio Infección del tracto urinario Absceso hepático piógeno	Pulmones Hígado
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Infección nosocomial Otitis media Fibrosis quística	Catéteres venosos centrales Oído medio Prótesis Pulmones Lentes de contacto
<i>Staphylococcus sp</i> (<i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Staphylococcus epidermidis</i>)	Infecciones nosocomiales Heridas crónicas Endocarditis Infecciones musculoesqueléticas Otitis media	Suturas Catéteres venosos centrales Derivaciones arteriovenosas Prótesis Superficies/piel profunda Válvulas cardíacas, huesos, oído medio
<i>Escherichia coli</i>	Prostatitis bacteriana Infección del tracto urinario Otitis media	Prótesis, tracto urinario, catéteres urinarios Oído medio
<i>Haemophilus influenzae</i>	Otitis media	Oído medio
<i>Burkholderia cepacia</i>	Fibrosis quística	Pulmones
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculosis	Pulmones

Adaptada de Sharma y col., (2019).

4.2.3. Resistencia que imparten las biopelículas hacia los antibióticos

Las biopelículas favorecen que las bacterias que las conforman desarrollen resistencia a antibióticos por varias razones: e.g., la penetración lenta o incompleta de los antibióticos en la biopelícula y el microambiente químico alterado dentro de la biopelícula (Sharma y col., 2019). La funcionalidad de las biopelículas, medida como su éxito para sobrevivir a condiciones extremas, depende su naturaleza multicelular (Sharma y col., 2019). Por lo tanto, diferentes autores plantean que la interrupción, en cualquier etapa, de la formación de la estructura multicelular de la biopelícula podría incrementar la eficacia de los antibióticos y el potencial del hospedero para vencer la infección, esto genera un nuevo enfoque para diseñar tratamientos alternativos contra los microorganismos resistentes a los antibióticos (Sharma y col., 2019).

Existen tres mecanismos que permiten que las biopelículas generen tolerancia y resistencia hacia los antibióticos (Hall y Mah, 2017; Goel y col., 2021), los cuales se describen a continuación. 1) Mala penetración de los antibióticos: los componentes de la matriz de SPE mantienen la estabilidad estructural de la biopelícula y actúan como barrera para varios antibióticos (Hall y Mah, 2017; Goel y col., 2021). Las SPE pueden disminuir la eficiencia de los antibióticos al inhibir su difusión, al formar complejos o degradarlos con enzimas presentes en la matriz de la biopelícula (Hall y Mah, 2017; Goel y col., 2021). 2) Tasa de crecimiento reducida: cuando un cultivo bacteriano se muere por falta de nutrientes ralentiza su crecimiento (Hall y Mah, 2017; Goel y col., 2021). La transición de las bacterias de la fase logarítmica a la fase estacionaria se ha relacionado con la susceptibilidad reducida a varios antibióticos, debido a que en el intervalo de esas fases las comunidades de biopelículas bacterianas se encuentran en

supervivencia bajo estrés por antibióticos. Sin embargo, al menos el 1% de las bacterias que se encuentran en la fase estacionaria se vuelven tolerantes a los antibióticos (Hall y Mah, 2017; Goel y col., 2021). La tasa de crecimiento de las bacterias se ve afectada por las diferencias en la disponibilidad de nutrientes y oxígeno dentro de las biopelículas, las bacterias de las capas más profundas de la biopelícula carecen de oxígeno en comparación con las bacterias presentes en la capa superior de biopelícula (Hall y Mah, 2017; Goel y col., 2021). Se sugiere que una tasa de crecimiento bacteriano lento confiere tolerancia, ya que los antimicrobianos son más efectivos contra las células en crecimiento rápido, esto se debe a que las bacterias que residen en lo profundo de la biopelícula experimentan una ausencia baja o total de oxígeno, causando que el crecimiento bacteriano se detenga, lo que hace que los antibióticos sean ineficaces (Hall y Mah, 2017; Goel y col., 2021). 3) Transferencia horizontal de genes: este mecanismo de resistencia a los antibióticos surge de la adquisición horizontal de genes, por ejemplo, por conjugación (Hall y Mah, 2017; Goel y col., 2021). Al respecto, las biopelículas son un microambiente que favorece este proceso: alta densidad celular, acumulación de elementos genéticos, presencia de ADNe y absorción de genes de resistencia (Hall y Mah, 2017; Goel y col., 2021).

4.3. Antecedentes

4.3.1. Plantas como fuente de compuestos antibiopelícula

Las plantas poseen una gran cantidad de compuestos con actividad antimicrobiana, la actividad *in vitro* de algunos es comparable a los antibióticos utilizados en clínica (Azüero y col., 2016). En la actualidad, extractos o compuestos de plantas se utilizan para el tratamiento de diferentes enfermedades, especialmente en

las que no existe un remedio adecuado (Azüero y col., 2016). El uso de muchas plantas se basa en aspectos etnofarmacológicos sin sustento científico (Azüero y col., 2016). Por lo tanto, el estudio científico de las plantas medicinales es indispensable para sustentar su uso tradicional, prevenir la toxicidad y para descubrir nuevos fármacos; el conocimiento desarrollado está encaminado al desarrollo de fitofármacos en beneficio a la comunidad por su menor costo, eficiencia y disponibilidad (Azüero y col., 2016). Lo anterior es válido para un gran número de plantas medicinales con actividad antibacteriana (Azüero y col., 2016).

Las plantas tienen una capacidad ilimitada de sintetizar metabolitos secundarios (e.g., alcaloides, terpinas, polifenoles, flavonoides, resinas, fenoles, aceites esenciales, entre otros) (**Cuadro 2**), un gran número de ellos presenta actividad antibacteriana y antibiopelícula (Domingo y López-Brea, 2003; Goel y col., 2021).

Aunque la capacidad para inhibir bacterias se determina como la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés), esto no correspondería a la concentración que puede prevenir o erradicar las biopelículas (Li y col., 2021). Sin embargo, si la Concentración Mínima Inhibitoria de Biopelículas (MBIC, por sus siglas en inglés) de un agente antimicrobiano es significativamente más alto que su MIC, esto indicaría que el agente antimicrobiano solo tiene actividad bactericida, mientras que, si el MBIC es más bajo que el MIC, entonces la actividad antibiopelícula no es bactericida y la acción bacteriostática está involucrada (Li y col., 2021).

Algunas plantas presentan buena capacidad antibiopelícula *in vitro*. El aceite esencial de cilantro (*Coriandrum sativum*) inhibió la formación de biopelícula en

Cuadro 2. Metabolitos obtenidos de plantas que presentan actividad antimicrobiana.

Metabolito	Compuesto	Planta	Actividad
Fenoles simples	Timol	<i>Thymus officinalis</i> (tomillo)	General
	Ácido antémico	<i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla)	<i>S. aureus</i> , <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium
	Terpenoide	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Salmonella</i>
Quinonas	Hipericina	<i>Hypericum perforatum</i> (hipérico)	VIH
Taninos		<i>Quercus rubra</i> (roble)	Bacterias y virus
		<i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto)	Virus
		<i>Melissa officinalis</i> (melisa)	
Cumarinas		<i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla)	Virus
Flavonas	Catequina	<i>Camellia sinensis</i>	<i>Shigella</i> , <i>Vibrio</i> , <i>S. mutans</i>
	Isoflavona	<i>Millettia thonningii</i>	<i>Schistosoma</i>
	Quercetina	<i>Quercus rubra</i> (roble)	
Alcaloides	Coca	<i>Erythroxylum coca</i> (coca)	Cocos grampositivos
	Piperina	<i>Piper nigrum</i>	Hongos, <i>Lactobacillus</i>
	Mescalina	<i>Lophophora williamsii</i> (peyote)	General

Modificada de Domingo y López-Brea (2003).

Stenotropomonas maltophilia y *Bacillus subtilis*, registrándose la mayor actividad contra *S. maltophilia* con valores MBIC₅₀=7.49 µL/mL y MBIC₉₀=7.96 µL/mL (Kačániová y col., 2020). Donde MBIC₅₀ es la concentración inhibitoria media de la formación de biopelícula (Kačániová y col., 2020). Emam y col. (2021) registraron la actividad del extracto de partes aéreas de *Lavandula coronopifolia* (0.02-0.16 mg/mL) contra la formación de la biopelícula de *P. aeruginosa*; la inhibición estuvo en el rango de 17 a 38%. Por otra parte, extractos acuosos de hojas de *Kalanchoe pinnata* inhibieron la formación de biopelículas de *E. coli* enteroagregativa (EAEC 042); la inhibición fue mayor a 50% a las concentraciones de 500 y 1000 µg/mL (Barboza y col., 2016). Asimismo, el extracto metanólico de hojas de *Graptopetalum paraguayense* (GP) inhibió la formación de biopelículas de MRSA hasta 50% a 1.6 mg/mL y hasta 90% a 2.5 mg/mL (Zaharieva y col., 2019). Los autores de este artículo sugieren que la actividad antibiopelícula *in vitro* se debe a los metabolitos secundarios (fenoles) presentes en el extracto. Por lo tanto, se requieren más estudios para identificar los compuestos responsables de la actividad antibiopelícula (Zaharieva y col., 2019). Asimismo, Osman y col. (2022) reportaron que el extracto metanólico (al 85%) de flores de *Kalanchoe laxiflora* mostró la mayor actividad antibiopelícula hacia *E. coli* con una MBIC₁₀₀ de 15.63 µg /mL.

4.3.2. Crassulaceae

La mayoría de las especies de la familia Crassulaceae son endémicas de México y se considera la más representativa del país. Las crasuláceas se caracterizan por sus hojas suculentas con gran capacidad para almacenar agua, permitiéndole desarrollarse en las regiones áridas del país, crecen habitualmente en zonas arenosas

o montañosas y entre las rocas (Toledo, 1988; Karwowska y col., 2015). Las plantas Crassulaceae tienen metabolismo CAM (metabolismo ácido de las crasuláceas, por sus siglas en inglés), la familia incluye 35 géneros y aproximadamente 1,500 especies. Basado en el número de especies, los géneros más importantes de crasuláceas son *Sedum* spp., *Crassula* spp., *Echeveria* spp. y *Kalanchoe* spp. (Reyes-Santiago y col., 2011; Eid y col., 2018). Es importante resaltar que varias especies de la familia Crassulaceae presentan importantes actividades biológicas/farmacológicas: e.g., antioxidante, antihiper glucémico, antimicrobiana, antiulcerogénica, citotóxica, anticancerígena, antiinflamatoria, antinociceptiva, hepatoprotectora, analgésica, antiartrítica, antipalúdica, antimutagénica, insecticida, antitrombolítica, antihipertensiva y miometrial. Además, las plantas Crassulaceae contienen una gran diversidad de compuestos: e.g., fenólicos (flavonoides, taninos), esteroides, triterpenoides, alcaloides y bufadienólidos (Reyes-Santiago y col., 2011; Eid y col., 2018).

4.3.3. El género *Echeveria*

El género *Echeveria* (Crassulaceae) (**Cuadro 3**) cuenta aproximadamente con 127 especies y 83% de ellas se restringen exclusivamente al territorio mexicano. Las especies de *Echeveria* son exclusivas de América, siendo México el centro de mayor diversidad y endemismo. La mayoría de las especies se desarrollan mejor en las zonas templadas del hemisferio norte (Reyes-Santiago y col., 2011).

Las especies de *Echeveria* se distribuyen en casi todos los estados de la República Mexicana (**Figura 2**), mostrando preferencia por sitios con afloramientos rocosos, riscos, laderas escarpadas, paredes más o menos verticales de cañadas y

Cuadro 3. Clasificación taxonómica del género *Echeveria*.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Saxifragales
Familia	Crassulaceae
Subfamilia	<u>Echeverioideae</u>
Género	<i>Echeveria</i>

Modificada de Reyes-Santiago y col. (2011).

DIVERSIDAD DE ECHEVERIAS EN MÉXICO

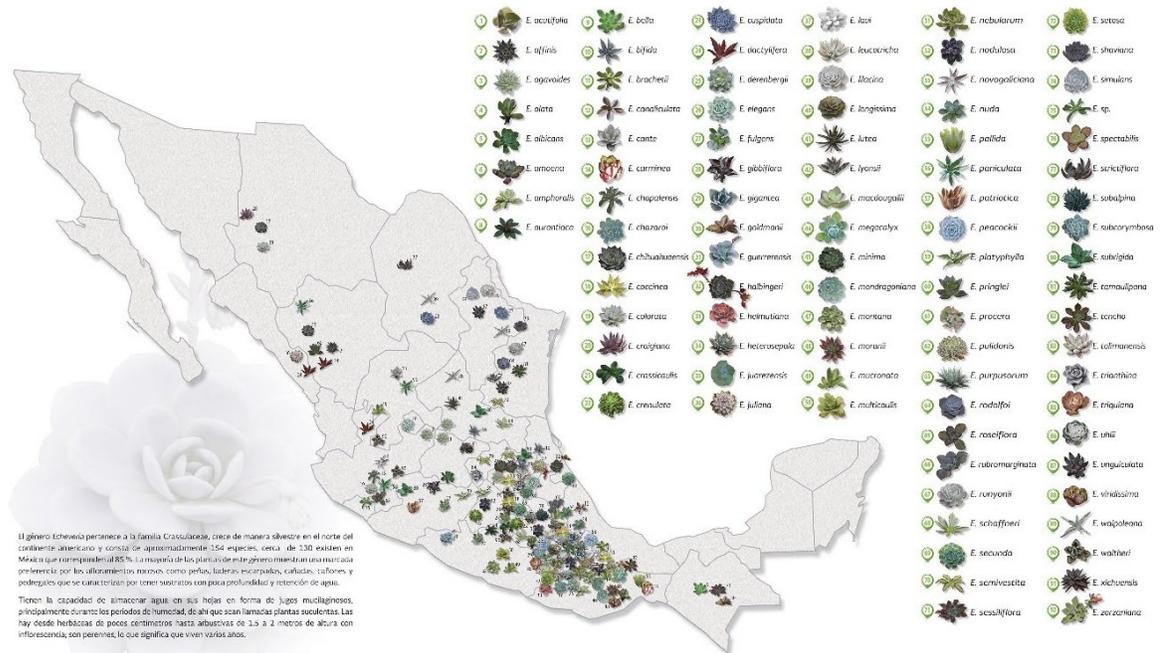


Figura 2. Distribución del género *Echeveria* en México. Mapa ilustrativo representando la distribución de algunas especies de *Echeveria*. La mayoría de las especies de *Echeveria* se distribuyen en el sureste del país. Adaptada del Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (2017).

cañones (Salgado-Gutiérrez, 2015). Las echeverias son plantas suculentas que tienen la capacidad de almacenar agua en sus hojas en forma de jugos mucilaginosos, principalmente durante los periodos de alta humedad (Salgado-Gutiérrez, 2015). Estas plantas reciben diferentes nombres: por ejemplo, conchita, rueda de la fortuna, oreja de burro, flor de piedra y siempreviva; según la lengua indígena local reciben los nombres de tememètla en náhuatl, tikií en mixteco, lixmazketu'ni en chontal de Oaxaca y dobié en zapoteco (Reyes-Santiago y col., 2011).

Las principales especies de *Echeveria* spp. se usan como plantas de ornato y en medicina tradicional (Reyes-Santiago y col., 2011). En la época navideña son utilizadas para decorar los nacimientos, desafortunadamente, cuando termina la época son desechadas a la basura (Reyes-Santiago y col., 2011). Algunas especies de *Echeveria* son cultivadas y muy apreciadas en jardinería dado su belleza, colores, inflorescencia atractiva (flores) y durabilidad de las hojas dispuestas en rosetas. Estas características han permitido que en años recientes su comercialización se haya convertido en una fuente importante de ingresos económicos (Reyes-Santiago y col., 2011). El uso de *Echeveria* spp. como plantas de ornato está registrado en países como Inglaterra, Estados Unidos de Norteamérica, Alemania y recientemente en Australia, Japón y Corea del Sur. Sin embargo, son escasos los viveros que cultivan y producen estas especies para posteriormente venderlas, siendo preocupante que México a pesar de contar con la mayor riqueza de especies en el género no se encuentre en las listas de países productores de echeverias, a pesar de contar con el material biológico y el clima apropiado para su propagación y cultivo (Reyes-Santiago y col., 2011).

Según el Códice de la Cruz-Badiano, las echeverias se han utilizado en medicina tradicional, desde la época prehispánica, para tratar diversos síntomas y padecimientos: e.g., dolor de cabeza, fiebre, heridas bucales, dolor de muela, infecciones bacterianas y enfermedades gastrointestinales. Actualmente, indígenas de la Mixteca oaxaqueña frotran sus dientes con hojas frescas de echeverias para limpiarlos (Reyes-Santiago y col., 2011).

4.3.4 Actividades biológicas de especies de *Echeveria*

Aunque algunos géneros de la familia Crassulaceae han sido ampliamente estudiados (e.g., *Kalanchoe*, *Sedum*, *Bryophyllum*), los estudios del género *Echeveria* son escasos. Delgado y col. (1999) demostraron la efectividad del uso de infusiones de *E. gibbiflora* para prevenir el embarazo, evaluaron el efecto de una fracción purificada del extracto acuoso crudo de *E. gibbiflora* en esperma de cobayo; mientras un estudio de microscopía de fluorescencia demostró que el extracto daña la membrana de espermias humanas (Reyes y col., 2002). El extracto metanólico *E. leucotricha* y dos de sus fracciones mostraron actividad antibacteriana (MIC = 20-200 µg/mL). La fracción clorofórmica presentó actividad antifúngica, mientras que extractos clorofórmicos y metanólicos tuvieron actividad antiparasitaria contra *Leishmania donovani* (Martínez Ruiz y col., 2013). Por otro lado, Lira-De León y col. (2014) reportaron débil actividad antifúngica del extracto metanólico de *E. acutifolia* contra *Fusarium solani*.

En cuanto a especies de *Echeveria* de Sinaloa, nuestro grupo de investigación ha trabajado en la caracterización químico-biológica de tres especies (*E. craigiana*, *E. kimnachii* y *E. subrigida*) reportando que los EM presentan buena actividad

antioxidante evaluada por diferentes métodos (*i.e.*, DPPH, ABTS, ORAC, decoloración de β -caroteno), fuerte actividad antimutagénica en el ensayo de Ames (*S. enterica* serovar Typhimurium YG-1024, 1-nitropireno como mutágeno), actividad inhibitoria de α -glucosidasa mejor que acarbosa y actividad antibacteriana de relevancia clínica con MICs menores a 100 μ g/mL (López-Angulo, 2016; López-Angulo y col., 2019). Asimismo, se demostró que extractos etanólicos de las mismas especies presentan actividad adaptogénica *in vivo* e inmunomoduladora *in vitro* (Heredia-Mercado, 2015).

Las especies de *Echeveria* de Sinaloa destacan por su notable actividad antibacteriana. Los EMs de *E. craigiana*, *E. kimnachii* y *E. subrigida* inhibieron el crecimiento de cuatro cepas Gram positivas (*S. aureus* ATCC 29213, *Streptococcus* grupo A-4 y *S. aureus* 3) y dos de las cuatro cepas Gram negativas (*E. coli* AO11 y *S. dysenteriae*) evaluadas, con MICs entre 15.63 y 1000 μ g/mL. *E. subrigida* fue la más activa presentando MICs de relevancia clínica (< 100 μ g/mL) (López-Angulo y col., 2019). El efecto antibacteriano reportado para especies de *Echeveria*, ubican al género como fuente de metabolitos activos con potencial uso antibacteriano (Martínez Ruiz y col., 2013; López-Angulo y col., 2019). En otro estudio, los EMs de estas especies de *Echeveria* mostraron actividad antibacteriana contra el aislado *E. coli* UTI-U7, destacando nuevamente *E. subrigida* (MIC = 5 mg/mL), seguida de *E. craigiana* (MIC = 25 mg/mL) y *E. kimnachii* (MIC = 50 mg/mL). El efecto del EM de *E. subrigida* se asocia a la presencia de metabolitos secundarios como flavonoides, cumarinas y taninos (Castañeda-Meléndrez y col., 2024). Además, estos EMs mostraron actividad contra seis patotipos de *E. coli* diarreogénicas (DEP, por sus siglas en inglés): enterotoxigénica (H10407), típica enteropatógena (E2348/69), enteroagregativa (042),

de adherencia difusa (C1845), enteroinvasiva (E11) y enterohemorrágica (EDL933) a concentraciones de 10 y 100 µg/mL tras 5 h de incubación, alcanzando el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano a 100 µg/mL (94.5 - 99.7 %). Incubaciones por 24 h con 100 µg/ml de EMs de *Echeveria* mostraron que *E. subrigida* tuvo el mejor efecto antibacteriano, considerándose el candidato más prometedor para eliminar las cepas DEP. Los compuestos identificados incluyen kaempferol-3-O-glucósido en *E. subrigida*, galato de epigallocatequina en *E. kimnachii* y lupeol en *E. craigiana* y *E. kimnachii*, los cuales han demostrado eficacia contra bacterias Gram positivas y negativas (Olivas-Quintero y col., 2022).

Con respecto a especies de *Echeveria* de México, nuestro grupo de investigación reportó que los EMs de 17 especies de *Echeveria* (*E. acutifolia*, *E. agavoides*, *E. amoena*, *E. colorata*, *E. derenbergii*, *E. difractens*, *E. elegans*, *E. gibbiflora*, *E. gigantea*, *E. longissima*, *E. penduliflora*, *E. procera*, *E. pulvinata*, *E. racemosa*, *E. secunda*, *E. shaviana* y *E. tencho*) presentaron alta actividad antioxidante evaluada por diferentes métodos (*i.e.*, DPPH, ABTS, ORAC) (Beltrán-Aguilar, 2020). La actividad antimutagénica de los EMs fue fuerte en el ensayo de Ames, con porcentajes de inhibición de la mutagenicidad de 72.2 - 87.7% para 16 de las especies. Mientras que en la actividad inhibitoria de α -glucosidasa (IC₅₀, µg/mL), los valores de los EMs (16.9-158.6) fueron hasta 230 veces menores que el de acarbosa (3894), excepto para *E. derenbergii* que fue mayor (5779.5 µg/mL) (Beltrán-Aguilar, 2020).

En otro estudio, Peinado-Beltrán (2021) evaluó la actividad antibacteriana de los EMs de las 17 especies de *Echeveria* estudiadas en nuestro laboratorio; 16 de las cuales presentaron actividad antibacteriana al menos contra seis de las diez cepas

evaluadas (MIC = 62.5 a 1000 µg/mL), resaltando el EM de *E. secunda*, el cual fue activo contra todas las cepas evaluadas (*S. aureus* ATCC 43300, *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* MRSA-1, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922, *S. dysenteriae*, *S. enterica* serovar Typhi, *E. coli* M51-3 y *E. coli* 17-UP) con MICs entre 62.5 a 1000 µg/mL. En contraste, *E. derenbergii* no presentó actividad hasta la concentración máxima probada. En general los EMs de las 16 especies de *Echeveria* presentaron mayor actividad contra las cepas Gram positivas, destacando *E. agavoides* y *E. amoena* con MICs menores (62.5 µg/mL) (Peinado-Beltrán, 2021). Por otra parte, las cepas Gram negativas fueron más resistentes ante los EMs de las especies de *Echeveria*, siendo *E. coli* ATCC 25922 la de mayor sensibilidad (Peinado-Beltrán, 2021).

4.3.5. Metabolitos secundarios en especies de *Echeveria*

Estudios fitoquímicos del género han reportado la presencia de fenólicos, alcaloides, flavonoides, lactonas, polisacáridos en *E. chihuahuensis* (Alvarado-Chávez, 2017); alcaloides y taninos en *E. venezuelensis* (Stevens y col., 1995); triterpenos, flavonoides, cardiotónicos, lactonas, alcaloides, saponinas, antraquinonas y taninos en *E. leucotricha* (Martínez Ruiz y col., 2013); así como terpenos, flavonoides, taninos, saponinas, cumarinas y antracénicos libres en las especies de Sinaloa (*E. craigiana*, *E. kimnachii* y *E. subrigida*) (López-Angulo y col., 2019). En cuanto a componentes específicos, en las especies de Sinaloa se han identificado terpenos/esteroles (*i.e.*, sitosterol, lupeol, germanicol, campesterol), flavonoides (*i.e.*, glucósidos de quercetina, isoramnetina y kaempferol) y taninos (dímeros a heptámeros de proantocianidinas) (López-Angulo, 2016; López-Angulo y col., 2019). También se han identificado en 17

especies de *Echeveria* (*E. acutifolia*, *E. agavoides*, *E. amoena*, *E. colorata*, *E. derenbergii*, *E. diffractens*, *E. elegans*, *E. gibbiflora*, *E. gigantea*, *E. longissima*, *E. penduliflora*, *E. procera*, *E. pulvinata*, *E. racemosa*, *E. secunda*, *E. shaviana* y *E. tencho*) ácidos fenólicos (*i.e.*, derivados de ácidos hidroxibenzoicos), flavonoides (*i.e.*, derivados de quercetina, isoramnetina, kaempferol, siringetina, laricitrina y miricetina) y taninos (*i.e.*, derivados de ácido gálico y proantocianidinas) (Beltrán-Aguilar, 2020). Los metabolitos más comunes en las 17 especies de *Echeveria* fueron ácido gálico, cianidín-O-hexósido, miricetín-O-hexósido, petunidín-O-hexósido, quercetín-O-hexósido y quercetín ramnósido (Beltrán-Aguilar, 2020).

4.3.6. Algunas especies de *Echeveria* en México

Las especies de *Echeveria* se agrupan en diferentes series: *E. agavoides* se agrupa a la serie Urceolatae, *E. derenbergii* a la serie Ciliatae y *E. secunda* a la serie Secundae (Kimnach, 2003b). Cada serie se caracteriza por tener características morfológicas especiales (*e.g.*, tamaño, forma, grosor y/o color de hojas y tallos), con distribución geográfica en diferentes regiones de México, crecen en diferentes condiciones climatológicas, tanto climas muy fríos como cálidos y presentan una gran variedad de formas y tamaños (Kimnach, 2003b; Reyes-Santiago y col., 2011; Reyes-Santiago, 2014).

4.3.6.1. *Echeveria agavoides*

Planta glabra, lisa, sin tricomas o cerdas en la epidermis, con hojas ovaladas de color verde oscuro con borde y puntas rojizas (**Figura 3A**). Posee un tallo corto, en forma de roseta con pocas hojas, amontonadas (Reyes-Santiago, 2014). Tiene una inflorescencia de tallo floral que mide hasta 40 cm de altura, habitualmente con dos

ramas, donde surgen de tres a ocho flores de hasta 12 mm de largo, de color roja en la parte de abajo y anaranjado en la de arriba; adentro amarillo mostaza (Reyes-Santiago, 2014). Sus frutos son de tipo polifolículo que se abren solos al madurar y que contienen más de 50 semillas cada uno (Reyes-Santiago, 2014). En cuanto a su origen se han encontrado en Guanajuato, Hidalgo y San Luis Potosí (Reyes-Santiago, 2014).

E. agavoides presenta actividad antioxidante ($\mu\text{mol ET/g EM}$) (ABTS = 4119.5, DPPH = 2662.8, y ORAC = 562.0), antimutagénica (77.16%), inhibitoria de α -glucosidasa ($\text{IC}_{50} = 33.7 \mu\text{g/mL}$) y antibacteriana, resultando más activa contra las cepas Gram positivas (*S. aureus* ATCC 43300, *S. aureus* ATCC 29213 y *E. faecalis* ATCC 29212) con MICs menores a 62.5 $\mu\text{g/mL}$ (Beltrán-Aguilar, 2020; Peinado-Beltrán, 2021). Entre sus componentes se han identificado flavonoides (quercetín ramnósido, quercetín-O-hexósido, miricetín-O-pentósido, laricitrín-O-HMG-O-hexósido, isoramnetín-O-hexósido y petunidín-O-hexósido) y el tanino ácido gálico (Beltrán-Aguilar, 2020; Peinado-Beltrán, 2021).



Figura 3. Especies de *Echeveria*: A) *E. agavoides*, B) *E. derenbergii*, C) *E. secunda*. Tomada de National Gardening Association (2022).

4.3.6.2. *Echeveria derenbergii*

Posee un tallo corto, ramificación múltiple, sus rosetas miden de 6 a 8 cm de diámetro (Kimnach, 2003a). Tiene hojas obovadas-cuneadas, mucronadas, 3 - 4 × 2 – 2.5 cm, 3 - 5 mm de espesor, verde claro, más o menos glauco, márgenes y puntas a menudo rojizas (**Figura 3B**). Presenta de dos a cuatro inflorescencias, cincino a 10 cm, simples, cada una con cinco o más flores, pedicelos erectos a 12 mm (Kimnach, 2003a). Sus flores son sépalos ascendentes a extendidos, subequales; corola erecta, miden de 12 - 15 mm de largo, amarilla, quillas y puntas rojizas (Kimnach, 2003a). Las rosetas de *E. derenbergii* cultivadas pueden alcanzar un diámetro de más de 10 cm y crecer más de lo que se describe en párrafos anteriores (Kimnach, 2003a). Se encuentra distribuida en Oaxaca (Kimnach, 2003a).

Echeveria derenbergii presenta actividad antioxidante ($\mu\text{mol ET/g EM}$; ABTS = 422.9, DPPH = 955.9 y ORAC = 1036.3), antimutagénica (81.27%) e inhibitoria de α -glucosidasa ($\text{IC}_{50} = 5779.5 \mu\text{g/mL}$), donde fue la única especie con menor actividad que el control positivo acarbosa ($\text{IC}_{50} 3.89 \pm 0.44 \text{ mg/mL}$) (Beltrán-Aguilar, 2020). Peinado-Beltrán (2021) demostró que el extracto metanólico no presentó actividad hasta la concentración máxima probada (1000 $\mu\text{g/mL}$). Entre sus componentes se han identificado flavonoides derivados de kaempferol (e.g., kaempferol-O-diacetilramnósido, kaempferol-O-ramnosil-O-(acetil) ramnósido), quercetina (quercetín-O-ramnosil-O-(diacetil) hexóxido y quercetín-O-cafeico) e isoramnetín-O-(cumaroil) hexóxido (Beltrán-Aguilar, 2020).

4.3.6.3. *Echeveria secunda*

Posee un tallo generalmente menor a 5 cm de largo y de aproximadamente 1 cm de diámetro, ramificado (Kimnach, 2003b). Sus hojas son cuneadas-obovadas, obtusas a truncadas, mucronadas, con márgenes delgados a obtusos, de color azul glauco (**Figura 3C**). El diámetro de su roseta es de 5 - 10 (máximo 15) cm. Posee inflorescencias en cincinos, 30 (máximo 40) cm, pedicelos 4 - 15 mm (Kimnach, 2003b). Sus flores presentan sépalos ascendentes y extendidos, corola pentagonal con lados acanalados, 5 - 6 mm de diámetro en la boca, de color rojo anaranjado a rosa intenso (Kimnach, 2003b). Se distribuye en Puebla, Tlaxcala, Jalisco, Querétaro, D.F, Estado de México (Kimnach, 2003b).

Echeveria secunda presenta actividad antioxidante ($\mu\text{mol ET/g EM}$; ABTS = 4126.5, DPPH = 3607.6 y ORAC = 946.6), antimutagénica (86.87%), inhibitoria de α -glucosidasa ($\text{IC}_{50} = 16.9 \mu\text{g/mL}$) y antibacteriana (MICs entre 62.5 a 1000 $\mu\text{g/mL}$) (Beltrán-Aguilar, 2020; Peinado-Beltrán, 2021). Cabe resaltar que *E. secunda* presentó la mayor actividad antioxidante por el método ABTS y DPPH, además fue la más activa en la actividad inhibitoria de α -glucosidasa y en la actividad antibacteriana (Beltrán-Aguilar, 2020; Peinado-Beltrán, 2021). Entre sus componentes se han identificado flavonoides (miricetín-O-hexósido, petunidín-O-hexósido, quercetín-3-O-(ramnosil)-7-O-HMG-hexósido, quercetín-O-hexósido, quercetín-O-ramnosil-O-(diacetil) hexósido y quercetín ramnósido) y taninos (galato de galocatequina y (epi)galocatequín-3-O-galato) (Beltrán-Aguilar, 2020; Peinado-Beltrán, 2021).

V. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, la resistencia bacteriana a los antibióticos es un grave problema de salud pública en el mundo. El desarrollo de la resistencia está asociado al uso inapropiado de antibióticos y a la capacidad de las bacterias para formar biopelículas, entre otros factores. Las biopelículas bacterianas constituyen un mecanismo de resistencia y virulencia y contribuyen a una alta persistencia de las infecciones bacterianas. Esto ha llevado a la existencia de cepas que son resistentes a los antibióticos disponibles comercialmente, dificultando el tratamiento de las infecciones que ocasionan. De esta manera, el desarrollo de alternativas terapéuticas es importante para atender las infecciones emergentes asociadas a bacterias multirresistentes. Al respecto, las plantas contienen un gran número de compuestos con actividad antibacteriana e inhibitoria de formación de biopelículas. En este sentido, especies del género *Echeveria* han presentado estas dos actividades y se han asociado con componentes químicos (e.g., ácidos fenólicos, flavonoides y taninos) que presentan un amplio espectro de actividades biológicas. En particular, nuestro grupo de trabajo ha demostrado distintas actividades biológicas (antioxidante, antimutagénica e inhibitoria de α -glucosidasa) de 17 especies de *Echeveria* de México, incluidas *E. agavoides*, *E. derenbergii* y *E. secunda* que presentaron valores altos de actividad, destacando una actividad antibacteriana de relevancia clínica posiblemente relacionada a su contenido de compuestos fenólicos. Al respecto, decidimos centrar nuestro estudio en especies de *Echeveria* debido a las prometedoras actividades biológicas observadas.

VI. HIPÓTESIS

Los extractos metanólicos de tres especies de *Echeveria* de México (*E. agavoides*, *E. derenbergii* y *E. secunda*) afectan la formación de biopelículas bacterianas y los componentes de la matriz extracelular (polisacáridos, proteínas y ADNe).

VII. OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

Evaluar la actividad de extractos metanólicos de tres especies de *Echeveria* (*E. agavoides*, *E. derenbergii* y *E. secunda*) de México contra la formación de biopelículas bacterianas y los componentes de la matriz extracelular de biopelículas (polisacáridos, proteínas y ADNe).

7.2. Objetivos específicos

7.2.1. Evaluar la actividad antibiopelícula de extractos metanólicos de tres especies de *Echeveria* en la inhibición de la formación y erradicación de biopelículas bacterianas.

