



UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Trabajo de Fin de Máster Titulado:

**Evaluación de la actividad antimicrobiana del d-limoneno frente a  
*Escherichia Coli* y docking molecular**

Realizado por:

**GINA STEFANY JARAMILLO BALCÁZAR**

Directores del proyecto:

**Dr. Jesús Antonio Romero Lugo.**

**Dr. Marlon Rolando Bravo Bonilla**

Como requisito para la obtención del título de:  
**MAGISTER EN BIOMEDICINA**

Quito,

---

## DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, **Gina Jaramillo**, con cédula de identidad 1105535668 declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.

**GINA STEFANY JARAMILLO BALCÁZAR**

1105535668

## DECLARACIÓN DE LOS DIRECTORES DE TESIS

Declaramos haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con la estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.

-----  
*Dr. Jesús Antonio Romero Lugo, Ph.D*

-----  
*Dr. Marlon Rolando Bravo Bonilla, Ph.D*

FIRMA

# **LOS PROFESORES INFORMANTES**

Los Profesores Informantes:

**Dra. Johanna Lucía Medrano Barboza**

**Dr. José Rubén Ramírez Iglesias**

Después de revisar el trabajo presentado,

lo han calificado como apto para su defensa oral

ante el tribunal examinador

FIRMA

Quito,

# **DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE**

Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.

**GINA STEFANY JARAMILLO BALCÁZAR**

1105535668

## DEDICATORIA

*Dedico este trabajo a Dios, por darme la fortaleza y sabiduría para culminar esta etapa de mi vida*

*A mi mami Yoni Balcázar, mis hermanos (Angie y Josué), por su amor, apoyo incondicional y por ser siempre mi mayor motivación.*

*A mi papi José, cuya presencia vive en mi corazón, su ejemplo de esfuerzo y valores continúa guiando cada uno de mis pasos.*

---

## AGRADECIMIENTO

A mi familia, por su amor, paciencia y apoyo incondicional a lo largo de este camino.

A la Universidad Internacional SEK (UISEK) y a los docentes de la Maestría en Biomedicina, por su formación académica, conocimientos y orientación durante este proceso.

A mis tutores de tesis Dr. Jesús Romero y Dr. Marlon Bravo, por su guía, apoyo y valiosos aportes científicos en el desarrollo de esta investigación.

A mis hermanos, por su paciencia, apoyo y confianza en mí, especialmente en aquellos momentos en los que su compañía y palabras fueron fundamentales para seguir adelante.

A la Universidad Nacional de Loja, por facilitar sus instalaciones y laboratorios para la realización de los ensayos experimentales que hicieron posible este estudio.

Finalmente, a todas las personas que, de una u otra manera, contribuyeron al desarrollo y culminación de esta investigación.

Artículo de tesis

# Evaluación de la actividad antimicrobiana del d-limoneno frente a *Escherichia coli* y docking molecular.

Gina Jaramillo<sup>1</sup>, Jesús Romero<sup>2</sup> and Marlon Bravo<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Maestría en Biomedicina, Facultad de Ciencias de la Salud, UISEK; gina.jaramillo@uisek.edu.ec.

Maestría en Biomedicina, Facultad de Ciencias de la Salud, UISEK Universidad Particular Internacional SEK (UISEK), Quito, 170302, Ecuador; [jesus.romero@uisek.edu.ec](mailto:jesus.romero@uisek.edu.ec).

<sup>2</sup> Grupo de Investigación de Genética y Biología Molecular, Carrera de Laboratorio Clínico, Universidad Nacional de Loja (UNL), Loja, 110103, Ecuador; [marlon.bravo@unl.edu.ec](mailto:marlon.bravo@unl.edu.ec).

**Resumen:** La resistencia antimicrobiana, especialmente en cepas de *Escherichia coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) como la enzima CTX-M-15, representa una de las mayores amenazas para la salud pública global. Ante la pérdida de eficacia de los antibióticos convencionales, surge la necesidad de explorar compuestos naturales como el d-limoneno, cuya estructura lipofílica sugiere un potencial para disrumpir membranas bacterianas e inhibir sistemas enzimáticos de resistencia. Para evaluar esta hipótesis, se empleó un enfoque multidisciplinario que incluyó microdilución en caldo para determinar la viabilidad celular (ATCC 25922), ensayos de difusión en disco para medir la sinergia con antibióticos (ATCC 35218) y simulaciones de acoplamiento molecular (docking) con la proteína IZG4. Los resultados revelaron una actividad antimicrobiana dosis-dependiente con una Concentración Inhibitoria Media ( $IC_{50}$ ) de 14.95 mg/mL, identificando un comportamiento bifásico caracterizado por un efecto adaptativo u hormético a bajas dosis (1-8 mg/mL) y una inhibición marcada a partir de los 16 mg/mL. En las pruebas de sinergia, el d-limoneno (64 mg/mL) potenció significativamente la acción de la gentamicina (+3 mm) y la ceftriaxona (+2 mm). Complementariamente, el docking predijo una afinidad de unión de -4.96 kcal/mol en el sitio catalítico de la CTX-M-15, estabilizada por interacciones hidrofóbicas. Se concluye que el d-limoneno actúa mediante un mecanismo dual de disrupción de membrana e inhibición enzimática competitiva por oclusión, posicionándose como un adyuvante prometedor para restaurar la eficacia terapéutica de antibióticos frente a cepas multirresistentes.

**Palabras clave:** BLEE; D-limoneno;  $IC_{50}$ ; acoplamiento molecular; CTX-M-15; terpenos; inhibición enzimática.

**Abstract:** Antimicrobial resistance, particularly in *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) such as the CTX-M-15 enzyme, represents one of the greatest threats to global public health. Given the loss of efficacy of conventional antibiotics, there is a pressing need to explore natural compounds like d-limonene, whose lipophilic structure suggests potential for disrupting bacterial membranes and inhibiting resistance enzymatic systems. To test this hypothesis, a multidisciplinary approach was employed, including broth microdilution to determine cell viability (ATCC 25922), disk diffusion assays to measure synergy with antibiotics (ATCC 35218), and molecular docking simulations with the IZG4 protein. Results revealed dose-dependent antimicrobial activity with a Half-Maximal Inhibitory Concentration ( $IC_{50}$ ) of 14.95 mg/mL, identifying a biphasic biological behavior characterized by an adaptive or hormetic effect at low doses (1-8 mg/mL) and marked inhibition starting at 16 mg/mL. In synergy tests, d-limonene (64 mg/mL) significantly enhanced the action of gentamicin (+3 mm) and ceftriaxone (+2 mm). Complementarily, docking predicted a binding affinity of -4.96 kcal/mol at the CTX-M-15 catalytic site, stabilized by hydrophobic interactions. It is concluded that d-limonene acts through a dual mechanism of membrane disruption and competitive enzymatic inhibition by occlusion, positioning itself as a promising adjuvant to restore the therapeutic efficacy of antibiotics against multi-resistant strains.

**Keywords:** ESBL; D-Limonene;  $IC_{50}$ ; Molecular docking; CTX-M-15; Terpenes; Enzymatic inhibition.

---

## 1. Introducción

La resistencia antimicrobiana (RAM), constituye uno de los principales retos de la salud pública global en el siglo XXI, ya que amenaza la eficacia de los tratamientos con antibióticos convencionales, favorece la propagación de infecciones recurrentes y conlleva un aumento significativo en los costos del sistema de salud, así como en la morbilidad y mortalidad (Zambrano Espinosa, 2022). La Organización Mundial de la Salud ha declarado la RAM como una prioridad mundial, reconociendo que en 2019 se registraron aproximadamente 1.27 millones de muertes directamente atribuibles a infecciones resistentes, y cerca de 4.95 millones de muertes asociadas a esta condición. Proyecciones recientes del proyecto *Global Research on Antimicrobial Resistance* (GRAM), publicadas en *The Lancet*, estiman que, de no aplicarse medidas eficaces, la RAM bacteriana podría provocar hasta 1.9 millones de muertes anuales atribuibles y más de 8 millones asociadas para el año 2050 (Murray et al., 2022). Complementariamente, el informe O'Neill (2016), encargado por el gobierno británico, advierte que esta cifra podría alcanzar los 10 millones de muertes anuales, superando incluso las proyecciones para enfermedades como el cáncer (O'NEILL, 2016).

Este escenario resulta particularmente alarmante para regiones como América Latina, donde la combinación de acceso irregular a servicios de salud, automedicación frecuente, ausencia de políticas sólidas de farmacovigilancia y uso extensivo de antibióticos han favorecido la emergencia de cepas bacterianas multirresistentes. En Ecuador, diversos informes clínicos y hospitalarios han documentado reportes como el aumento sostenido de cepas de *Escherichia coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), cuya prevalencia compromete seriamente la eficacia de tratamientos basados en cefalosporinas y penicilinas especialmente en infecciones urinarias, gastrointestinales y sistémicas (Solís et al., 2022).

*Escherichia coli*, es una bacteria gram negativa que forma parte de la microbiota intestinal humana, pero que puede actuar como patógeno oportunista. Su relevancia en el contexto de la RAM radica en su capacidad e importancia clínica por su habilidad para adquirir genes de resistencia a través de plásmidos y elementos genéticos móviles, lo cual ha facilitado su diseminación en ambientes hospitalarios y comunitarios (Gupta et al., 2021c; Li et al., 2022). Las enzimas  $\beta$ -lactamasas del tipo CTX-M han sido reconocidas como una de las principales causas de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, por su capacidad para hidrolizar una amplia gama de cefalosporinas de tercera generación (Solís et al., 2022).