7.2.2. Determinar el efecto de extractos metanólicos de tres especies de *Echeveria* sobre la actividad metabólica en biopelículas bacterianas.

7.2.3. Determinar el efecto de extractos metanólicos de tres especies de *Echeveria* en la cantidad de componentes de la matriz extracelular de biopelículas (polisacáridos, proteínas y ADNe).

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Diseño experimental

Para cumplir con los objetivos propuestos se evaluó la actividad antibiopelícula del extracto metanólico (EM) de tres especies de *Echeveria* (*E. agavoides*, *E. derenbergii* y *E. secunda*) de México (**Figura 4**). La evaluación incluyó el efecto en la inhibición de la formación de la biopelícula y de la erradicación de la biopelícula ya formada. Posteriormente, se determinó el efecto de los EMs en la actividad metabólica de biopelículas y se observó por microscopía su efecto. También, se determinó el efecto de los EMs sobre la composición de la matriz extracelular polimérica de biopelículas: polisacáridos, proteínas y ADN extracelular (ADNe).

8.2. Materiales

8.2.1. Material vegetal

Las especies de *Echeveria* (*E. agavoides*, *E. derenbergii* y *E. secunda*) fueron obtenidas de viveros certificados por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) de diferentes estados del país. Posteriormente fueron transportadas al Laboratorio de Química de Productos Naturales y procesadas para su análisis.

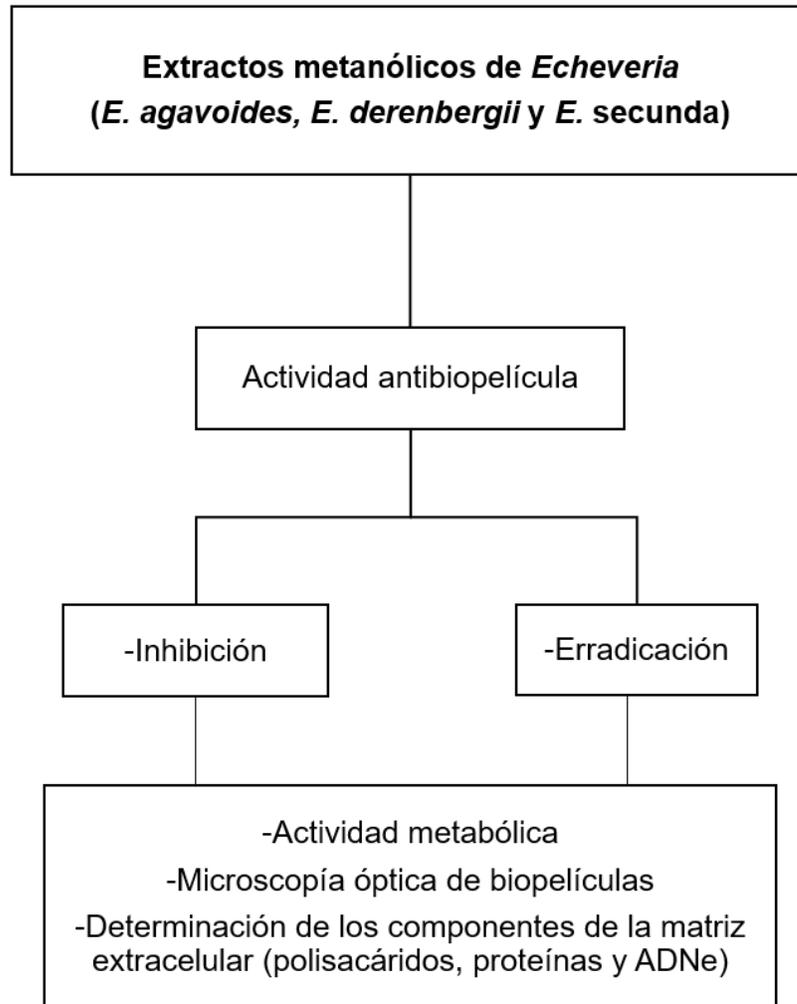


Figura 4. Diagrama de flujo correspondiente al efecto del extracto metanólico de tres especies *Echeveria* de México sobre la formación de biopelículas bacterianas y sobre los componentes de la matriz extracelular de biopelículas (polisacáridos, proteínas y ADN).

8.2.2. Material biológico

8.2.2.1. Microorganismos

En la investigación se utilizaron ocho bacterias patógenas humanas clasificadas previamente con diferente capacidad de formación de biopelícula.

Se emplearon cinco Gram positivas y tres Gram negativas, cuatro son cepas control ATCC (*S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *E. coli* ATCC 25922) y cuatro de origen clínico (*E. coli* M51-3, MRSA-03, MRSA-04, MRSA-05). Estas bacterias fueron proporcionadas por el cepario de la Unidad de Investigaciones en Salud Pública “Dra Kaethe Willms”, Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

8.2.3. Reactivos

Los reactivos utilizados fueron grado analítico. Se emplearon los siguientes medios de cultivo: agar de tripticaseína y soya (TSA) y caldo de soya tripticaseína (TSB) suplementado con 1% de glucosa. Los siguientes reactivos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.): dimetilsulfóxido (DMSO), cristal violeta, kit XTT, solución amortiguadora de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés), NaCl, isopropanol, fenol-ácido sulfúrico y reactivo de Bradford. Los solventes empleados fueron metanol (MeOH), etanol y agua destilada. Se utilizó como medio de resuspensión agua libre de nucleasas.

8.3. Metodología

8.3.1. Elaboración de harinas

Las hojas de las tres especies de *Echeveria*, provenientes de una poza de hojas de diferentes plantas para cada especie, fueron congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y secadas por liofilización (VirTis 25EL, VirTis Co. EE.UU.) (López-Angulo, 2016). Las muestras secas se molieron y tamizaron (malla no. 40). Las harinas fueron almacenadas en bolsas de plástico, manteniéndolas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ protegidas de la luz hasta su utilización (López-Angulo, 2016).

8.3.2. Obtención de extractos metanólicos

Los EMs fueron preparados a partir de harina de hojas liofilizadas de cada especie. Las harinas de *Echeveria* fueron extraídas por maceración con metanol (1:20 p/v, 3 días) y agitación constante (López-Angulo, 2016). El solvente se eliminó bajo presión reducida a 40°C en un rotavapor (BÜCHI Labortechnik AG, Suiza). Los extractos secos correspondientes a cada especie de *Echeveria* se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ protegidos de la luz hasta su uso (López-Angulo, 2016).

8.3.3. Actividad antibiopelícula

8.3.3.1. Inhibición de la formación de biopelículas

El potencial de inhibición de formación de biopelículas de los extractos se evaluó a una serie de concentraciones menores al valor MIC determinado previamente (Peinado-Beltrán, 2021). En la evaluación se empleó el método de tinción con cristal violeta en microplacas de poliestireno de 96 pozos con fondo plano (Dolatabadi y col., 2018). A partir de un cultivo bacteriano fresco (TSA/ 37°C /18-20h) se preparó una

suspensión bacteriana en solución salina 0.85% p/v, ajustando la turbidez al estándar 0.5 de McFarland (1×10^8 UFC/mL) (Dolatabadi y col., 2018). A partir de esta suspensión se realizó una dilución 1:100 con medio TSB + 1% glucosa para obtener el inóculo de prueba (1×10^6 UFC/mL). En cada pozo de la microplaca se colocaron 100 μ L de extracto a diferentes concentraciones y se añadieron 100 μ L del inóculo (Dolatabadi y col., 2018). Las microplacas se incubaron a 37°C por 24 h. Después de la incubación, se midió la densidad óptica (DO) de cada pozo a 620 nm para verificar el crecimiento bacteriano. Las bacterias planctónicas se eliminaron por decantación de la placa y tres lavados con 250 μ L de PBS (pH = 7.2, temperatura ambiente). Las placas se secaron en posición invertida a temperatura ambiente (15 min). Las bacterias adheridas a la placa se fijaron con 150 μ L de metanol por 15 min y se dejaron secar. Posteriormente, se tiñeron con 150 μ L de cristal violeta al 1% por 15 min, el colorante se retiró con una micropipeta y el exceso se eliminó con lavados con agua destilada estéril. La microplaca se dejó secar por 15 min en posición invertida; el colorante adherido a la biopelícula se eluyó añadiendo suavemente 150 μ L de etanol al 95% y se mantuvo a temperatura ambiente por 30 min sin agitación. Pasado el tiempo, se midió la densidad óptica de cada pozo a 540 nm (Dolatabadi y col., 2018). Los controles que se emplearon fueron los siguientes: de crecimiento, inóculo más solvente; blanco, medio más EM; y esterilidad, medio más solvente. Para cada combinación EM/cepa bacteriana se realizaron tres ensayos independientes con 4 réplicas por ensayo (Chaieb y col., 2011; Bazargani y Rohloff, 2016). Se calculó la media de los valores de DO, se le restó el valor de DO del control blanco y se calculó el porcentaje de inhibición comparado con el control de crecimiento como

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{DO control de crecimiento} - \text{DO muestra}}{\text{DO control de crecimiento}} \times 100 \quad (\text{Chaieb y col., 2011;}$$

Bazargani y Rohloff, 2016).

8.3.3.2. Evaluación de la erradicación de biopelículas

Para evaluar el efecto del extracto en una biopelícula formada, se produjo la biopelícula bacteriana por 24 h a 37 °C en microplacas de 96 pozos como se describió previamente, el contenido de los pozos se retiró con ayuda de una micropipeta (Dolatabadi y col., 2018). A la biopelícula formada se le añadió el extracto (100 µL) a diferentes concentraciones y la microplaca se incubó a 37 °C por 24 h. Se procedió al lavado, tinción con cristal violeta y elución de biopelículas (Dolatabadi y col., 2018). Para cada combinación EM/biopelícula bacteriana se realizaron tres ensayos independientes con 4 réplicas por ensayo. Se calculó la media de los valores de DO, se le restó el valor de DO del control blanco de los valores de DO obtenidos y se calculó el porcentaje de erradicación comparado con el control de crecimiento como

$$\% \text{ de erradicación} = \frac{\text{DO control de crecimiento} - \text{DO muestra}}{\text{DO control de crecimiento}} \times 100 \quad (\text{Mohammadi y col., 2019}).$$

En este ensayo se utilizaron los mismos controles indicados en la sección previa.

8.3.3.3. Actividad metabólica en la inhibición de formación de biopelículas

La actividad metabólica de las biopelículas formadas en ausencia y presencia de los extractos se determinó empleando el ensayo de reducción XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida) (Costa y col., 2017). Un vial de la mezcla XTT-PMS 1% (5 mg) se reconstituyó en 5 mL de PBS 1% para obtener la solución a 1 mg/mL, la solución se almacenó a -20 °C hasta su uso. Se inició formando las biopelículas como se describió anteriormente y se lavaron 3 veces con 250 µL de

PBS para eliminar las bacterias no adheridas (Costa y col., 2017). Los controles empleados fueron de crecimiento (inóculo más solvente), blanco (medio más extracto) y de esterilidad (medio más solvente). Después de secar, a cada pozo de la placa se añadieron 100 μ L de PBS 1% y 20 μ L de la solución XTT-PMS 1%. Las placas fueron incubadas en la oscuridad a 37 °C por 3 h y la absorbancia de la mezcla de reacción se leyó a 492 nm (Costa y col., 2017). El porcentaje de inhibición de la viabilidad de biopelículas se calculó con los valores medios de las lecturas de DO usando la ecuación $\% \text{ de inhibición de viabilidad} = \frac{\text{DO control de crecimiento} - \text{DO muestra}}{\text{DO control de crecimiento}} \times 100$. Los experimentos se realizaron en tres ensayos independientes con cuatro réplicas por ensayo (Costa y col., 2017).

8.3.3.4. *Actividad metabólica en la erradicación de biopelículas*

Para evaluar la actividad metabólica en la erradicación de biopelículas, se produjo la biopelícula bacteriana en microplacas de 96 pozos durante 24 h a 37 °C, siguiendo el procedimiento descrito previamente, el contenido de los pozos se retiró con ayuda de una micropipeta (Dolatabadi y col., 2018). A la biopelícula formada se le añadieron 100 μ L de extracto a diferentes concentraciones y la microplaca se incubó nuevamente a 37 °C por 24 h. Posteriormente, se procedió al lavado con PBS, añadiendo 100 μ L de PBS 1% y 20 μ L de la solución XTT-PMS 1% a cada pozo, como en la sección previa (Costa y col., 2017). Las placas se incubaron en la oscuridad a 37 °C durante 3 h y la absorbancia de la mezcla de reacción se leyó a 492 nm (Costa y col., 2017). Se emplearon los mismos controles que en la metodología de actividad metabólica en inhibición y los experimentos se realizaron en tres ensayos independientes con cuatro réplicas por ensayo (Costa y col., 2017). El porcentaje de

erradicación de la viabilidad de biopelículas se calculó con los valores medios de las lecturas de DO utilizando la ecuación *% de erradicación de viabilidad* =
$$\frac{\text{DO control de crecimiento} - \text{DO muestra}}{\text{DO control de crecimiento}} \times 100$$
 (Costa y col., 2017).

8.3.3.5. Microscopía óptica de biopelículas

El efecto de los extractos sobre la inhibición y erradicación de las biopelículas bacterianas se observó bajo un microscopio óptico. En el fondo de placas de poliestireno de 24 pozos se colocaron cubreobjetos redondos de vidrio estériles, se adicionó medio TSB + 1% glucosa, algunos pozos tenían extracto y otros no, y se inocularon con las cepas evaluadas (Ali y col., 2016; Kannappan y col., 2017; Qais y col., 2019). Las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C y las biopelículas adheridas a los cubreobjetos se sometieron al mismo proceso de lavado y tinción previamente descrito. La visualización de las biopelículas se hizo a 40X (Ali y col., 2016; Kannappan y col., 2017; Qais y col., 2019).

8.3.4. Efecto del EM sobre la ECM de biopelículas

8.3.4.1. Extracción de la matriz extracelular polimérica de biopelícula

A partir de un cultivo bacteriano fresco (TSA/37°C/18-20 h) se preparó una suspensión bacteriana en solución salina (0.85% p/v), ajustando su turbidez al estándar 0.5 de McFarland (1×10^8 UFC/mL) (Chiba y col., 2015). Posteriormente, para preparar el inóculo de prueba (1×10^6 UFC/mL), en tubos cónicos (15 mL) se mezclaron 9.9 mL de medio TSB + 1% glucosa con 0.1 mL de la suspensión bacteriana (dilución 1:100); la mezcla se incubó a 37°C/24 h sin agitación, se centrifugó (6000 g/15 min/ 25°C), se descartó una parte del sobrenadante y el resto se transfirió a viales

Eppendorf de 1.5 mL. Posteriormente, la mezcla se centrifugó nuevamente (8000 g/10 min/ 25°C) y el sobrenadante se descartó. Para extraer los componentes de la ECM de biopelícula, la pastilla se resuspendió en 100 µL NaCl 1.5 M. Las suspensiones se centrifugaron (5000 g/10 min/ 25°C) y los sobrenadantes se transfirieron a un nuevo vial (1.5 mL) como fracciones de la ECM (Chiba y col., 2015).

8.3.4.2. Cuantificación de polisacáridos

El contenido de polisacáridos en las fracciones de la ECM se determinó por el método colorimétrico de DuBois, empleando placas de microtitulación de 96 pocillos (Minich y col., 2022). Brevemente, 20 µL de muestra, 20 µL de fenol al 5 % y 100 µL de H₂SO₄ se mezclaron e incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. El desarrollo de color se midió en un lector de microplaca (Multiskan Bichromatic, Fisher Scientific, USA) a 492 nm (Minich y col., 2022).

8.3.4.3. Cuantificación de proteínas

El contenido de proteínas en las fracciones de matriz extracelular se determinó mediante el método de Bradford, empleando placas de microtitulación de 96 pocillos (Minich y col., 2022). En los pocillos se mezclaron 20 µL de ECM con 180 µL de reactivo de tinción de Bradford (Bio- Rad). La mezcla se incubó durante 5 min y se midió la absorbancia (595 nm) con un lector de microplaca (Multiskan Bichromatic, Fisher Scientific, USA) (Minich y col., 2022).

8.3.4.4. Cuantificación de ADNe

El ADNe se extrajo mediante una modificación del procedimiento descrito por Chiba y col. (2015). Para determinar la cantidad de ADNe extraído, el ADNe se purificó

de acuerdo con lo reportado por Green y Sambrook (2017) con algunas modificaciones; volúmenes iguales (90 μ L) de ADNe e isopropanol frío (80%) se mezclaron y la mezcla se almacenó a -80 °C durante el fin de semana. Posteriormente, la muestra se centrifugó (10 min/10000 rpm/4°C), se decantó cuidadosamente el sobrenadante y la muestra se centrifugó nuevamente (10 min/10000 rpm/4°C) para desechar el sobrenadante restante. La pastilla de ADNe se resuspendió en 10 μ L de agua libre de nucleasas (Green y Sambrook, 2017). La concentración y pureza del ADN purificado se determinó espectrofotométricamente mediante la relación de absorbancia A_{260}/A_{280} utilizando el equipo NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific) (Chiba y col., 2015).

8.4. Análisis estadístico

Las mediciones se realizaron por cuadruplicado y se expresaron como la media \pm la desviación estándar (SD). Los resultados se analizaron mediante ANOVA de dos vías, utilizando el programa GraphPad Prism v. 8.1 (software GraphPad Prism®, Inc., EE. UU.). Siendo los factores y niveles los siguientes: ocho cepas (*S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* M51-3, MRSA-03, MRSA-04 y MRSA-05) y cuatro concentraciones de cada extracto; las concentraciones varían y son menores al valor MIC de significancia, 1/2, 1/3 y 1/4. Las diferencias estadísticas se establecieron usando un nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

IX. RESULTADOS

9.1. Evaluación de la actividad antibiopelícula de extractos metanólicos de tres especies de *Echeveria* de México

9.1.1. Inhibición de la formación de biopelículas

Nuestro grupo de investigación previamente determinó la MIC para los EMs de tres especies de *Echeveria* de México: *E. secunda*, *E. agavoides* y *E. derenbergii* (Peinado-Beltrán, 2021) (**Cuadro 4**). En la inhibición de formación de biopelículas se evaluaron concentraciones inferiores a la MIC.

9.1.1.1. *Echeveria secunda*

El EM de *E. secunda* inhibió la formación de biopelículas de las cepas Gram positivas de *S. aureus*, el efecto sólo fue significativo a las dos concentraciones más altas (125 y 62.5 µg/mL) para las cepas ATCC 43300, 3R, 4R y 5R (% inhibición = 46.80-88.65%) y en la cepa ATCC 25923 el efecto no fue significativo (**Figura 5**). Las cepas de *S. aureus* son clasificadas como formadoras de biopelícula moderadas y débiles. Por otro lado, el efecto del EM de *E. secunda* sobre las bacterias Gram negativas dependió de la cepa: *E. coli* ATCC 25922 es formadora débil de biopelícula y el EM indujo valores de inhibición significativos (59.09-100%) (**Figura 6A**). El aislado clínico *E. coli* M51-3 se clasifica como no formador de biopelícula y el EM de *E. secunda* (500 µg/mL-125 µg/mL) mostró efecto inhibitorio (**Figura 6B**). En relación con la cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853, la inhibición se registró sólo a 500 µg/mL y a

Cuadro 4. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de los extractos metanólicos de tres especies de *Echeveria*.

		MIC (µg/mL)								
		Gram-positivas				Gram-negativas				
Especies de	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>						
<i>Echeveria</i>	ATCC 43300	MRSA-03	MRSA-04	MRSA-05	MRSA-05	ATCC 25923		ATCC 25922	ATCC 27853	M51-3
<i>E. secunda</i>	125	125 ^a	62.5	500	1000					
<i>E. agavoides</i>	62.5	500 ^a	500 ^a	500 ^a	500 ^a	62.5 ^a	62.5 ^a	62.5	125	>1000 ^b
<i>E. derenbergii</i>	>1000 ^b	>1000 ^b								

^a Valor MIC no evaluado. El valor MIC considerado fue el obtenido para las bacterias evaluadas pertenecientes al mismo género y especie y con características de resistencia similares.

^b No se obtuvo el valor MIC hasta 1000 µg/mL, considerándose esta concentración como subinhibitoria.

Modificada de Peinado-Beltrán (2021).

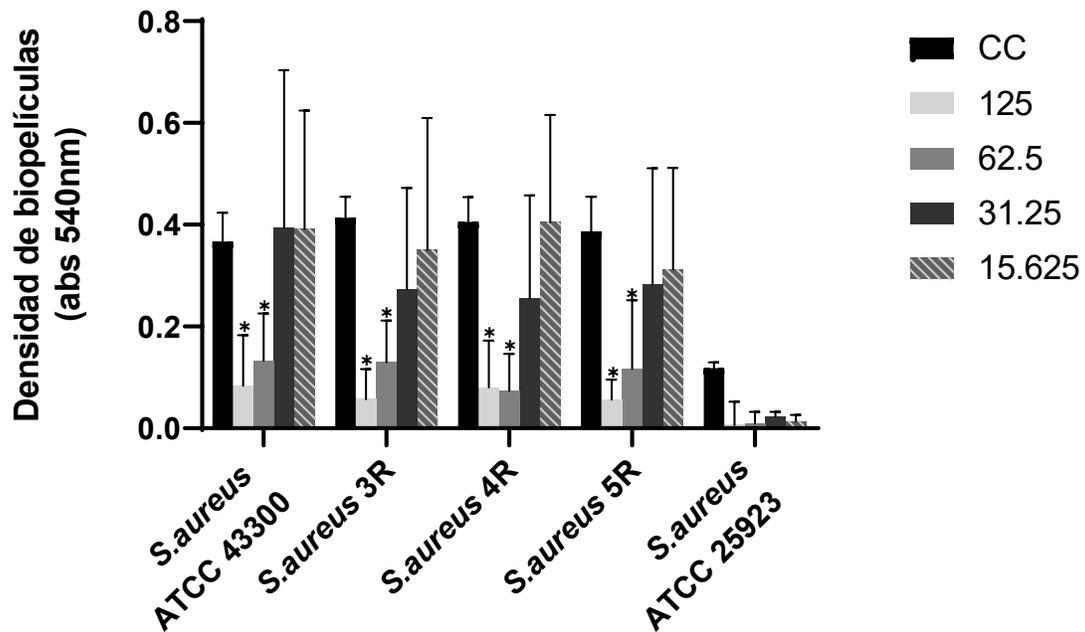


Figura 5. Efecto del extracto metanólico de *Echeveria secunda* (125-15.625 $\mu\text{g/mL}$) en la inhibición de la formación de biopelícula de cepas Gram positivas *Staphylococcus aureus*. La gráfica muestra la densidad óptica (DO), media \pm desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes con cuatro réplicas. * Diferencias significativas respecto al grupo control (CC), aplicando la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

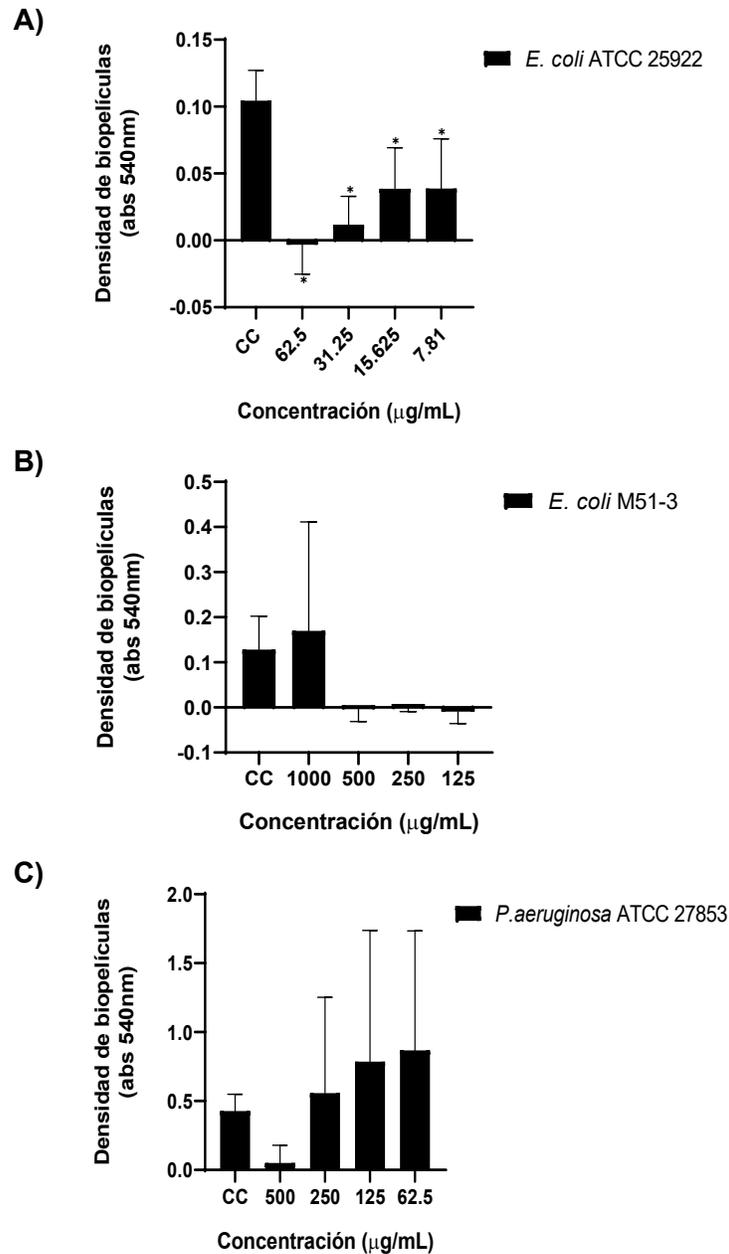


Figura 6. Efecto del extracto metanólico de *Echeveria secunda* (1000-7.81 µg/mL) en la inhibición de la formación de biopelícula de cepas Gram negativas: (A) *Escherichia coli* ATCC 25922, (B) *Escherichia coli* M51-3 y (C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Las gráficas muestran valores de densidad óptica (DO), media ± desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes con cuatro réplicas. * Diferencias significativas respecto al grupo control (CC), aplicando la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

concentraciones menores se registró un incremento, en ambos casos el efecto fue no significativo (**Figura 6C**).

La observación microscópica (40X) de las biopelículas corroboró los resultados cuantitativos registrados en el EM de *E. secunda* (**Figura 7 y 8**). El efecto inhibitorio del EM de *E. secunda* sobre la formación de biopelícula con las cepas Gram positivas de *S. aureus* incrementa a mayores concentraciones y disminuye a bajas concentraciones del EM. En el caso, de las bacterias Gram negativas, en las cepas de *E. coli* ATCC 25922 y M51-3 (débil y no formadora de biopelícula), el EM presentó un leve efecto de inhibición, por el contrario, el EM no presentó un efecto de inhibición en la cepa *P. aeruginosa* (formadora fuerte de biopelícula) (**Figura 8**).

9.1.1.2. *Echeveria agavoides*

El EM de *E. agavoides* inhibió la formación de biopelículas en las cepas Gram positivas de *S. aureus* (clasificadas como moderadas y débil formadoras de biopelícula). El efecto fue significativo en todas las concentraciones del EM evaluadas (500-62.5 $\mu\text{g/mL}$) para las cepas 3R, 4R y 5R con un rango de inhibición del 68.10 al 100% (**Figura 9A**). En la cepa de *S. aureus* ATCC 43300 el efecto del EM fue significativo a las concentraciones de 62.5 $\mu\text{g/mL}$ (71.49%) y 31.25 $\mu\text{g/mL}$ (39.58%) y en la cepa ATCC 25923 el efecto solo fue significativo a la concentración más alta (62.5 $\mu\text{g/mL}$) con un porcentaje de inhibición del 89.21% (**Figura 9B**).

En relación con las cepas Gram negativas, el efecto inhibitorio del EM sobre *E. coli* ATCC 25922 (formador débil de biopelícula) resultó estadísticamente significativo a todas las concentraciones (62.5 - 7.81 $\mu\text{g/mL}$) con un porcentaje de inhibición que

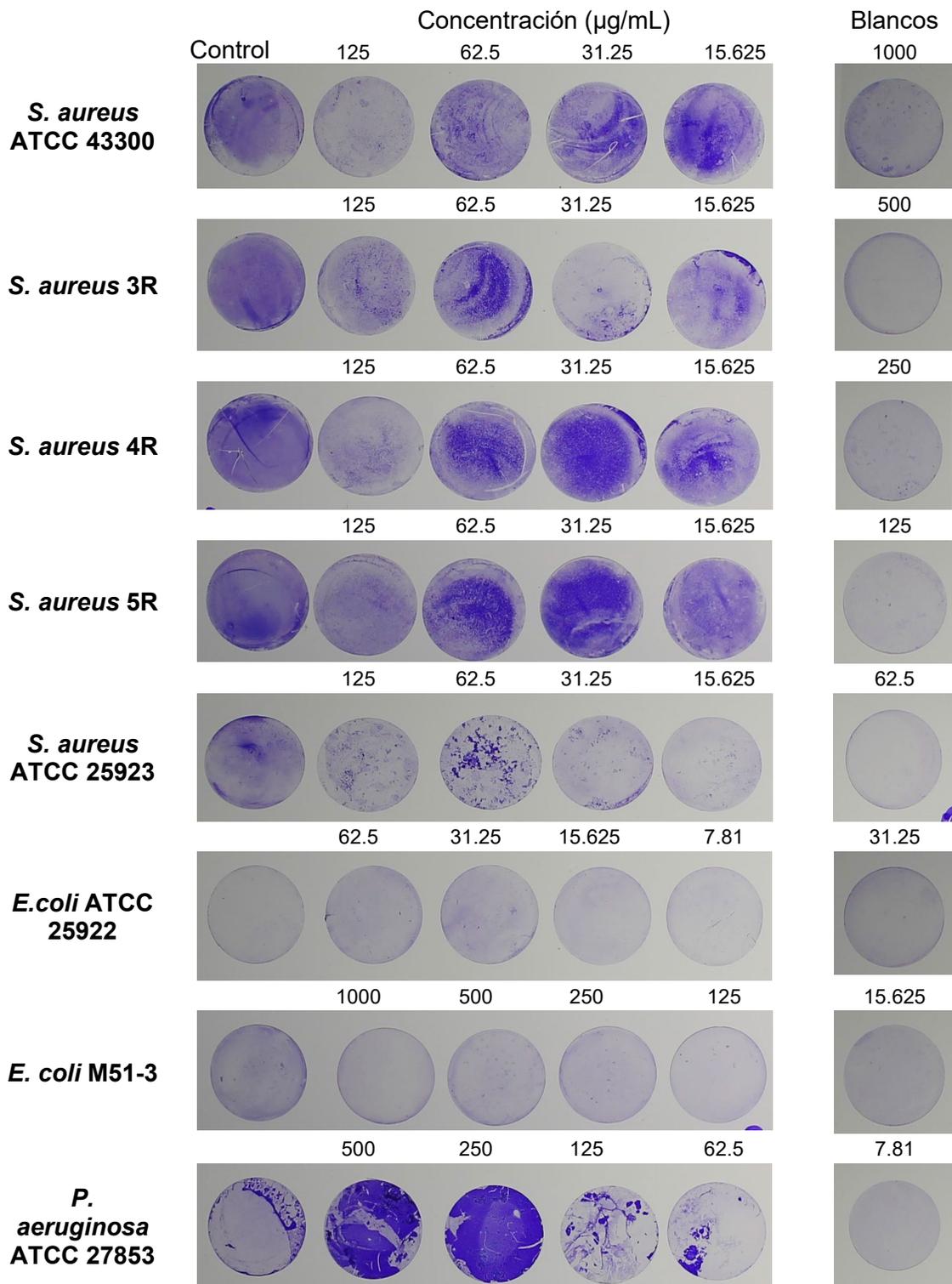


Figura 7. Cubreobjetos mostrando el efecto del EM de *Echeveria secunda* en la inhibición de formación de biopelículas bacterianas.

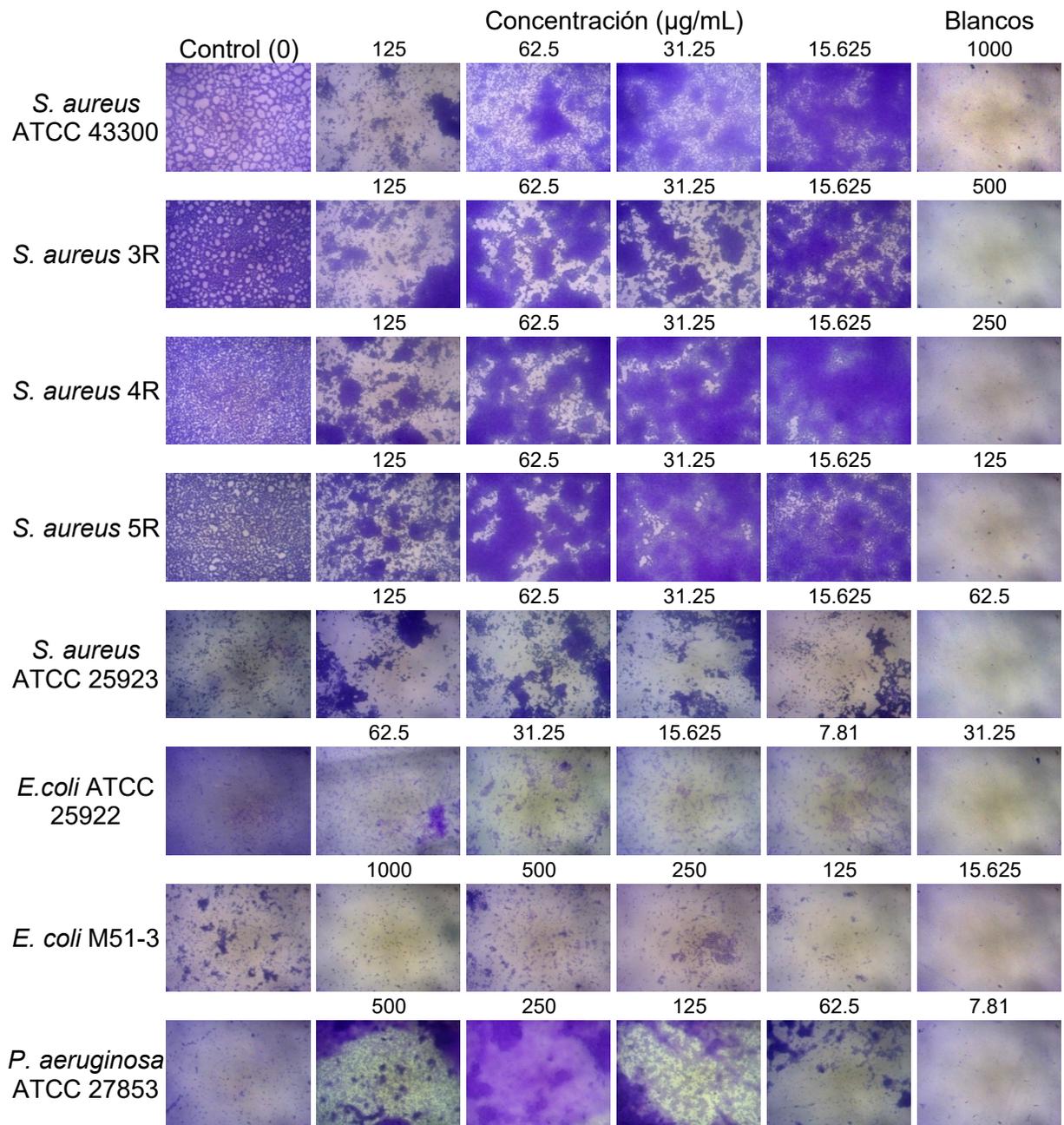


Figura 8. Microscopia óptica (40X) del efecto del EM de *E. secunda* en la inhibición de formación de biopelículas bacterianas (Microscopio Carl Zeiss modelo Primostar).

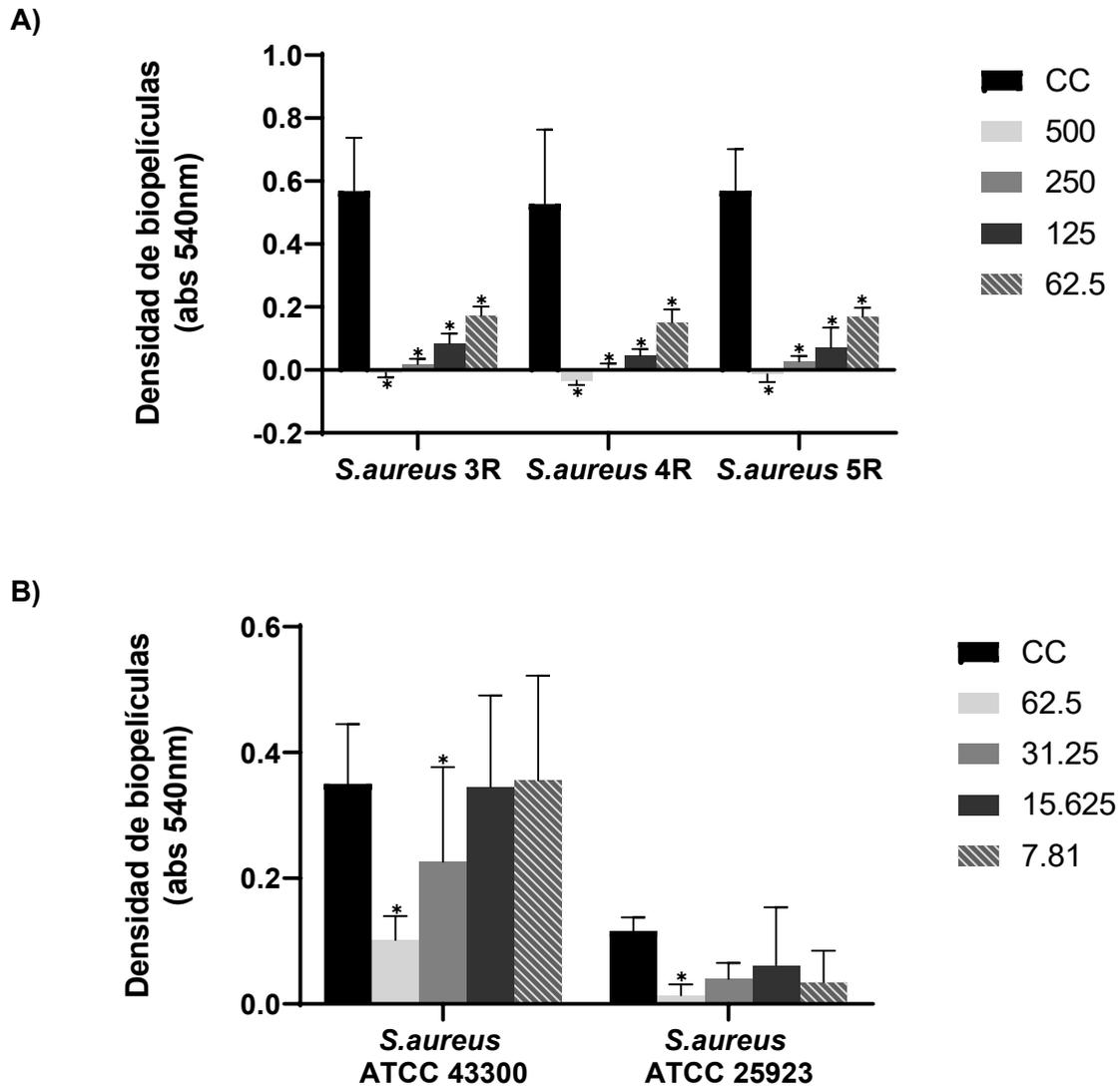


Figura 9. Efecto del extracto metanólico de *Echeveria agavoides* (500-7.81 µg/mL) en la inhibición de la formación de biopelícula de cepas Gram positivas: (A) *Staphylococcus aureus* (3R, 4R y 5R) y (B) *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300 y ATCC 25923). Las gráficas muestran valores de densidad óptica (DO), media \pm desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes con cuatro réplicas. * Diferencias significativas respecto al grupo control (CC), aplicando la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

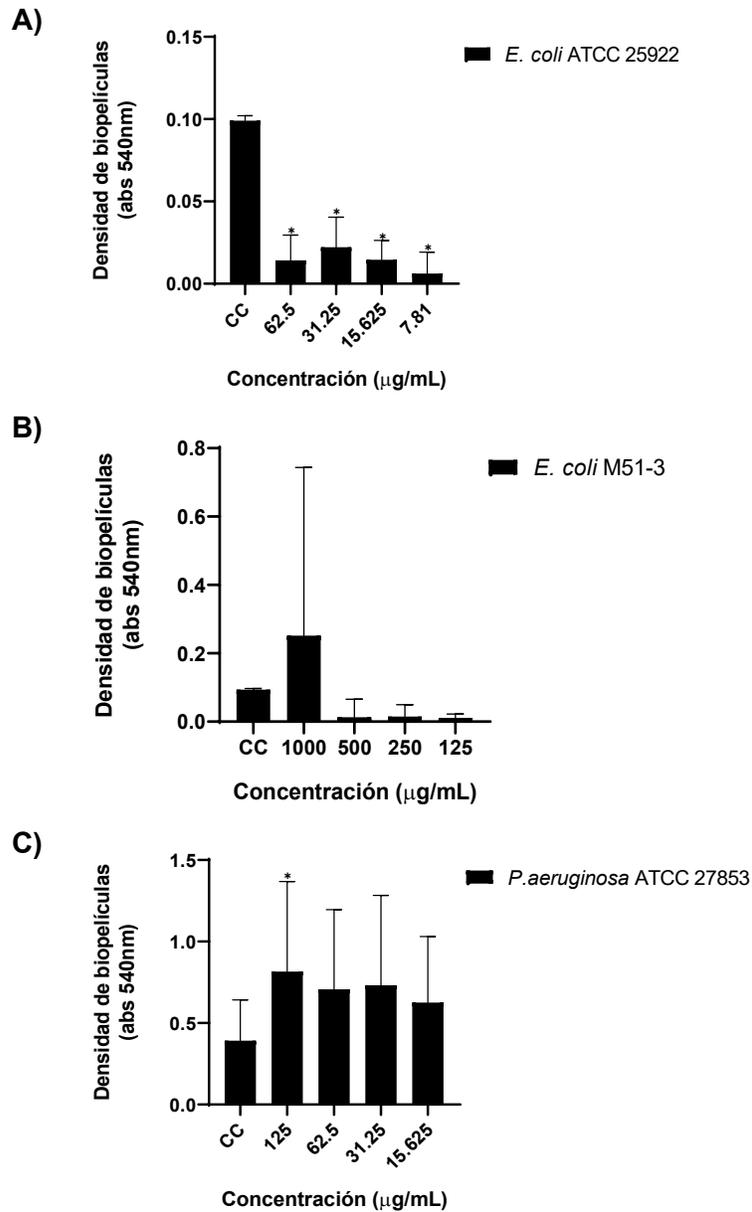


Figura 10. Efecto del extracto metanólico de *Echeveria agavoides* (1000-7.81 µg/mL) en la inhibición de la formación de biopelícula de cepas Gram negativas: (A) *Escherichia coli* ATCC 25922, (B) *Escherichia coli* M51-3 y (C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Las gráficas muestran valores de densidad óptica (DO), media \pm desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes con cuatro réplicas. * Diferencias significativas respecto al grupo control (CC), aplicando la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

osciló entre 77.96 y 93.76% (**Figura 10A**). Para el caso de *P. aeruginosa* (clasificada como formadora fuerte de biopelícula), el EM no inhibió a ninguna de las concentraciones evaluadas, registrándose un aumento estadísticamente significativo a la concentración de 125 µg/mL (**Figura 10C**). Por otra parte, el efecto inhibitorio del EM sobre la cepa *E. coli* M51-3 se registró a la concentración de 500-125 µg/mL aunque no resultó significativo (**Figura 10B**).

Los resultados obtenidos por el método de tinción con cristal violeta en microplaca fueron corroborados al observar los cubreobjetos bajo el microscopio óptico (**Figura 11 y 12**). El efecto en la formación de biopelícula de *S. aureus* (Gram positiva) del EM de *E. agavoides* fue inhibitorio a altas concentraciones y estimulador a bajas concentraciones. Este comportamiento se registró para las cepas ATCC 43300, 3R, 4R y 5R que comparten el ser MRSA, en contraste con la cepa ATCC 25923 (no es MRSA) (**Figura 12**). Este extracto presentó un ligero efecto inhibitorio sobre *E. coli* (débil y no formadoras de biopelículas). El efecto del EM sobre la cepa *E. coli* M51-3 fue más notorio en las concentraciones de 500, 250 y 125 µg/mL al compararlo con el control de crecimiento. En el caso de *P. aeruginosa* (formadora fuerte de biopelícula), el EM de *E. agavoides* estimuló la formación de biopelícula en todas las concentraciones probadas, aunque no se registró diferencia con el control (**Figura 12**).

9.1.1.3. *Echeveria derenbergii*

El EM de *E. derenbergii* inhibió la formación de biopelículas de las cepas Gram positivas *S. aureus* 3R, 4R y 5R; registrándose efecto significativo sólo para las cepas 3R y 5R. Para 3R, la inhibición fue significativa a todas las concentraciones del EM

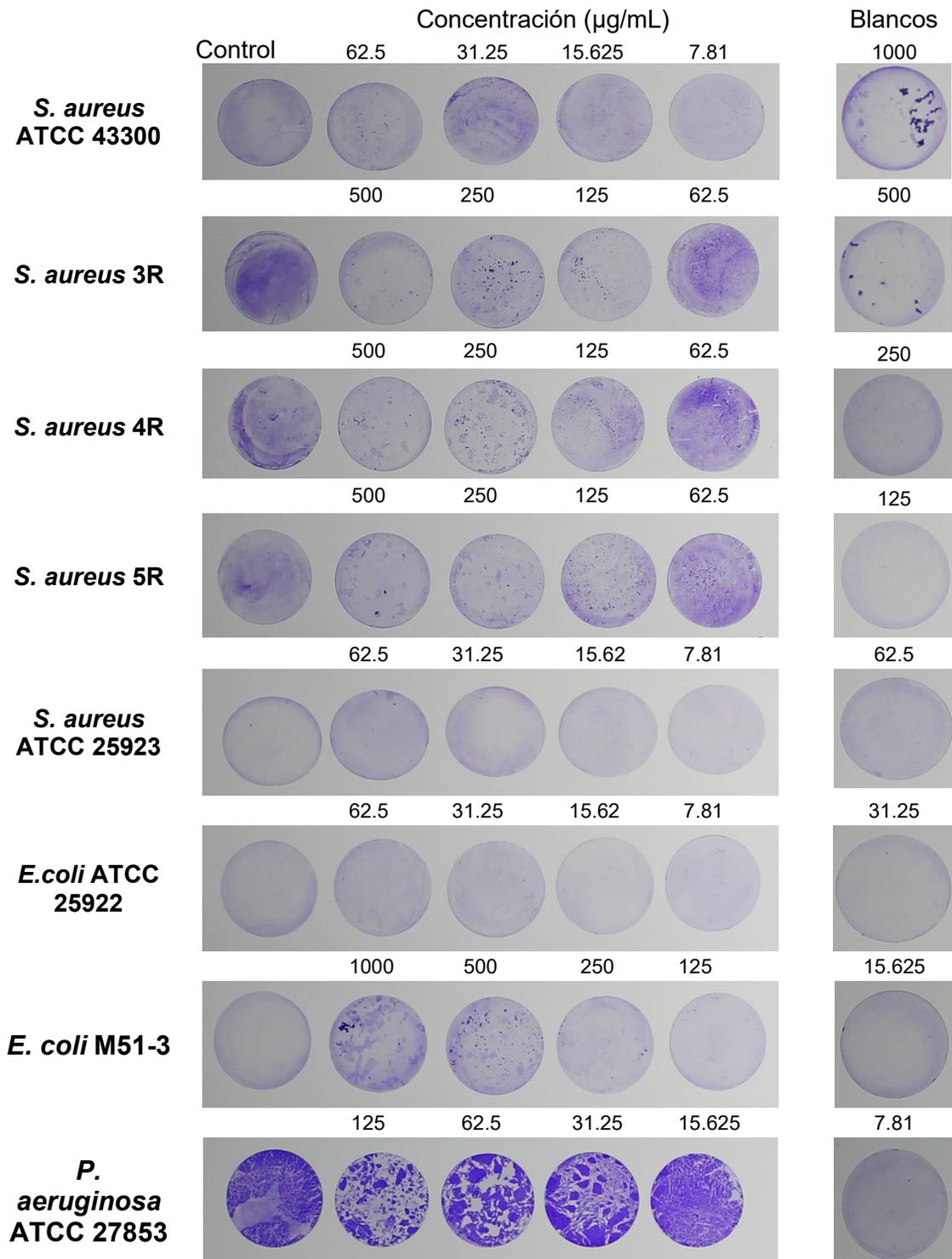


Figura 11. Cubreobjetos mostrando el efecto del EM de *Echeveria agavoides* en la inhibición de formación de biopelículas bacterianas.

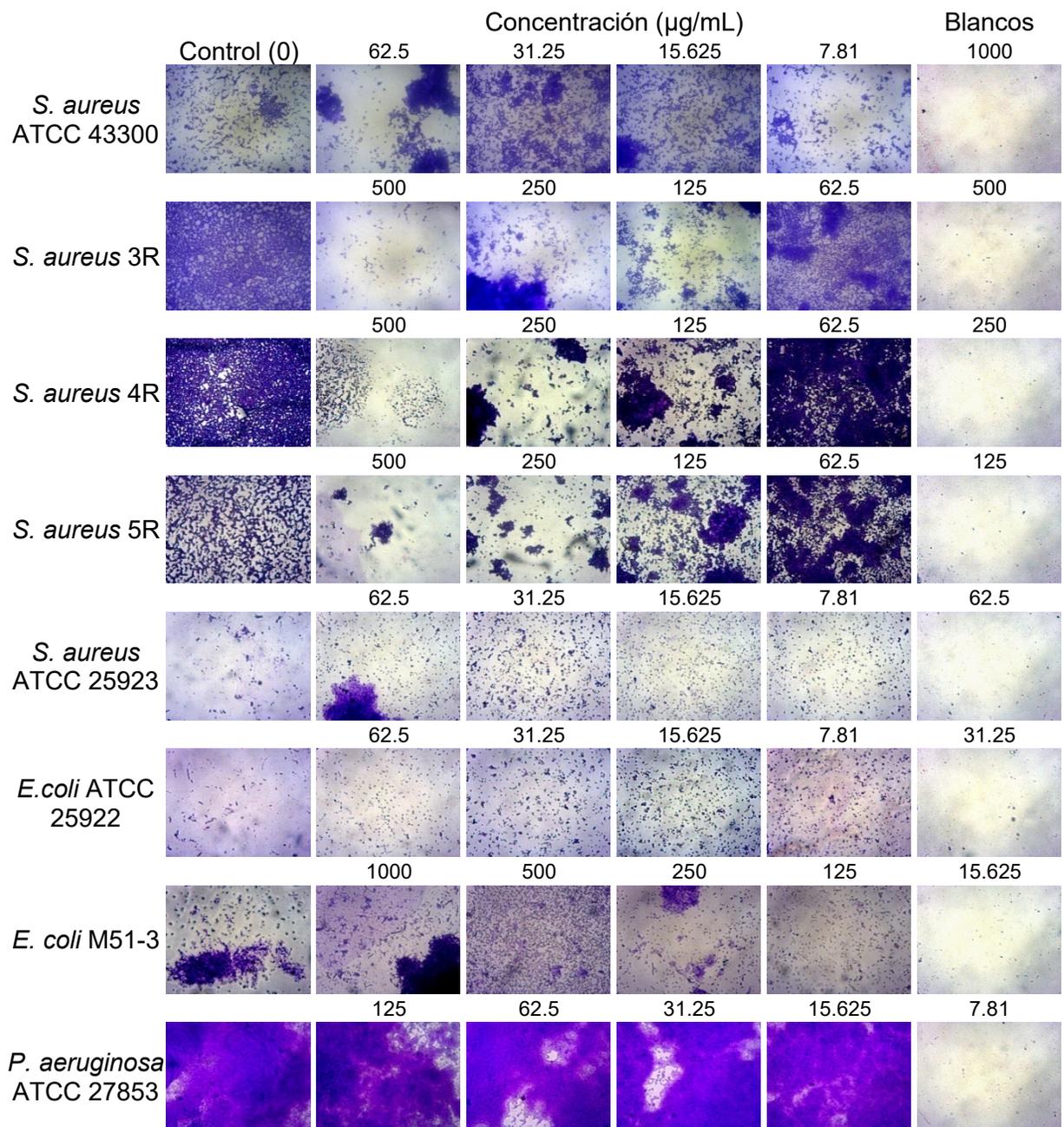


Figura 12. Microscopia óptica (40X) del efecto del EM de *E. agavoides* en la inhibición de formación de biopelículas bacterianas (Microscopio Carl Zeiss modelo Primostar).

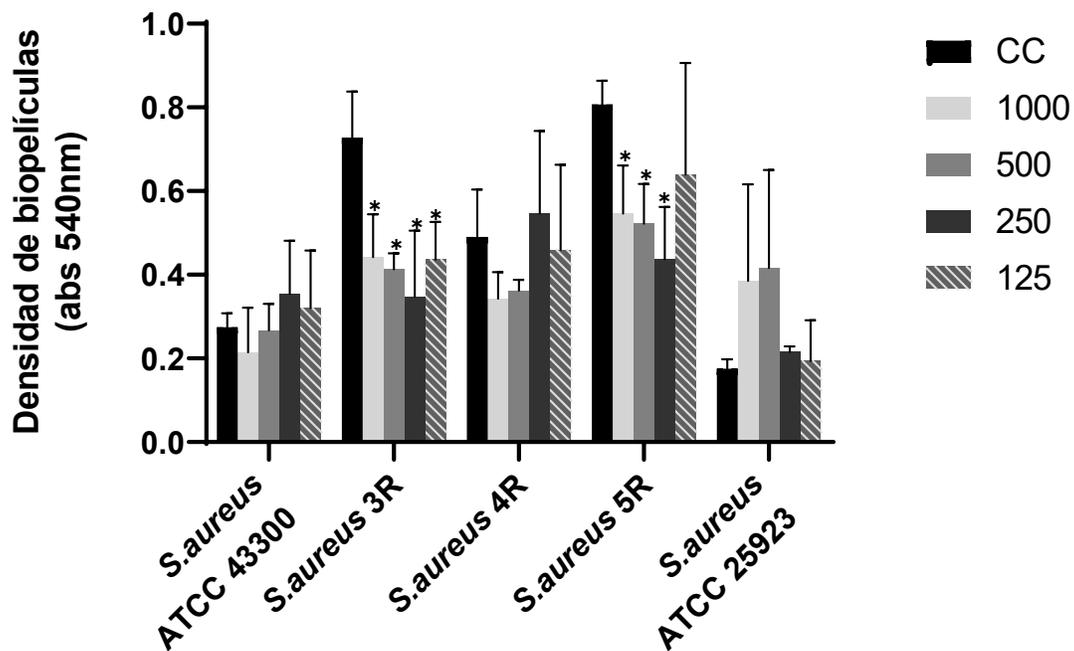


Figura 13. Efecto del extracto metanólico de *Echeveria derenbergii* (1000-125 $\mu\text{g/mL}$) en la inhibición de la formación de biopelícula de cepas Gram positivas *Staphylococcus aureus*. La gráfica muestra valores de densidad óptica (DO), media \pm desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes con cuatro réplicas. *Diferencias significativas respecto al grupo control (CC), aplicando la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

(1000-125 µg/mL) con valores de 38.63 al 52.52%. En lo que respecta a la 5R, la inhibición (32.43-46.34%) fue significativa sólo a las concentraciones más altas (1000–250 µg/mL). En contraste, el EM de *E. derenbergii* no presentó efecto inhibitorio sobre *S. aureus* ATCC 25923 (**Figura 13**).

En las bacterias Gram negativas, el EM de *E. derenbergii* (1000-125 µg/mL) presentó un efecto inhibitorio no significativo en la formación de biopelícula de *E. coli* ATCC 25922 y M51-3 (**Figura 14**). Por otro lado, el EM (1000 µg/mL) incrementó significativamente la biopelícula formada por *P. aeruginosa* (**Figura 14**).

La observación microscópica del efecto del EM de *E. derenbergii* sobre la formación de biopelícula corresponde a lo obtenido en el método de tinción con cristal violeta, mostrando a altas concentraciones un ligero efecto inhibitorio en la formación de biopelículas en las cepas *S. aureus* (ATCC 43300, 3R, 4R y 5R). Por su parte, *S. aureus* ATCC 25923 (formadora moderada de biopelícula) no fue afectado por el EM. En el caso de las bacterias Gram negativas *E. coli* (ATCC 25922 y M51-3), el EM presentó un leve efecto de inhibición. En cambio, *P. aeruginosa* (formadora fuerte de biopelícula) no presentó diferencia con el control por su incremento de formación de biopelícula en todas las concentraciones evaluadas del EM (**Figura 15 y 16**).

9.1.2. Erradicación de biopelícula

Las concentraciones de los tres EMs de *Echeveria* evaluadas para erradicar una biopelícula formada fueron el doble de las establecidas en la inhibición de formación de biopelícula.

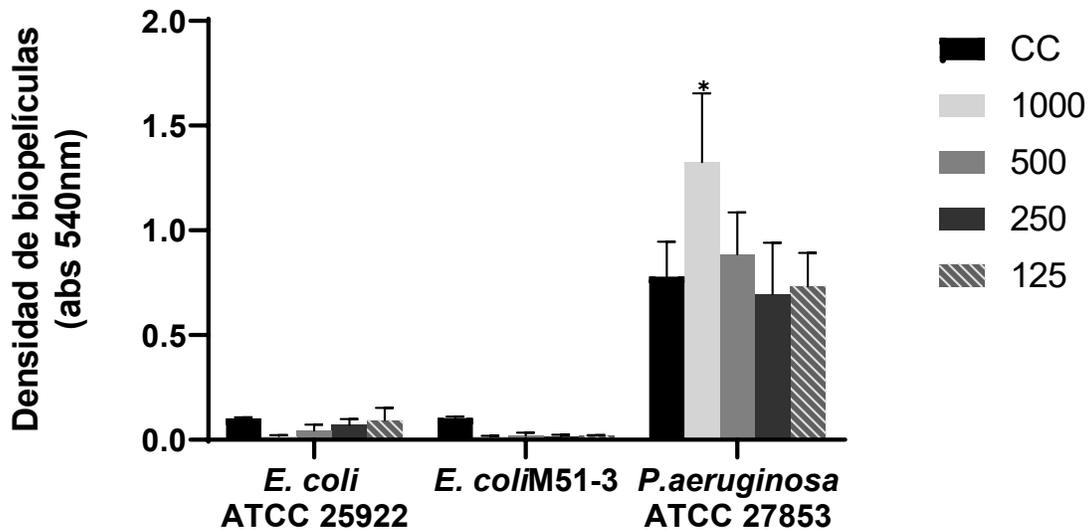


Figura 14. Efecto del extracto metanólico de *Echeveria derenbergii* (1000-125 µg/mL) en la inhibición de la formación de biopelícula de cepas Gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*). La gráfica muestra valores de densidad óptica (DO), media \pm desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes con cuatro réplicas. * Diferencias significativas respecto al grupo control (CC), aplicando la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

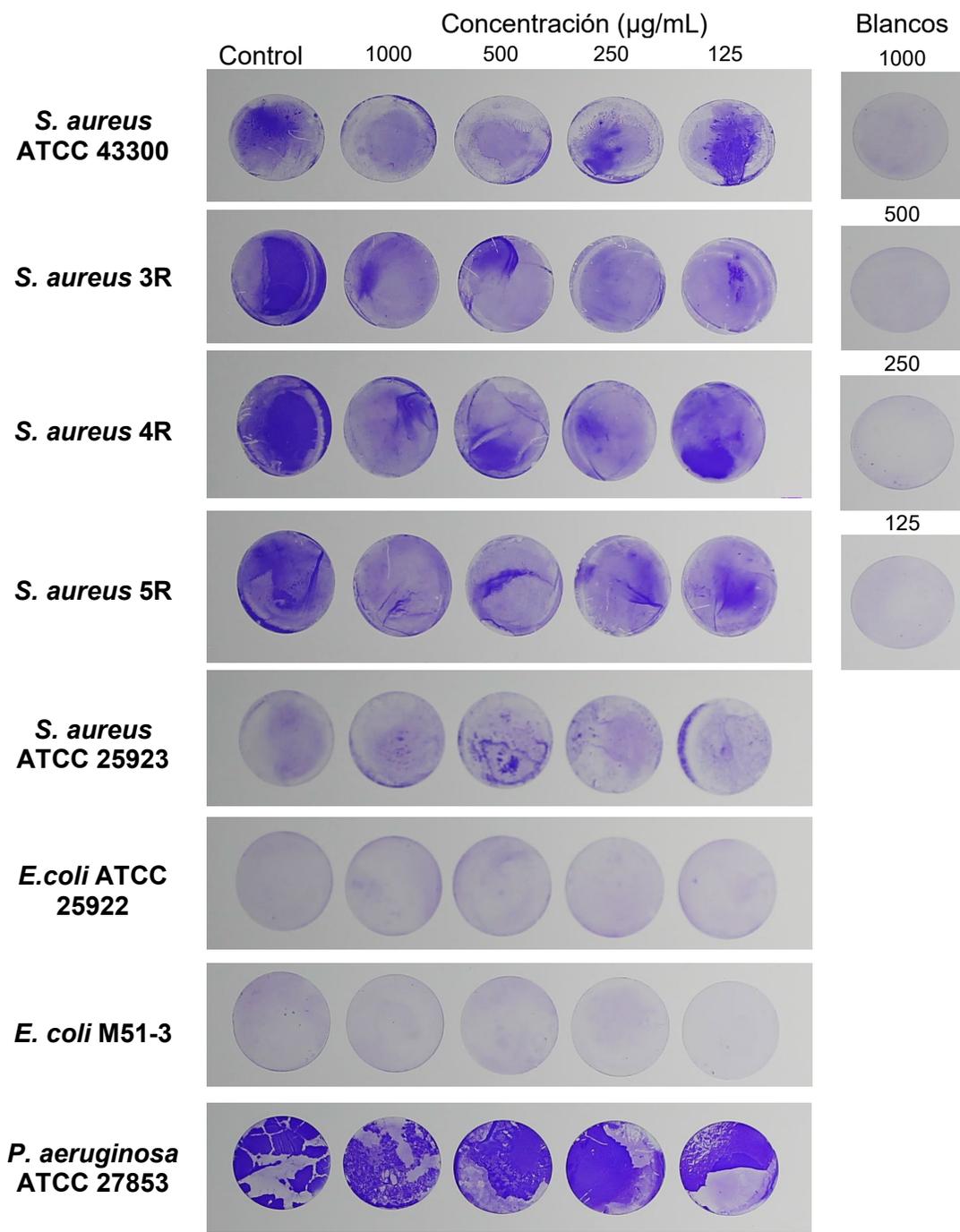


Figura 15. Cubreobjetos mostrando el efecto del EM de *Echeveria derenbergii* en la inhibición de formación de biopelículas bacterianas.

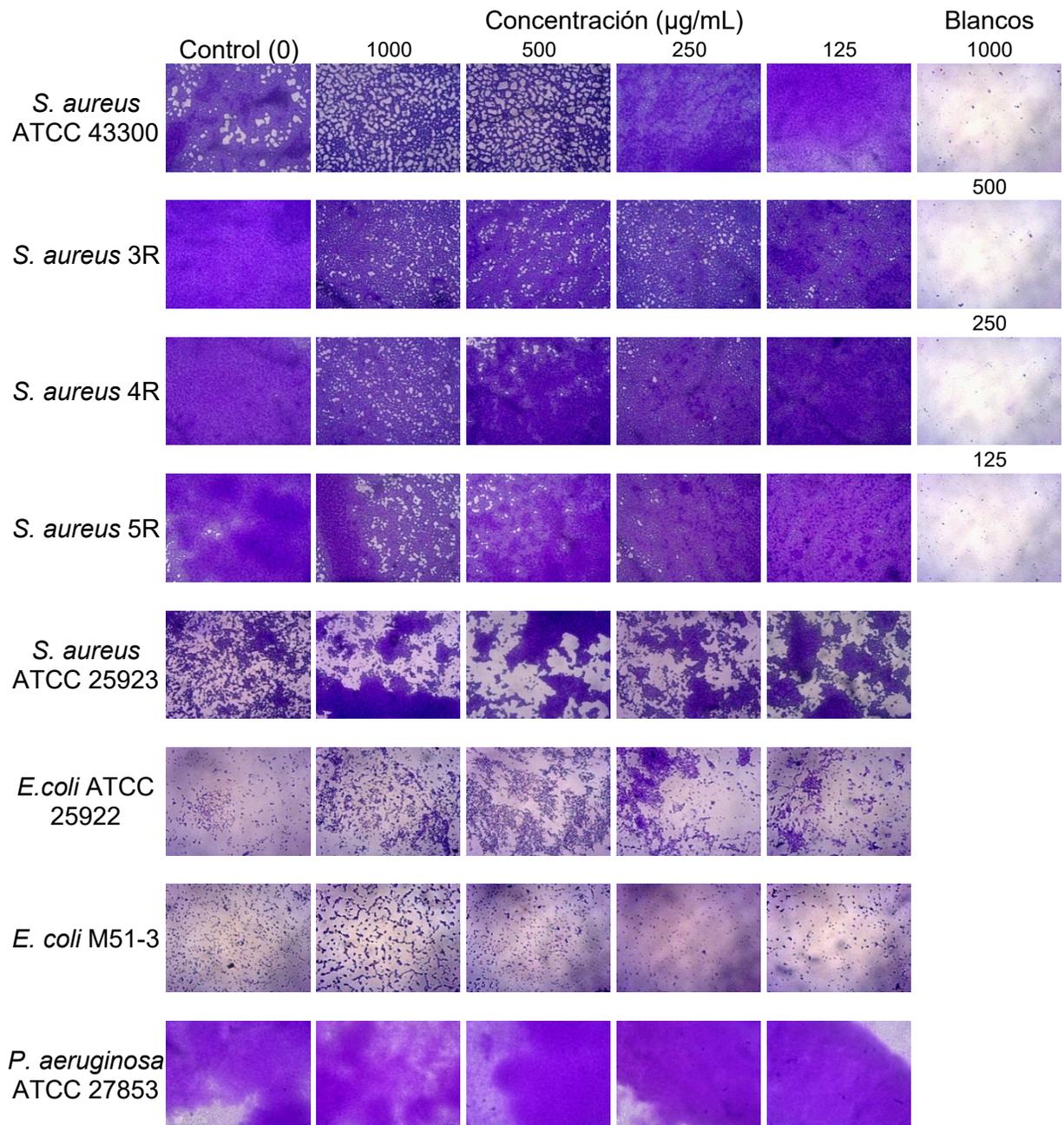


Figura 16. Microscopia óptica (40X) del efecto del EM de *E. derenbergii* en la inhibición de formación de biopelículas bacterianas (Microscopio Carl Zeiss modelo Primostar).

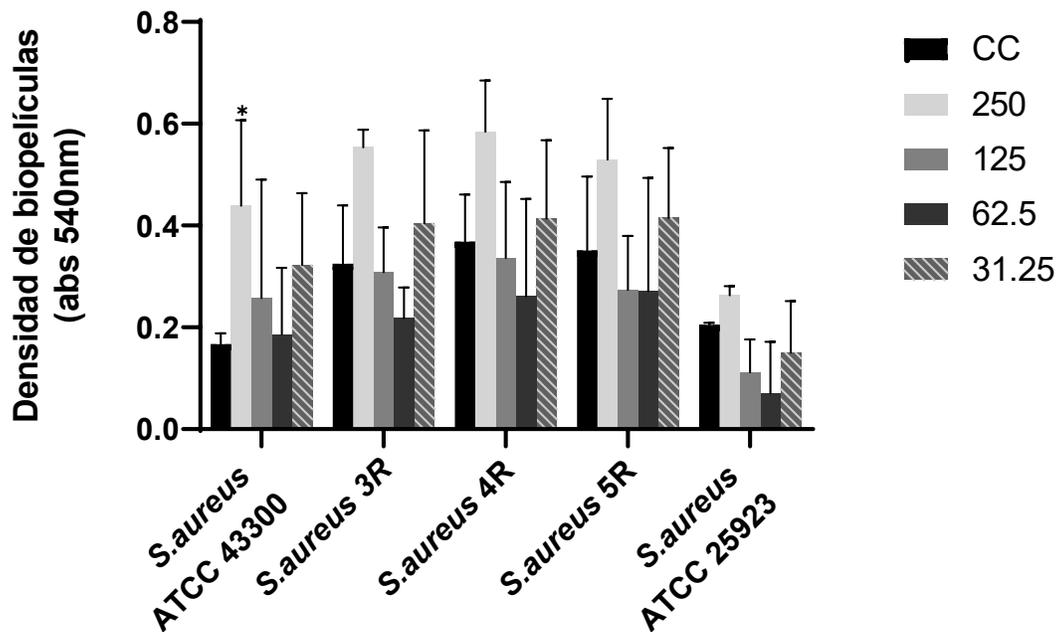


Figura 17. Efecto del extracto metanólico de *Echeveria secunda* (250-31.25 $\mu\text{g/mL}$) en la erradicación de la biopelícula de cepas Gram positivas *Staphylococcus aureus*. La gráfica muestra valores de densidad óptica (DO), media \pm DS de tres experimentos independientes con cuatro réplicas. * Diferencias significativas respecto al grupo control (CC), aplicando la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

9.1.2.1. *Echeveria secunda*

El EM de *E. secunda* no tuvo efecto en la erradicación de biopelículas de las cepas Gram positivas de *S. aureus* ($P > 0.05$) (**Figura 17**), aunque se registraron disminuciones en las biopelículas del 6.87 a 75.19% en las evaluaciones a 125 y 62.5 $\mu\text{g/mL}$ excepto para la cepa ATCC 43300. En las evaluaciones a 250 y 31.25 $\mu\text{g/mL}$ del EM se registró un incremento en la formación de biopelícula, resultando significativo para la cepa ATCC 43300 a 250 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 17**).