Ante este panorama, sobre la creciente ineficacia de los antibióticos tradicionales; estudios internacionales han intensificado la búsqueda de alternativas con actividad antimicrobiana, sobre todo aquellos derivados de fuentes naturales, destacando compuestos bioactivos como el d-limoneno, un monoterpeno cíclico que constituye el principal componente en los aceites esenciales de cítricos, destacando como una molécula prometedora por su diversidad estructural y su baja toxicidad (Budiarto et al., 2024; Cordeiro Mariana et al., 2021). Este compuesto posee potencial antimicrobiano frente a diversas bacterias gram positivas y gram negativas, incluyendo *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella entérica* y *Listeria monocytogenes*, a través de mecanismos que incluyen la disrupción de la membrana celular bacteriana, interfiriendo en la expresión genética de factores de virulencia, inhibición de sistemas enzimáticos e incluso presentando sinergias con fármacos como la ciprofloxacina y la gentamicina (Gupta et al., 2021a; Pakbin et al., 2021; Sreepian et al., 2022a). A pesar de su amplio espectro de acción, la evidencia experimental local sobre su eficacia frente a cepas de *Escherichia coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas sigue siendo escasa.

Son limitados los estudios que integran herramientas computacionales con ensayos microbiológicos para analizar la interacción estructural de este compuesto con enzimas clave en los mecanismos de resistencia. El uso de técnicas de modelado molecular como el acoplamiento molecular o docking permite simular la interacción entre una molécula ligando y una proteína blanco, y ha demostrado ser una herramienta valiosa para explorar el potencial terapéutico de compuestos naturales, sobre todo cuando se busca identificar posibles sitios de unión y estimar la afinidad energética de la interacción (Leelananda & Lindert, 2016; Sreenithya et al., 2025a).

En este sentido, el d-limoneno representa una molécula interesante para este tipo de análisis, debido a su estructura lipofílica, bajo peso molecular y capacidad de difusión en medios lipídicos. Su afinidad potencial por sitios activos hidrofóbicos, como los presentes en las  $\beta$ -lactamasas, indica que podría actuar como inhibidor competitivo o alostérico de estas enzimas, bloqueando parcial o totalmente su función catalítica (Yuan & Hao, 2023). No obstante, para validar esta hipótesis, es necesario integrar la evidencia experimental *in vitro* con simulaciones computacionales *in silico*, que permitan visualizar y cuantificar su comportamiento a nivel estructural (Sharma & Kaur, 2023).

La combinación de ambos enfoques microbiológico y estructural, permite no solo confirmar la eficacia del d-limoneno como agente antibacteriano, sino también comprender los mecanismos moleculares implicados en su actividad. Esta aproximación multidisciplinaria proporciona un marco más robusto para evaluar el potencial terapéutico del compuesto, y abre la posibilidad de futuras optimizaciones estructurales que incrementen su eficacia o selectividad (Bibi et al., 2023a).

La hipótesis central de integrar estos enfoques radica en que, si el d-limoneno logra interactuar estructuralmente con el sitio activo de enzimas como la  $\beta$ -lactamasa CTX-M-15, podría actuar no solo como un agente antimicrobiano intrínseco, sino también como un adyuvante capaz de restaurar la sensibilidad de la bacteria frente a cefalosporinas de tercera generación y otros antibióticos convencionales que han perdido su eficacia clínica.

La presente investigación tiene como finalidad evaluar la eficacia del d-limoneno frente a *Escherichia coli* cepa sensible ATCC 25922 (Puvača et al., 2021) y cepa BLEE ATCC 35218, determinando su potencia inhibitoria ( $IC_{50}$ ) mediante modelos de regresión de dosis-respuesta. Adicionalmente, se busca explorar su capacidad moduladora como adyuvante frente a antibióticos de uso clínico mediante ensayos de sinergia, y analizar su mecanismo de interacción estructural con la enzima  $\beta$ -lactamasa tipo CTX-M-15 mediante modelado molecular (docking) (Bibi et al., 2023b; Sreenithya et al., 2025b), proponiendo una estrategia integral para validar este compuesto natural como alternativa terapéutica frente a la resistencia bacteriana (Caballero Gómez et al., 2022; Ribeiro et al., 2023).

---

## 2. Materiales y Métodos

### Tipo de estudio y enfoque metodológico.

El presente estudio se desarrolló mediante un enfoque experimental de laboratorio, complementado con herramientas de bioinformática estructural. Se emplearon métodos estandarizados de microbiología para evaluar la actividad antimicrobiana del d-limoneno frente a *Escherichia coli* ATCC 25922. Adicionalmente, se analizó el potencial del d-limoneno como agente sensibilizador frente a la cepa multirresistente *Escherichia coli* productora de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), ATCC 35218, mediante ensayos de sinergia utilizando el método de difusión en disco y se aplicaron técnicas de modelado molecular (docking) para analizar la interacción del d-limoneno con la enzima  $\beta$ -lactamasa CTX-M-15.

### Reactivación y preparación de la cepa bacteriana

Se trabajó con dos cepas de referencia de *Escherichia coli*: la cepa sensible ATCC 25922 y la cepa multirresistente productora de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) ATCC 35218.

- Cepa *E. coli* ATCC 25922: Fue donada por el Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja. Se mantuvo conservada en viales criogénicos a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para su reactivación, se inocularon  $10\text{ }\mu\text{L}$  del vial en placas de agar nutritivo mediante la técnica de estriado por agotamiento, incubando a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.
- Cepa *E. coli* BLEE ATCC 35218: Fue donada por la Universidad Internacional SEK (UISEK). Esta cepa fue rehidratada siguiendo las instrucciones del proveedor y cultivada bajo condiciones controladas para asegurar la expresión de su fenotipo resistente.

### Preparación del inóculo bacteriano

Para los ensayos biológicos, ambas cepas fueron cultivadas en caldo Mueller-Hinton

- Ajuste de turbidez: Las suspensiones bacterianas se ajustaron a una turbidez equivalente al estándar 0,5 de McFarland aproximadamente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL.
- Inóculo para microdilución (ATCC 25922): De acuerdo con las recomendaciones del CLSI M100-2025, la suspensión se diluyó 1:100 en caldo Mueller-Hinton, obteniendo una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/mL, luego de la mezcla final en el pocillo de la microplaca (dilución 1:2) se reduce a  $5 \times 10^5$  UFC/mL.
- Inóculo para ensayos de sinergia por difusión en disco (ATCC 35218): Para estas pruebas se utilizó directamente la suspensión ajustada al 0,5 de McFarland, sin dilución adicional, con el fin de obtener un crecimiento sobre la superficie del agar Mueller-Hinton (Miranda-romero et al., n.d.).

### Preparación del d-limoneno

El compuesto (+)-R-limoneno (CAS 5989-27-5, Ref 62118) se disolvió inicialmente en dimetilsulfóxido (DMSO) y se ajustó con Caldo Mueller-Hinton (MHB) para preparar una solución madre a una concentración de  $64\text{ mg/mL}$ . Esta solución de trabajo se empleó tanto para la impregnación de los discos en los ensayos de sinergia como para preparar las diluciones seriadas requeridas en las pruebas de microdilución.

La elección del DMSO se basó en su alta capacidad para solubilizar y emulsionar compuestos hidrofóbicos (Hulankova, 2024), como los terpenos. Siendo la concentración máxima de DMSO en la solución madre del 4% (v/v), garantizando que en los ensayos finales la concentración del solvente no supere el 2% (v/v) (Ilieva et al., 2021; Subramenium et al., 2015)

**Tabla 1.***Dilución del D-limoneno en DMSO.*

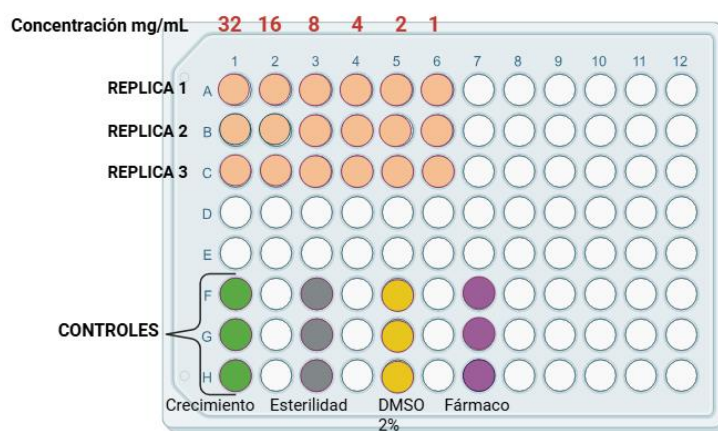
Reactivo	Volumen
D- limoneno	76 $\mu$ l
DMSO	40 $\mu$ l
MHB	884 $\mu$ L
Volumen final	1000 $\mu$ l – 1ml
Concentración final del D-limoneno	64 mg/ml

**Nota:** Esta dilución madre fue utilizada para preparar las concentraciones utilizadas en los ensayos de microdilución en caldo. El DMSO fue seleccionado por su capacidad para solubilizar hidrofóbicos como el d-limoneno, manteniendo una toxicidad bacteriana mínima a las concentraciones utilizadas.