Analizando el efecto del EM de *E. secunda* en la erradicación de biopelículas de bacterias Gram negativas, todas las concentraciones del EM disminuyeron la biopelícula de *E. coli* ATCC 25922 ($P < 0.05$), cepa clasificada como formadora débil de biopelícula (**Figura 18A**); mientras que para *E. coli* M51-3 se registró disminución significativa sólo a 1000 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 18B**). En contraste, el EM de *E. secunda* no erradicó la biopelícula preformada de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (formadora fuerte de biopelícula) y mostró una tendencia a incrementar la formación de biopelícula a todas las concentraciones evaluadas (**Figura 18C**).

Aunado a lo anterior, las observaciones al microscopio óptico confirmaron que el EM de *E. secunda* carece de efecto de erradicación de biopelículas de las cepas Gram positivas de *S. aureus* y Gram negativa (*P. aeruginosa* ATCC 27853) (**Figura 19 y 20**). El EM presentó un ligero efecto de erradicación sobre las cepas *E. coli* (ATCC 25922 y M51-3) (**Figura 20**). Al respecto, los cubreobjetos con las biopelículas Gram negativas (*E. coli* y *P. aeruginosa*) mostraron partes más intensamente teñidas, esto se asoció a que durante los lavados parte de la biopelícula formada se rompió y fue

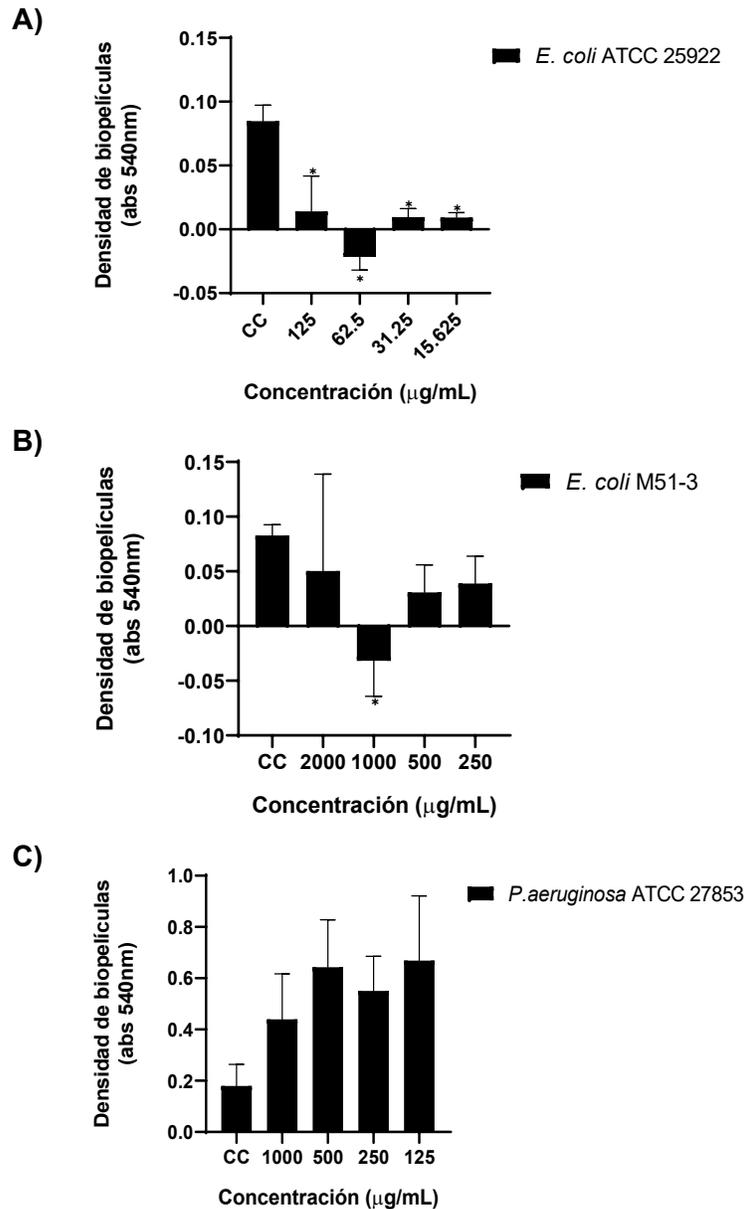


Figura 18. Efecto del extracto metanólico de *Echeveria secunda* (2000-15.625 µg/mL) en la erradicación de la biopelícula de cepas Gram negativas: (A) *Escherichia coli* ATCC 25922, (B) *Escherichia coli* M51-3 y (C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Las gráficas muestran valores de densidad óptica (DO), media ± DS de tres experimentos independientes con cuatro réplicas. * Diferencias significativas respecto al grupo control (CC), aplicando la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

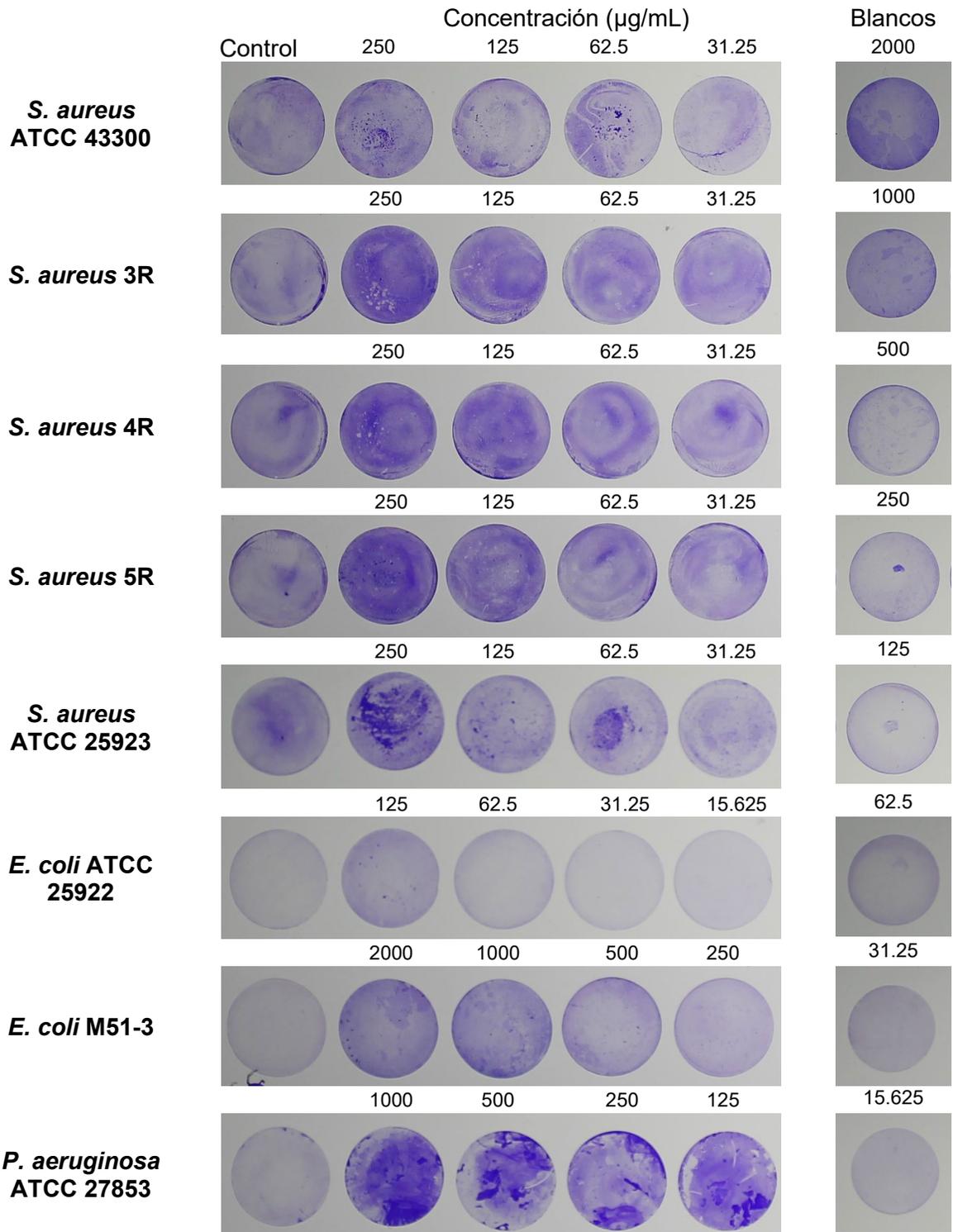


Figura 19. Cubreobjetos mostrando el efecto del EM de *E. secunda* en la erradicación de biopelículas bacterianas preformadas.

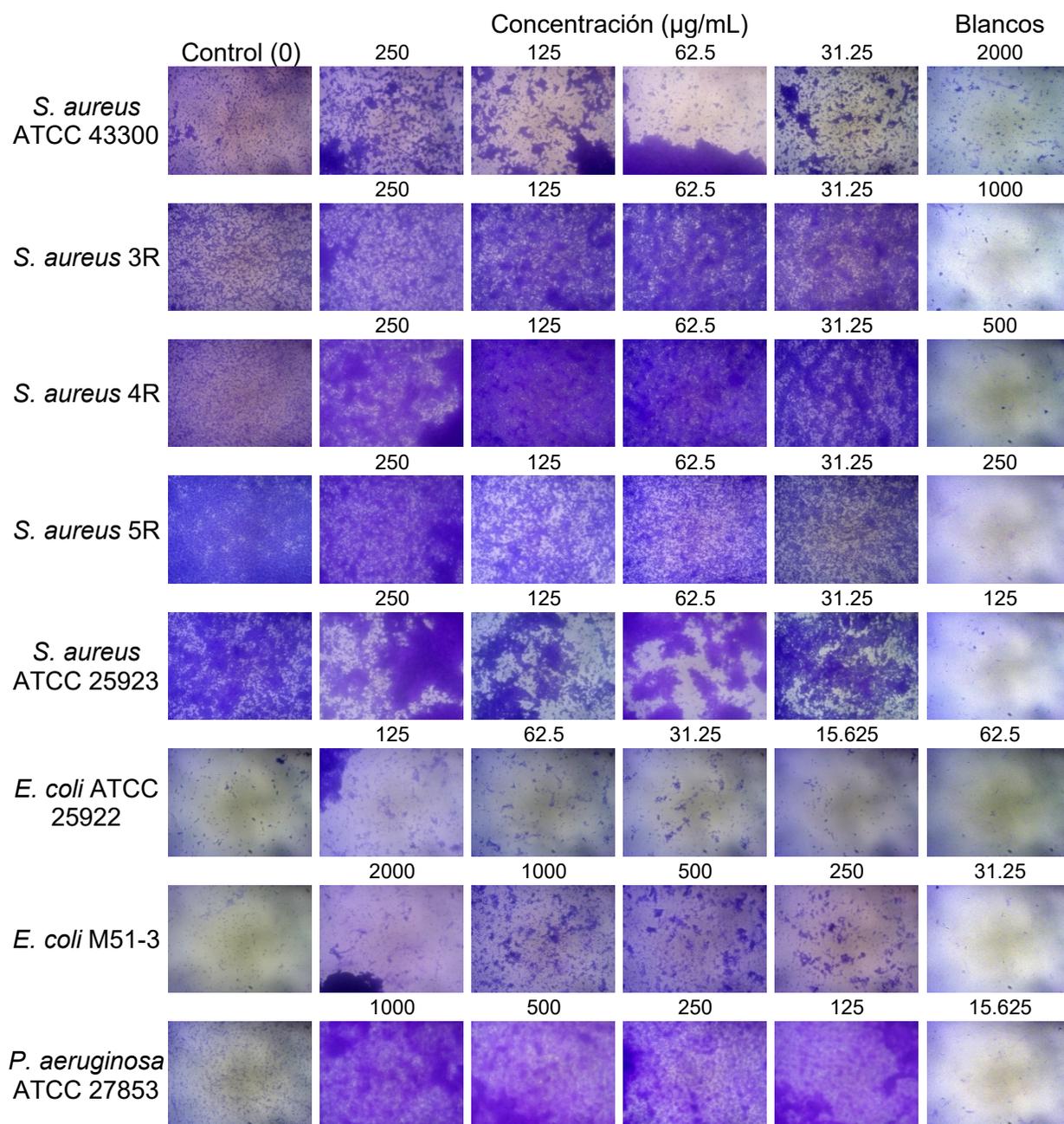


Figura 20. Microscopia óptica (40X) del efecto del EM de *E. secunda* en la erradicación de las biopelículas bacterianas (Microscopio Carl Zeiss modelo Primostar).

eliminada, situación que también contribuye a una mayor variabilidad en la cuantificación. Observación que también aplica para las otras cepas bacterianas evaluadas (**Figura 19, 23 y 27**).

9.1.2.2. *Echeveria agavoides*

El EM de *E. agavoides* no erradicó la biopelícula preformada de las cepas de *S. aureus* 3R, 4R y 5R (formadoras moderadas de biopelícula); al contrario, favoreció su formación, registrando diferencias significativas a las concentraciones más altas (250-1000 $\mu\text{g/mL}$) (**Figura 21A**). En las cepas de *S. aureus* ATCC 43300 (formadora débil de biopelícula) y ATCC 25923 (formadora moderada de biopelícula), el EM mostró una tendencia a erradicar la biopelícula, excepto a 125 $\mu\text{g/mL}$ para la cepa ATCC 43300 (formador débil de biopelícula) (**Figura 21B**).

Con respecto a las cepas Gram negativas, el EM de *E. agavoides* mostró un efecto de erradicación de biopelícula en las cepas *E. coli* ATCC 25922 y M51-3, el efecto fue significativo para la cepa ATCC 25922 (formadora débil de biopelícula) a todas las concentraciones (125-15.625 $\mu\text{g/mL}$), alcanzando un porcentaje de erradicación de 72.45 a 100% (**Figura 22A**). En lo que respecta a la cepa M51-3 (no formadora de biopelícula), el efecto fue significativo a las concentraciones 500 y 250 $\mu\text{g/mL}$ (% erradicación = 40.36-83.18%) (**Figura 22B**). En relación con la cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853 (formadora fuerte de biopelícula), el EM no erradicó la biopelícula preformada a las concentraciones evaluadas (250-31.25 $\mu\text{g/mL}$), incrementándose la formación de biopelícula y alcanzando valores significativamente diferentes a 250 y 125 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 22C**).

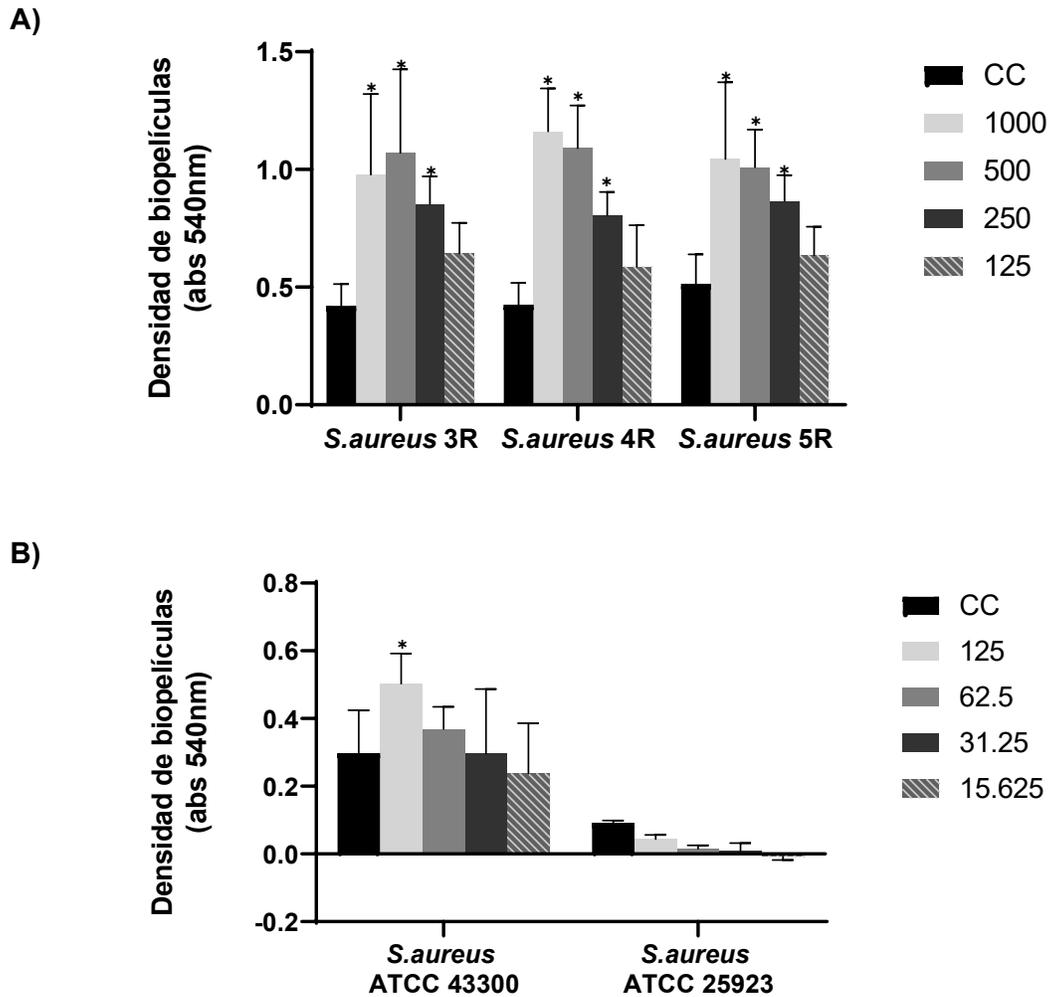


Figura 21. Efecto del extracto metanólico de *Echeveria agavoides* (1000-15.625 µg/mL) en la erradicación de la biopelícula de cepas Gram positivas: (A) *Staphylococcus aureus* (3R, 4R y 5R) y (B) *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300 y ATCC 25923). Las gráficas muestran valores de densidad óptica (DO), media \pm DS de tres experimentos independientes con cuatro réplicas. * Diferencias significativas respecto al grupo control (CC), aplicando la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

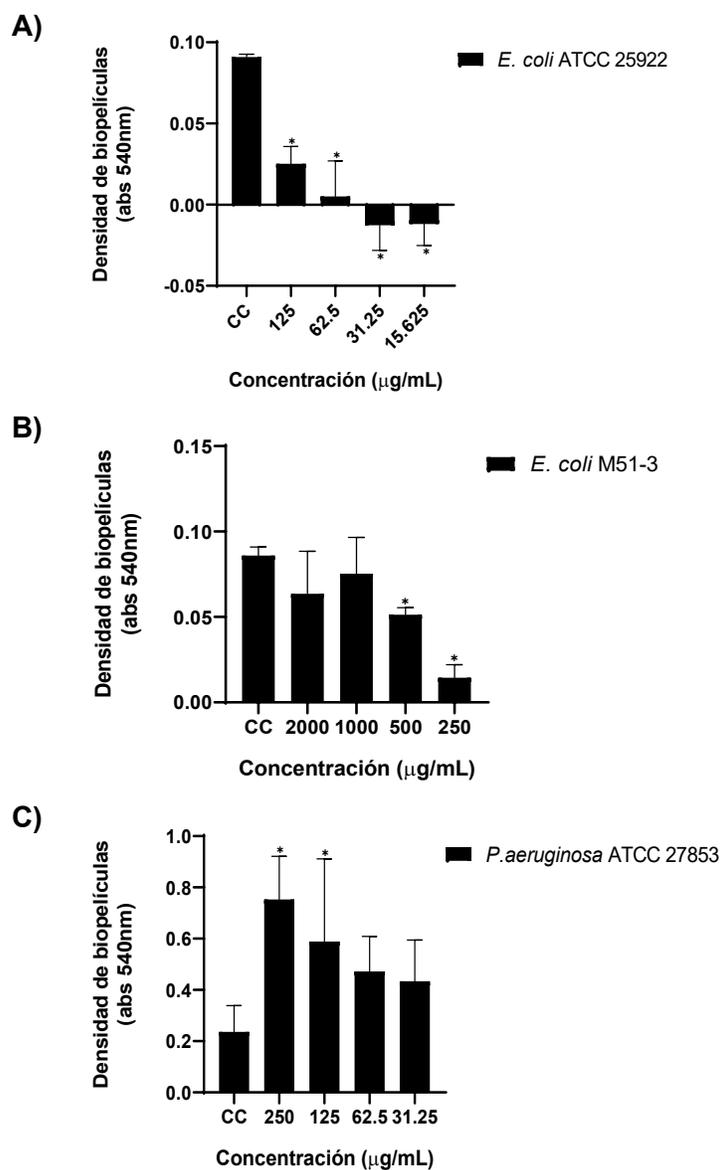


Figura 22. Efecto del extracto metanólico de *Echeveria agavoides* (2000-15.625 µg/mL) en la erradicación de la biopelícula de cepas Gram negativas: (A) *Escherichia coli* ATCC 25922, (B) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y (C) *Escherichia coli* M51-3. La gráfica muestra valores de densidad óptica (DO), media ± DS de tres experimentos independientes con cuatro réplicas. * Diferencias significativas respecto al grupo control (CC), aplicando la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

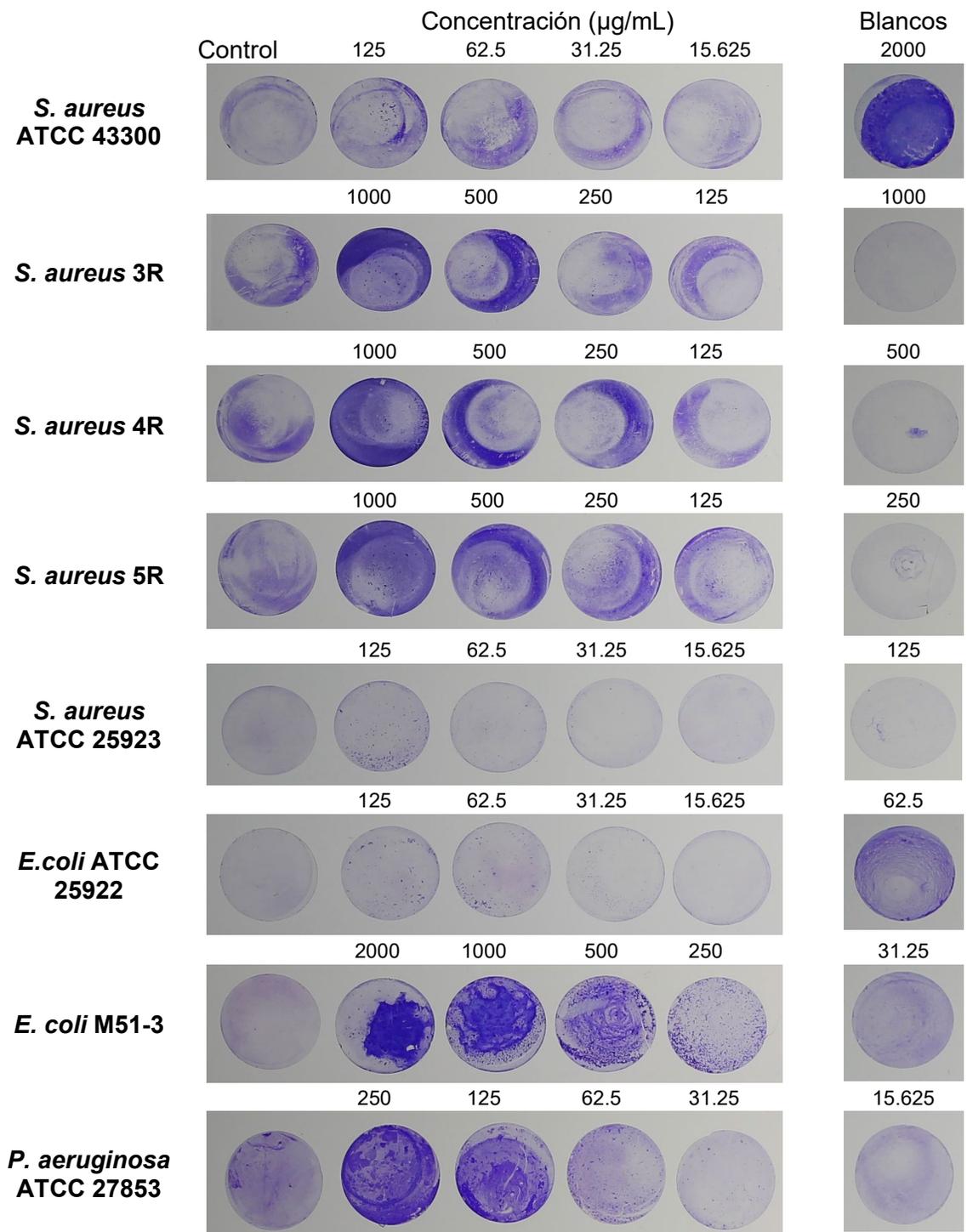


Figura 23. Cubreobjetos mostrando el efecto del EM de *E. agavoides* en la erradicación de biopelículas bacterianas preformadas.

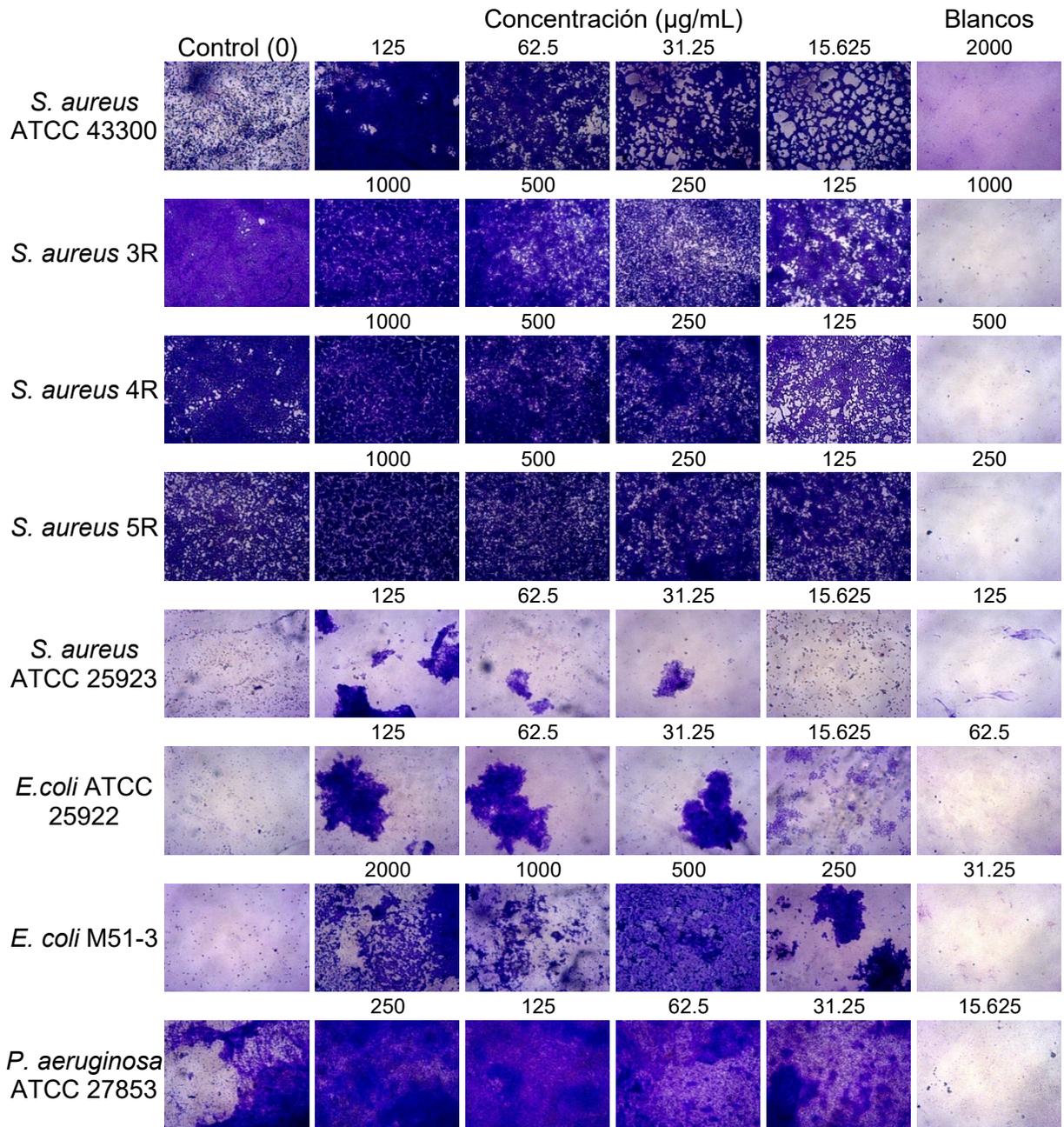


Figura 24. Microscopia óptica (40X) del efecto del EM de *E. agavoides* en la erradicación de las biopelículas bacterianas (Microscopio Carl Zeiss modelo Primostar).

Los resultados cualitativos observados por microscopía óptica concuerdan con lo obtenido en el método de tinción con cristal violeta. El EM de *E. agavoides* no mostró un efecto de erradicación de biopelículas en las cepas de *S. aureus* (3R, 4R y 5R) y *P. aeruginosa* (**Figura 23 y 24**). Se observa una tendencia a erradicar la biopelícula en la cepa de *S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* ATCC 25922. En el caso de *S. aureus* ATCC 43300 no se aprecia un efecto del EM en la erradicación de biopelícula comparado con el control, este resultado difiere al obtenido en las lecturas de densidad de biopelícula en la erradicación (**Figura 21A y 24**).

9.1.2.3. *Echeveria derenbergii*

Las cepas Gram positivas de *S. aureus* (moderadas y débiles formadoras de biopelícula) mostraron una tendencia de incremento en la formación de biopelícula a concentraciones altas del EM de *E. derenbergii*, mientras que a bajas concentraciones se presentó un efecto de erradicación (7.60-37.64%). El porcentaje de erradicación fue significativo a 250 µg/mL para la cepa ATCC 43300 (37.64%) y 4R (28.74%); mientras que incrementos significativos se registraron para la cepa 5R a 2000 µg/mL y para la cepa ATCC 25923 a 2000 y 1000 µg/mL (**Figura 25**).

Por otra parte, el EM de *E. derenbergii* presentó un efecto de erradicación de biopelícula en las cepas Gram negativas. El efecto fue estadísticamente significativo a la concentración más baja (250 µg/mL) en la cepa débil formadora de biopelícula *E. coli* ATCC 25922 (% erradicación = 95.39%) y no formadora de biopelícula *E. coli* M51-3 (% erradicación = 91.20%). En la cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853 (formadora fuerte

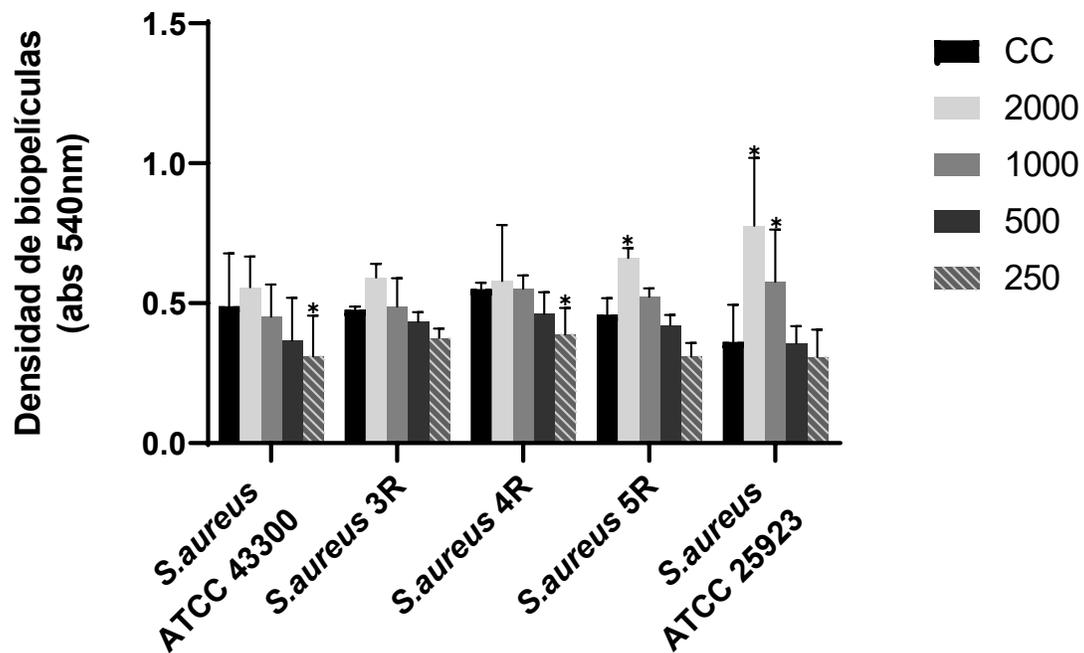


Figura 25. Efecto del extracto metanólico de *Echeveria derenbergii* (2000-250 µg/mL) en la erradicación de la biopelícula de cepas Gram positivas *Staphylococcus aureus*. La gráfica muestra valores de densidad óptica (DO), media ± DS de tres experimentos independientes con cuatro réplicas. * Diferencias significativas respecto al grupo control (CC), aplicando la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

de biopelícula), el efecto fue significativo en las concentraciones de 2000, 1000 y 500 $\mu\text{g/mL}$ con un rango de erradicación de 19.74 a 58.56% (**Figura 26**).