### Determinación de actividad antibacteriana y viabilidad celular.

La actividad antimicrobiana del d-limoneno se evaluó mediante el método de microdilución en caldo en placas de 96 pocillos, siguiendo las directrices del CLSI M100-2025; se prepararon diluciones seriadas con el fin de obtener concentraciones finales de 32, 16, 8, 4, 2 y 1 mg/mL. Cuyo diseño incluyó controles de: crecimiento, esterilidad, solvente (DMSO al 2%) y fármaco, cada uno de los pocillos se le añadieron 100  $\mu$ L de las respectivas concentraciones y 100  $\mu$ L del inóculo ajustado ( $5 \times 10^5$  UFC/mL) y finalmente fueron incubadas a 37 °C durante 20 horas.

La densidad óptica fue medida utilizando un lector de microplacas BioTek ELx800 controlado por el software Gen5 versión 2.01.14, configurado a una longitud de onda de 630 nm, y los datos fueron normalizados respecto al control de crecimiento para calcular el porcentaje de crecimiento y estimar la  $IC_{50}$  (Chattopadhyay et al., 2009; Gupta et al., 2021a). (**Fig. 1.**)



**Fig. 1.** Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del D-limoneno frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 mediante el método de microdilución en caldo. Se prepararon diluciones seriadas triples del compuesto en un rango de 32 a 1 mg/mL (columnas 1 a 6), evaluadas en triplicado (filas A–C). Control de crecimiento: columna 1, fila F-H corresponde al (CC: 100  $\mu$ L MHB + 100  $\mu$ L inóculo), control esterilidad: columna 3, fila F-H (CE: 200  $\mu$ L MHB); control DMSO (CS: 100  $\mu$ L (MHB+4%DMSO) + 100  $\mu$ L inóculo); control fármaco (CF: 100  $\mu$ L concentración de 64 mg/mL + 100  $\mu$ L inóculo). En cada pocillo su volumen final es 200  $\mu$ L. La lectura se realizó tras incubación a 37 °C entre las 18 - 20 horas.

### Ensayos de sinergia por difusión en disco.

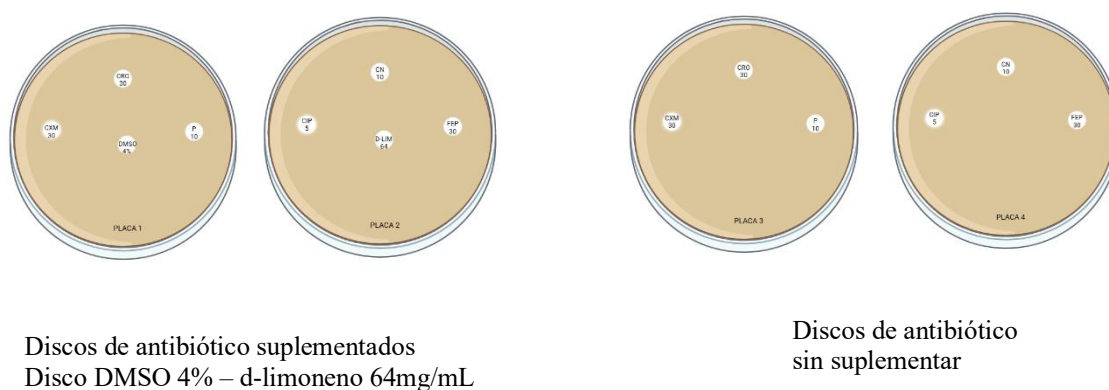
Para evaluar el efecto potenciador del d-limoneno sobre la actividad de diversos antibióticos, se empleó el método de difusión en disco modificado (Kirby-Bauer). Se utilizaron placas de agar Mueller-Hinton (MHA) inoculadas con una suspensión bacteriana de *Escherichia coli* productora de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), cepa ATCC 35218 (Evangelist-Martínez et al., 2018).

La suspensión bacteriana se ajustó al estándar de turbidez 0,5 de McFarland, equivalente aproximadamente a  $1 \times 10^5$  UFC/mL, con el objetivo de obtener un crecimiento bacteriano homogéneo y confluyente sobre la superficie del medio. Posteriormente, la inoculación se realizó mediante siembra por extensión con hisopo estéril sobre toda la superficie del agar Mueller-Hinton, siguiendo las recomendaciones establecidas por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para ensayos de susceptibilidad antimicrobiana (M. Wang et al., 2024).

Los discos comerciales de antibióticos como la ceftriaxona 30  $\mu\text{g}$  (CRO), cefepime 30  $\mu\text{g}$  (FEP), gentamicina 10  $\mu\text{g}$  (CN), penicilina 10 UI (P), ciprofloxacino 5  $\mu\text{g}$  (CIP) y cefuroxima 30  $\mu\text{g}$  (CXM); fueron impregnados con 15  $\mu\text{L}$  de solución D-limoneno a una concentración de 64 mg/mL, previamente preparada en DMSO al 4 % (v/v) y caldo Mueller-Hinton (MHB).

Como controles experimentales, se incluyeron: discos de antibióticos sin suplementar, discos impregnados únicamente con DMSO al 4 %, y discos con d-limoneno solo, con el fin de evaluar posibles efectos del solvente o del compuesto de forma independiente (Atta et al., 2023).

Posteriormente, las placas se incubaron a 37 °C durante 20 horas en condiciones aerobias. La evaluación de la sinergia se realizó mediante la comparación de los diámetros de los halos de inhibición, considerando la presencia de un efecto sinérgico cuando el halo de inhibición de la combinación antibiótico + d-limoneno mostró un incremento  $\geq 2$  mm en comparación con el antibiótico solo (Y. Wang et al., 2020a). (**Fig 2.**)



**Figura 2.** Ensayo de difusión en disco para evaluar la actividad sinérgica del d-limoneno frente a *Escherichia coli* BLEE (ATCC 35218) en agar Mueller-Hinton tras 20 h de incubación a 37 °C.

Placas 1 y 2: discos de antibióticos CXM, CRO, P, CIP, CN, FEP; suplementados con 15  $\mu\text{L}$  de D-limoneno (64 mg/mL) preparado en DMSO al 4 % v/v, incluyendo controles con DMSO al 4 % y D-limoneno solo.

Placas 3 y 4: discos de antibióticos sin suplementar, utilizados como control de sensibilidad basal.

### Modelo molecular del d-limoneno

La molécula de d-limoneno se obtuvo de la base de datos PubChem (CID: 440917) (Dionisio et al., 2018) en formato .pdb y fue importada en el software Avogadro v1.2.0 (Hanwell et al., 2012a) para su modelado y análisis de propiedades moleculares. Se representó la estructura tridimensional del isómero correspondiente y se identificó el conformero más estable mediante la minimización de energía con el campo de fuerza molecular de Merck (MMFF94), optimizando la geometría de la molécula en función de sus centros de rotación. Posteriormente, se asignaron los hidrógenos polares, se calcularon las cargas de Gasteiger y se definió la torsión rotacional, identificando un total de un enlace rotable (Hanwell et al., 2012b). Finalmente, las características moleculares fueron evaluadas y validadas de acuerdo con la regla de los cinco de Lipinski y la regla de Veber, confirmando su viabilidad como potencial candidato a fármaco (Lipinski et al., 2001; Veber et al., 2002).

### Preparación de la proteína blanco.

Se utilizó la estructura cristalográfica de la enzima  $\beta$ -lactamasa CTX-M-15 de *E. coli* (PDB ID: 1ZG4), descargada del Protein Data Bank (Stec et al., 2005). En ADT se eliminaron ligandos, iones y agua. Luego se adicionaron hidrógenos polares y cargas de Gasteiger. El archivo resultante fue guardado como .pdbqt para ser utilizado en AutoDock Vina versión 1.2.3 (Eberhardt et al., 2021).

### Simulación de docking molecular

La simulación de acoplamiento molecular se realizó mediante un ensayo de docking ciego (blind docking) utilizando el software AutoDock Vina v1.2.3. Para permitir una exploración sin sesgos del ligando sobre la superficie de la enzima CTX-M-15 (1ZG4), se configuró un espacio de búsqueda (grid box) extendido con dimensiones de 40  $\times$  40  $\times$  40 Å, garantizando que el (+)-R-limoneno identificara de manera espontánea el sitio de mayor estabilidad termodinámica. Se empleó una exhaustividad de 8 y un espaciado de 0.375 Å, analizando la energía libre de unión en kcal/mol. y las interacciones se visualizaron en PyMOL versión 1.1.0 (Schrödinger, 2018).

## Análisis estadísticos

El análisis estadístico y la visualización de los datos se realizaron utilizando el entorno y lenguaje de programación R (versión 4.5.3) (R Core Team, 2026). La importación de las bases de datos experimentales se realizó mediante el paquete readr (versión 1.4.3) (Wickham et al., 2023), mientras que la manipulación, el filtrado y la normalización de los porcentajes de crecimiento se ejecutaron con el paquete dplyr (versión 1.1.4) (Wickham et al., 2026), permitiendo la normalización de los porcentajes de crecimiento bacteriano a partir de 54 observaciones experimentales. Cuyos resultados se expresaron como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) a partir de las réplicas experimentales.

Previamente al análisis inferencial, se evaluaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas mediante las pruebas de Shapiro–Wilk y Levene (paquete car) respectivamente (Fox, 2023). Una vez verificados los supuestos paramétricos no se cumplieron estrictamente en todos los grupos, se aplicó de forma complementaria la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para confirmar las diferencias globales entre las distintas concentraciones evaluadas. Luego se procedió con un Análisis de Varianza de un factor (ANOVA), calculando el tamaño del efecto mediante eta cuadrado ( $\eta^2$ ). Para comparaciones específicas entre pares de grupos, se aplicó la prueba de t de student para muestras independientes, validando la significancia de la inhibición máxima observada.

Posteriormente, se empleó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para identificar diferencias significativas entre todos los tratamientos. Asimismo, se realizó un análisis del Coeficiente de Variación (CV) por grupo para caracterizar la dispersión de los datos e identificar puntos de transición fisiológica en la población bacteriana.

La Concentración Inhibitoria Media ( $IC_{50}$ ) se estimó mediante el ajuste de los datos de viabilidad bacteriana en función de la concentración (transformada a escala logarítmica) utilizando un modelo de regresión log-logística de cuatro parámetros (4PL) implementado en el paquete dcr (Ritz et al., 2015), lo que permitió calcular además intervalos de confianza del 95 % para los parámetros estimados.

Las representaciones gráficas, incluyendo diagramas de caja (boxplots), gráficas de dispersión y curvas de dosis–respuesta, se generaron utilizando el paquete ggplot2 (Wickham et al., 2016), permitiendo una visualización clara de las tendencias experimentales y de la relación concentración–respuesta.

En todos los análisis estadísticos se consideró un nivel de significancia de  $p < 0,05$ .

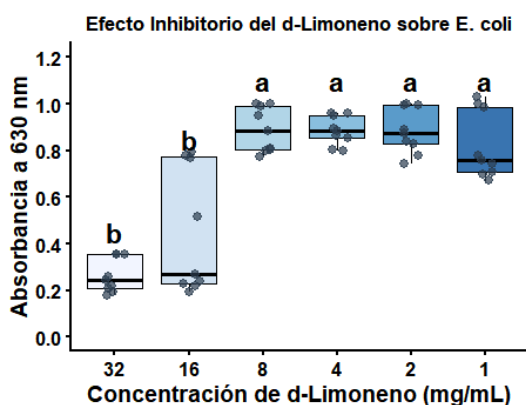
## 3. Resultados.

### 3.1 Actividad antibacteriana y Concentración Inhibitoria Media ( $IC_{50}$ )

La evaluación in vitro demostró que el D-limoneno ejerce un efecto inhibitorio dependiente de la concentración frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gupta et al., 2021b; Lin et al., 2024). El análisis descriptivo evidenció un comportamiento no lineal; en bajas concentraciones (1–8 mg/mL) no se observó reducción del crecimiento, registrándose un incremento en la viabilidad relativa de aproximadamente el 120%. Este comportamiento es consistente con un efecto hormético, en el cual la exposición a dosis subletales induce respuestas adaptativas en las bacterias (Melkina et al., 2021).

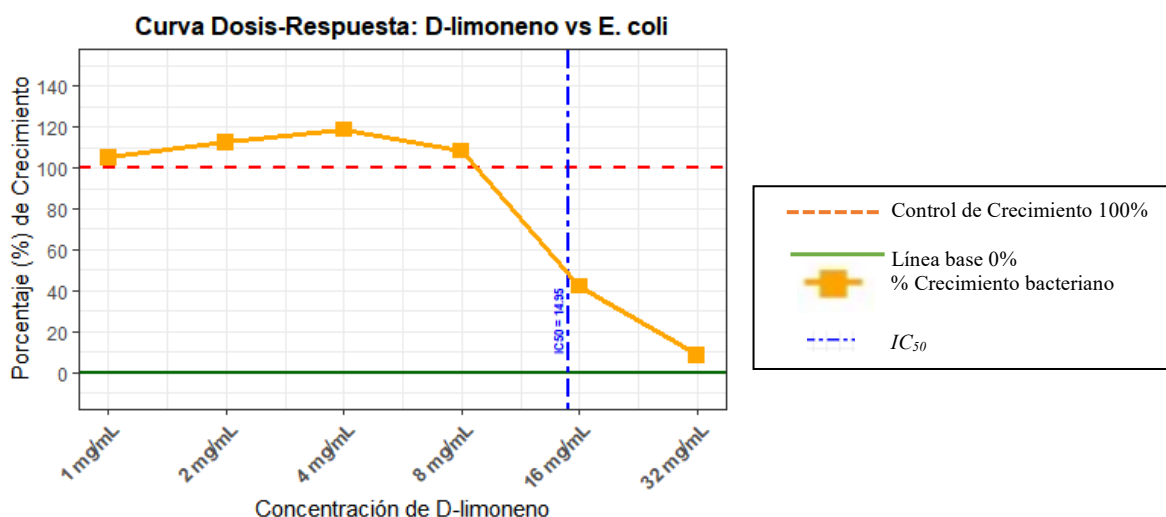
El análisis de varianza (ANOVA) de un factor confirmó diferencias globales significativas entre las concentraciones evaluadas ( $F(5,48)=67.16$ ;  $p= 1,69 \times 10^{-20}$ ). Complementariamente, la prueba de kruskal-Wallis ratificó la significación de estos hallazgos ( $H= 38,18$ ;  $p < 0.001$ ), demostrando la robustez de los datos ante la heterogeneidad de las varianzas. El tamaño del efecto ( $\eta^2= 0,875$ ), mostró una asociación extremadamente fuerte entre dosis–respuesta.

El efecto inhibitorio comenzó a manifestarse de forma marcada a partir de 16 mg/mL, donde se registró la mayor variabilidad poblacional (CV= 48,4%), lo que sugiere un punto de transición fisiológica. A la concentración máxima evaluada (32 mg/mL), la prueba t de Student evidenció una reducción altamente significativa del crecimiento bacteriano respecto al control ( $t(16) = 10.16$ ;  $p < 0.001$ ), alcanzando una inhibición cercana al 63 % (Gupta et al., 2021d; Ribeiro et al., 2023b). (Fig 3.)



**Figura 3.** Efecto del D-limoneno sobre la viabilidad de *Escherichia coli* ATCC 25922, evaluado mediante densidad óptica (OD 630 nm). Los diagramas de caja representan la distribución de las réplicas biológicas, donde las cajas indican el rango intercuartílico (IQR) y la línea central corresponde a la mediana. Las letras diferentes (a, b) señalan diferencias estadísticas significativas entre las concentraciones evaluadas, determinadas mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Tukey ( $p < 0.05$ ).

Dado que no se alcanzó una inhibición completa a 32 mg/mL (CMI > 32 mg/mL), se estimó la Concentración Inhibitoria Media ( $IC_{50}$ ) mediante un modelo de regresión log-logística de cuatro parámetros (4PL). El ajuste del modelo indicó una  $IC_{50}$  de 14.95 mg/mL ( $p < 0.05$ ), correspondiente al punto en el que el D-limoneno reduce el crecimiento de *E. coli* al 50 % de su capacidad máxima (Ritz et al., 2015). (Fig 4)



**Fig 4.** Curva de dosis-respuesta del efecto del D-limoneno sobre la viabilidad de *E. coli*. La línea punteada azul indica el valor exacto de la  $IC_{50}$  calculada (14.95 mg/mL).

### 3.2 Ensayo de sinergia con antibióticos

Los resultados del ensayo de difusión en disco mostraron que la combinación con D-limoneno modifica los patrones de susceptibilidad de la cepa multirresistente *E. coli* BLEE (ATCC 35218) de manera dependiente del antibiótico evaluado. Los discos control impregnados únicamente con DMSO al 4 % y D-limoneno (64 mg/mL) no produjeron halos de inhibición (0 mm), confirmando que el solvente no presenta actividad antibacteriana y sugiriendo que el monoterpeno posee difusión limitada en el agar Mueller-Hinton debido a su naturaleza lipofílica (Hulankova, 2024; Ribeiro et al., 2023).

Al evaluar las combinaciones, se observó un efecto sinérgico definido como un incremento  $\geq 2$  mm en el diámetro del halo de inhibición al suplementar los discos de gentamicina y ceftriaxona (Y. Wang et al., 2020b). De la misma forma, el halo de inhibición de la gentamicina aumentó de 13 mm a 16 mm (Sreepian et al., 2022b), mientras que el de ceftriaxona se incrementó de 15 mm a 17 mm.

La combinación con ciprofloxacino mostró un efecto marginalmente aditivo (+1 mm; de 32 a 33 mm), mientras que la actividad de cefuroxima permaneció sin cambios (25 mm).

Por el contrario, la adición de D-limoneno a los discos de penicilina y cefepime produjo una ligera reducción en el halo de inhibición (-2 mm y -1 mm, respectivamente), lo que indica ausencia de sinergia y sugiere una posible interferencia fisicoquímica en la difusión de estos antibióticos (Bibi et al., 2023b; Gupta et al., 2021b).