El efecto de erradicación de biopelícula del EM de *E. derenbergii* se corroboró mediante microscopía óptica (**Figura 27 y 28**). Se observó un incremento en la formación de biopelícula a mayor concentración del EM, mientras que a menor concentración se apreciaba un efecto de erradicación en las cepas Gram positivas de *S. aureus*. En las cepas Gram negativas, el EM presentó un leve efecto de erradicación en las biopelículas de *E. coli* (ATCC 25922 y M51-3). Con respecto a *P. aeruginosa* ATCC 27853, los resultados no coincidieron con los obtenidos en el método de tinción con cristal violeta en microplacas (**Figura 26**); en la microscopía óptica no se aprecia un efecto del EM en la erradicación de biopelícula (**Figura 28**).

9.1.3. Actividad metabólica en la inhibición de formación de biopelícula

La inhibición de formación de biopelícula se evaluó mediante el método de tinción con cristal violeta que mide la cantidad de biomasa de la biopelícula, mientras que en la evaluación de la actividad metabólica se empleó el reactivo XTT como indicador de la viabilidad celular de la biopelícula. Dado que ambos ensayos proporcionan información diferente, se espera que su relación refleje la cantidad de actividad metabólica por unidad de biomasa, según lo detectado por el ensayo de cristal violeta.

9.1.3.1. *Echeveria secunda*

En la evaluación de actividad metabólica de cepas Gram positivas tratadas con el EM de *E. secunda* en el ensayo de inhibición de formación de biopelículas, el EM (125-31.25 $\mu\text{g/mL}$) redujo significativamente la viabilidad de las cepas *S. aureus* 3R,

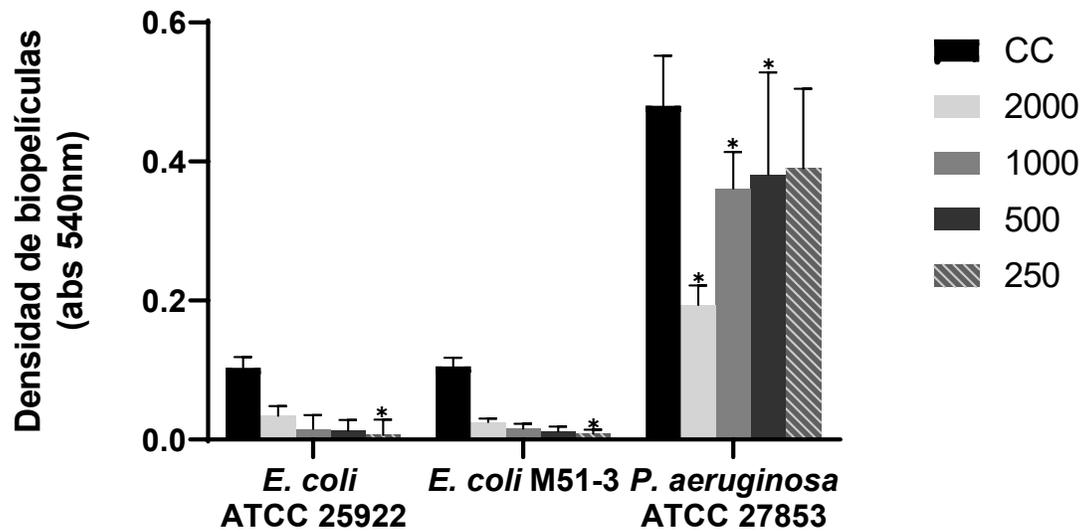


Figura 26. Efecto del extracto metanólico de *Echeveria derenbergii* (2000-250 µg/mL) en la erradicación de la biopelícula de cepas Gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*). La gráfica muestra valores de densidad óptica (DO), media ± DS de tres experimentos independientes con cuatro réplicas. * Diferencias significativas respecto al grupo control (CC), aplicando la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

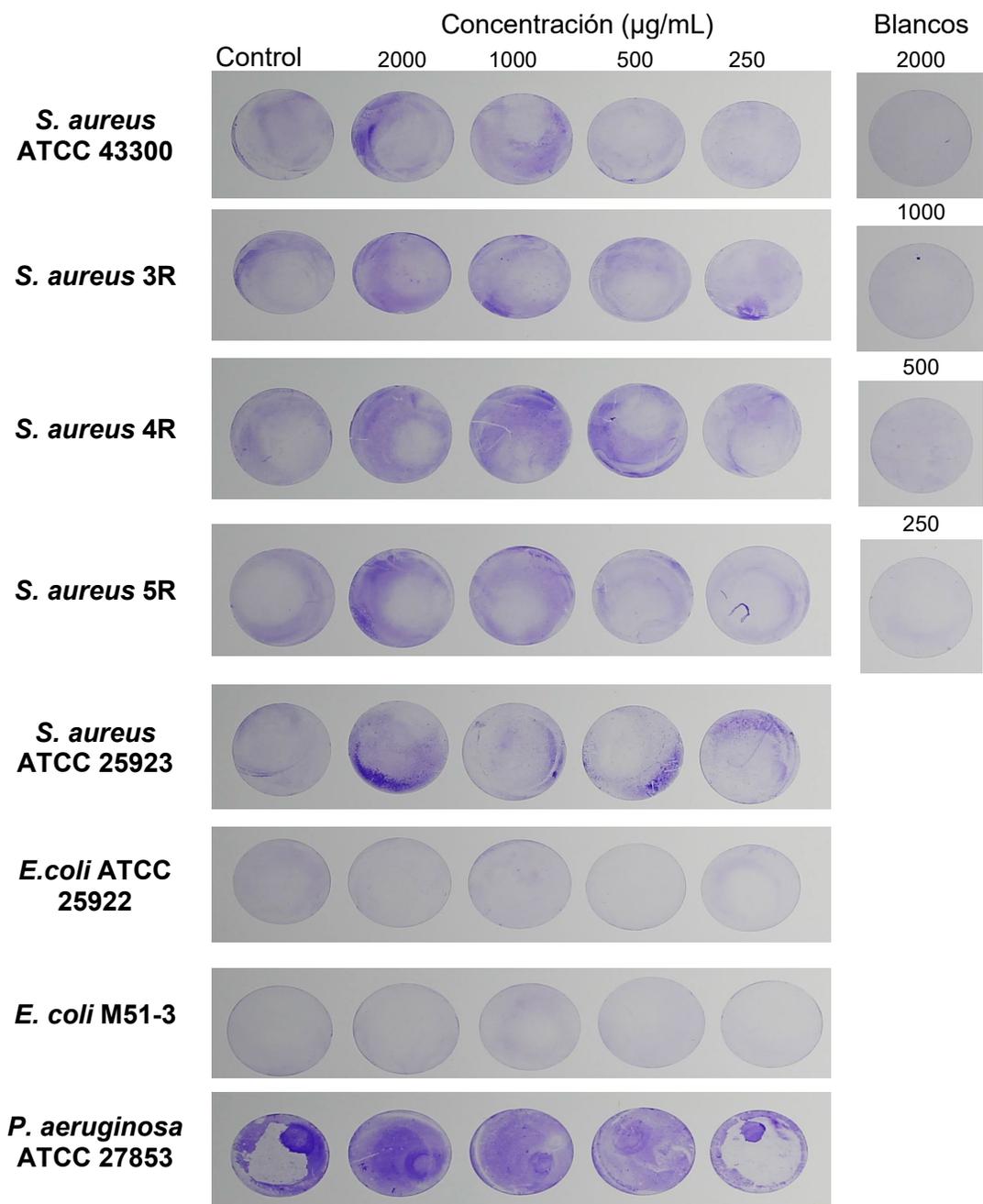


Figura 27. Cubreobjetos mostrando el efecto del EM de *E. derenbergii* en la erradicación de biopelículas bacterianas preformadas.

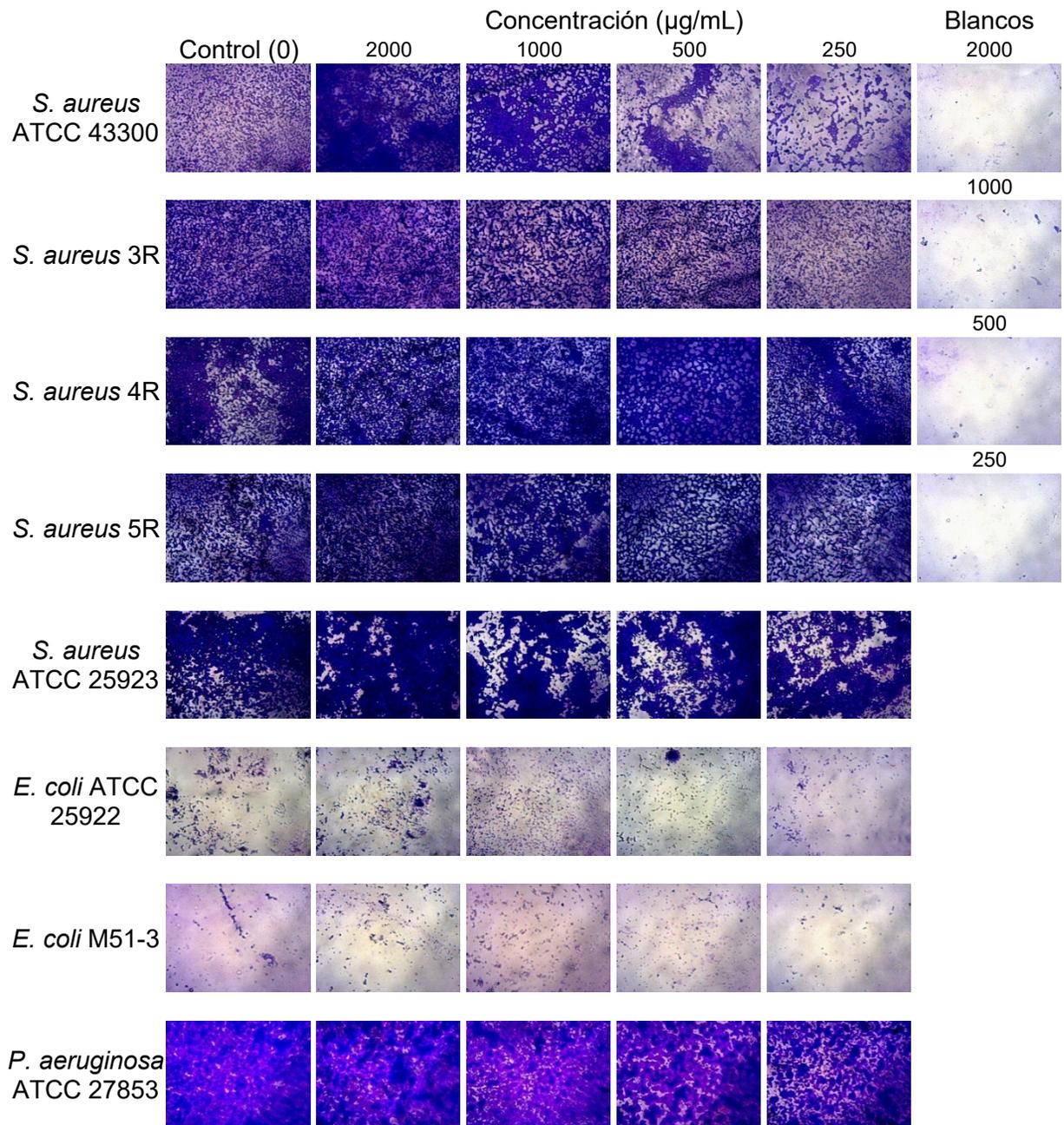


Figura 28. Microscopia óptica (40X) del efecto del EM de *E. derenbergii* en la erradicación de las biopelículas bacterianas (Microscopio Carl Zeiss modelo Primostar).

4R y 5R (% inhibición = 80.28-99.83%), mientras que la disminución no fue significativa para las cepas ATCC 43300 y ATCC 25923 (**Figura 29**).

En relación con las cepas Gram negativas, la cepa *E. coli* ATCC 25922 tratada con el EM (62.5-7.81 µg/mL) no presentó viabilidad celular; para la cepa *E. coli* M51-3 ocurrió lo mismo a 500 y 125 µg/mL (**Figura 30A**) y se registraron disminuciones significativas a 1000 µg/mL (66.41%) y 250 µg/mL (84.46%) (**Figura 30B**). En el caso de *P. aeruginosa* ATCC 27853, su viabilidad disminuyó significativamente (45.63-96.63%) a todas las concentraciones del EM (500-62.5 µg/mL) (**Figura 30C**).

9.1.3.2. *Echeveria agavoides*

El tratamiento de los aislados de *S. aureus* 3R, 4R y 5R con el EM de *E. agavoides* (500-62.5 µg/mL) disminuyó significativamente la actividad metabólica (81.65-100%) (**Figura 31A**). En las cepas de *S. aureus* ATCC 43300 y 25923, el EM (62.5-7.81 µg/mL) también disminuyó significativamente su actividad metabólica (74.12-100%) (**Figura 31B**).

En las cepas Gram negativas, el EM de *E. agavoides* evaluado a 62.5-7.81 µg/mL disminuyó totalmente la actividad metabólica de *E. coli* ATCC 25922 a excepción de la concentración 15.625 µg/mL (86.98%) (**Figura 32A**), mientras que el tratamiento con 1000-125 µg/mL indujo una disminución significativa (97.31-100%) en *E. coli* M51-3 (**Figura 32B**). En contraste, el EM no afectó a *P. aeruginosa* ATCC 27853, registrándose una disminución no significativa a la menor concentración (15.625 µg/mL) (**Figura 32C**).

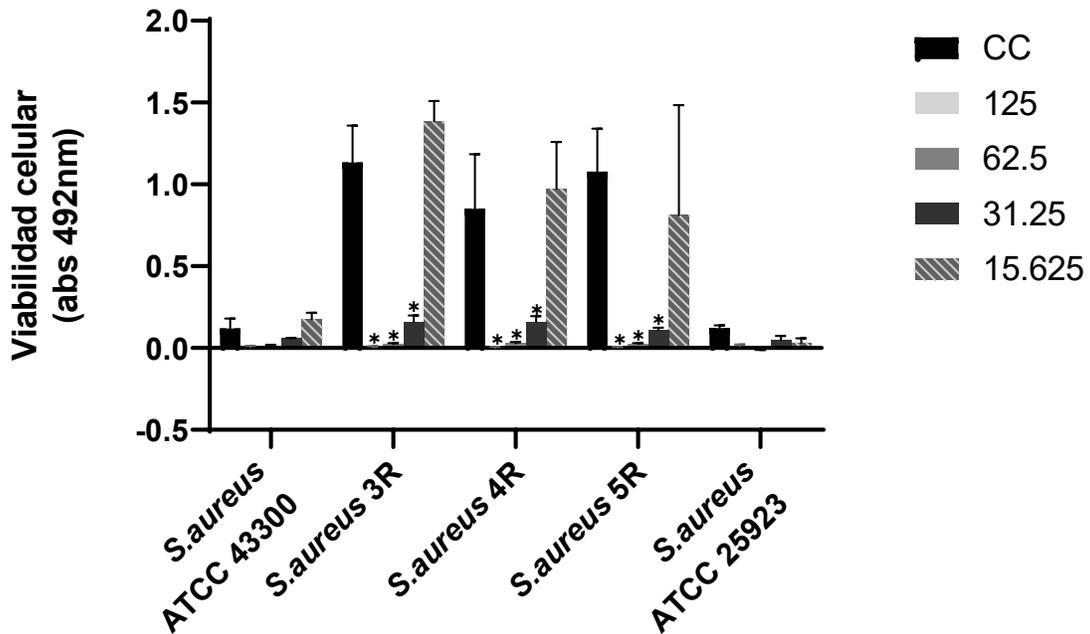


Figura 29. Efecto del extracto metanólico de *Echeveria secunda* (125-15.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre la actividad metabólica en la biopelícula obtenida en ensayo de inhibición de la formación de biopelícula de cepas Gram positivas *Staphylococcus aureus*. La gráfica muestra la densidad óptica (DO), media \pm desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes con cuatro réplicas. * Diferencias significativas respecto al grupo control (CC), aplicando la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

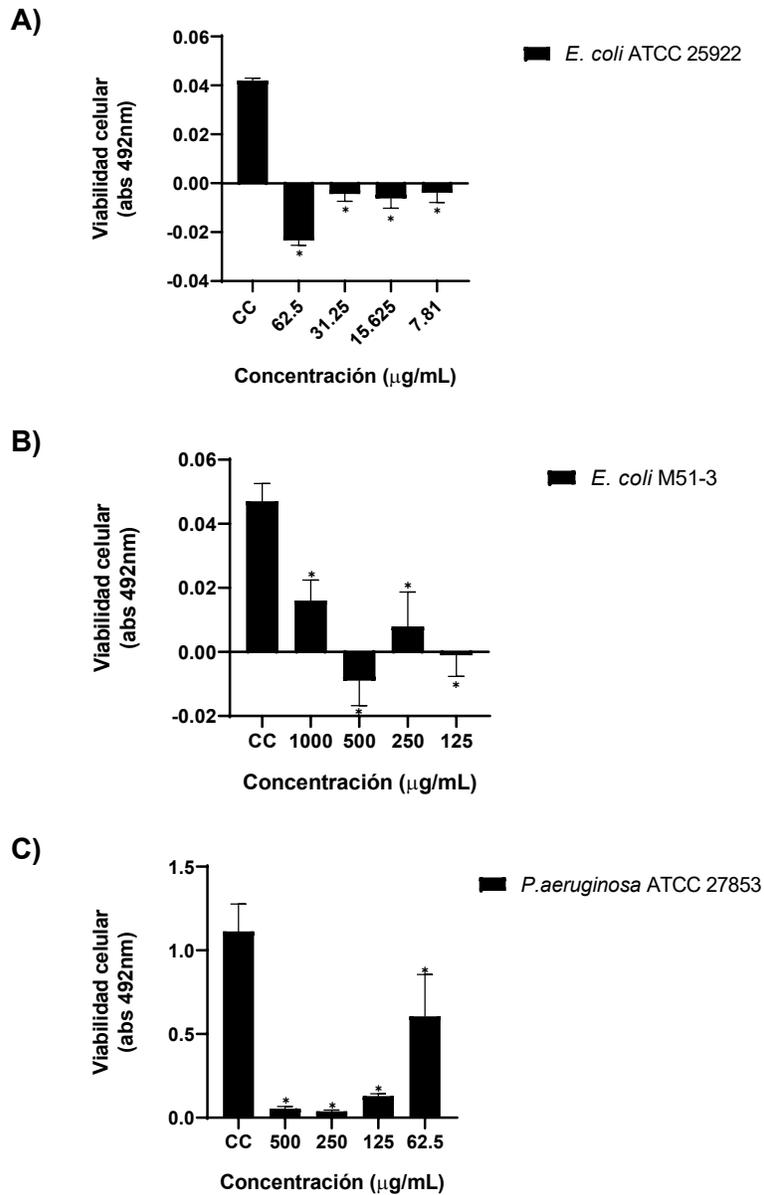
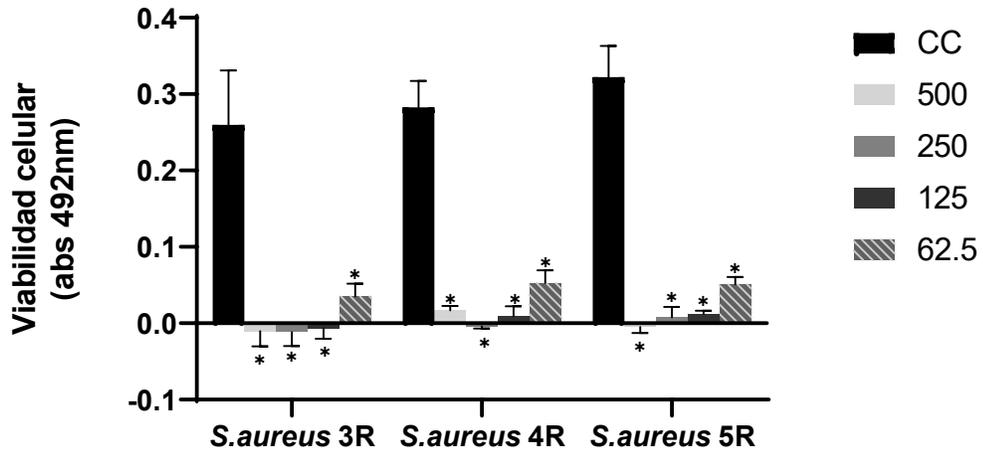


Figura 30. Efecto del extracto metanólico de *Echeveria secunda* (1000-7.81 µg/mL) sobre la actividad metabólica en la biopelícula obtenida en ensayo de inhibición de la formación de biopelícula de cepas Gram negativas: (A) *Escherichia coli* ATCC 25922, (B) *Escherichia coli* M51-3 y (C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Las gráficas muestran valores de densidad óptica (DO), media ± desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes con cuatro réplicas. * Diferencias significativas respecto al grupo control (CC), aplicando la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

A)



B)

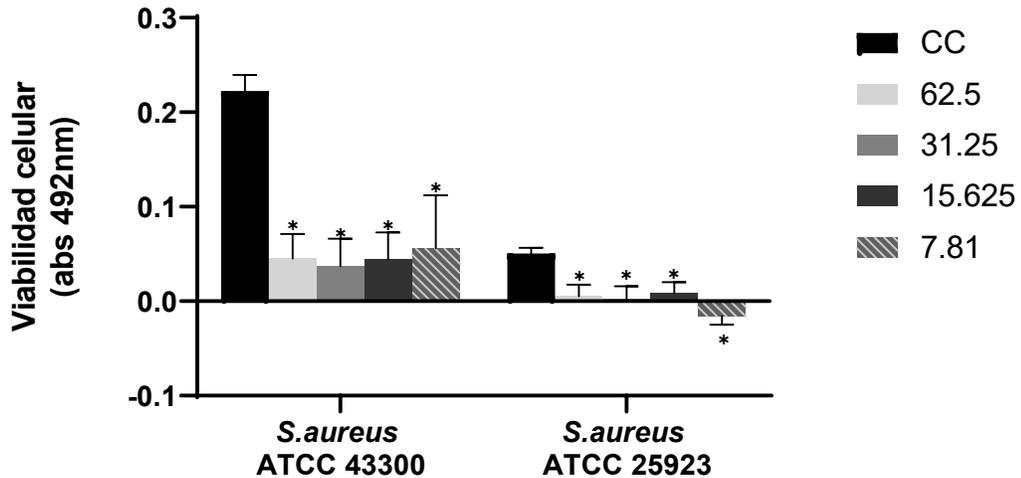


Figura 31. Efecto del extracto metanólico de *Echeveria agavoides* (500-7.81 µg/mL) sobre la actividad metabólica en la biopelícula obtenida en ensayo de inhibición de la formación de biopelícula de cepas Gram positivas: (A) *Staphylococcus aureus* (3R, 4R y 5R) y (B) *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300 y ATCC 25923). Las gráficas muestran valores de densidad óptica (DO), media ± desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes con cuatro réplicas. * Diferencias significativas respecto al grupo control (CC), aplicando la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

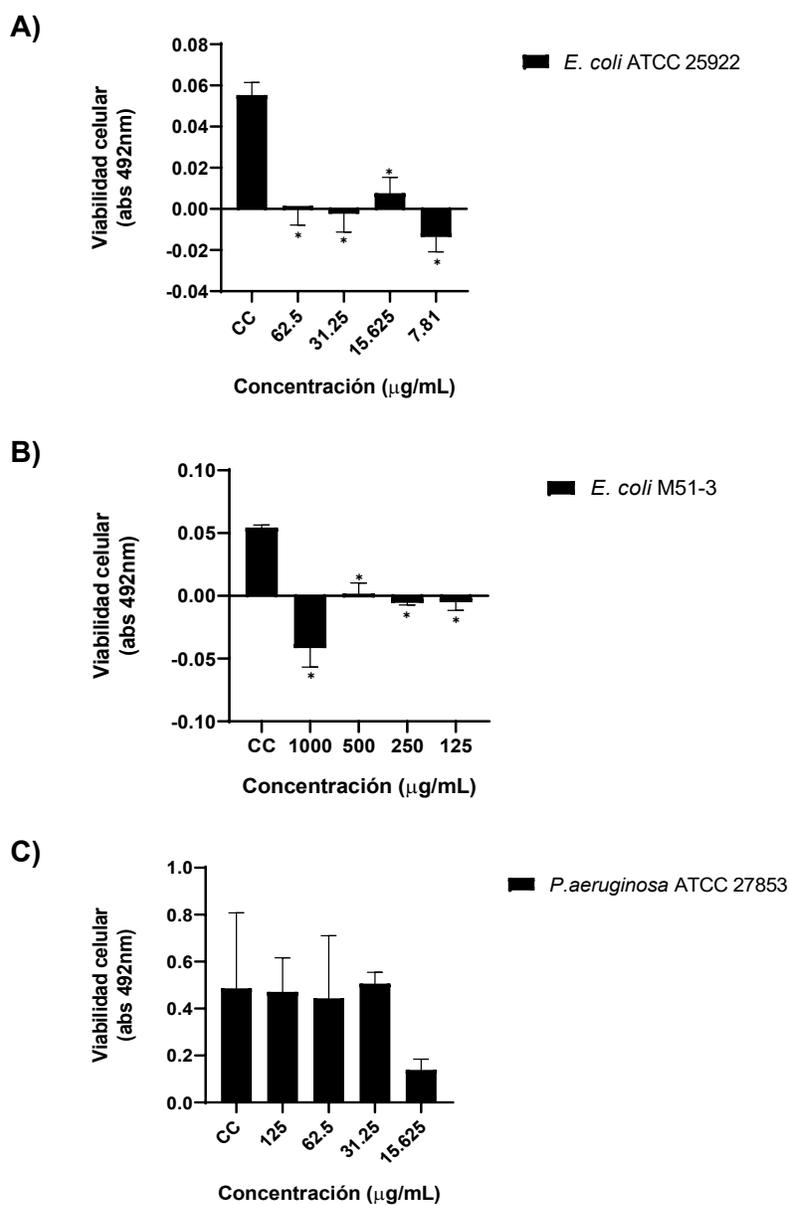


Figura 32. Efecto del extracto metanólico de *Echeveria agavoides* (1000-7.81 µg/mL) sobre la actividad metabólica en la biopelícula obtenida en ensayo de inhibición de la formación de biopelícula de cepas Gram negativas: (A) *Escherichia coli* ATCC 25922, (B) *Escherichia coli* M51-3 y (C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Las gráficas muestran valores de densidad óptica (DO), media \pm desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes con cuatro réplicas. * Diferencias significativas respecto al grupo control (CC), aplicando la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

9.1.3.3. *Echeveria derenbergii*

El EM de *E. derenbergii* disminuyó la actividad metabólica para algunas cepas de *S. aureus* y sólo a algunas concentraciones (cepa/concentración/% de inhibición): 3R/1000-250 µg/mL/ 29.22-87.82%, 4R/ 1000 y 250 µg/mL/ 84.11 y 24.54% y 5R/ 1000 y 500 µg/mL/ 81.19 y 22.25%. En contraste, el EM no afectó significativamente la actividad metabólica de las cepas ATCC 43300 y 25923 (**Figura 33**).

El EM de *E. derenbergii* no afectó significativamente la actividad metabólica de las cepas Gram negativas, registrándose disminución a todas las concentraciones para las cepas de *E. coli* y a 500-125 µg/mL para *P. aeruginosa* ATCC 27853 (**Figura 34**).

9.1.4. Actividad metabólica en la erradicación de biopelícula

9.1.4.1. *Echeveria secunda*

En los experimentos del efecto del EM de *E. secunda* sobre la erradicación de biopelícula, el tratamiento con 250 µg/mL aumentó significativamente la viabilidad de *S. aureus* con respecto al control correspondiente, excepto para *S. aureus* 5R. En general, todas las concentraciones (250-31.25 µg/mL) incrementaron la viabilidad de *S. aureus* 3R, mientras que para el aislado 5R no se vio afectado. En las bacterias *S. aureus* ATCC (43300 y 25923) y 4R, bajas concentraciones del EM disminuyeron no significativamente la viabilidad (**Figura 35**).

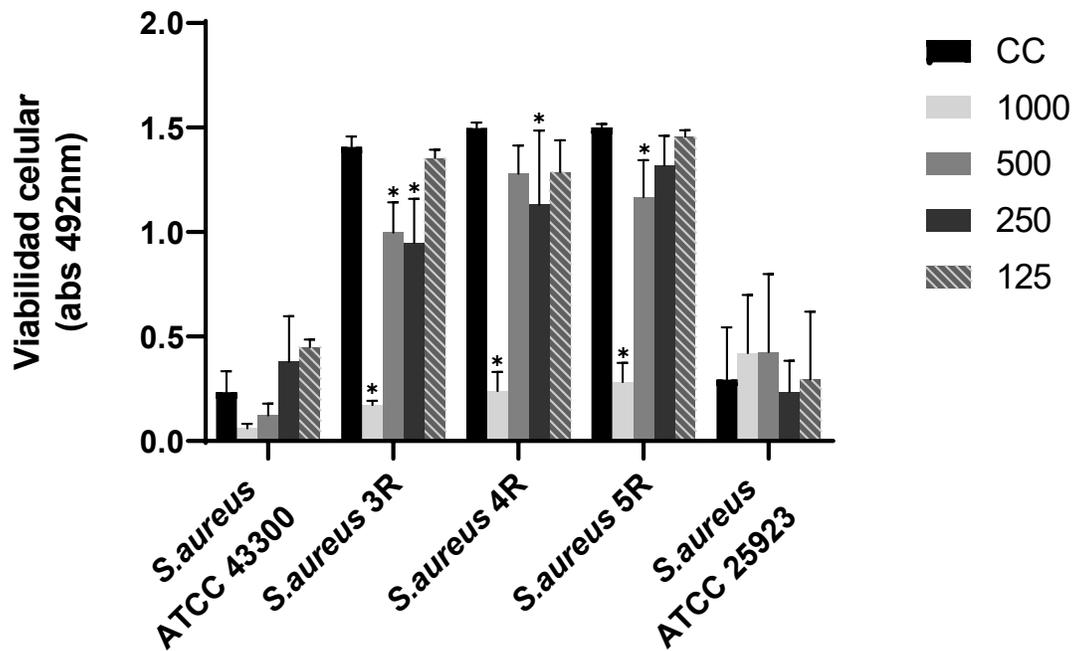


Figura 33. Efecto del extracto metanólico de *Echeveria derenbergii* (1000-125 $\mu\text{g/mL}$) sobre la actividad metabólica en la biopelícula obtenida en ensayo de inhibición de la formación de biopelícula de cepas Gram positivas *Staphylococcus aureus*. La gráfica muestra valores de densidad óptica (DO), media \pm desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes con cuatro réplicas. * Diferencias significativas respecto al grupo control (CC), aplicando la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

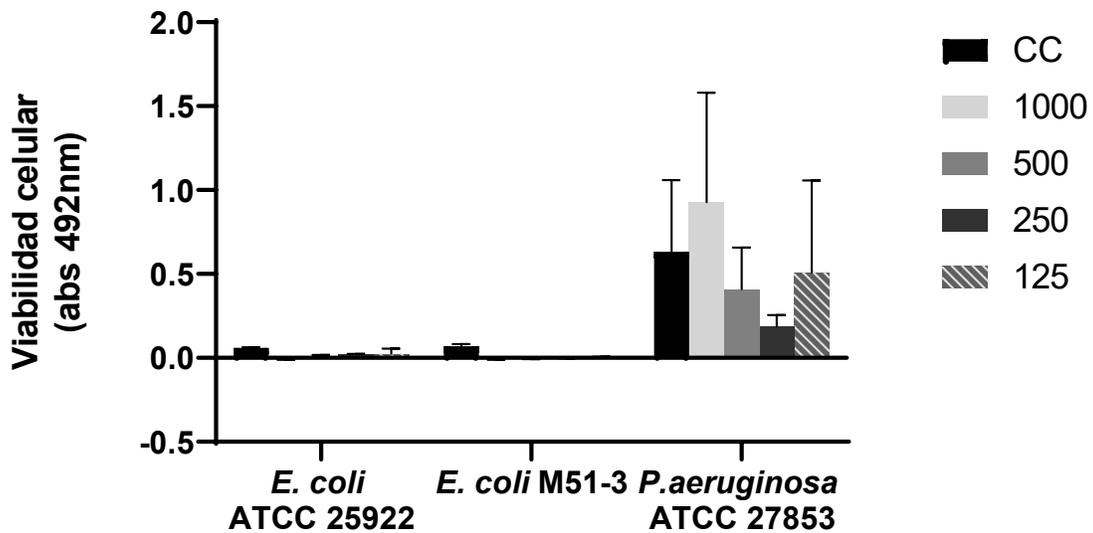


Figura 34. Efecto del extracto metanólico de *Echeveria derenbergii* (1000-125 µg/mL) sobre la actividad metabólica en la biopelícula obtenida en ensayo de inhibición de la formación de biopelícula de cepas Gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*). La gráfica muestra valores de densidad óptica (DO), media \pm desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes con cuatro réplicas. * Diferencias significativas respecto al grupo control (CC), aplicando la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

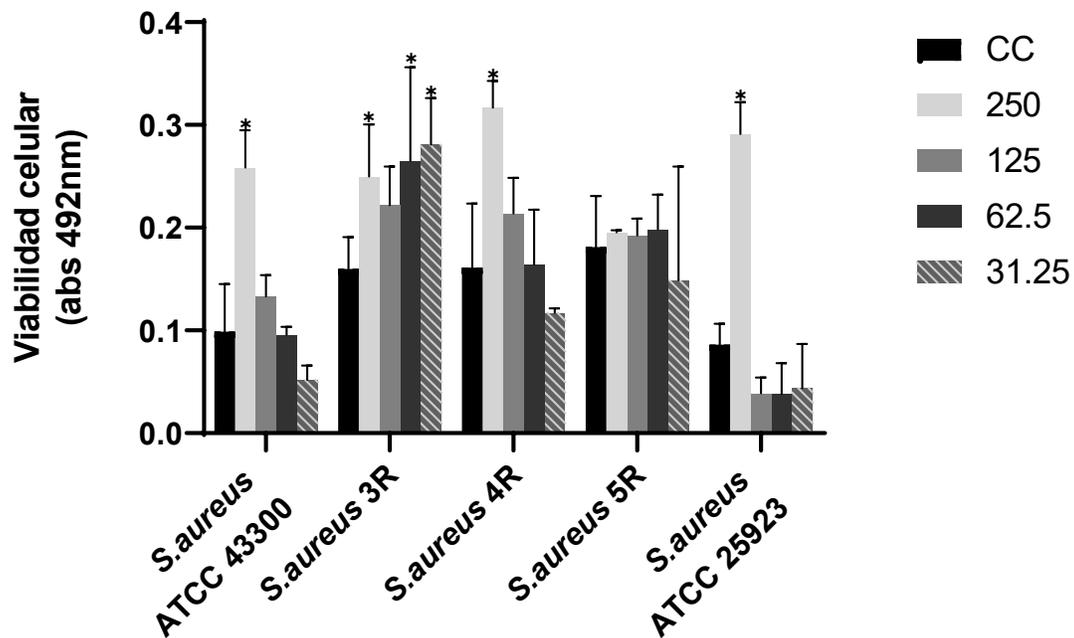


Figura 35. Efecto del extracto metanólico de *Echeveria secunda* (250-31.25 µg/mL) sobre la actividad metabólica en la biopelícula obtenida en ensayo de erradicación de la biopelícula de cepas Gram positivas *Staphylococcus aureus*. La gráfica muestra la densidad óptica (DO), media \pm desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes con cuatro réplicas. * Diferencias significativas respecto al grupo control (CC), aplicando la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

En cuanto a las cepas Gram negativas, el EM de *E. secunda* (125-15.625 µg/mL) disminuyó significativamente la viabilidad de *E. coli* ATCC 25922 (77.22-100%) (**Figura 36A**); mientras que para *E. coli* M51-3 se registró disminución significativa a las concentraciones más bajas: 1000 µg/mL (70.56%), 500 µg/mL (62.45%) y 250 µg/mL (78.02%) (**Figura 36B**). En el caso de *P. aeruginosa* ATCC 27853, el EM de *E. secunda* no afectó significativamente su viabilidad (**Figura 36C**).