### 3.3 Modelado molecular y acoplamiento (Docking) del D-limoneno con $\beta$ -lactamasa CTMX-M-15

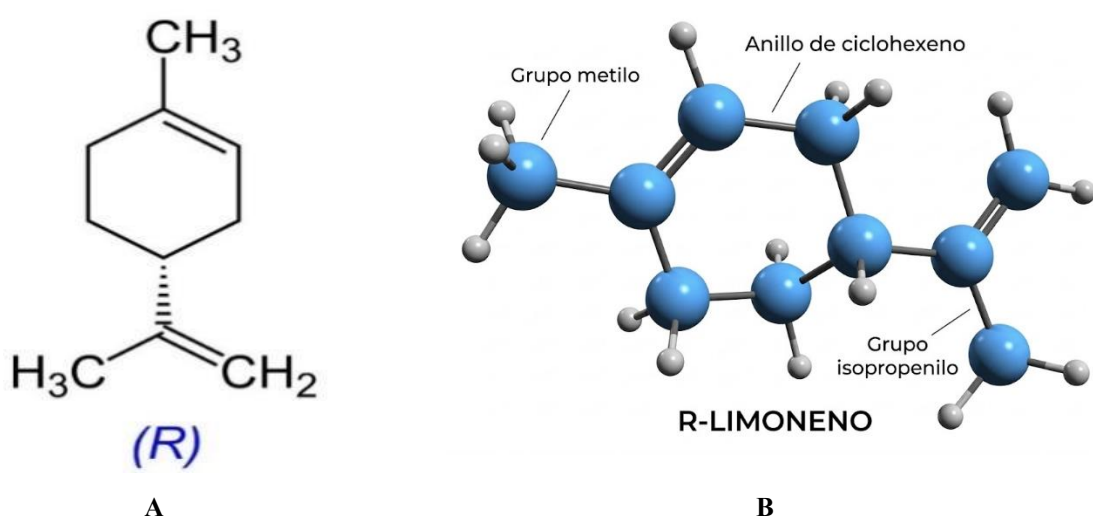
#### Preparación del ligando (d-limoneno)

- **Metabolito natural:** d-limoneno
- **Actividad reportada:** Actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram negativas, efecto sinérgico con antibióticos  $\beta$ -lactámicos; alteración de membranas celulares bacterianas; posible inhibición de enzimas asociadas a resistencia.
- **Proteína blanco sugerida:**  $\beta$ -lactamasa tipo CTX-M-15.
- **Función:** Enzima bacteriana responsable de la resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos.
- **PDB ID:** 1ZG4.

El d-limoneno (isómero R) fue seleccionado como ligando debido a su naturaleza de monoterpene cíclico y su reportada actividad como agente disruptor de membranas y potencial inhibidor enzimático. La estructura tridimensional se obtuvo de la base de datos PubChem (CID: 440917) en formato .pdb.

Se realizó una optimización geométrica exhaustiva mediante el software Avogadro v1.2.03333, y de esta manera garantizar la fiabilidad del acoplamiento; llevando a cabo un análisis comparativo utilizando diversos campos de fuerza, determinando que el MMFF94 proporcionó la conformación de mayor estabilidad termodinámica con una energía potencial de -30,76 kJ/mol. Este procedimiento es fundamental para que la simulación de docking parta de un estado de mínima energía, emulando condiciones fisicoquímicas reales. Tras la optimización, se asignaron hidrógenos polares y cargas de Gasteiger, identificando un único enlace rotatable (C4-C7), lo que sugiere una flexibilidad conformacional limitada que favorece una interacción más específica en el sitio activo. Las propiedades moleculares evaluadas (Masa: 136,24 g/mol; LogP: 4,58) confirman que el compuesto cumple con las reglas de Lipinski y Veber, validando su viabilidad como candidato bioactivo.

La (figura 5B) representa una visualización tridimensional del modelo optimizado del isómero R del D-limoneno, con los grupos funcionales estructurales: un anillo de ciclohexeno, un grupo metilo, un doble enlace y un grupo isopropenilo, distribuidos de forma tal que favorecen la interacción hidrofóbica en entornos enzimáticos como los de las  $\beta$ -lactamasas.



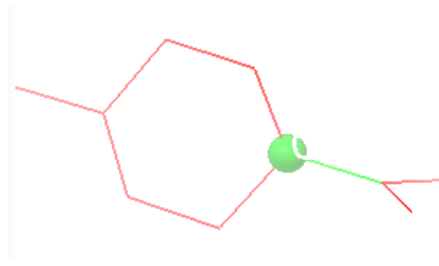
**Fig 5. Optimización del isómero del R del d-limoneno.** A) Estructura química 2D con configuración estereoquímica absoluta. B) Representación 3D optimizada mediante el campo de fuerza MMFF94, resaltando los grupos funcionales y la conformación de mínima energía basal necesaria para la reproducibilidad del experimento.

### Propiedades moleculares del ligando.

**Tabla 2.**

*Propiedades moleculares.*

Propiedades del ligando	Valores
Nombre	d-limoneno
Formula química	$C_{10}H_{16}$
Masa molecular	136.24 g/mol
Enlaces rotables	1
LogP	4.58
Número de átomos	26
Energía	-30,76 Kj/mol



**Fig 6. Representación tridimensional del ligando d-limoneno.** Optimización geométrica del d-limoneno realizada en Avogadro mediante el campo de fuerza MMFF94. La estructura optimizada evidencia la conformación más estable de la molécula y su carácter cíclico correspondiente al esqueleto p-mentano. Se observa la presencia de un único enlace rotable libre ( $C_4-C_7$ ), señalado con una esfera verde, lo que confiere una rigidez estructural elevada y limita la flexibilidad conformacional del ligando, favoreciendo un acoplamiento molecular más definido en el sitio activo de la  $\beta$ -lactamasa.

**Tabla 3.**  
Valores de energía potencial asociados a cada modelo

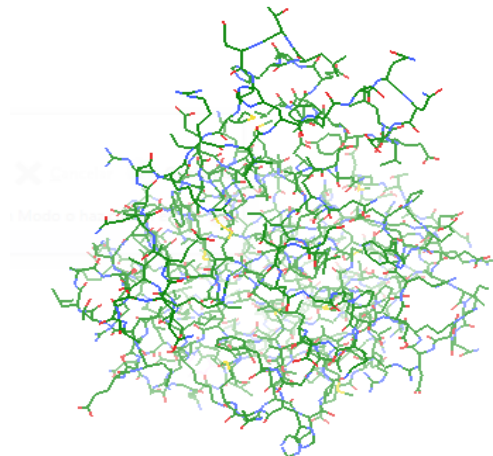
CAMPO DE FUERZA	VALOR
GAFF	29,214 kJ/mol
GHEMICAL	4,25292 kJ/mol
MMFF94	-30,7612 kJ/mol
MMFF94s	103,399 kJ/mol

Los valores de energía potencial obtenidos mediante distintos campos de fuerza indican que MMFF94 presentó la energía más baja (-30,76 kJ/mol), correspondiente a la conformación más estable del d-limoneno. En comparación, GAFF, GHEMICAL y MMFF94s mostraron valores energéticos superiores, por lo que MMFF94 fue seleccionado para la optimización geométrica y los estudios posteriores de acoplamiento molecular. Esto permitió simular interacciones más realistas con la  $\beta$ -lactamasa de *E. coli* y obtener resultados energéticos confiables.

### Preparación del receptor $\beta$ -lactamasa CTX-M-15

Como blanco molecular se utilizó la estructura cristalográfica de la  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE) CTX-M-15, recuperada del Protein Data Bank (PDB ID: 1ZG4). Esta enzima es un blanco de alta relevancia clínica debido a su prevalencia en cepas de *Escherichia coli* multirresistentes.

La preparación del receptor fue rigurosa: se eliminaron moléculas de agua de cristalización y co-factores no biológicos mediante AutoDock Tools v1.5.7 para evitar sesgos en el cálculo de la energía libre de unión. Se añadieron hidrógenos polares para satisfacer las valencias de los aminoácidos y se estandarizaron las cargas para reflejar el estado de protonación a pH fisiológico.



**Fig 6. Estructura tridimensional de la  $\beta$ -lactamasa CTX-M-15 de *Escherichia coli*.** La estructura proteica fue preparada utilizando AutoDock Tools v1.5.7, mediante la eliminación de las moléculas de agua cristalográficas y de los componentes no proteicos. Posteriormente, se añadieron hidrógenos polares y se asignaron cargas parciales de Kollman, obteniéndose un receptor correctamente parametrizado para los ensayos de acoplamiento molecular con el ligando d-limoneno.

La gráfica representa un paso fundamental en la preparación del receptor para el docking molecular, ya que garantiza que la proteína se encuentre en un estado adecuado para la simulación. La eliminación de moléculas de agua evita interferencias en la predicción de interacciones, mientras que la incorporación de hidrógenos polares y la asignación de cargas aseguran una configuración electrostática más realista, favoreciendo la precisión en la predicción del modo de unión del ligando (Hahn et al., 2024).

**Tabla 4.**

*Propiedades estructurales del receptor  $\beta$ -lactamasa CTX-M-15 de Escherichia coli.*

Propiedad del receptor	Valor
Nombre	$\beta$ -lactamasa CTX-M-15
Organismo	<i>Escherichia coli</i>
PDB ID	1ZG4
Tamaño de proteína	291 residuos
Número de átomos	2356
Fuente	Protein Data Bank

**Nota:** La proteína presenta un tamaño de 291 residuos y un total de 2356 átomos, información esencial para su preparación y análisis en los ensayos de acoplamiento molecular.

#### Configuración del espacio de búsqueda (*Grid Box*).

Para garantizar una exploración exhaustiva y sin sesgos del ligando sobre la superficie de la  $\beta$ -lactamasa CTX-M-15, el acoplamiento molecular se realizó mediante un enfoque de docking ciego (blind docking) y se estableció una caja de búsqueda (grid box) con dimensiones extendidas de  $40 \times 40 \times 40$  Å, centrada en las coordenadas de la región catalítica asociada al residuo conservado Ser70 (Tabla 5).

**Tabla 5.**

*Parámetros del grid box definidos para el ensayo de acoplamiento molecular*

Parámetro	Valor
Center_x	5,095
Center_y	2,5.0
Center_z	32,185
espacio	0.375 Å

**Nota:** El centro de la caja se ubicó en las coordenadas (5,095; 2,5; 32,185), con un tamaño de  $40 \times 40 \times 40$  Å y un espaciamiento de 0.375 Å, abarcando la región catalítica de la proteína para asegurar la exploración adecuada del sitio activo.

Para el proceso de acoplamiento molecular estos parámetros permitieron delimitar de manera precisa el sitio catalítico de la  $\beta$ -lactamasa CTX-M-15, garantizando que el espacio de búsqueda incluyera las regiones críticas de interacción y favoreciendo así la predicción confiable del modo de unión del d-limoneno (Medeleanu et al., 2025).

#### Simulación de acoplamiento molecular con Autodock Vina.

El acoplamiento molecular se llevó a cabo utilizando AutoDock Vina v1.2.7, empleando un valor de exhaustividad de 8 y generando un total de nueve modos de unión. La evaluación de los resultados se basó en la energía libre de unión ( $\Delta G$ , kcal/mol) y en los valores de desviación cuadrática media (RMSD).

El acoplamiento arrojó una energía de afinidad de -4,96 kcal/mol en su pose de mayor estabilidad. El análisis termodinámico revela que el d-limoneno se aloja en el bolsillo hidrofóbico de la CTX-M-15, estableciendo interacciones de Van der Waals y contactos hidrofóbicos con residuos clave: Val216, Leu220, Ala237, Phe72 e Ile173. A diferencia de los antibióticos convencionales, el d-limoneno no presenta puentes de hidrógeno, lo que indica que su estabilidad en el sitio activo depende exclusivamente de fuerzas de dispersión de London y el efecto hidrofóbico. Esto sugiere un mecanismo de inhibición competitiva por oclusión, donde el volumen del ligando impide físicamente el ingreso del anillo  $\beta$ -lactámico al sitio de hidrólisis. (Bibi et al., 2023a; Gupta et al., 2021c; Sreenithya et al., 2025a).

**Tabla 6.**

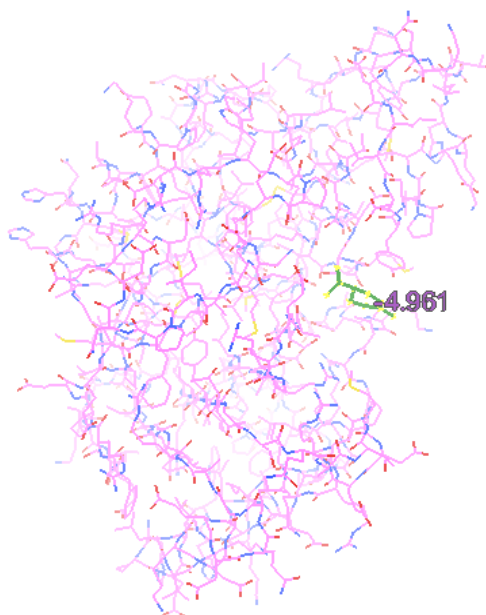
*Resultados del acoplamiento molecular.*

Modo	Afinidad (kcal/mol)	RMSD l.b	RMSD u.b
1	-4.961	0	0
2	-4.907	1.443	3.988
3	-4.879	17.05	18.81
4	-4.786	24.16	26.42
5	-4.751	16.95	19
6	-4.74	1.849	2.641
7	-4.668	23.94	26.32
8	-4.655	1.495	4.348
9	-4.585	1.201	4.188

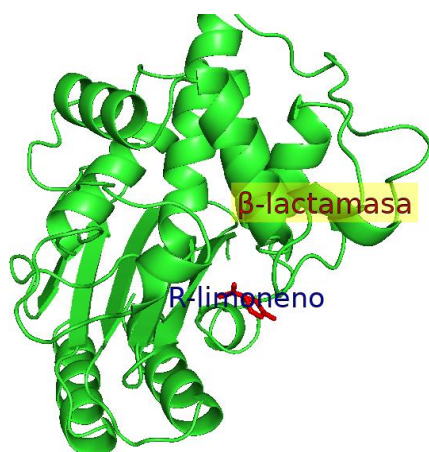
**Nota:** Se presentan las afinidades de unión (kcal/mol) junto con los valores de RMSD inferior (l.b) y superior (u.b) para las nueve conformaciones generadas por AutoDock Vina. La mejor pose correspondió al modo 1, con una energía de -4,961 kcal/mol y valores de RMSD de 0, lo que indica que representa la conformación de referencia más estable dentro del conjunto de resultados.

### Visualización de los complejos

La visualización del complejo proteína–ligando se realizó en PyMOL v2.5.5. La proteína se representó en estilo cartoon y el ligando en esferas, resaltando su ubicación dentro del sitio activo. Se añadieron etiquetas con los nombres “ $\beta$ -lactamasa CTX-M-15” y “R-limoneno”, así como la energía de afinidad obtenida por docking.



**Fig 7. Complejo formado entre el d-limoneno y la  $\beta$ -lactamasa CTX-M-15 de *Escherichia coli* tras el acoplamiento molecular.** Se observa el ligando ubicado en el sitio catalítico de la proteína, con una afinidad de unión de -4,961 kcal/mol correspondiente al modo de mayor estabilidad, la representación tridimensional evidencia las interacciones hidrofóbicas predominantes del ligando con residuos cercano y coherentes con su naturaleza apolar.



**Figura 8. Representación esquemática del acoplamiento molecular entre el monoterpeno d-limoneno (rojo) y la enzima  $\beta$ -lactamasa de *Escherichia coli* (verde).** El ligando se ubica dentro del sitio catalítico, como se confirmó mediante análisis computacional de docking con AutoDock Vina.

Los resultados del docking respaldan la hipótesis de que el d-limoneno puede interactuar favorablemente con la  $\beta$ -lactamasa CTX-M-15 mediante interacciones hidrofóbicas, contribuyendo potencialmente a la inhibición de la actividad enzimática y explicando, a nivel molecular, los efectos antimicrobianos observados in vitro.

#### 4. Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio confirman que el d-limoneno presenta un efecto antimicrobiano dependiente de la concentración frente a *Escherichia coli* ATCC 25922. A diferencia de estudios previos realizados por (Gallegos et al., 2019; Gupta et al., 2021b; Melkina et al., 2021) que reportan valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) basados únicamente en evaluaciones visuales, el presente trabajo empleó un análisis cuantitativo mediante medición de densidad óptica y modelado de regresión no lineal, lo que permitió estimar con mayor precisión una  $IC_{50}$  de 14.95 mg/mL. Estos hallazgos son consistentes con estudios que describen la actividad antimicrobiana de monoterpenos frente a bacterias Gram negativas, atribuida principalmente a su capacidad para alterar la integridad y estabilidad de la membrana celular bacteriana.

El análisis de la distribución de las réplicas biológicas representado en los diagramas de caja (Figura 1) contribuye información relevante sobre la dinámica poblacional de *E. coli* frente al estrés químico inducido por el d-limoneno. En las concentraciones subinhibitorias (1–8 mg/mL; grupo de significancia “a”), la dispersión moderada del rango intercuartílico refleja la variabilidad fenotípica propia de la respuesta adaptativa temprana de la bacteria (Ackermann, 2015). Es de mucho interés el comportamiento observado a 16 mg/mL (grupo “b”), donde se registra la mayor amplitud en la dispersión de los datos, dado que esta elevada variabilidad sugiere que dicha concentración podría representar un punto de transición fisiológico, en el cual la población bacteriana presenta respuestas heterogéneas mientras los mecanismos de adaptación comienzan a verse superados por la acción tóxica del compuesto (El-Halfawy & Valvano, 2015).

En contraste, la concentración máxima evaluada (32 mg/mL) muestra una distribución mucho más compacta de las réplicas, indicando una respuesta consistente entre los ensayos. Esta homogeneidad sugiere que, al alcanzar este umbral, el d-limoneno ejerce un efecto inhibitorio fuerte y generalizado, reduciendo significativamente la variabilidad en la susceptibilidad de las células bacterianas (Gupta et al., 2021d; Ribeiro et al., 2023).

Desde una perspectiva terapéutica, los resultados del ensayo de sinergia frente a la cepa productora de BLEE (*E. coli* ATCC 35218) resultan particularmente relevantes. La reversión parcial de la resistencia y el efecto sinérgico observado con ceftriaxona (+2 mm) y gentamicina (+3 mm) evidencian el potencial del d-limoneno como agente coadyuvante en terapias antimicrobianas (Sreepian et al., 2022b; Y. Wang et al., 2020b). Estudios previos realizados por Derakhshan et al., (2022); Nguyen et al., (2022) han documentado efectos complementarios de este monoterpeno frente a bacilos Gram negativos, con respaldo fuertemente en terapias combinadas.

No obstante, la ausencia de halo de inhibición del d-limoneno en forma aislada (0 mm) sugiere que su alta lipofiliidad y baja solubilidad en medios acuosos limitan su difusión en el agar, lo que constituye una limitación técnica relevante para su evaluación in vitro y un desafío para su desarrollo en formulaciones terapéuticas adecuadas (Hulankova, 2024).