9.1.4.2. *Echeveria agavoides*

En el experimento del efecto del EM de *E. agavoides* en la erradicación de biopelícula de *S. aureus*, en general, la viabilidad de las bacterias tratadas fue mayor que la del control, registrándose diferencias significativas en los tratamientos a las concentraciones mayores. El incremento significativo en viabilidad de las bacterias tratadas con el EM a 1000-250 µg/mL estuvo en el rango de 1.1 a 4.7 veces mayor al control para los aislados clínicos de *S. aureus* 3R, 4R y 5R; mientras que para las cepas ATCC solo se registró a 125 µg/mL, 2.5 veces para la 43300 y 1 vez para la 25923 (**Figuras 37A y 37B**).

En el caso de las cepas Gram negativas, el EM de *E. agavoides* disminuyó la viabilidad de *E. coli*, registrándose diferencias significativas solo a las concentraciones menores. Los valores de viabilidad para *E. coli* ATCC 25922 tratadas con el EM fueron: 58.38% a 62.5 µg/mL, 50.63% a 31.25 µg/mL y 50.18% a 15.625 µg/mL (**Figura 38A**); mientras que para *E. coli* M51-3 fueron 65.49% a 500 µg/mL y 75.81% a 250 µg/mL (**Figura 38B**). En contraste, el EM de *E. agavoides* (250-31.25 µg/mL) indujo un aumento no significativo en la viabilidad de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (**Figura 38C**).

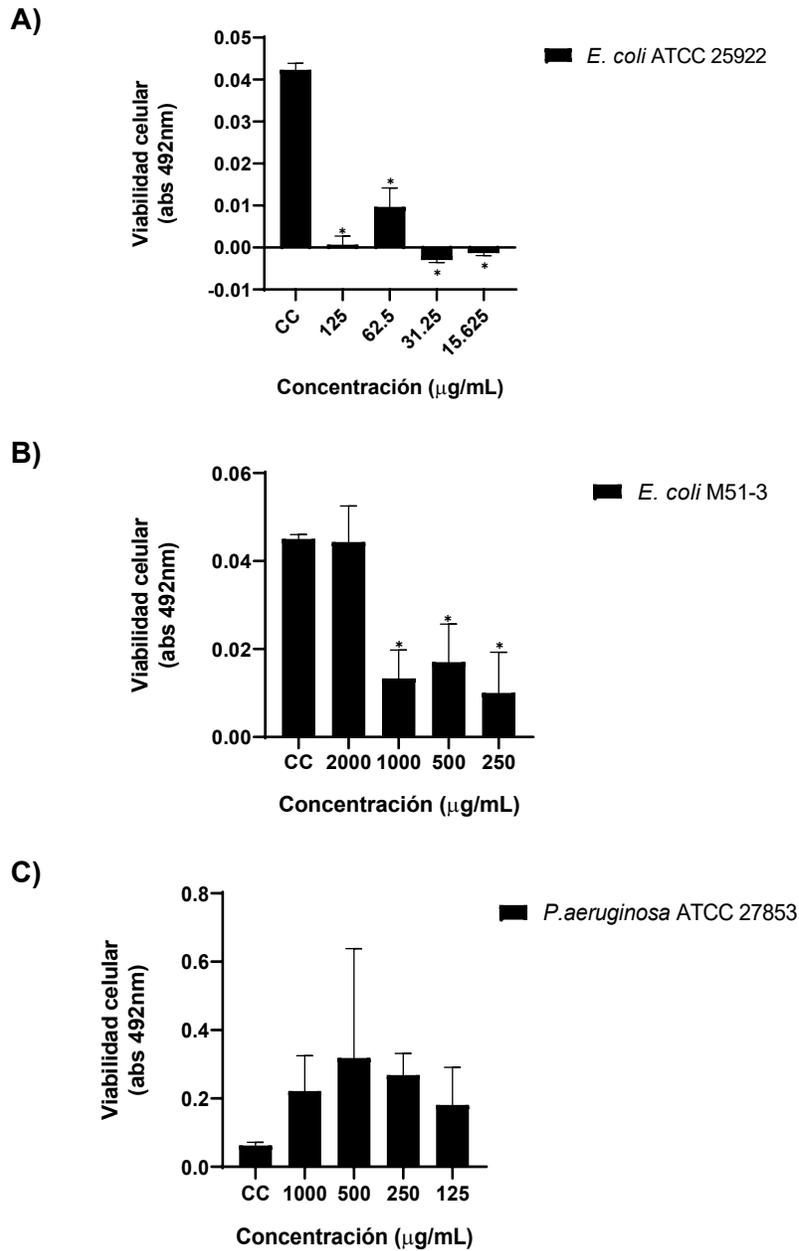
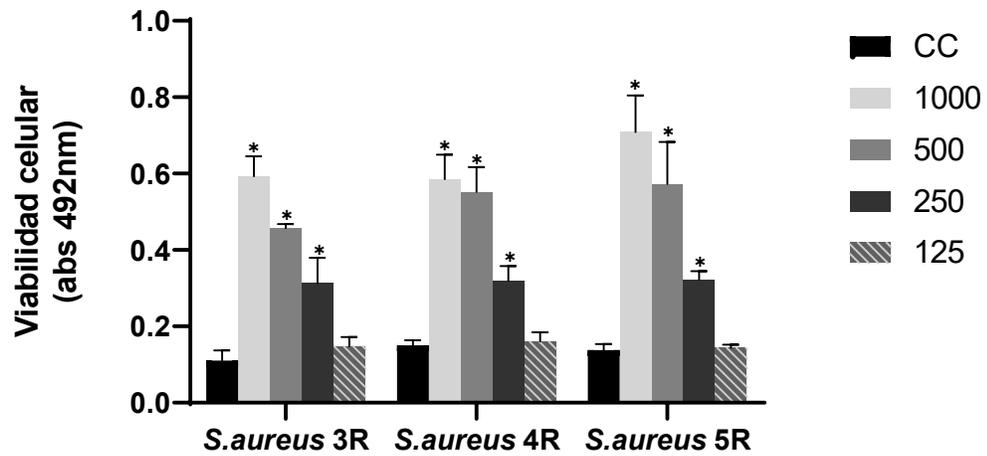


Figura 36. Efecto del extracto metanólico de *Echeveria secunda* (2000-15.625 µg/mL) sobre la actividad metabólica en la biopelícula obtenida en ensayo de erradicación de la biopelícula de cepas Gram negativas: (A) *Escherichia coli* ATCC 25922, (B) *Escherichia coli* M51-3 y (C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Las gráficas muestran valores de densidad óptica (DO), media \pm desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes con cuatro réplicas. * Diferencias significativas respecto al grupo control (CC), aplicando la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

A)



B)

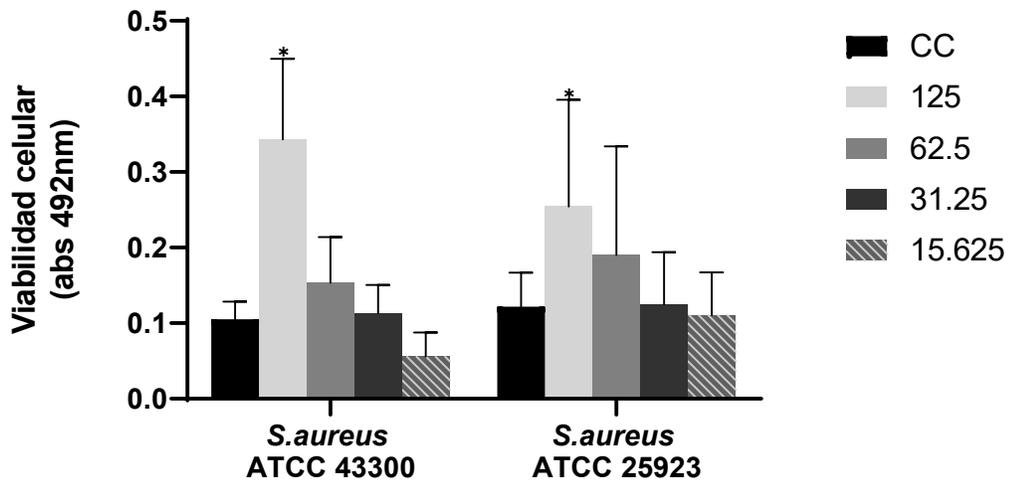


Figura 37. Efecto del extracto metanólico de *Echeveria agavoides* (1000-15.62 µg/mL) sobre la actividad metabólica en la biopelícula obtenida en ensayo de erradicación de la biopelícula de cepas Gram positivas: (A) *Staphylococcus aureus* (3R, 4R y 5R) y (B) *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300 y ATCC 25923). Las gráficas muestran valores de densidad óptica (DO), media \pm desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes con cuatro réplicas. * Diferencias significativas respecto al grupo control (CC), aplicando la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

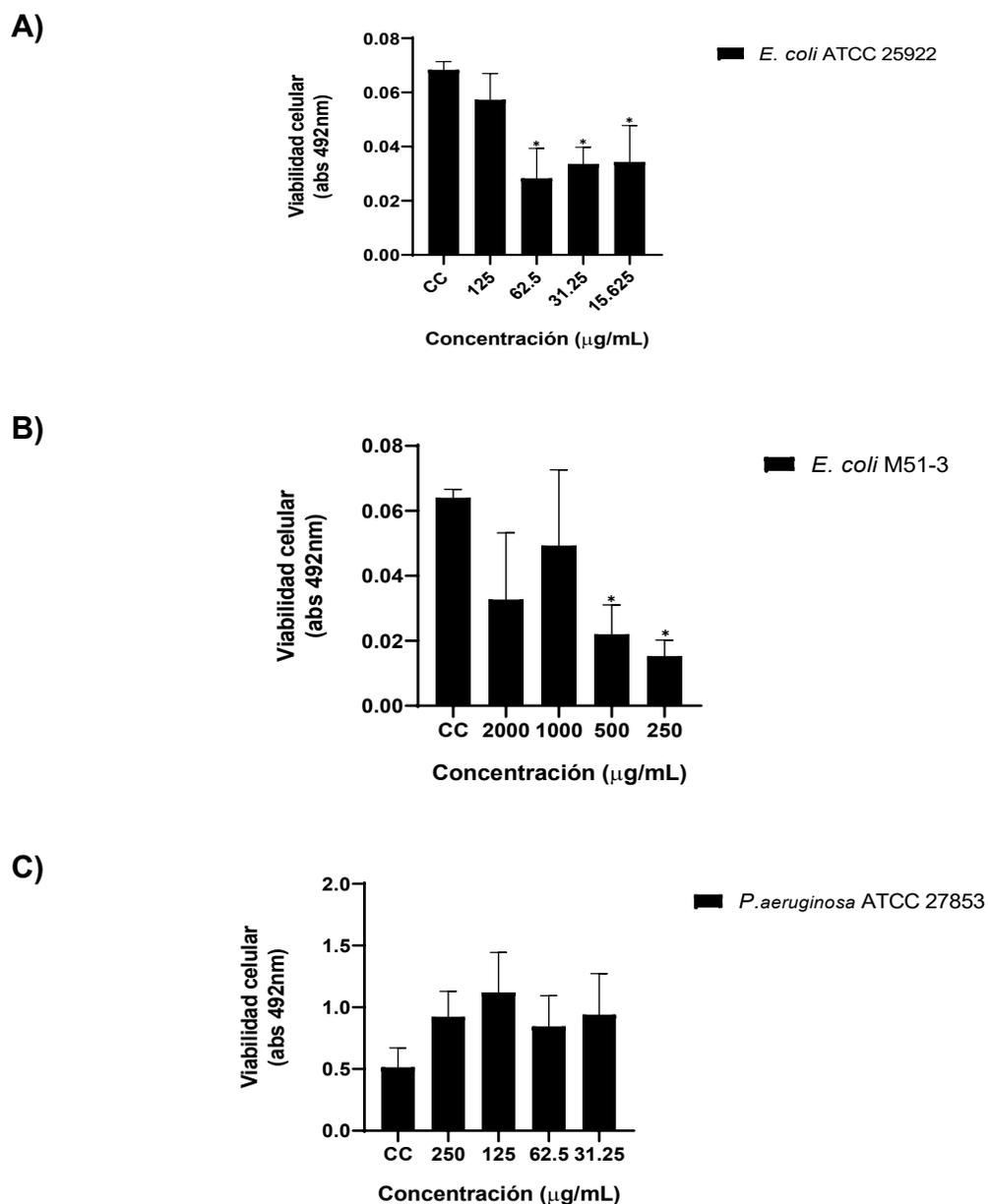


Figura 38. Efecto del extracto metanólico de *Echeveria agavoides* (2000-15.625 µg/mL) sobre la actividad metabólica en la biopelícula obtenida en ensayo de erradicación de la biopelícula de cepas Gram negativas: (A) *Escherichia coli* ATCC 25922, (B) *Escherichia coli* M51-3 y (C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Las gráficas muestran valores de densidad óptica (DO), media \pm desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes con cuatro réplicas. * Diferencias significativas respecto al grupo control (CC), aplicando la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

9.1.4.3. *Echeveria derenbergii*

La evaluación del efecto del EM de *E. derenbergii* sobre la actividad metabólica de *S. aureus*, en el experimento de erradicación de biopelícula, mostró una tendencia a un aumento en la viabilidad, registrándose diferencia significativa solo en los tratamientos de *S. aureus* 4R con 1000 y 500 µg/mL del EM (**Figura 39**).

En las cepas Gram negativas, el EM de *E. derenbergii* (2000-250 µg/mL) disminuyó la viabilidad celular. La disminución en la viabilidad fue significativa solo para ciertas concentraciones: en *E. coli* ATCC 25922 tratada con 1000 µg/mL alcanzó 100% y con 250 µg/mL 99.19%; en *E. coli* M51-3 tratada con 250 µg/mL fue del 100%; y en *P. aeruginosa* ATCC 27853 tratada a todas las concentraciones del EM (1000-250 µg/mL) alcanzó del 27.91 al 63.44% (**Figura 40**).

9.2. Efecto del EM sobre la ECM de biopelícula

Para una mayor comprensión del efecto de los EM de *Echeveria* en la inhibición de la formación de biopelícula de cepas Gram positivas y Gram negativas, en las bacterias tratadas con el EM se determinó la composición de la matriz extracelular polimérica de la biopelícula cuantificando el contenido de polisacáridos, proteínas y ADNe. La selección de los EM, sus concentraciones y las cepas se realizó considerando el porcentaje de inhibición en la formación de biopelícula causado por el EM en cada cepa, por consiguiente, se seleccionaron los extractos metanólicos de *E. secunda* y *E. agavoides* (**Cuadro 5**). En este enfoque se permitió que las biopelículas se formaran antes de extraer y observar la matriz extracelular polimérica de cada

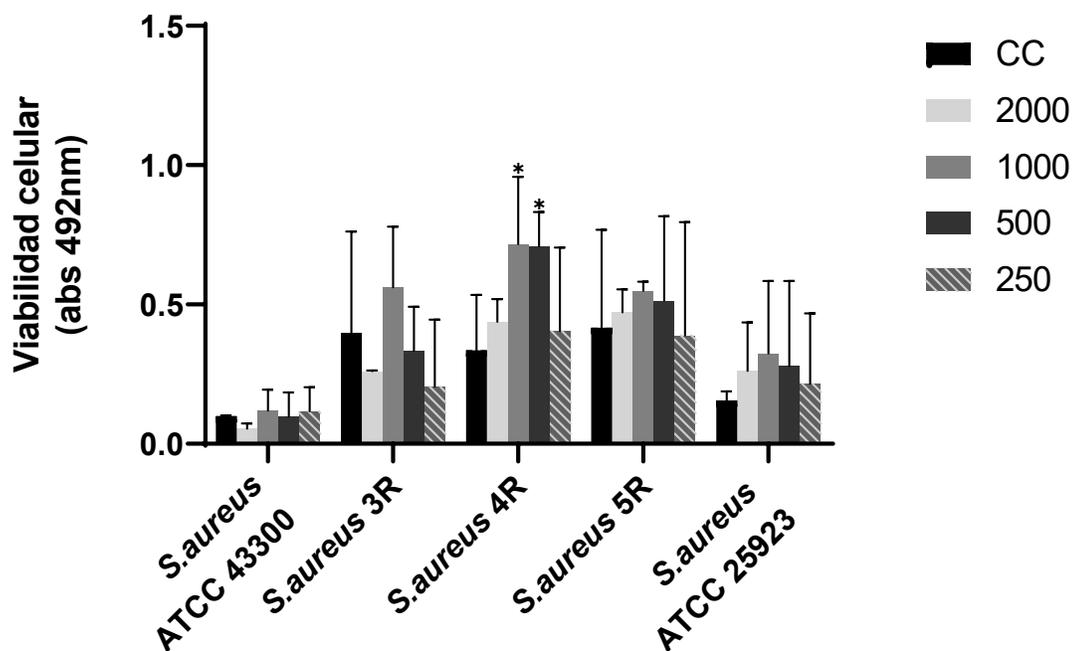


Figura 39. Efecto del extracto metanólico de *Echeveria derenbergii* (2000-250 µg/mL) sobre la actividad metabólica en la biopelícula obtenida en ensayo de erradicación de la biopelícula de cepas Gram positivas *Staphylococcus aureus*. La gráfica muestra la densidad óptica (DO), media \pm desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes con cuatro réplicas. * Diferencias significativas respecto al grupo control (CC), aplicando la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

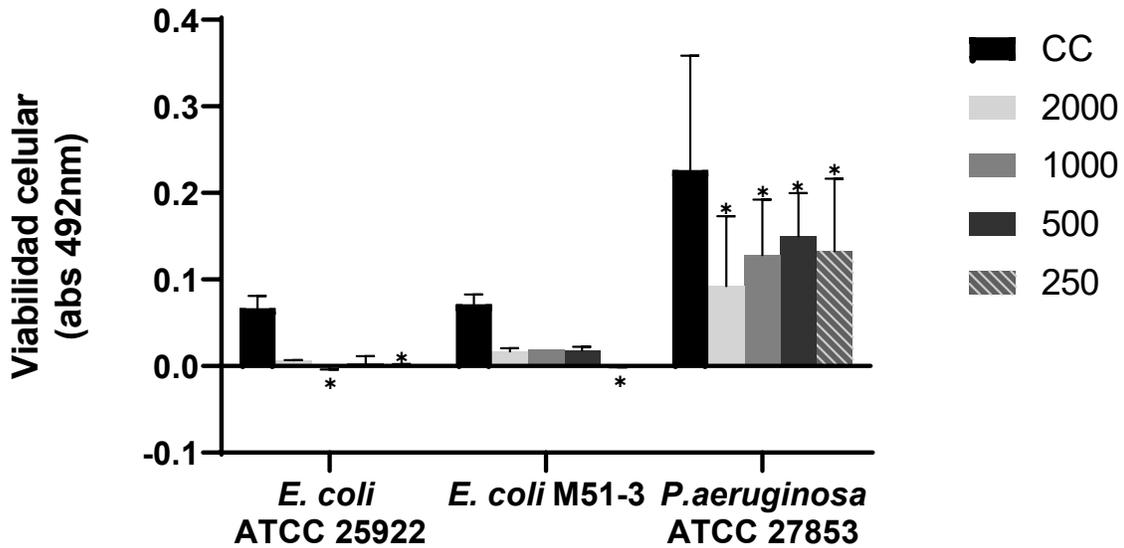


Figura 40. Efecto del extracto metanólico de *Echeveria derenbergii* (2000-250 µg/mL) sobre la actividad metabólica en la biopelícula obtenida en ensayo de erradicación de la biopelícula de cepas Gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*). La gráfica muestra valores de densidad óptica (DO), media \pm desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes con cuatro réplicas. * Diferencias significativas respecto al grupo control (CC), aplicando la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

Cuadro 5. Porcentaje de inhibición de formación de biopelícula de cepas Gram positivas y Gram negativas inducido por el extracto metanólico de las especies de *Echeveria* seleccionadas.

Especie de <i>Echeveria</i>	Cepas	Concentración (µg/mL)	% inhibición
<i>E. secunda</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	62.5	46.80
	<i>S. aureus</i> 4R	62.5	75.18
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	31.25	78.54
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	15.625	59.95
<i>E. agavoides</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	62.5	71.49
	<i>S. aureus</i> 4R	62.5	69.21
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	31.25	67.86
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	31.25	77.96

S. aureus = *Staphylococcus aureus*; *E. coli* = *Escherichia coli*

biopelícula, así como su respuesta a la concentración del EM correspondiente, comparando los resultados con su control de crecimiento.

9.2.1. Cuantificación de polisacáridos

9.2.1.1. Echeveria secunda

El EM de *E. secunda* inhibió al 100% la secreción de carbohidratos de *S. aureus* ATCC 43300, 4R y ATCC 25923 hacia la matriz extracelular polimérica de biopelícula. Por otra parte, el EM disminuyó hasta el 81.81% el contenido de carbohidratos presentes en la matriz extracelular de la biopelícula de *E. coli* ATCC 25922 (**Cuadro 6**).

9.2.1.2. Echeveria agavoides

El EM de *E. agavoides* disminuyó al 100% el contenido de carbohidratos presentes en la matriz extracelular de la biopelícula de *S. aureus* ATCC 43300, 4R y ATCC 25923 y *E. coli* 25922 (**Cuadro 6**).

9.2.2. Cuantificación de proteínas

9.2.2.1. Echeveria secunda

El contenido de proteínas de la matriz extracelular de las biopelículas de las cepas de *S. aureus* tratadas con el EM de *E. secunda* disminuyó hasta en un 98.64% (ATCC 25923), mientras que la disminución para *E. coli* ATCC 25922 fue de 78.20% (**Cuadro 6**).

Cuadro 6. Efecto de los EMs de *Echeveria* sobre los componentes de la matriz extracelular polimérica de biopelícula de cepas Gram positivas y Gram negativas*.

Especie de <i>Echeveria</i>	Cepas	Concentración (µg/mL)	% de inhibición de la secreción de componentes en la matriz extracelular polimérica de biopelícula		
			Polisacáridos	Proteínas	ADNe
<i>E. secunda</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	62.5	100	97.63	100
	<i>S. aureus</i> 4R	62.5	100	95.77	100
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	31.25	100	98.64	64.99
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	15.625	81.81	78.20	0
<i>E. agavoides</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	62.5	100	99.01	100
	<i>S. aureus</i> 4R	62.5	100	94.30	90.67
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	31.25	100	92.65	13.82
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	31.25	100	88.53	62.60

S. aureus = *Staphylococcus aureus*; *E. coli* = *Escherichia coli*

* Para la determinación de estos porcentajes se utilizó un control de crecimiento (inóculo más solvente).

9.2.2.2. *Echeveria agavoides*

La matriz extracelular de las bacterias *S. aureus* ATCC 43300, 4R y 25923 y *E. coli* ATCC 25922 tratadas con el EM de *E. agavoides* presentó hasta 99.01% (*S. aureus*) y 88.53% (*E. coli*) menos proteínas que la matriz de los controles correspondientes (**Cuadro 6**).

9.2.3. Cuantificación de ADNe

9.2.3.1. *Echeveria secunda*

En las bacterias tratadas con el EM de *E. secunda*, el contenido de ADNe en la matriz extracelular de la biopelícula de *S. aureus* ATCC 43300 (formadora débil de biopelícula) y *S. aureus* 4R (formadora moderada de biopelícula) disminuyó en 100%. Por otro lado, la disminución de ADNe para la cepa de *S. aureus* ATCC 25923 (formadora moderada de biopelícula) fue de 64.99% y para *E. coli* ATCC 25922 del 0% (**Cuadro 6**).

9.2.3.2. *Echeveria agavoides*

El contenido de ADNe en la matriz extracelular de las bacterias tratadas con el EM de *E. agavoides* disminuyó desde 13.82% en *S. aureus* ATCC 25923 hasta 100% en *S. aureus* ATCC 43300; mientras que el contenido en *E. coli* ATCC 25922 disminuyó 62.60% (**Cuadro 6**).

X. DISCUSIÓN

10.1. Evaluación de la actividad antibiopelícula de extractos metanólicos de tres especies de *Echeveria* de México

10.1.1. Inhibición de la formación de biopelículas

La formación de biopelículas es un mecanismo indirecto que favorece el desarrollo de resistencia a los antibióticos en las bacterias que tienen esa capacidad; por ejemplo, mediante la transferencia horizontal de genes (Famuyide y col., 2019). En este sentido, especies bacterianas de diferentes géneros son patógenos humanos y veterinarios, las infecciones que causan son de difícil tratamiento y forman biopelículas: e.g., *Escherichia* spp., *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Pasteurella* spp., *Bacillus* spp., *Salmonella* spp., entre otras (Famuyide y col., 2019). De esta manera, inhibir la formación de biopelícula es una estrategia crucial para prevenir y tratar infecciones bacterianas (Okba y col., 2021).

El EM de *E. secunda* inhibió la formación de biopelícula en cepas de *S. aureus* a las concentraciones más altas (125 y 62.5 µg/mL), alcanzando valores de 46.80 al 88.65% (**Figura 5**). Entre las bacterias Gram negativas, sólo se registró efecto significativo con la cepa más sensible (*E. coli* ATCC 25922), a todas las concentraciones evaluadas (62.5-7.81 µg/mL) y alcanzando valores de inhibición de 59.09 a 100%. En relación con *E. agavoides*, el EM (500-62.5 µg/mL) fue mejor inhibidor (68.1-100%) de la formación de biopelículas de las cepas de *S. aureus* menos sensibles al extracto (3R, 4R y 5R); mientras que para las cepas más sensibles (ATCC 43300 y ATCC 25923), el EM solo tuvo efecto a las concentraciones más altas (62.5 y

31.25 µg/mL), mostrando valores de inhibición de 39.58 a 89.21% (**Figura 9**). En cepas Gram negativas, el EM de *E. agavoides* sólo mostró efecto significativo a todas las concentraciones (62.5-7.81 µg/mL) en la cepa de *E. coli* ATCC 25922 (formador débil de biopelícula), presentando valores de inhibición de 77.96 al 93.76%. Entre los EMs de *Echeveria*, el EM de *E. derenbergii* tuvo el menor efecto inhibitorio, afectando significativamente dos cepas de *S. aureus* (3R y 5R) a concentraciones de 1000-125 µg/mL, con valores de 32.43 a 52.52% (**Figura 13**). A la fecha, los reportes sobre el efecto de extractos de especies de *Echeveria* en la inhibición de la formación de biopelícula son inexistentes. Sin embargo, algunas especies de la familia Crassulaceae presentan actividad antibiopelícula. En este sentido, el EM de hojas de *Graptopetalum paraguayense* (2500 µg/mL) inhibió en un 90% la formación de biopelícula de MRSA NBIMCC 8327 (Zaharieva y col., 2019). Aunque el porcentaje de inhibición de esta investigación fue superior a la mayoría de los obtenidos en nuestro estudio, el EM se evaluó a una concentración más alta. Asimismo, Kim y col. (2020) investigaron el efecto de la fracción en acetato de etilo de *Orostachys japonicus* en la inhibición de formación de biopelícula de MRSA, registrando un efecto concentración-dependiente: 91.91±14.93% (500 µg/mL), 67.66±7.67% (1000 µg/mL), 50.45± 9.11% (2000 µg/mL) y 38.91±4.77% (4000 µg/mL). Este comportamiento es similar al observado para el efecto del EM de *E. agavoides* en cepas de *S. aureus* (**Figura 9**). Por otro lado, Barboza y col. (2016) reportaron que el extracto acuoso de hojas de *Kalanchoe pinnata* (500 y 1000 µg/mL) exhibió un efecto inhibitorio en la formación de biopelícula de *E. coli* enteroagregativa 042 superando el 50%. Este porcentaje de inhibición fue menor al registrado con los EMs de *E. secunda* y *E. agavoides*,

alcanzando valores hasta del 100% en la cepa *E. coli* 25922, evaluados a concentraciones menores. En otro estudio, el EM de *Kalanchoe blossfeldiana* inhibió la formación de biopelículas de *P. aeruginosa* MTCC 2453 de manera dependiente a la concentración 84.7% (125 µg/mL), 69.22% (62.5 µg/mL), 37.9% (30 µg/mL) y 11.82% (15 µg/mL) (Sarkar y col., 2015). Al respecto y de manera general, los EMs de *Echeveria* fueron inactivos contra *P. aeruginosa*.

Por otra parte, Blando y col. (2019) reportaron el efecto inhibitorio de formación de biopelícula de *Staphylococcus aureus* ATCC 35556 (fuerte formador de biopelícula), tratado con extractos polifenólicos de cladodios (maduros e inmaduros) de *Opuntia ficus-indica*. A una concentración de 1000 µg/mL, el extracto de cladodio inmaduro mostró una inhibición del 80% en la formación de biopelícula; mientras que a la máxima concentración (1500 µg/mL), el extracto de cladodio inmaduro inhibió en un 85% y el extracto de cladodio maduro un 71% (Blando y col., 2019). Los autores sugieren que este efecto podría atribuirse a la presencia de flavonoides en los extractos de cladodios (Blando y col., 2019). Asimismo, los EM de *E. secunda* y *E. agavoides* tuvieron porcentajes de inhibición similares a los extractos polifenólicos de cladodios (maduros e inmaduros) de *Opuntia ficus-indica*, una especie con metabolismo CAM.

Comparando nuestros hallazgos con otros estudios, el EM de flores de *Eucalyptus sideroxylon* mostró una inhibición significativa de formación de biopelículas de *S. aureus* ACL51 (MRSA) en la máxima concentración (50 µg/mL), con una tasa de inhibición del 95.9%; mientras que el EM (300-30 µg/mL) no presentó efecto inhibitorio en *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Okba y col., 2021). La fuerte actividad antibiopelícula

del EM contra MRSA podría deberse a floroglucinoles, flavonoides y taninos identificados por HPLC-PDA-ESI-MS/MS (Okba y col., 2021). Este efecto fue similar al reportado para los EMs de *E. secunda* y *E. agavoides*. Por otro lado, Mehrishi y col. (2022) evaluaron la actividad antibiopelícula de EMs de *Azadirachta indica*, *Aloe vera* y *Mentha piperita* frente a 58 aislados clínicos multirresistentes a diversas concentraciones (50, 25, 12.5 y 6.25 mg/mL). La actividad antibiopelícula del EM de *A. indica* (50, 25, 12.5 y 6.25 mg/ml) alcanzó valores del 70 y 80% contra aislados clínicos productores de biopelícula fuertes y moderados (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. saprophyticus* y *Acinetobacter baumannii*), siendo *S. aureus* ATCC 25923 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 los que presentaron mayor porcentaje de inhibición (superior al 80%) en las concentraciones de 50 y 25 mg/ml (Mehrishi y col., 2022). En el caso del EM de *A. vera* (50, 25, 12.25 y 6.25 mg/ml) inhibió en un rango del 50-55% la formación de biopelículas de *S. aureus* ATCC 25923 y para los aislado de *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* y *Acinetobacter baumannii* su porcentaje de inhibición osciló entre 50-53% (Mehrishi y col., 2022). El EM de *M. piperita* (50, 25, 12.5 y 6.25 mg/ml) no presentó un efecto significativo sobre la inhibición de formación de biopelículas en *S. aureus* ATCC 25923 (< al 50%), mientras que el porcentaje de inhibición fue superior al 50% en los aislados *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* y *A. baumannii* (Mehrishi y col., 2022). Comparando con los EMs de *A. indica*, *A. vera* y *M. piperita*, la presente investigación mostró una inhibición similar o superior de los EMs de *E. secunda* y *E. agavoides* en *S. aureus* ATCC 25923 y *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Además, Alenazy (2023) reportó que el EM *Trigonella foenum-graecum* inhibió la formación de biopelícula en *E. coli* ATCC 35218 en 48.2% a 250 µg/mL y 85.3% a 500 µg/mL; mientras que fue de 70.95% a 500 µg/mL en *S. aureus* ATCC 25923. Dicho esto, el EM presentó un comportamiento similar a nuestros resultados en los EMs de *E. secunda* y *E. agavoides*. Por otro lado, Arab y col. (2022) encontraron que el extracto en acetato de etilo de *Senecio hoggariensis* mostró efecto antibiopelícula concentración-dependiente, registrando a 100 µg/mL la mayor actividad en *P. aeruginosa* ATCC 27853 (59.04%), *E. coli* ATCC 25922 (59.02%) y *E. faecalis* ATCC 29212 (58.13%); mientras que fue a 50 µg/mL en *S. aureus* ATCC 25923 (49.55%). Estos resultados están en el rango de valores de nuestros hallazgos para los EMs de *E. secunda* y *E. agavoides*.

La inhibición de la formación de biopelícula obtenida con los EMs de *E. secunda* y *E. agavoides* fue mejor que la del EM de *E. derenbergii*, destacando su actividad contra las cepas bacterianas resistentes y formadoras moderadas de biopelícula. *E. agavoides* fue la especie más interesante por su efecto sobre MRSA 3R, 4R y 5R, en todas las concentraciones evaluadas, y la formadora moderada de biopelícula *S. aureus* ATCC 25923 a la concentración más alta. Es importante considerar que los resultados pueden variar según la concentración y composición del extracto utilizado.

La formación de biopelículas es afectada por diversos factores como disponibilidad de nutrientes, temperatura, presión osmótica y pH, entre otros (Lebeloane y col., 2024). La adhesión de las células bacterianas a la superficie biótica o abiótica depende del movimiento browniano, las fuerzas electrostáticas y de van der Waals (Lebeloane y col., 2024). También, la hidrofobicidad de la superficie celular es

importante para la formación de biopelícula, propiedad de la que también depende la adhesión y desprendimiento bacteriano de la superficie (Lebeloane y col., 2024). La etapa de maduración de la biopelícula se regula mediante el proceso de señalización QS. Este sistema de comunicación célula a célula reconoce la densidad de la población bacteriana al medir y detectar la acumulación de moléculas señalizadoras específicas (autoinductores) que regulan la expresión genética y determinan la virulencia. A su vez, el sistema QS controla diversas actividades bacterianas, como la patogenicidad, virulencia, motilidad, bioluminiscencia, simbiosis, resistencia a los antibióticos y la producción de SPE (Lebeloane y col., 2024).

Existen compuestos fitoquímicos que regulan tanto la formación como el crecimiento de las biopelículas bacterianas, afectando diversas etapas del proceso de formación de biopelícula tales como la adhesión bacteriana, la motilidad y QS (Borges y col., 2013). Una ventaja adicional de estos compuestos es su menor probabilidad de provocar resistencia bacteriana (Borges y col., 2013). Por ejemplo, las homoserín-lactonas aciladas (AHL, por sus siglas en inglés) están involucradas en QS y son importantes para la formación de biopelículas bacterianas (Deryabin y col., 2019). Los terpenos, fenilpropanoides, flavonoides y taninos participan en la inhibición de formación de biopelículas, actuando como inhibidores del QS mediado por AHL en bacterias (Deryabin y col., 2019). Por lo tanto, el efecto inhibitorio de formación de biopelícula que presentan los tres EMs de *Echeveria* podría deberse al efecto en el QS.

En relación con análisis químicos de los EMs de las especies de *Echeveria* estudiadas, *E. secunda* tiene el mayor contenido de fenólicos totales (FenT) (400.2 mg

EAG/g EM) y taninos totales (TanT) (1650 mg EC/g EM), mientras que *E. derenbergii* presenta el menor contenido de FenT (19.6 mg EAG/g EM) y TanT (4.3 mg EC/g EM), pero destacó en flavonoides totales (FlaT) (63.9 mg EQ/g EM) (Peinado-Beltrán, 2021). Basado en esta información, la mayor actividad inhibitoria de formación de biopelícula de *E. secunda* y *E. agavoides* podría estar relacionada con el contenido de FenT y TanT.

Beltrán-Aguilar (2020) identificó compuestos fenólicos en estas especies mediante HPLC-MS-ESI. En *E. secunda* se identificaron flavonoides (miricetín-O-hexósido, petunidín-O-hexósido, quercetín-3-O-(ramnosil)-7-O-HMG-hexósido, quercetín-O-hexósido, quercetín-O-ramnosil-O-(diacetil)hexósido y quercetín ramnósido) y taninos (galato de galocatequina y (epi)galocatequín-3-O-galato). En *E. agavoides* se detectaron flavonoides (quercetín ramnósido, quercetín-O-hexósido, miricetín-O-pentósido, laricitrín-O-HMG-O-hexósido, isoramnetín-O-hexósido y petunidín-O-hexósido) y ácido gálico. Asimismo, en *E. derenbergii* se encontraron flavonoides (derivado de kaempferol, kaempferol-O-diacetilramnósido, kaempferol-O-ramnosil-O-(acetil)ramnósido, kaempferol-O-ramnósido, derivado de kaempferol ramnósido, quercetín-O-ramnosil-O-(diacetil)hexósido, quercetín-O-cafeico e isoramnetín-O-(cumaroil)hexósido (Beltrán-Aguilar, 2020). Esta información sugiere que el mayor contenido de FlaT y una mayor presencia de derivados de kaempferol en el EM no favorece la inhibición de la formación de biopelículas en las especies/cepas bacterianas evaluadas.

En la literatura está registrado que metabolitos secundarios de plantas (e.g., flavonoides, ácidos fenólicos, taninos) poseen actividades antibacterianas y

antibiopelícula (Slobodníková y col., 2016). De hecho, flavonoides como la quercetina, apigenina, luteolina y kaempferol inhiben la formación de biopelícula de *S. aureus* y *E. coli*. En tanto que algunos precursores de taninos inhiben la formación de biopelícula: catequina (*P. aeruginosa*), ácido gálico (*E. coli*) y (-)-galato de epigallocatequina (*S. aureus*) (Slobodníková y col., 2016).

10.1.2. Erradicación de biopelícula

La erradicación de biopelícula bacteriana sigue siendo un desafío crítico para los investigadores (Ray y Pattnaik, 2023). Estas biopelículas representan comunidades microbianas altamente organizadas y resistentes, donde las bacterias están protegidas por una matriz extracelular. La naturaleza de esta matriz y la capacidad de las bacterias para comunicarse y cooperar entre sí dificultan su eliminación aplicando antimicrobianos convencionales (Ray y Pattnaik, 2023).

En contraste con la nula actividad en la erradicación de biopelícula de las cepas de *S. aureus* de los EMs de *E. secunda* y *E. agavoides*, estos EMs mostraron actividad de erradicación en *E. coli*, los porcentajes de erradicación variaron del 40.36 al 100%. *E. coli* ATCC 25922 fue la más sensible al tener efecto en el rango de 125 a 15.625 µg/mL para ambos EMs. En la cepa *E. coli* M51-3 el efecto se observó a mayores concentraciones: 1000 µg/mL en *E. secunda* y 500-250 µg/mL en *E. agavoides*. Por otro lado, el EM de *E. derenbergii* (MIC > 1000 µg/mL) mostró un efecto estadísticamente significativo en la erradicación de las cepas Gram positivas y Gram negativas, destacando el efecto a 250 µg/mL en las cepas de *S. aureus* ATCC 43300 (37.64%), 4R (28.74%), *E. coli* ATCC 25922 (95.39%) y M51-3 (91.20%). En la cepa

P. aeruginosa ATCC 27853, el efecto fue significativo en concentraciones de 2000, 1000 y 500 µg/mL con un rango de erradicación de 19.74 a 58.56%.

No se han registrado informes sobre el efecto de erradicación de biopelícula en otras especies de *Echeveria*. No obstante, nuestros resultados coinciden con los obtenidos para el extracto etanólico de hoja de *Piper betle*, aunque a concentraciones menores. El extracto etanólico erradicó el 60% (620 µg/mL), 30% (310 µg/mL) y 25% (155 µg/mL) la biopelícula de *S. aureus* ATCC 29213; así como el 70% (2500 µg/mL), 65% (1250 µg/mL) y 20% (625 µg/mL) en la cepa *E. coli* ATCC 25922 (Saeloh y Visutthi, 2021). Los autores atribuyen esta actividad antibiopelícula al eugenol (segundo compuesto más abundante del extracto), considerando su capacidad para alterar las estructuras de las biopelículas y membranas celulares (Saeloh y Visutthi, 2021).

Otro estudio demostró que el extracto metanólico de raíz de *Aptosimum albomarginatum* tuvo efecto moderado en la erradicación de biopelícula (40%) de un aislado nasal de *S. aureus*, sin mostrar efecto sobre la biopelícula de *S. aureus* ATCC 25923 y *S. aureus* ATCC 33591 (MRSA) (Walter y Böck, 2021). Dicho resultado fue superior a los nuestros, sin embargo, no se especifica la concentración. Los autores señalan que este efecto puede deberse a flavonoides y saponinas presentes en la raíz de la planta (Walter y Böck, 2021). Por otro lado, el EM de la parte aérea de *Euphorbia hirta* fue eficaz en erradicar la biopelícula formada de *P. aeruginosa* ATCC 27853, caracterizado por una Concentración Mínima de Erradicación de biopelícula (MBEC) de 500 µg/mL (Perumal y Mahmud, 2013). Sin embargo, la actividad de erradicación del EM fue menor contra la cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853 (MBEC = 1000 µg/mL) y

no tuvo efecto sobre las cepas *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 33591 (MRSA) y los aislados clínicos resistentes (*Salmonella enterica* serovar Typhi, *Shigella dysenteriae*, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus*) a la mayor concentración evaluada (1000 µg/mL) (Perumal y Mahmud, 2013). Los autores sugieren que el efecto del EM en la erradicación de la biopelícula de *P. aeruginosa* podría atribuirse a su actividad inhibitoria de QS (Perumal y Mahmud, 2013). Este extracto mostró efectos de erradicación a concentraciones similares a las utilizadas para el EM de *E. derenbergii*. Consecuentemente, este EM podría ejercer su efecto de erradicación de la biopelícula de *P. aeruginosa* y *S. aureus* (ATCC 43300 y 4R) a través de inhibición del QS. Las bacterias utilizan el QS para coordinar y regular la formación de biopelículas. Por otra parte, los tres EMs de *Echeveria* presentaron una mayor eficacia en la erradicación de biopelículas producidas por bacterias Gram negativas que aquellas de Gram positivas. Debemos destacar que las cepas Gram negativas de este estudio se clasifican como formadoras de biopelícula débil o no formadoras de biopelículas, excepto *P. aeruginosa* que es fuerte. Al respecto, se ha sugerido que la hidrofobicidad de las superficies bacterianas desempeña un papel crucial en la adhesión bacteriana, formación y estabilización de biopelículas en superficies bióticas y abióticas (Chipenzi y col., 2020). El efecto sobre las bacterias Gram negativas podría relacionarse con la reducción de la hidrofobicidad de la superficie celular de *E. coli* ATCC 25922, M51-3, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. aureus* (ATCC 43300 y 4R), favoreciendo el desprendimiento de biopelículas preformadas (Chipenzi y col., 2020). Además, este desprendimiento podría ser resultado de la disminución en las fuerzas de adhesión en

las biopelículas, posiblemente causada por un incremento en la solubilidad de los polisacáridos bacterianos (Chipenzi y col., 2020).

La etapa de maduración de biopelículas bacterianas es afectada por diversos compuestos como el eugenol, carvona, carvacrol, carveol, timol, naringenina, kaempferol, quercetina, apigenina, quercitrina, sanguinarina, 2,4-dihidroxibencilformaldehído (DHBF) y cinamaldehído (Ray y Pattnaik, 2023). En la presente investigación, el EM de *E. derenbergii* fue la especie más eficaz en la erradicación de biopelícula, registrándose diferencia estadística significativa en varias cepas, principalmente en la moderada (*S. aureus* 4R) y fuerte formadora de biopelícula (*P. aeruginosa* ATCC 27853). Este extracto contiene una variedad de flavonoides, incluidos derivados de kaempferol, kaempferol-O-diacetilramnósido, kaempferol-O-ramnosil-O-(acetil) ramnósido, kaempferol-O-ramnósido, derivados de kaempferol ramnósido, quercetín-O-ramnosil-O-(diacetil) hexósido, quercetín-O-cafeico e isoramnetín-O-(cumaroil) hexósido (Beltrán-Aguilar, 2020). Esta diversidad de derivados de kaempferol no se encuentra en los otros dos EMs de *Echeveria* y pudiera explicar la mayor efectividad de *E. derenbergii*.

Flavonoides, fenólicos, cumarinas, quinonas, alcaloides, saponinas, glucósidos, esteroides, taninos, fenoles y triterpenoides poseen efecto antibiopelícula (Ray y Pattnaik, 2023). El mecanismo de acción contra la biopelícula bacteriana variará con el tipo de compuesto, incluyendo la privación del sustrato, la disrupción de la membrana celular, la unión con el complejo de adhesinas u otras proteínas, afectación de la pared celular, entre otros (Ray y Pattnaik, 2023).

Los EMs de *Echeveria* fueron más eficaces en inhibir la formación que en erradicar las biopelículas. Este comportamiento podría atribuirse a la presencia de compuestos fenólicos (e.g., flavonoides) en los extractos, sugiriendo que actúan en la regulación bacteriana y afectan el sistema de detección de quórum (Touzout y col., 2023). Por ejemplo, la quercetina (presente en estos extractos) es un inhibidor de la ADN girasa, necesaria para la replicación del ADN bacteriano (Yapıcı y Kivanç, 2023). Por lo tanto, los extractos son más efectivos contra la biopelícula cuando se añaden antes de su formación (Yapıcı y Kivanç, 2023).

10.1.3. Actividad metabólica en la biopelícula en la inhibición de su formación

Los EMs de *Echeveria* redujeron significativamente la actividad metabólica (80.28-100%) de las células en la biopelícula de *S. aureus* 3R, 4R y 5R; *E. secunda* evaluada de 125 a 31.25 µg/mL y *E. agavoides* de 500 a 62.5 µg/mL. El EM de *E. derenbergii* (1000-250 µg/mL) indujo una reducción de la viabilidad celular (22.25-87.82%) en la biopelícula de las cepas de *S. aureus* 3R, 4R y 5R. Solo el EM de *E. agavoides* (62.5-7.81 µg/mL) inhibió significativamente la viabilidad celular de las cepas de *S. aureus* ATCC 43300 y 25923, en un rango del 74.12 al 100%. La presente investigación es la primera en evaluar la actividad metabólica en biopelículas de cepas Gram positivas y Gram negativas tratadas con extracto de alguna especie de *Echeveria* para inhibir la formación de biopelícula bacteriana. En otras plantas modelo, el EM de semillas de cilantro (*Coriander sativum* L.) (4000 µg/mL) no inhibió la actividad metabólica de las células de la biopelícula de *S. aureus* CCUG 4151, mientras que, el EM de semillas de anís (*Pimpinella anisum*) (4000 µg/mL) mostró 19.9% de inhibición y el de hojas de menta (*Mentha piperita*) (2000 µg/mL) alcanzó un

61.7% de inhibición (Bazargani y Rohloff, 2016). En contraste, a concentraciones menores que las previamente mencionadas, los EMs de las especies de *Echeveria* mostraron mayores porcentajes de inhibición de viabilidad celular.

Investigaciones previas han evaluado la actividad metabólica en la inhibición de formación de biopelícula en cepas Gram negativas. El extracto etanólico de canela mostró efecto concentración-dependiente (1,562.5 µg/mL – 50,000 µg/mL) al inhibir la viabilidad celular de *E. coli* ATCC 25922 en un rango del 15 al 90% (Lu y col., 2021). Además, Yiemwattana y col. (2023) reportaron que el extracto etanólico de tallos de *Morus alba* (2000 µg/mL) inhibió en 60% la actividad metabólica en la biopelícula de *P. aeruginosa* ATCC 27853. Estos resultados fueron similares a los de la presente investigación, pero en ésta se utilizaron concentraciones menores en los EMs. En *E. coli* M51-3, el EM de *E. secunda* disminuyó significativamente la viabilidad celular a las concentraciones de 1000 µg/mL (66.41%) y 250 µg/mL (84.46%). Para *P. aeruginosa* ATCC 27853, la viabilidad disminuyó significativamente (45.63-96.63%) a todas las concentraciones del EM (500-62.5 µg/mL). En cambio, el EM de *E. agavoides* (62.5-7.81 µg/mL) inhibió completamente la actividad metabólica de *E. coli* ATCC 25922, excepto a 15.625 µg/mL (86.98%), mientras que en *E. coli* M51-3, el EM indujo una disminución significativa de 97.31-100% a concentraciones de 1000-125 µg/mL.

Analizando la actividad metabólica de las tres especies de *Echeveria*, el EM de *E. agavoides* fue el más efectivo en inhibir la viabilidad celular en cepas Gram positivas, seguido por *E. secunda* y luego *E. derenbergii*. Las tres especies mostraron un efecto significativo contra cepas resistentes y formadoras moderadas de biopelícula. En cepas Gram negativas, el EM de *E. secunda* mostró un mayor efecto

inhibitorio en la viabilidad celular en todas las cepas, incluyendo la cepa fuerte formadora de biopelícula, mientras que el EM de *E. agavoides* solo generó efecto en la viabilidad celular de dos cepas Gram negativas. Los resultados de las pruebas con cristal violeta y XTT indicaron que los EMs fueron efectivos para reducir la biomasa de la biopelícula y la viabilidad celular, lo que sugiere su capacidad para prevenir la formación de biopelícula. El EM de *E. secunda* mostró efectividad contra *S. aureus* (3R, 4R y 5R) y *E. coli* ATCC 25922, mientras que el EM de *E. agavoides* afectó a *S. aureus* (3R, 4R, 5R, ATCC 43300 y 25923) y *E. coli* ATCC 25922. Por otro lado, el EM de *E. derenbergii* solo tuvo efecto en *S. aureus* 3R y 5R.

La actividad metabólica de los microorganismos está estrechamente relacionada con la composición molecular de las células y esta relación puede variar según el estado en el que se encuentren los microorganismos (Lu y col., 2021). Diversos estudios han determinado que la disminución de la actividad metabólica en las biopelículas se debe principalmente a la reducción en el suministro de nutrientes y oxígeno. Esta disminución en la actividad metabólica puede explicar cómo las bacterias en la biopelícula desarrollan resistencia a los agentes antimicrobianos (Bazargani y Rohloff, 2016).

10.1.4. Actividad metabólica en la erradicación de biopelícula

Los estudios sobre el efecto de extractos de plantas en la actividad metabólica en biopelículas en el ensayo de erradicación son escasos y los datos generados en esta investigación son los primeros para extractos de especies de *Echeveria*. Considerando otras plantas, Almeida y col. (2022) reportaron que el aceite esencial de *Thymbra capitata* (0.64 µg/mL) redujo significativamente la viabilidad celular (77-90%)

de siete aislados clínicos de MRSA: *S. aureus* ATCC 25923, dos de septicemias (S6 y S12), dos de úlceras en pie diabético (D5 y D26) y dos de osteomielitis (O11 y O19) (Almeida y col., 2022). El extracto etanólico de la corteza de *Juglans regia* (64-512 µg/mL) disminuyó la viabilidad celular del 50 al 98% en la biopelícula preformada de *S. aureus* ATCC 25923, mientras que la reducción fue del 20 al 30% para *E. coli* ATCC 35218 tratada con 128-512 µg/mL del extracto (Chaieb y col., 2013). En contraste, nuestros resultados no mostraron un efecto estadísticamente significativo en viabilidad celular (ensayo de erradicación) de las cepas de *S. aureus* (ATCC 43300, 3R, 4R, 5R y ATCC 25923), pero sí en las cepas de *E. coli* ATCC 25922 y M51-3. Especialmente, el EM de *E. derenbergii* mostró una reducción de viabilidad significativa a las concentraciones de 1000 µg/mL (100%) y 250 µg/mL (99.19%) en *E. coli* ATCC 25922 y a la concentración de 250 µg/mL (100%) en *E. coli* M51-3. Además, el EM de *E. secunda* (125-15.625 µg/mL) también disminuyó significativamente la viabilidad de *E. coli* ATCC 25922 (77.22-100%); mientras que para *E. coli* M51-3 se registró una disminución significativa del 62.45-78.02% a las concentraciones de 1000-250 µg/mL. Por otro lado, el EM de *E. agavoides* redujo la viabilidad de *E. coli* ATCC 25922 del 50.18-58.38% a la concentración de 62.5-15.625 µg/mL, en el caso de *E. coli* M51-3 fueron 65.49% a 500 µg/mL y 75.81% a 250 µg/mL. Estos resultados sugieren que el EM de *E. derenbergii* es el más efectivo en la reducción de la viabilidad celular de *E. coli*, seguido por el EM de *E. secunda* y *E. agavoides*.

El extracto etanólico de tallos de *Morus alba* (4000 µg/mL) disminuyó significativamente (\cong 65%) la viabilidad celular de la biopelícula preformada de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Yiemwattana y col., 2023). Por otro lado, la reducción fue de

20 al 28% con el extracto etanólico de la corteza de *Juglans regia* (128-512 µg/mL) en *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Chaieb y col., 2013). Nuestra investigación destaca que solo el EM de *E. derenbergii* (2000-250 µg/mL) mostró una reducción estadísticamente significativa de la actividad metabólica (27.91-63.44%) en la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853.

El efecto de los EMs de *Echeveria* en la reducción de la viabilidad celular (ensayo de erradicación) fue similar al observado en la evaluación de la biomasa de la biopelícula con cristal violeta. Sin embargo, los EMs no lograron disminuir significativamente la actividad metabólica en las cepas Gram positivas. La viabilidad celular y la biomasa de las biopelículas de *E. coli* y *P. aeruginosa* (formadora fuerte de biopelícula) se redujeron considerablemente con el EM de *E. derenbergii*. Por otro lado, el EM de *E. secunda* afectó significativamente la actividad metabólica, reduciendo la viabilidad celular y la biomasa de las cepas *E. coli* ATCC 25922 y M51-3 (débil y no formadora de biopelícula, respectivamente), seguido por el EM de *E. agavoides*. Estos resultados confirman la efectividad de los EMs contra las bacterias Gram negativas, como *E. coli* y *P. aeruginosa*, destacando el potencial del EM de *E. derenbergii* frente a diferentes microorganismos.

10.2. Efecto del EM sobre la ECM de biopelícula

10.2.1. Cuantificación de polisacáridos

La ECM tiene un papel destacado en la formación de biopelículas y está constituida principalmente por compuestos de alto peso molecular, como polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos (Laspidou y Rittmann, 2002). La ECM estabiliza y crea una barrera en la biopelícula, mitigando los efectos adversos y la

pérdida de humedad (Laspidou y Rittmann, 2002). La composición de la ECM varía según la especie bacteriana e incluso entre cepas de una misma especie (Uruén y col., 2021). Cada SPE cumple una función crucial dentro de la biopelícula, e.g., los polisacáridos participan en las interacciones de adhesión (Samrot y col., 2021).

Los EMs de *E. secunda* y *E. agavoides* (62.5 y 31.25 µg/mL) disminuyeron al 100% el contenido de polisacáridos en la matriz extracelular de la biopelícula de *S. aureus* ATCC 43300, 4R y ATCC 25923. Nuestros hallazgos superan la eficacia del aceite esencial de cardamomo (MIC = 0.5 mg/mL), el cual redujo en un 60.69% el contenido de polisacáridos de MRSA T34 evaluado a 2 MBIC (Cui y col., 2020). Además, el EM de *E. secunda* (15.625 µg/mL) disminuyó en 81.81% y el de *E. agavoides* (31.25 µg/mL) en 100% el contenido de polisacáridos en la biopelícula de *E. coli* ATCC 25922. Estos resultados fueron mejores que el registrado para el extracto clorofórmico de cúrcuma (128 µg/mL) que redujo el contenido de carbohidratos de la ECM de la biopelícula formada por *E. coli* KT273995 (43.43%) y *S. aureus* KT250728 (54.91%) (Hayat y col., 2018).

Contrastando con otras investigaciones que cuantificaron el contenido de polisacáridos, los EMs de *Echeveria* provocaron mayor disminución que el EM de hojas de *Bruguiera cylindrica*, el cual redujo la cantidad de polisacáridos presentes en la matriz extracelular de la biopelícula de *E. coli* ATCC 25404 en un 20% (10 µg/mL) y 30% (100 µg/mL), mientras que el EM de hojas de *Laguncularia racemosa* (10 µg/mL y 100 µg/mL) disminuyó el contenido en un 10% de la misma biopelícula (Glasenapp y col., 2019). Además, el extracto de semilla de toronja (*S. aureus*, 12.5 µg/mL; *E. coli*, 125 µg/ml) redujo significativamente la producción de polisacáridos en la matriz

extracelular de la biopelícula de *S. aureus* 7 (54.87%), *S. aureus* 8 (60.82%), *E. coli* ATCC 25922 (28.85%) y *E. coli* O157:H4 FRIK 125 (2.64%) en comparación con un grupo control (Song y col., 2019). Por otro lado, extracto fresco de ajo (0.5 y 1%) redujo la cantidad de polisacáridos en la biopelícula de *E. coli* productora de toxina Shiga en un 20 y 40%, respectivamente (Bhatwalkar y col., 2019).

Nuestros resultados indican que los EMs de *Echeveria* tienen la capacidad de inhibir la producción de polisacáridos tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas. En particular, el EM de *E. agavoides* resultó ser más efectivo que el EM de *E. secunda* en la reducción de los polisacáridos presentes en la biopelícula de *E. coli* ATCC 25922. Por lo tanto, una disminución en la producción de polisacáridos conlleva una reducción en la formación de biopelículas. De esta manera, este efecto de los EMs de *Echeveria* podría estar contribuyendo a sus actividades antibiopelícula, especialmente para el EM de *E. agavoides* que presentó una mayor actividad inhibitoria en la biomasa y viabilidad celular. También, el efecto observado de los EMs puede atribuirse a variaciones en la composición de la pared celular de las bacterias Gram positivas y Gram negativas. El principal componente de la pared celular de las bacterias Gram positivas es peptidoglicano; por lo tanto, toma especial relevancia que las bacterias produzcan polisacáridos. En contraste, la pared de las bacterias Gram negativas contiene lipopolisacáridos y deben ser más influenciadas por el fenómeno de hidrofobicidad (Song y col., 2019).

10.2.2. Cuantificación de proteínas

Las proteínas de la matriz extracelular en las biopelículas pueden provenir de los sistemas de secreción activos o de la liberación durante la lisis celular (Uruén y col.,

2021). Aunque la función de muchas de las proteínas en la matriz de la biopelícula aún no se comprende completamente, se ha identificado que algunas son esenciales en la formación o restructuración de la biopelícula generada por diversos patógenos (Uruén y col., 2021). Entre los componentes proteicos se incluyen subunidades proteicas de flagelos y pili, adhesinas de la superficie celular, proteínas extracelulares secretadas y proteínas de vesículas de la membrana externa; proteínas que contribuyen a la adhesión inicial a las superficies y, en ciertos microorganismos, también están implicadas en la migración a lo largo de las superficies, facilitando así la colonización (Fong y Yildiz, 2015). Por otro lado, las proteínas de la matriz son importantes para la estructura y estabilidad de las biopelículas. Estudios con bacterias mutantes demuestran que la ausencia de proteínas en la ECM reduce la formación y estabilidad de las biopelículas, alterando así sus arquitecturas (Fong y Yildiz, 2015).

La disminución del contenido de proteínas en la matriz extracelular de las biopelículas de las bacterias de *S. aureus* ATCC 43300, 4R y 25923 y *E. coli* ATCC 25922 tratadas con el EM de *E. secunda* (62.5-15.625 µg/mL) osciló del 95.77 al 98.64% para *S. aureus* y 78.20% para *E. coli*. Por otro lado, las bacterias tratadas con el EM de *E. agavoides* (62.5-31.25 µg/mL) mostraron una reducción del 92.65 al 99.01% para *S. aureus* y de 88.53% para *E. coli*. Comparando con otros estudios, el EM de hojas de *Bruguiera cylindrica* disminuyó el contenido de proteínas presentes en la matriz extracelular de la biopelícula de *E. coli* ATCC 25404 en un 10% (10 µg/mL), 38.4% (100 µg/mL) y 51.1% (1000 µg/mL) (Glasenapp y col., 2019). El extracto clorofórmico de cúrcuma (128 µg/mL) redujo significativamente el contenido de proteínas de la ECM en la biopelícula de *E. coli* KT273995 (30.54%) y *S. aureus*

KT250728 (60.11%) (Hayat y col., 2018). Sin embargo, este contenido de proteínas fue mayor al obtenido con las especies de *Echeveria*. Por otra parte, el extracto fresco de ajo (0.5 y 1%) no afectó el contenido de proteínas de la biopelícula de *E. coli* productora de toxina Shiga (Bhatwalkar y col., 2019). Por otro lado, el EM de hojas de *Laguncularia racemosa* (10 µg/mL) no afectó el contenido de proteínas en la biopelícula de *E. coli*; a 100 µg/mL la reducción fue del 5% y a 1000 µg/mL del 32.8% (Glasenapp y col., 2019). En todos los estudios mencionados, los porcentajes de inhibición del contenido de proteínas fueron inferiores a los registrados en este estudio.

La presente investigación demuestra que los EMs de *E. secunda* y *E. agavoides* inhiben la liberación de proteínas hacia la ECM generada por bacterias Gram positivas y Gram negativas, como *S. aureus* y *E. coli*. Ambas especies de *Echeveria* mostraron altos porcentajes de inhibición en la secreción de proteínas en cepas moderadas en formación de biopelícula, destacando el EM de *E. agavoides* como el más efectivo. Además, el EM de *E. agavoides* presentó mejores resultados en la inhibición de formación de biopelículas y en la disminución de la viabilidad celular. Estos hallazgos sugieren que la disminución del contenido de proteínas contribuye a la actividad antibiopelícula bacteriana de los EMs de estas especies de *Echeveria*, destacando el EM de *E. agavoides*.

10.2.3. Cuantificación de ADNe

El ADNe es un componente crucial en la matriz extracelular de biopelículas al participar en la regulación de la formación y en la estabilidad dimensional de las biopelículas (Yang y col., 2022). Además, el ADNe representa una parte significativa del ADN total presente en la ECM (Yang y col., 2022). Otras de las funciones del ADNe

incluyen el suministro de nutrientes, su papel como portador de información genética en la transferencia horizontal de genes y la formación y maduración de biopelículas (Yang y col., 2022).

No existen reportes previos sobre el contenido de ADNe en biopelículas de bacterias tratadas con extractos de *Echeveria*. Por lo tanto, resulta pertinente contrastar con el efecto de otros extractos de plantas. El extracto acuoso de *Polygonum chinense* (250, 500, 1000, 2000 y 4000 µg/mL) mostró una reducción dependiente de la concentración en el contenido de ADNe de la biopelícula de *S. aureus* ATCC 29213, registrando porcentajes superiores a 28, 48, 64, 80 y 88%, respectivamente (Zeng y col., 2022). Tabunhan y Tungsukruthai (2022) reportaron que el extracto etanólico de rizoma de *Curcuma zedoaria* (625, 312.5, 156.25, 78.125, 39.0625 y 19.53 µg/mL) disminuyó significativamente el contenido de ADNe en la biomasa de biopelícula de *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) y *S. aureus* sensible a la meticilina ATCC 25923 (MSSA, por sus siglas en inglés); el efecto fue dependiente de la concentración del extracto, desde 156.25 µg/mL a 625 µg/mL para MRSA y de 39.0625 µg/mL a 625 µg/mL para MSSA. Por otro lado, Zhao y col. (2018) encontraron que el aceite de árbol de té redujo aproximadamente el 70% (4000 µg/mL), 60% (2000 µg/mL), 40% (1000 µg/mL) y 30% (500 µg/mL) del contenido de ADNe en la matriz extracelular de la biopelícula de *S. aureus* ATCC 29213.

En nuestro estudio, la medición espectrofotométrica mostró una reducción del 100% en la cantidad de ADNe en la matriz de biopelícula de *S. aureus* ATCC 43300 y 4R tras el tratamiento con el EM de *E. secunda* (62.5 µg/mL). Asimismo, la cepa *S. aureus* ATCC 25923 mostró una disminución del 64.99% cuando se expuso al mismo

extracto a una concentración de 31.25 µg/mL. Respecto a las cepas tratadas con el EM de *E. agavoides*, el contenido de ADNe se redujo desde el 13.82% (31.25 µg/mL) en *S. aureus* ATCC 25923 hasta el 100% (62.5 µg/mL) en *S. aureus* ATCC 43300. A pesar de utilizar concentraciones considerablemente menores en nuestra investigación, nuestros resultados fueron similares o superiores a los estudios previos.

Como se ha mencionado, los estudios sobre la cuantificación de ADNe en biopelículas de bacterias tratadas con especies de *Echeveria* son escasos, incluso dentro del ámbito de las crasuláceas. Sin embargo, el ADNe se ha cuantificado en biopelículas de *E. coli* tratadas con diferentes compuestos. El flavonoide isoorientina está presente en diversas plantas, incluidas las especies de *Echeveria*. La isoorientina redujo el contenido de ADNe en la matriz de biopelícula de aislados de *E. coli* no sensible a carbapenémicos (MIC = 125 o 250 µg/mL), registrando un efecto dependiente de la concentración: 1/4 MIC (33.33%), 1/2 MIC (57.6%) y MIC (87.8%) (Zuo y col., 2023).

Vishwakarma y Vavilala (2019) informaron que los polisacáridos sulfatados extraídos de *Chlamydomonas reinhardtii* disminuyeron el contenido de ADNe en la biopelícula de *E. coli* MTCC 1687, las reducciones registradas fueron 78% (500 µg/mL), 89% (1000 µg/mL), 95% (2000 µg/mL), 91% (4000 µg/mL) y 92% (8000 µg/mL). Contrastando con los resultados de este estudio, el EM de *E. agavoides* redujo el contenido de ADNe en la matriz extracelular de la biopelícula de *E. coli* ATCC 25922 (62.60%) a una concentración de 31.25 µg/mL, siendo esta concentración menor que la utilizada en los estudios previamente mencionados.

La disminución en la liberación de ADNe se ha atribuido a compuestos fenólicos en los extractos que imitan la señal de detección de quórum (Zeng y col., 2022). Dado que los EM de *E. secunda* y *E. agavoides* contienen compuestos fenólicos (flavonoides, taninos), esto sugiere una alta eficacia de los extractos en la reducción del contenido de ADNe en las biopelículas bacterianas, principalmente en el EM de *E. agavoides*. La especie con mayor actividad antibiopelícula en inhibición y viabilidad celular (*E. agavoides*) presentó un mayor efecto en la inhibición del contenido de ADNe en las cepas Gram positivas y Gram negativas, por lo que la actividad antibiopelícula podría asociarse con este tipo de efecto.

XI. CONCLUSIONES

11.1 Conclusión general

Los tres EMs de *Echeveria* mostraron una significativa actividad inhibitoria en la formación de biopelículas y viabilidad celular, resaltando que los extractos de *E. secunda* y *E. agavoides* fueron más potentes que *E. derenbergii*. El tratamiento con *E. secunda* y *E. agavoides* provocó altos porcentajes en la reducción de componentes de la ECM (polisacáridos, proteínas y ADNe) en biopelículas de bacterias Gram positivas y Gram negativas, siendo el EM de *E. agavoides* el más efectivo. Esta disminución en los componentes de la ECM podría ser responsable de la reducción en la formación de biopelículas observadas. Además, el efecto de inhibición de los tres EMs de *Echeveria* podría deberse a sus componentes, como flavonoides y taninos, que actúan como inhibidores del QS.