Para comprender el mecanismo subyacente a la sinergia observada, se empleó un enfoque computacional basado en modelado molecular. La optimización conformacional del isómero R del d-limoneno evidenció una alta estabilidad estructural, con una energía mínima de  $-30.76$  kJ/mol. En la simulación, el compuesto mostró una afinidad de unión de  $-4.96$  kcal/mol con la  $\beta$ -

---

lactamasa CTX-M-15, estableciendo interacciones hidrofóbicas con los residuos Val216, Leu220, Ala237, Phe72 e Ile173, localizados en el bolsillo catalítico de la enzima. En este contexto, la ocupación del sitio catalítico por el d-limoneno, mediante el análisis *in silico*, sugiere un posible mecanismo de inhibición competitiva por oclusión estérica, que podría impedir el acceso del anillo  $\beta$ -lactámico al sitio de hidrólisis enzimática (Bibi et al., 2023b; Gupta et al., 2021b).

En conjunto, la integración de datos experimentales y computacionales consolida la hipótesis de un mecanismo de acción dual: por un lado, una actividad antibacteriana intrínseca basada en la disrupción de la membrana celular a concentraciones elevadas; y por otro, una interferencia directa sobre enzimas de resistencia que le permite actuar como un adyuvante para antibióticos convencionales. Esta dualidad mecanicista refuerza el potencial del d-limoneno como una molécula líder en la lucha contra la resistencia antimicrobiana, sentando las bases para futuras optimizaciones galénicas y estudios *in vivo* que validen su eficacia y seguridad en modelos de infección sistémica (Lin et al., 2024).

## 5. Conclusiones.

El d-limoneno demostró una potente actividad antimicrobiana dosis-dependiente frente a *E. coli*, con una Concentración Inhibitoria Media ( $IC_{50}$ ) 14.95 mg/mL y su acción presentó un comportamiento biológico bifásico: un efecto adaptativo (hormético) a dosis subinhibitorias, seguido de una drástica y homogénea inhibición a partir de 16 mg/mL, confirmando su viabilidad como agente antibacteriano.

En la evaluación de terapias combinadas frente a la cepa multirresistente productora de BLEE (*E. coli* ATCC 35218), el d-limoneno demostró actuar como un adyuvante antimicrobiano selectivo y eficaz, por su capacidad para generar un efecto sinérgico al combinarse con ceftriaxona (+2 mm) y gentamicina (+3 mm) evidencia su potencial para revertir parcialmente los fenotipos de resistencia bacteriana y restaurar la eficacia de antibióticos convencionales que han perdido parte de su utilidad clínica.

El modelado molecular explicó esta función adyuvante al predecir que el d-limoneno tiene una fuerte afinidad de unión (-4.96 kcal/mol) con el sitio activo de la enzima  $\beta$ -lactamasa CTX-M-15. Esta interacción sugiere una inhibición competitiva por oclusión, donde el monoterpeno bloquea físicamente el acceso de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos al sitio activo de la enzima, explicando así la sinergia observada *in vitro*.

## 6. Recomendaciones.

Finalmente, este trabajo no solo concluye con el hallazgo de una molécula líder, sino que abre la puerta a la optimización química del d-limoneno.

Se recomienda que futuras investigaciones se centren en mejorar su solubilidad mediante nanotecnología y validar su seguridad en células humanas, consolidando así una estrategia integral contra la multirresistencia.

**Contribución de los Autores:** Conceptualización, GJ, JR; metodología, MB, JR; software, JR, MB; validación, GJ, JR; análisis formal, GJ, MB, JR; investigación (parte experimental), MB; investigación (acoplamiento molecular), JR; recursos, GJ, JR; escritura—preparación del borrador original, GJ; escritura—revisión y edición, JR, MB; visualización final, MB, JR; supervisión, JR, MB; adquisición de fondos, GJ, JR. Todos los autores han leído y están de acuerdo con la versión final del manuscrito.

**Financiamiento:** La presente investigación no recibió ninguna subvención específica de agencias de financiamiento del sector público, comercial o sin fines de lucro. El estudio se realizó con recursos propios de los autores.

**Agradecimientos:** A la Universidad Internacional SEK (UISEK) por la donación de la cepa *E. coli* ATCC 35218. Asimismo, se agradece al Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja (UNL) por la donación de la cepa *E. coli* ATCC 25922 utilizada en los ensayos experimentales y por el apoyo institucional y las facilidades brindadas para el desarrollo de esta investigación.

---

## REFERENCIAS

- Ackermann, M. (2015). A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms. *Nature Reviews Microbiology* 2015 13:8, 13(8), 497–508. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3491>
- Atta, S., Waseem, D., Fatima, H., Naz, I., Rasheed, F., & Kanwal, N. (2023). Antibacterial potential and synergistic interaction between natural polyphenolic extracts and synthetic antibiotic on clinical isolates. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 30(3). <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2023.103576>
- Bibi, Z., Asghar, I., Ashraf, N. M., Zeb, I., Rashid, U., Hamid, A., Ali, M. K., Hatamleh, A. A., Al-Dosary, M. A., Ahmad, R., & Ali, M. (2023a). Prediction of Phytochemicals for Their Potential to Inhibit New Delhi Metallo  $\beta$ -Lactamase (NDM-1). *Pharmaceuticals*, 16(10). <https://doi.org/10.3390/ph16101404>
- Bibi, Z., Asghar, I., Ashraf, N. M., Zeb, I., Rashid, U., Hamid, A., Ali, M. K., Hatamleh, A. A., Al-Dosary, M. A., Ahmad, R., & Ali, M. (2023b). Prediction of Phytochemicals for Their Potential to Inhibit New Delhi Metallo  $\beta$ -Lactamase (NDM-1). *Pharmaceuticals*, 16(10). <https://doi.org/10.3390/ph16101404>
- Budiarto, R., Khalisha, A., Sari, D. N., Ujilestari, T., Wahyono, T., Azmi, A. F. M., Adli, D. N., Lusiana, E. D., Sitaresmi, P. I., & Sholikin, M. M. (2024). Antioxidant properties of lemon essential oils: a meta-analysis of plant parts, extraction methods, dominant compounds, and antioxidant assay categories. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s40538-024-00621-w>
- Caballero Gómez, N., Manetsberger, J., Benomar, N., Castillo Gutiérrez, S., & Abriouel, H. (2022). Antibacterial and antibiofilm effects of essential oil components, EDTA and HLE disinfectant solution on *Enterococcus*, *Pseudomonas* and *Staphylococcus* sp. multiresistant strains isolated along the meat production chain. *Frontiers in Microbiology*, 13(October), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1014169>
- Chattopadhyay, R. R., Bhattacharyya, S. K., Medda, C., Chanda, S., & Bag, A. (2009). A comparative evaluation of antibacterial potential of some plants used in Indian traditional medicine for the treatment of microbial infections. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(5), 1123–1128. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132009000500009>
- Cordeiro Mariana, Vieira de Oliveira Marcos Paulo, da Silva Tibolla Tiago, Gonçalves Sunti Poliana Fernanda, & Farias Millezi Alessandra. (2021). MICRO SOLUÇÕES DE MONOTERPENOS BIOATIVOS PARA CONTROLE DE *Escherichia coli*. *Anais Da Mostra Nacional de Iniciação Científica e Tecnológica Interdisciplinar (MICTI) - e-ISSN 2316-7165*, 1(12). <https://doi.org/10.21166/micti.v1i1.1864>
- Derakhshan, S., Ahmadi, S., Ahmadi, E., Nasseri, S., & Aghaei, A. (2022). Characterization of *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection and association between virulence expression and antimicrobial susceptibility. *BMC Microbiology*, 22(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02506-0>
- Dionisio, K. L., Phillips, K., Price, P. S., Grulke, C. M., Williams, A., Biryol, D., Hong, T., & Isaacs, K. K. (2018). Data Descriptor: The Chemical and Products Database, a resource for exposure-relevant data on chemicals in consumer products. *Scientific Data*, 5. <https://doi.org/10.1038/sdata.2018.125>
- Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tillack, A. F., & Forli, S. (2021). AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 61(8), 3891–3898. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203>
- El-Halfawy, O. M., & Valvano, M. A. (2015). Antimicrobial heteroresistance: An emerging field in need of clarity. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(1), 191–207. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-14>
- Evangelista-Martínez, Z., Reyes-Vázquez, N., & Rodríguez-Buenfil, I. (2018). Antimicrobial evaluation of plant essential oils against pathogenic microorganisms: In vitro study of oregano oil combined with conventional food preservatives. *Acta Universitaria*, 28(4), 10–18. <https://doi.org/10.15174/au.2018.1817>
- Fox, J. (2023, March 19). *R Companion 3E*. <https://www.john-fox.ca/Companion/>
- Gallegos, Bañuelos, Delgadillo, Meza, & Echavarría. (2019). Actividad Antibacteriana De Cinco Compuestos Terpenoides: Carvacrol, Limoneno, Linalool, A-Terpineno Y Timol † [Antibacterial Activity of Five Terpenoid Compounds: Carvacrol, Limonene, Linalool, A-Terpinene and Thymol]. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 22, 241–248.
- Gupta, A., Jeyakumar, E., & Lawrence, R. (2021a). Journey of limonene as an antimicrobial agent. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 15(3), 1094–1110. <https://doi.org/10.22207/JPAM.15.3.01>
- Gupta, A., Jeyakumar, E., & Lawrence, R. (2021b). Journey of limonene as an antimicrobial agent. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 15(3), 1094–1110. <https://doi.org/10.22207/JPAM.15.3.01>
- Gupta, A., Jeyakumar, E., & Lawrence, R. (2021c). Strategic approach of multifaceted antibacterial mechanism of limonene traced in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92843-3>
- Gupta, A., Jeyakumar, E., & Lawrence, R. (2021d). Strategic approach of multifaceted antibacterial mechanism of limonene traced in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92843-3>
- Hahn, D. F., Gapsys, V., de Groot, B. L., Mobley, D. L., & Tresadern, G. (2024). Current State of Open Source Force Fields in Protein-Ligand Binding Affinity Predictions. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 64(13), 5063–5076. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.4c00417>
- Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. R. (2012a). Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*, 4(8), 1–17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17/FIGURES/14>

- Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. R. (2012b). Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*, 4(8), 1–17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17/FIGURES/14>
- Hulankova, R. (2024). Methods for Determination of Antimicrobial Activity of Essential Oils In Vitro—A Review. In *Plants* (Vol. 13, Number 19). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/plants13192784>
- Ilieva, Y., Dimitrova, L., Zaharieva, M. M., Kaleva, M., Alov, P., Tsakovska, I., Pencheva, T., Tibi, I. P. El, Najdenski, H., & Pajeva, I. (2021). Cytotoxicity and microbicidal activity of commonly used organic solvents: A comparative study and application to a standardized extract from vaccinium macrocarpon. *Toxics*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/toxics9050092>
- Leelananda, S. P., & Lindert, S. (2016). Computational methods in drug discovery. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 12(September), 2694–2718. <https://doi.org/10.3762/bjoc.12.267>
- Li, Y., Liu, S., Zhao, C., Zhang, Z., Nie, D., Tang, W., & Li, Y. (2022). The Chemical Composition and Antibacterial and Antioxidant Activities of Five Citrus Essential Oils. *Molecules*, 27(20). <https://doi.org/10.3390/molecules27207044>
- Lin, H., Li, Z., Sun, Y., Zhang, Y., Wang, S., Zhang, Q., Cai, T., Xiang, W., Zeng, C., & Tang, J. (2024). D-Limonene: Promising and Sustainable Natural Bioactive Compound. *Applied Sciences (Switzerland)*, 14(11). <https://doi.org/10.3390/app14114605>
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1–3), 3–26. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0)
- Medeleanu, M. L., Fucile, M., Fărcaș, A. C., Statti, G., Vodnar, D. C., Ancuța Socaci, S., & Conforti, F. (2025). Citrus essential oils nano-emulsions: Antimicrobial and anti-inflammatory dual strategy against foodborne pathogens. *Food Bioscience*, 71, 107181. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2025.107181>
- Melkina, O. E., Plyuta, V. A., Khmel, I. A., & Zavilgelsky, G. B. (2021). The mode of action of cyclic monoterpenes (–)-limonene and (+)- $\alpha$ -pinene on bacterial cells. *Biomolecules*, 11(6), 1–20. <https://doi.org/10.3390/biom11060806>
- Miranda-romero, L. A., Huerta-bravo, M., & Castillo-lopez, E. (n.d.). *preservado analizado a través de cinética de fermentación y digestibilidad de forrajes in vitro Introducción*. 315–334.
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Nguyen, S. N., Thi Le, H. T., Tran, T. D., Vu, L. T., & Ho, T. H. (2022). Clinical Epidemiology Characteristics and Antibiotic Resistance Associated with Urinary Tract Infections Caused by E. coli. *International Journal of Nephrology*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/2552990>
- O'NEILL, J. (2016). TACKLING DRUG-RESISTANT INFECTIONS GLOBALLY: FINAL REPORT AND RECOMMENDATIONS THE REVIEW ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE CHAIRED BY JIM O'NEILL.
- Pakbin, B., M Brück, W., & WA Rossen, J. (2021). Factores de virulencia de Escherichia coli patógena entérica . *International Journal of Molecular Sciences*, 1–18.
- Puvača, N., Milenković, J., Galonja Coghil, T., Bursić, V., Vojislava, Tanasković, S., Pelić, M., Ljubojević Pelić, D., & Miljković, T. (2021). Antimicrobial activity of selected essential oils against selected pathogenic bacteria: In vitro study. *Antibiotics*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050546>
- R Core Team. (2026, March 12). R: El proyecto R para computación estadística. <https://www.r-project.org/>
- Ribeiro, A. D., Cardoso, M. N. A., Freire, J. C. P., Júnior, E. C. F., Costa, M. M. A., Silva, P. G., Gomes, D. Q. de C., de Brito, E. M. M., & Pereira, J. V. (2023). Antimicrobial activity of limonene: Integrative review. In *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* (Vol. 22, Number 5, pp. 581–593). MS-Ediciones. <https://doi.org/10.37360/blacpma.23.22.5.42>
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., & Gerhard, D. (2015). Dose-Response Analysis Using R. *PLOS ONE*, 10(12), e0146021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>
- Schrödinger, L. (2018). The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.1.0.
- Sharma, A. D., & Kaur, I. (2023). Chemical Profile and in-silico Docking Studies on Bioactives from Essential Oil of *Cymbopogon pendulus* Targeting Penicillin Binding Proteins (PBPs) in Bacteria. *Biology, Medicine, & Natural Product Chemistry*, 12(1), 225–232. <https://doi.org/10.14421/biomedich.2023.121.225-232>
- Solis, M. B., Romo, S., Granja, M., Sarasti, J. J., Paz y Miño, A., & Zurita, J. (2022). Infección comunitaria del tracto urinario por *Escherichia coli* en la era de resistencia antibiótica en Ecuador. *Metro Ciencia*, 30(1), 37–48. <https://doi.org/10.47464/metrociencia/vol30/1/2022/37-48>
- Sreenithya, K. H., Manoharadas, S., & Sugumar, S. (2025a). Comprehensive screening of potential inhibitors from ZINC15 database for Metallo-L1 B -Lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia* via in Silico and in vitro approaches. *BMC Microbiology*, 25(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-025-03994-6>
- Sreenithya, K. H., Manoharadas, S., & Sugumar, S. (2025b). Comprehensive screening of potential inhibitors from ZINC15 database for Metallo-L1 B -Lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia* via in Silico and in vitro approaches. *BMC Microbiology*, 25(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-025-03994-6>
- Sreepian, A., Popruk, S., Nutralai, D., Phutthanu, C., & Sreepian, P. M. (2022a). Antibacterial Activities and Synergistic Interaction of Citrus Essential Oils and Limonene with Gentamicin against Clinically Isolated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Scientific World Journal*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/8418287>

- 
- Sreepian, A., Popruk, S., Nutalai, D., Phutthanu, C., & Sreepian, P. M. (2022b). Antibacterial Activities and Synergistic Interaction of Citrus Essential Oils and Limonene with Gentamicin against Clinically Isolated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Scientific World Journal*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/8418287>
- Stec, B., Holtz, K. M., Wojciechowski, C. L., & Kantrowitz, E. R. (2005). TEM1 beta lactamase. *Worldwide Protein Data Bank*. <https://doi.org/10.2210/pdb1zg4/pdb>
- Subramenium, G. A., Vijayakumar, K., & Pandian, S. K. (2015). Limonene inhibits streptococcal biofilm formation by targeting surface-associated virulence factors. *Journal of Medical Microbiology*, 64(8), 879–890. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000105>
- Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H. Y., Smith, B. R., Ward, K. W., & Kopple, K. D. (2002). Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(12), 2615–2623. [https://doi.org/10.1021/JM020017N/SUPPL\\_FILE/JM020017N\\_S.PDF](https://doi.org/10.1021/JM020017N/SUPPL_FILE/JM020017N_S.PDF)
- Wang, M., Liu, Z., Liu, C., He, W., Qin, D., & You, M. (2024). DN<sub>A</sub>zyme-based ultrasensitive immunoassay: Recent advances and emerging trends. *Biosensors and Bioelectronics*, 251, 116122. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2024.116122>
- Wang, Y., Li, H., Xie, X., Wu, X. H., Li, X., Zhao, Z., Luo, S., Wan, Z., Liu, J., Fu, L., & Li, X. (2020a). In vitro and in vivo assessment of the antibacterial activity of colistin alone and in combination with other antibiotics against *Acinetobacter baumannii* and *Escherichia coli*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 20, 351–359. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.09.013>
- Wang, Y., Li, H., Xie, X., Wu, X. H., Li, X., Zhao, Z., Luo, S., Wan, Z., Liu, J., Fu, L., & Li, X. (2020b). In vitro and in vivo assessment of the antibacterial activity of colistin alone and in combination with other antibiotics against *Acinetobacter baumannii* and *Escherichia coli*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 20, 351–359. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.09.013>
- Wickham, H., Chang, W., Henry, L., Pedersen, T. L., Takahashi, K., & Wilke, C. (2016). *The Grammar of Graphics*. *The Grammar of Graphics*. <https://doi.org/10.1007/0-387-28695-0>
- Wickham, H., François, R., Henry, L., Müller, K., & Vaughan, D. (2026). *dplyr: A Grammar of Data Manipulation*. CRAN: Contributed Packages. <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.dplyr>
- Wickham, H., François, R., Henry, L., Müller Kirill, & Vaughan, D. (2023). CRAN: Package dplyr. <https://cran.r-project.org/web/packages/dplyr/index.html>
- Yuan, C., & Hao, X. (2023). Antibacterial mechanism of action and in silico molecular docking studies of *Cupressus funebris* essential oil against drug resistant bacterial strains. *Heliyon*, 9(8), e18742. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18742>
- Zambrano Espinosa, A. K. (2022). La ética en la investigación médica. 21(19784), 102.