11.2 Conclusiones específicas

1. El EM de *Echeveria agavoides* presentó el mejor efecto inhibitorio en la formación de biopelículas de cepas Gram positivas (*S. aureus* 3R, 4R, 5R y ATCC 25923), probablemente debido a su contenido de flavonoides, como la quercetina.
2. El EM de *Echeveria derenbergii* fue la única especie que erradicó la biopelícula formada por las cepas de *S. aureus* 4R y *P. aeruginosa* ATCC 27853. Este efecto del extracto podría deberse a su variado contenido de flavonoides, específicamente de derivados de kaempferol (no presentes en los otros dos EMs de *Echeveria*), o a que los compuestos del extracto inhiban el QS.

3. La actividad antibiopelícula presentada por las tres EMs de *Echeveria* fueron más efectivos en inhibición que en erradicación de las biopelículas. Al respecto, la actividad inhibitoria puede deberse a fenólicos y flavonoides presentes que afectan la regulación bacteriana y el sistema QS. Por ejemplo, la quercetina (presente en estos extractos) inhibe la ADN girasa, necesaria para la replicación del ADN bacteriano. Por lo tanto, los extractos son más efectivos contra la biopelícula cuando se añaden antes de su formación.
4. Los EMs de las tres especies de *Echeveria* presentaron un buen efecto inhibitorio en la actividad metabólica, destacando que los extractos de *Echeveria secunda* y *Echeveria agavoides* fueron más potentes que *Echeveria derenbergii*. En este sentido se sugiere que esta inhibición se debe a la reducción de la biomasa, asociada a una menor disponibilidad de nutrientes y oxígeno.
5. *Echeveria agavoides* presentó el efecto inhibitorio más destacado en la viabilidad celular de las biopelículas de cepas Gram positivas (*S. aureus* 3R, 4R, 5R y ATCC 25923), así como en la cepa Gram negativa *E. coli* ATCC 25922, coincidiendo con los resultados del método de tinción con cristal violeta, mostrando que esta especie puede prevenir la formación de biopelículas.
6. *Echeveria derenbergii* fue la única especie que redujo la viabilidad celular en la biopelícula formada por la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853, confirmando su efectividad en la reducción de la biomasa de la biopelícula observada con cristal violeta. Al compararlo con la composición de flavonoides de *E. secunda* y *E. agavoides*, la actividad puede asociarse a la presencia de derivados de kaempferol en el extracto.

7. El efecto de los EMs de *Echeveria secunda* y *Echeveria agavoides* sobre los componentes de la ECM (polisacáridos, proteínas y ADNe) de biopelícula de cepas Gram positivas y Gram negativas fue relevante. Sin embargo, *E. agavoides* fue más efectivo en la disminución del contenido de polisacáridos, proteínas y ADNe. Este efecto puede atribuirse a variaciones en la composición de la pared celular de las bacterias y a la presencia de compuestos fenólicos en los extractos, que imitan la señal de detección de quórum. Esto sugiere una alta eficacia en la reducción del contenido de ADNe en las biopelículas, especialmente en el caso de *E. agavoides*.

XII. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO

1. Evaluar el efecto de los tres EMs de *Echeveria* sobre la expresión de genes de las biopelículas bacterianas relacionados a su formación.
2. Analizar a detalle la interacción de los EMs de *Echeveria* sobre los componentes de la ECM de biopelícula.
3. Evaluar los mecanismos moleculares que sustentan la actividad antibiopelícula de los EMs de *Echeveria* mediante el análisis proteómico y metabolómico.
4. Investigar posibles sinergias entre los tres EMs de *Echeveria* y otros compuestos antimicrobianos, para potenciar su eficacia contra las biopelículas bacterianas.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abebe, G. M. (2020). The role of bacterial biofilm in antibiotic resistance and food contamination. *International Journal of Microbiology*, 2020, 1705814. <https://doi.org/10.1155/2020/1705814>
- Alenazy, R. (2023). Antimicrobial activities and biofilm inhibition properties of *Trigonella foenumgraecum* methanol extracts against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Life (Basel)*, 13(3), 703. <https://doi.org/10.3390/life13030703>
- Ali, K., Dwivedi, S., Azam, A., Saquib, Q., Al-Said, M. S., Alkhedhairy, A. A., y Musarrat, J. (2016). *Aloe vera* extract functionalized zinc oxide nanoparticles as nanoantibiotics against multi-drug resistant clinical bacterial isolates. *Journal of Colloid and Interface Science*, 472, 145-156. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.03.021>
- Almeida, L., Lopes, N., Gaio, V., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., Silva, V., . . . Cerca, N. (2022). *Thymbra capitata* essential oil has a significant antimicrobial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pre-formed biofilms. *Lett Appl Microbiol*, 74(5), 787-795. <https://doi.org/10.1111/lam.13665>
- Alós, J.-I. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global [10.1016/j.eimc.2014.10.004]. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10), 692-699. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>
- Alvardo-Chávez, B. (2017). *Actividad antioxidante y citotóxica de 35 plantas medicinales de la Cordillera Negra* [Maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos].
- Arab, Y., Sahin, B., Cyelan, O., Zellagui, A., Olmez, O. T., Kucukaydin, S., . . . 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>
- Azuero, A., Jaramillo-Jaramillo, C., Diana, S.-M., y D'Armas-Regnault, H. (2016). Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador / Analysis of antimicrobial effect of twelve medicinal plants of ancient

- use in Ecuador. *CIENCIA UNEMI*, 9(20). <https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol9iss20.2016pp11-18p>
- Barboza, T. J. S., Ferreira, A. F., Ignácio, A. C. P. R., y Albarello, N. (2016). Cytotoxic, antibacterial and antibiofilm activities of aqueous extracts of leaves and flavonoids occurring in *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. *Journal of Medicinal Plants Research*, 10(41), 763-770. <https://doi.org/10.5897/JMPR2016.6260>
- Bazargani, M. M., y Rohloff, J. (2016). Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food Control*, 61, 156-164. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.036>
- Beltrán-Aguilar, A. G. (2020). *Caracterización química y actividades antioxidante, antimutagénica e inhibitoria de α -glucosidasa in vitro de 17 especies de Echeveria de México* [Maestría, Universidad Autónoma de Sinaloa]. Culiacán, Sinaloa, México.
- Bhatwalkar, S. B., Gound, S. S., Mondal, R., Srivastava, R. K., y Anupam, R. (2019). Anti-biofilm and antibacterial activity of *Allium sativum* against drug resistant shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) isolates from patient samples and food sources. *Indian Journal of Microbiology*, 59(2), 171-179. <https://doi.org/10.1007/s12088-019-00784-3>
- Blando, F., Russo, R., Negro, C., De Bellis, L., y Frassinetti, S. (2019). Antimicrobial and antibiofilm activity against *Staphylococcus aureus* of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. cladode polyphenolic extracts. *Antioxidants*, 8(5), 117. <https://www.mdpi.com/2076-3921/8/5/117>
- Borges, A., Abreu, A. C., Malheiro, J., Saavedra, M. J., Simões, M., Frías, R., y Prados, Q. d. (2013). Biofilm prevention and control by dietary phytochemicals. En A. Méndez-Vilas (Ed.), *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education* (pp. 32-41). Formatex Research Center. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:31820864>
- Castañeda-Meléndrez, A. M., Magaña-Lizárraga, J. A., Martínez-Valenzuela, M., Clemente-Soto, A. F., García-Cervantes, P. C., Delgado-Vargas, F., y Bernal-Reynaga, R. (2024). Genomic characterization of a multidrug-resistant

- uropathogenic *Escherichia coli* and evaluation of *Echeveria* plant extracts as antibacterials. *AIMS Microbiology*, 10(1), 41-61. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2024003>
- Castañeda-Méndez, P. F., Hernández-Juarez, D., Muñoz-López, M., y Soto-Ramírez, L. E. (2018). Frecuencia de infecciones por *S. aureus* en pacientes hospitalizados en un hospital privado de tercer nivel de la Ciudad de México. *Revista Médica MD*, 9-10(4), 317-321. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revmed/md-2018/md184i.pdf>
- CENAPRECE. (2012). *Tuberculosis*. Secretaría de Salud. Recuperado 15 de diciembre de 2023 <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/descargas/pdf/tuberculosis.pdf>
- Cervantes-García, E., García-González, R., y Salazar-Schettino, P. M. (2015). *Staphylococcus aureus* asociado a la comunidad (CA-MRSA). *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 62(2), 100-111. <https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2015/pt152f.pdf>
- Chaieb, K., Kouidhi, B., Jrah, H., Mahdouani, K., y Bakhrouf, A. (2011). Antibacterial activity of thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa* and its potency to prevent bacterial biofilm formation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11, 29. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-29>
- Chaieb, K., Kouidhi, B., Slama, R. B. E. N., Fdhila, K., Zmantar, T., y Bakhrouf, A. (2013). Cytotoxicity, antibacterial, antioxidant, and antibiofilm properties of Tunisian *Juglans regia* bark extract. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, 19(2), 168-179. <https://doi.org/10.1080/10496475.2012.762818>
- Chávez-Jacobo, V. M. (2020). La batalla contra las superbacterias: No más antimicrobianos, no hay ESKAPE. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 23, 1405-1888X. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.202>
- Chiba, A., Sugimoto, S., Sato, F., Hori, S., y Mizunoe, Y. (2015). A refined technique for extraction of extracellular matrices from bacterial biofilms and its applicability.

Microbial Biotechnology, 8(3), 392-403. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12155>

- Chipenzi, T., Baloyi, G., Mudondo, T., Sithole, S., Fru Chi, G., y Mukanganyama, S. (2020). An evaluation of the antibacterial properties of tormentic acid congener and extracts from *Callistemon viminalis* on selected ESKAPE pathogens and effects on biofilm formation. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 2020, 8848606. <https://doi.org/10.1155/2020/8848606>
- Costa, E. M., Silva, S., Tavarina, F. K., y Pintado, M. M. (2017). Insights into chitosan antibiofilm activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*, 122(6), 1547-1557. <https://doi.org/10.1111/jam.13457>
- Cui, H., Zhang, C., Li, C., y Lin, L. (2020). Inhibition mechanism of cardamom essential oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. *LWT-Food Science and Technology*, 122, 109057. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109057>
- Delgado, N. M., Taboada Ramírez, J., Ortega Hernández, A., Merchant-Larios, H., Sánchez-Vázquez, M. L., Ramírez, G., y Reyes, R. (1999). Effects of a purified fraction from *Echeveria gibbiflora* aqueous crude extract on guinea-pig spermatozoa. *Phytotherapy Research*, 13(1), 46-49. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-1573\(199902\)13:1](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-1573(199902)13:1)
- Deryabin, D., Galadzhieva, A., Kosyan, D., y Duskaev, G. (2019). Plant-derived inhibitors of AHL-mediated quorum sensing in bacteria: Modes of action. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5588. <https://doi.org/10.3390/ijms20225588>
- Dolatabadi, S., Moghadam, H. N., y Mahdavi-Ourtakand, M. (2018). Evaluating the anti-biofilm and antibacterial effects of *Juglans regia* L. extracts against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathogenesis*, 118, 285-289. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.055>
- Domingo, D., y López-Brea, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*, 16(4), 385-393. https://seq.es/wp-content/uploads/2008/08/seq.es_seq_0214-3429_16_4_385.pdf

- Eid, O., Ezzat, S., Gonaid, M., y Choucry, M. (2018). Crassulaceae (chemistry and pharmacology) - A review. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(2), 234-240. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fjps.2018.07.003>
- Emam, M., Abdel-Haleem, D. R., Salem, M. M., Abdel-Hafez, L. J. M., Latif, R. R. A., Farag, S. M., . . . El Raey, M. A. (2021). Phytochemical profiling of *Lavandula coronopifolia* Poir. aerial parts extract and its larvicidal, antibacterial, and antibiofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecules*, 26(6), 1710. <https://doi.org/10.3390/molecules26061710>
- Famuyide, I. M., Aro, A. O., Fasina, F. O., Eloff, J. N., y McGaw, L. J. (2019). Antibacterial and antibiofilm activity of acetone leaf extracts of nine under-investigated south African *Eugenia* and *Syzygium* (Myrtaceae) species and their selectivity indices. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1), 141. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2547-z>
- Fong, J. N. C., y Yildiz, F. H. (2015). Biofilm matrix proteins. *Microbiology Spectrum*, 3(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0004-2014>
- García, A., Martínez, C., Juárez, R. I., Téllez, R., Paredes, M. A., Herrera, M. d. R., y Giono, S. (2019). Resistencia a la meticilina y producción de biopelícula en aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa* negativa en México. *Biomédica*, 39(3), 513-523. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4131>
- Glaserapp, Y., Cattò, C., Villa, F., Saracchi, M., Cappitelli, F., y Papenbrock, J. (2019). Promoting beneficial and inhibiting undesirable biofilm formation with mangrove extracts. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14), 3549. <https://doi.org/10.3390/ijms20143549>
- Goel, N., Fatima, S. W., Kumar, S., Sinha, R., y Khare, S. K. (2021). Antimicrobial resistance in biofilms: Exploring marine actinobacteria as a potential source of antibiotics and biofilm inhibitors. *Biotechnology Reports*, 30, e00613. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00613>
- González-Mendoza, J., Maguiña-Vargas, C., y González-Ponce, F. d. M. (2019). La resistencia a los antibióticos: un problema muy serio *Acta Médica Peruana*, 36,

- 145-151. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172019000200011&nrm=iso
- Green, M. R., y Sambrook, J. (2017). Precipitation of DNA with isopropanol. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2017(8), pdb.prot093385. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot093385>
- Hall, C. W., y Mah, T.-F. (2017). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 276-301. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux010>
- Hayat, S., Sabri, A. N., y McHugh, T. D. (2018). Chloroform extract of turmeric inhibits biofilm formation, EPS production and motility in antibiotic resistant bacteria. *Journal of General and Applied Microbiology*, 63(6), 325-338. <https://doi.org/10.2323/jgam.2017.01.004>
- Heredia-Mercado, B. (2015). *Actividad adaptogénica, inmunomoduladora y antioxidante de tres especies de Echeveria (E. craigiana, E. kimnachii, E. subrigida) de Sinaloa* [Maestría, Universidad Autónoma de Sinaloa]. Culiacán, Sinaloa, México.
- Instituto Nacional de Salud Pública. (2020). *Día mundial de la tuberculosis 2019*. Instituto Nacional de Salud Pública. Recuperado 1 de enero de 2024 <https://www.insp.mx/avisos/4904-tuberculosis-dia-mundial.html>
- Kačániová, M., Galovičová, L., Ivanišová, E., Vukovic, N. L., Štefániková, J., Valková, V., . . . Tvrdá, E. (2020). Antioxidant, antimicrobial and antibiofilm activity of coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil for its application in foods. *Foods*, 9(3), 282. <https://www.mdpi.com/2304-8158/9/3/282>
- Kannappan, A., Gowrishankar, S., Srinivasan, R., Pandian, S. K., y Ravi, A. V. (2017). Antibiofilm activity of *Vetiveria zizanioides* root extract against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbial Pathogenesis*, 110, 313-324. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.07.016>
- Karwowska, K., Brzezicka, E., Kozieradzka-Kiszkurno, M., y Chernetsky, M. (2015). Anatomical structure of the leaves of *Crassula cordata* (Crassulaceae). *Modern Phytomorphology*, 8, 53-54. <https://doi.org/10.5555/20153218945>

- Karygianni, L., Ren, Z., Koo, H., y Thurnheer, T. (2020). Biofilm matrixome: Extracellular components in structured microbial communities. *Trends in Microbiology*, 28(8), 668-681. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.03.016>
- Khan, J., Tarar, S. M., Gul, I., Nawaz, U., y Arshad, M. (2021). Challenges of antibiotic resistance biofilms and potential combating strategies: a review. *3 Biotech*, 11(4), 169. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02707-w>
- Kim, J.-H., Han, S.-Y., Kwon, J.-H., y Lee, D.-S. (2020). *Orostachys japonicus* ethyl acetate fraction suppresses MRSA biofilm formation. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 13(1), 38-45. <https://doi.org/10.4103/1995-7645.273573>
- Kimnach, M. (2003a). *Echeveria derenbergii*. International Crassulaceae Network. Recuperado 15 de noviembre de 2022 <http://www.crassulaceae.ch/de/artikel?akID=48&aalD=2&ailD=E&aID=5425>
- Kimnach, M. (2003b). *Echeveria secunda*. International Crassulaceae Network. Recuperado 15 de noviembre de 2022 <http://www.crassulaceae.ch/de/artikel?akID=48&aalD=2&ailD=E&aID=5332>
- Lapidou, C. S., y Rittmann, B. E. (2002). A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Research*, 36(11), 2711-2720. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00413-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00413-4)
- Lebeloane, M. M., Famuyide, I. M., Dzoyem, J. P., Adeyemo, R. O., Makhubu, F. N., Elgorashi, E. E., . . . McGaw, L. J. (2024). Influence of selected plant extracts on bacterial motility, aggregation, hydrophobicity, exopolysaccharide production and quorum sensing during biofilm formation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *South African Journal of Botany*, 167, 197-208. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.02.022>
- Li, J., Chen, D., y Lin, H. (2021). Antibiofilm peptides as a promising strategy: comparative research. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(4), 1647-1656. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11103-6>
- Lira-De León, K. I., Ramírez-Mares, M. V., Sánchez-López, V., Ramírez-Lepe, M., Salas-Coronado, R., Santos-Sánchez, N. F., . . . Hernández-Carlos, B. (2014).

- Effect of crude plant extracts from some Oaxacan flora on two deleterious fungal phytopathogens and extract compatibility with a biofertilizer strain [Original Research]. *Frontiers in Microbiology*, 5, 383. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00383>
- López-Angulo, G. (2016). *Caracterización química de compuestos con actividad biológica obtenidos de tres especies de Echeveria del estado de Sinaloa* [Doctorado, Universidad Autónoma de Sinaloa]. Culiacán, Sinaloa, México.
- López-Angulo, G., Montes-Avila, J., Díaz-Camacho, S. P., Vega-Aviña, R., Ahumada-Santos, Y. P., y Delgado-Vargas, F. (2019). Chemical composition and antioxidant, α -glucosidase inhibitory and antibacterial activities of three *Echeveria* DC. species from Mexico. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(8), 1964-1973. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.11.050>
- Lu, C., Liu, H., Shangguan, W., Chen, S., y Zhong, Q. (2021). Antibiofilm activities of the cinnamon extract against *Vibrio parahaemolyticus* and *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology*, 203(1), 125-135. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02008-5>
- Martínez Ruiz, M. G., Gómez-Velasco, A., Juárez, Z. N., Hernández, L. R., y Bach, H. (2013). Exploring the biological activities of *Echeveria leucotricha*. *Natural Product Research*, 27(12), 1123-1126. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.708662>
- Mehrishi, P., Agarwal, P., Broor, S., y Sharma, A. (2022). Antibacterial and antibiofilm properties of *Azadirachta indica* (neem), *Aloe vera* (aloe vera), and *Mentha piperita* (peppermint) against multidrug-resistant clinical isolates. *Biomedical and Biotechnology Research Journal*, 6(1), 98-104. https://doi.org/10.4103/bbrj.bbrj_178_21
- Minich, A., Levarski, Z., Mikulášová, M., Straka, M., Liptáková, A., y Stuchlík, S. (2022). Complex analysis of vanillin and syringic acid as natural antimicrobial agents against *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1816. <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/3/1816>
- Mohammadi, M., Masoumipour, F., Hassanshahian, M., y Jafarinasab, T. (2019). Study the antibacterial and antibiofilm activity of *Carum copticum* against antibiotic-

- resistant bacteria in planktonic and biofilm forms. *Microbial Pathogenesis*, 129, 99-105. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.02.002>
- National Gardening Association. (2022). *Echeveria agavoides*. National Gardening Association. Recuperado 15 de enero de 2024 <https://garden.org/plants/photo/617200/>
- NYU Langone. (2024). *Types of antibiotic-resistant infections*. New York University. Recuperado 20 de enero de 2024 <https://nyulangone.org/conditions/antibiotic-resistant-infections/types>
- Okba, M. M., El-Shiekh, R. A., Abu-Elghait, M., Sobeh, M., y Ashour, R. M. S. (2021). HPLC-PDA-ESI-MS/MS profiling and anti-biofilm potential of *Eucalyptus sideroxylon* flowers. *Antibiotics (Basel)*, 10(7), 761. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10070761>
- Olivas-Quintero, S., Bernal-Reynaga, R., Lopez-Saucedo, C., Maldonado-Puga, S., Díaz-Camacho, S. P., Uribe-Carvajal, S., . . . Estrada-Garcia, T. (2022). Bacteriostatic effect of Echeveria extracts on diarrheagenic E. coli pathotypes and non-cytotoxicity on human Caco-2 cells. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 16(01), 147-156. <https://doi.org/10.3855/jidc.15125>
- OMS. (2020). *La resistencia a los antimicrobianos*. Organización Mundial de la Salud. Recuperado 15 de diciembre de 2023 <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Orozco-Andrade, I., Acosta-Loya, J. A., Bravo-Rodríguez, G., Martínez-Lozano, F. N., Enríquez-Porras, A., Espinoza-Hernández, M. E., . . . Orozco-Béjar, I. A. (2018). Epidemiología de tuberculosis pulmonar en población migrante. *Neumología y Cirugía de Tórax*, 77(2), 125-131.
- Osman, E. E. A., Mohamed, A. S., Elkhateeb, A., Gobouri, A., Abdel-Aziz, M. M., y Abdel-Hameed, E.-S. S. (2022). Phytochemical investigations, antioxidant, cytotoxic, antidiabetic and antibiofilm activities of *Kalanchoe laxiflora* flowers. *European Journal of Integrative Medicine*, 49, 102085. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eujim.2021.102085>

- Peinado-Beltrán, L. L. (2021). *Análisis de fitoquímicos totales y actividad antibacteriana de 17 especies de Echeveria de México* [Licenciatura, Universidad Autónoma de Sinaloa]. Culiacán, Sinaloa, México.
- Pérez-Vega, Á. I. (2018). Cumplimiento normativo en el control de la venta y la dispensación de antibióticos en farmacias y perspectivas en México en combate a la Resistencia Antimicrobiana (RAM). *Boletín Comisión Nacional de Arbitraje Médico*, 4, 17-20.
<http://www.conamed.gob.mx/gobmx/boletin/pdf/boletin22/Cumplimento.pdf>
- Perumal, S., y Mahmud, R. (2013). Chemical analysis, inhibition of biofilm formation and biofilm eradication potential of *Euphorbia hirta* L. against clinical isolates and standard strains. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 346. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-346>
- Qais, F. A., Khan, M. S., y Ahmad, I. (2019). Broad-spectrum quorum sensing and biofilm inhibition by green tea against gram-negative pathogenic bacteria: Deciphering the role of phytochemicals through molecular modelling. *Microbial Pathogenesis*, 126, 379-392.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.11.030>
- Ray, R. R., y Pattnaik, S. (2023). Contribution of phytoextracts in challenging the biofilms of pathogenic bacteria. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 48, 102642. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102642>
- Reyes-Santiago, J. (2014). *Echeveria agavoides ficha técnica red Echeveria*. Xochimanki. Recuperado 15 de abril de 2023
<https://xochimankimx.wordpress.com/2015/03/28/echeveria-agavoides-ficha-tecnica-red-echeveria/>
- Reyes-Santiago, P. J., Islas-Luna, M. A., González-Zorzano, O., Carrillo-Reyes, P., Vergara-Silva, F. R., y Pascal-Brachet, I. (2011). *Echeveria, manual del perfil diagnóstico del género Echeveria en México* (J. Reyes-Santiago, Ed.)
https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/225088/Echeveria_manual_d_el_perfil_diagn_stico_del_genero_echeveria_en_mexico.pdf
- Reyes, R., Merchant-Larios, H., Ortega-Hernández, A., y Delgado, N. M. (2002). Male contraception, IV: Hypotonic-like effect from *Echeveria gibbiflora* on human

sperm. *Archives of Andrology*, 48(6), 443-449.
<https://doi.org/10.1080/01485010290099327>

- Rizo-Amézquita, J. N., y Camargo, E. A. (2017). Patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos. *Boletín Comisión Nacional de Arbitraje Médico*, Marzo-Abril, 1-9.
https://www.researchgate.net/profile/Jose-Rizo-Amezquita/publication/337843769_Patogenos_prioritarios_para_la_investigacion_y_desarrollo_de_nuevos_antimicrobianos/links/5dee960b92851c8364704bad/Patogenos-prioritarios-para-la-investigacion-y-desarrollo-de-nuevos-antimicrobianos.pdf
- Rodríguez-Herrera, R. (2017). Humanismo y medicina. *Boletín CONAMED*, 11.
http://www.conamed.gob.mx/gobmx/boletin/pdf/boletin11/Numero_completo.pdf
- Saeloh, D., y Visutthi, M. (2021). Efficacy of Thai plant extracts for antibacterial and anti-biofilm activities against pathogenic bacteria. *Antibiotics (Basel)*, 10(12), 1470. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121470>
- Salgado-Gutiérrez, M. J. (2015). *Regeneración in vitro de Echeveria calycosa Moran (Crassulaceae), vía organogénesis* [Maestría, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.]. Guadalajara, Jalisco, México.
- Samrot, A. V., Abubakar Mohamed, A., Faradjeva, E., Si Jie, L., Hooi Sze, C., Arif, A., . . . Kumar, S. S. (2021). Mechanisms and impact of biofilms and targeting of biofilms using bioactive compounds-a review. *Medicina (Kaunas)*, 57(8), 839. <https://doi.org/10.3390/medicina57080839>
- Sarkar, R., Mondal, C., Bera, R., Chakraborty, S., Barik, R., Roy, P., . . . Sen, T. (2015). Antimicrobial properties of *Kalanchoe blossfeldiana*: a focus on drug resistance with particular reference to quorum sensing-mediated bacterial biofilm formation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67(7), 951-962. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jphp.12397>

- Sharma, D., Misba, L., y Khan, A. U. (2019). Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 8(1), 76. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0533-3>
- Slobodníková, L., Fialová, S., Rendeková, K., Kováč, J., y Mučaji, P. (2016). Antibiofilm activity of plant polyphenols. *Molecules*, 21(12), 1717. <https://doi.org/10.3390/molecules21121717>
- Song, Y. J., Yu, H. H., Klm, Y. J., Lee, N. K., y Paik, H. D. (2019). Anti-biofilm activity of grapefruit seed extract against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(8), 1177-1183. <https://doi.org/10.4014/jmb.1905.05022>
- Soto-Estrada, G., Moreno-Altamirano, L., y Pahuá Díaz, D. (2016). Panorama epidemiológico de México, principales causas de morbilidad y mortalidad. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 59(6), 8-22. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0026-17422016000600008&lng=es&nrm=iso
- Srinivasan, R., Santhakumari, S., Poonguzhali, P., Geetha, M., Dyavaiah, M., y Xiangmin, L. (2021). Bacterial biofilm inhibition: A focused review on recent therapeutic strategies for combating the biofilm mediated infections [Review]. *Frontiers in Microbiology*, 12, 676458. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.676458>
- Stevens, J. F., Hart, H. T., Van Ham, R. C. H. J., Elema, E. T., Van Den Ent, M. M. V. X., Wildeboer, M., y Zwaving, J. H. (1995). Distribution of alkaloids and tannins in the Crassulaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 23(2), 157-165. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0305-1978\(95\)00082-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0305-1978(95)00082-6)
- Suasnavas, J., Flores, R., y Echeverría, I. (2017). Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de microalgas usando cepas ATCC. *Química Central Ciencia y Naturaleza*, 6(1). <https://doi.org/10.29166/quimica.v6i1.1416>
- Tabunhan, S., y Tungsukruthai, P. (2022). Antibiofilm activity of a *Curcuma zedoaria* Rosc rhizome extract against methicillin-resistant and susceptible *Staphylococcus aureus*. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 50(2), 193-201. <https://doi.org/10.48022/mbl.2201.01007>

- Toledo, V. M. (1988). La diversidad biológica de México. *Ciencia y Desarrollo*, 81, 17-30.
- Torres-Manrique, C. (2012). *La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming*. Academia de farmacia “Reino de Aragón”. <https://academiadefarmaciadearagon.es/docs/Noticias/DocumentoNoticia29.pdf>
- Touzout, S. N., Merghni, A., Laouani, A., Boukhibar, H., Alenazy, R., Alobaid, A., . . . El-Bok, S. (2023). Antibacterial properties of methanolic leaf extracts of *Melia azedarach* L. against Gram-positive and Gram-negative pathogenic bacteria. *Microorganisms*, 11(8), 2062. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11082062>
- Uruén, C., Chopo-Escuin, G., Tommassen, J., Mainar-Jaime, R. C., y Arenas, J. (2021). Biofilms as promoters of bacterial antibiotic resistance and tolerance. *Antibiotics (Basel)*, 10(1), 3. <https://www.mdpi.com/2079-6382/10/1/3>
- Varela, M. F., Stephen, J., Lekshmi, M., Ojha, M., Wenzel, N., Sanford, L. M., . . . Kumar, S. H. (2021). Bacterial resistance to antimicrobial agents. *Antibiotics (Basel)*, 10(5), 593. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050593>
- Vestby, L. K., Grønseth, T., Simm, R., y Nesse, L. L. (2020). Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. *Antibiotics (Basel)*, 9(2), 59. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020059>
- Vishwakarma, J., y Vavilala, S. L. (2019). Evaluating the antibacterial and antibiofilm potential of sulphated polysaccharides extracted from green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Applied Microbiology*, 127(4), 1004-1017. <https://doi.org/10.1111/jam.14364>
- Walter, S., y Böck, R. (2021). Antibacterial and anti-biofilm properties of *Aptosimum albomarginatum* (Marloth & Engl.) and *Dicoma schinzii* (O. Hoffm.) crude methanolic extracts against *S. aureus* and MRSA. *Namibian Journal for Research, Science and Technology*, 3(1), 69-78. <https://doi.org/10.54421/njrst.v3i1.44>
- Yang, K., Wang, L., Cao, X., Gu, Z., Zhao, G., Ran, M., . . . Yang, M. (2022). The origin, function, distribution, quantification, and research advances of extracellular DNA. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), 13690.

- Yapıcı, S., y Kıvanç, M. (2023). Ceviz yaprak ekstralarının antioksidan, antimikrobiyel ve antibiyofilm aktivitesi [Antioxidant, antimicrobial and antibiofilm activity of leaf extracts of walnut]. *Gıda*, 48(2), 405-421. <https://doi.org/10.15237/gida.GD22082>
- Yiemwattana, I., Kaomongkolgit, R., Wirojchanasak, S., Suwannakul, S., Nathamtong, S., y Wacharanad, S. (2023). Inhibitory effect of *Morus alba* stem extract on bacterial biofilms and matrix metalloproteinase (MMP)-1, and MMP-2 expression *in vitro*. *Journal of International Dental and Medical Research*, 16, 1-7. https://www.jidmr.com/journal/wp-content/uploads/2023/03/1-D22_2041_Ichaya_Yiemwattana_Thailand.pdf
- Zaharieva, M. M., Genova-Kalou, P., Dincheva, I., Badjakov, I., Krumova, S., Enchev, V., . . . Markova, N. (2019). Anti-herpes simplex virus and antibacterial activities of *Graptopetalum paraguayense* E. Walther leaf extract: a pilot study. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 33(1), 1251-1259. <https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1656108>
- Zeng, J., Chen, D., Lv, C., Qin, K., Zhou, Q., Pu, N., . . . Wang, X. (2022). Antimicrobial and anti-biofilm activity of *Polygonum chinense* L. aqueous extract against *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*, 12(1), 21988. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-26399-1>
- Zhao, X., Liu, Z., Liu, Z., Meng, R., Shi, C., Chen, X., . . . Guo, N. (2018). Phenotype and RNA-seq-Based transcriptome profiling of *Staphylococcus aureus* biofilms in response to tea tree oil. *Microbial Pathogenesis*, 123, 304-313. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.07.027>
- Zuo, J., Liu, L., Hou, S., Liu, X., Teng, J., Li, P., y Liu, X. (2023). Antimicrobial and antibiofilm activity of isoorientin against carbapenem non-sensitive *Escherichia coli* from raw milk of goats. *Journal of Animal Science*, 101, skad047. <https://doi.org/10.1093/jas/skad047>

XIII. SIGLAS Y ABREVIATURAS

ABTS: Acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico

ADNe: Ácido desoxirribonucleico extracelular

AHL: Homoserina lactonas aciladas, por sus siglas en inglés

ARNe: Ácido ribonucleico extracelular

ATCC: American Type Culture Collection

CAM: Metabolismo ácido de las crasuláceas, por sus siglas en inglés

CC: Grupo control

CENAPRECE: Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades

CONACYT: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

DEP: Patotipos de *E. coli* diarreogénicas, por sus siglas en inglés

DMSO: Dimetilsulfóxido

DO: Densidad óptica

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

e.g.: Ejemplo

ECM: Matriz extracelular polimérica, por sus siglas en inglés

EE.UU.: Estados Unidos de América

EM o EMs: Extracto (s) Metanólico (s)

ERC: Enterobacterias resistentes a carbapenémicos

ET: Equivalentes de trolox

FenT: Fenólitos totales

FlaT: Flavonoides totales

HPLC: Cromatografía de líquidos de alta resolución

i.e.: Esto es

IC₅₀: Concentración inhibitoria media

MBIC: Concentración mínima inhibitoria de biopelículas, por sus siglas en inglés

mg: Miligramo

MIC: Concentración mínima inhibitoria, por sus siglas en inglés

MICs: Concentraciones mínimas inhibitorias

mL: Mililitro

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina, por sus siglas en inglés

MSSA: *Staphylococcus aureus* sensible a la metilina, por sus siglas en inglés

NBIMCC: (Banco Nacional de Microorganismos Industriales, Bulgaria) (National Bank for Industrial Microorganisms, Bulgaria)

OMS: Organización mundial de la salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

ORAC: Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno

PBS: Solución amortiguadora de fosfatos, por sus siglas en inglés

PMS: Metosulfato de fenazina, por sus siglas en inglés

QS: Quorum sensing

rpm: Revoluciones por minuto

SD: Desviación estándar

SEMARNAT: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales

SPE: Sustancias poliméricas extracelulares

TanT: Taninos totales

TSA: Agar de tripticaseína y soya, por sus siglas en inglés

TSB: Caldo de soya tripticaseína, por sus siglas en inglés

UFC: Unidades formadoras de colonias

XTT: (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfobenzo)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida)

µg: Microgramo

µL: Microlitro

µmol: micromole

°C: Grados Celsius

%: Por ciento